

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Rafał Różalski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- I. 29 czerwca 2000 roku - tytuł magistra analityki medycznej, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, kierunek analityka medyczna.
- II. 7 września 2005 roku - stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Lekarski; tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza zawartości produktów reperacji oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych w płynach biologicznych człowieka”; promotor: prof. dr hab. Ryszard Oliński, recenzenci: prof. dr hab. Jarosław Kuśmierk, prof. dr hab. Roman Kaliszan.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- I. sierpień 1999 - wrzesień 2001: Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej - technik,
- II. od 1 października 2005: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej - adiunkt.

4. Wskazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy:

4.A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Ocena stresu oksydacyjnego na podstawie analizy produktów naprawy uszkodzeń DNA wydalanych z moczem.”

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem sześciu przedstawionych poniżej publikacji w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) cytowanych łącznie 81 razy, o sumarycznym współczynniku IF równym 15,591.

	IF	Cyt.
1. Cooke MS, Rozalski R , Dove R, Gackowski D, Siomek A, Evans MD, Olinski R. Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. Biol Chem. 2006 Apr;387(4):393-400.	2.752	15
2. Cooke MS, Barregard L, Mistry V, Potdar N, Rozalski R , Gackowski D, Siomek A, Foksinski M, Svoboda P, Kasai H, Konje JC, Sallsten G, Evans MD, Olinski R. Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. Biomarkers. 2009 Mar;14(2):103-10.	1.608	21
3. Danielsen PH, Bräuner EV, Barregard L, Sällsten G, Wallin M, Olinski R, Rozalski R , Møller P, Loft S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. Mutat Res. 2008 Jul 3;642(1-2):37-42.	3.198	34
4. Rozalski R , Migdalski A, Gackowski D, Guz J, Siomek A, Foksinski M, Szpila A, Zarakowska E, Majer M, Jawien A, Olinski R. Does morphology of carotid plaque depend on patient's oxidative stress? Clin Biochem. 2013 Aug;46(12):1030-5.	2.229	1
5. Jaruga P, Rozalski R , Jawien A, Migdalski A, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA damage products (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. Biochemistry. 2012 Mar 6;51(9):1822-4.	3.377	10
6. Rafal Rozalski , Daniel Gackowski, Agnieszka Siomek-Gorecka, Marta Starczak, Martyna Modrzejewska, Zbigniew Banaszekiewicz and Ryszard Olinski. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. Biomarkers 2015, DOI: 10.3109/1354750X.2015.1068860 (praca w druku).	2.427	-
Razem:	15.591	81

Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim w załączniku nr 3.

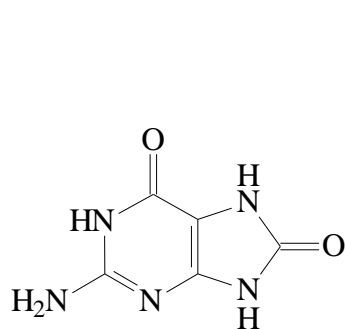
Wykaz prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu autorskiego w załączniku nr 4.

4.B. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

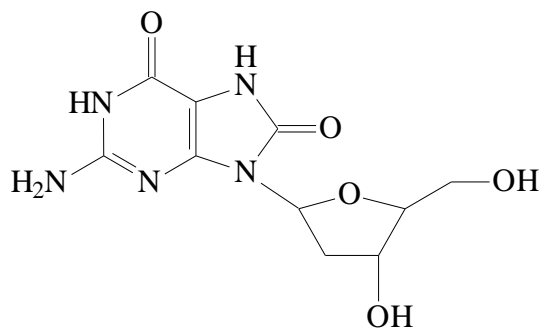
W wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy powstawaniem reaktywnych form tlenu, a mechanizmami chroniącymi przed skutkami ich działania dochodzi do uszkodzenia elementów strukturalnych komórki. Stan taki definiowany jako stres oksydacyjny może być spowodowany zarówno obniżoną aktywnością systemów antyoksydacyjnych, jak i nadmiernym tworzeniem się wolnych rodników tlenowych. W ostatnim okresie bardzo wiele

stanów patologicznych, takich jak nowotwory, przewlekłe stany zapalne czy choroby sercowo-naczyniowe było wiązanych ze stresem oksydacyjnym, jednakże w większości przypadków nie rozstrzygnięto czy jest on skutkiem choroby czy też jej przyczyną. Oksydacyjne uszkodzenia DNA mają szczególne znaczenie, ponieważ w odróżnieniu od białek czy lipidów nowa cząsteczka nie może zostać zsyntetyzowana i w całości zastąpić uszkodzonej. Systemy naprawy DNA funkcjonujące w komórkach chronią przed utrwaleniem się takiego uszkodzenia i są niezwykle ważne dla zachowania stabilności genomu. Usunięte modyfikacje pochodzące z naprawy trafiają ostatecznie do moczu.

Jednym z najwcześniej wykrytych i najczęściej badanych oksydacyjnym uszkodzeniem tego typu jest 8-oksyo-7,8-dihydroguanina (8-oksyoGua). Zmodyfikowana w pozycji C-8 guanina została zidentyfikowana w moczu zarówno w postaci zasady, jak i nukleozydu - 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny (8-oksyoGuo). Ponieważ wcześniejsze badania sugerowały, że dieta i/lub śmierć komórek może wpływać na poziom tych pochodnych w moczu przeprowadziliśmy kilka eksperymentów wykorzystując metodę chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii masowej. Badania na modelu zwierzęcym i ludzkim wykazały, iż dieta jak i zasady/nukleozydy pochodzące z DNA obumarłych komórek prawdopodobnie nie mają wpływu na poziom 8-oksyoGua i 8-oksyoGuo w moczu (prace 23, 25 i 34, załącznik nr 4, pkt IIA).



8-oksyo-7'8-dihydroguanina



8-oksyo-7'8-dihydro -2'-deoksyguanozyna

Dlatego też, wydaje się, że głównym źródłem 8-oksyoGua i 8-oksyoGuo w moczu jest naprawa DNA. Za usunięcie 8-oksyo-7,8-dihydroguaniny z DNA w postaci zasady odpowiada system naprawy BER (base excision repair), a enzymem usuwającym to uszkodzenie jest glikozylaza 8-oksyo-7,8-dihydroguaniny (OGG1 -8-Oxoguanine DNA glycosylase 1). Źródło 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny w moczu nie jest do końca jasne ponieważ nie opisano enzymu, który usuwałby to uszkodzenie z DNA w postaci 2'-deoksynukleozydu. Najlepiej scharakteryzowanym enzymem, który może

odpowiadać za pojawienie się tego uszkodzenia w moczu jest 8-oksydGTP pirofosforylaza (NUDT1; nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 1). Enzym ten chroni pulę wolnych nukleotydów przed wbudowaniem 8-oksydGTP do DNA degradując zmodyfikowany nukleotyd do 8-oksydGMP. Dalsza hydroliza przy udziale 3'(5')-nukleotyduazy prowadzi do powstania 8-oksydGuo, który w tej postaci trafia do moczu. Sugeruje się również udział naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER - nucleotide excision repair) oraz endonukleaz w usuwaniu 8-oksyguaniny w postaci nukleozydu.

1. Cooke MS, **Rozalski R**, Dove R, Gackowski D, Siomek A, Evans MD, Olinski R. Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. Biol Chem. 2006 Apr;387(4):393-400.

W pracy podjęliśmy kolejną próbę wyjaśnienia kwestii związanych z pochodzeniem uszkodzeń DNA w moczu. Metody chromatograficzne oraz immunoenzymatyczna zostały wykorzystane do oznaczeń oksydacyjnych uszkodzeń w DNA oraz w moczu w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów chorych na nowotwory płuc i jelita grubego. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, zaobserwowaliśmy istotnie podwyższony poziom 8-oksydGuo w DNA pacjentów w porównaniu do kontroli, co może wskazywać na większy stres oksydacyjny lub/i upośledzoną naprawę. Natomiast poziom uszkodzeń w moczu nie różnił się w badanych grupach dla 8-oksGua i 5-hydroksyuracylu (5hmUra) lub też był istotnie wyższy w grupie kontrolnej dla 8-oksydGuo.

Żaden z oznaczanych w pracy biomarkerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA (bez względu na zastosowaną metodę analizy) nie korelował z poziomem kwasu moczowego, który jest uważany za biochemiczny marker obrotu komórkowego w organizmie. Wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że śmierć komórkowa nie wpływa w znaczącym stopniu na poziom uszkodzeń DNA w moczu. Korelacja pomiędzy 8-oksGua i 8-oksydGuo może wspierać hipotezy, że zmodyfikowany oksydacyjnie nukleozyd jest produktem naprawy, jednakże nie wskazano jednoznacznie, który z systemów naprawy jest odpowiedzialny za usuwanie tego uszkodzenia.

Średnie stężenia 8-oksydGuo w moczu oznaczane immunoenzymatycznie były około trzy razy wyższe w porównaniu do metody chromatograficznej. Dodatkowo wykazano umiarkowaną, ale istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem 8-oksGua, a poziomem nukleozydu oznaczanego metodą ELISA. **Może to wskazywać na reakcję krzyżową używanego przeciwciała w stosunku do 8-oksGua. Jest również możliwe, że za opisywane różnice odpowiada reakcja przeciwciała z 8-oksydGuo w oligonukleotydach pochodzących z naprawy NER, 8-oksydGMP jako produktu**

działania enzymu NUDT1 lub z 8-oksydGDP jako produktu aktywności endonukleazy 8-oksydGuo.

Biorąc pod uwagę niewielki wpływ diety i/lub śmierci komórkowej, głównym źródłem oksydacyjnych uszkodzeń w moczu wydaje się być naprawa DNA. **Ponieważ produkty działania glikozylaz, jakimi są uszkodzone zasady azotowe nie różnią się w obu grupach badanych, upośledzona aktywność naprawcza w grupie pacjentów nowotworowych może dotyczyć mechanizmów odpowiedzialnych za naprawę 8-oksydGuo. Ze względu na to, że aktywność enzymu NUDT1 jest najprawdopodobniej głównym źródłem 8-oksydGuo w moczu, upośledzenie jego aktywności może mieć związek z procesem karcynogenezy.**

2. Cooke MS, Barregard L, Mistry V, Potdar N, **Rozalski R**, Gackowski D, Siomek A, Foksinski M, Svoboda P, Kasai H, Konje JC, Sallsten G, Evans MD, Olinski R. Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers*. 2009 Mar;14(2):103-10.

Metody, które są stosowane do oznaczeń oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych możemy podzielić na chromatograficzne i immunoenzymatyczne. Spośród metod chromatograficznych najczęściej wykorzystywane są: wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną (HPLC-EC) lub tandemową i pojedynczą detekcją spektrometrii mas (HPLC-MS/MS) lub też chromatografia gazowa z detekcją spektrometrii masowej z wstępnym oczyszczaniem próbki przy udziale chromatografii cieczowej (HPLC-GC/MS). Metoda immunoenzymatyczna (ELISA) stosowana do analizy 8-oxodGuo w moczu wykorzystuje opracowane w Japonii przeciwciała N45.1.

W 2008 został powołany Europejski Komitet d/s Standaryzacji Analiz Uszkodzeń DNA w Moczach (European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis - ESCULA), którego głównym celem jest porównanie i walidacja metod oznaczania 8-oksydGuo w moczu. Praca ta była pierwszym krokiem w tym kierunku. Ze względu na doniesienia literaturowe i nasze wcześniejsze obserwacje wskazujące na znacząco wyższe wyniki uzyskane metodą immunoenzymatyczną w porównaniu z oznaczeniami chromatograficznymi, postanowiliśmy porównać trzy powszechnie stosowane metody analizy 8-oksydGuo: HPLC-EC, HPLC-GC/MS i ELISA.

Badania przeprowadzono w moczu pochodzącym od grupy 140 mężczyzn w wieku od 20 do 60 lat. Zakodowane próbki zostały wysłane do laboratoriów w Polsce (HPLC-GC/MS), Japonii (HPLC-EC) i Wielkiej Brytanii (ELISA).

Wyniki uzyskane metodą HPLC-EC były około 10% wyższe w porównaniu do HPLC-GC/MS, natomiast poziom 8-oksydGuo w moczu oznaczony techniką immunoenzymatyczną był około 5 razy wyższy w porównaniu do metod chromatograficznych. Wykazano silną liniową korelację dla technik HPLC-GC/MS i HPLC-EC ($r=0.89$, $p< 0.0001$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy HPLC-GC/MS i ELISA oraz HPLC-EC i ELISA (odpowiednio $r = 0.17$ ($p= 0.08$) i $r = 0.28$ ($p= 0.003$)).

Otrzymane wyniki wskazują, że brak zgodności pomiędzy technikami chromatograficznymi, a techniką immunoenzymatyczną ogranicza użyteczność tej ostatniej w oznaczaniu 8-oksydGuo w moczu. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami wykazaliśmy, że ELISA generuje znacząco wyższe wartości. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy może być niespecyficzność przeciwciała stosowanego w komercyjnych zestawach.

Kolejne badania porównawcze w ramach ESCULA z udziałem około 20 laboratoriów (prace 4 i 6, załącznik nr 4, pkt IIA) ostatecznie potwierdziły użyteczność metod chromatograficznych do ilościowego oznaczania 8-oksydGuo w moczu, rekomendując szczególnie metody z detekcją spektrometrii mas ze względu na zastosowanie znakowanych stabilnymi izotopami standardów wewnętrznych.

3. Danielsen PH, Bräuner EV, Barregard L, Sällsten G, Wallin M, Olinski R, **Rozalski R**, Møller P, Loft S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutat Res.* 2008 Jul 3;642(1-2):37-42.

Wiele badań epidemiologicznych skupiało się na ocenie niekorzystnego wpływu na zdrowie człowieka cząstek stałych obecnych w powietrzu, który wynika prawdopodobnie z indukcji stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych. Zdecydowana większość dotyczyła cząstek stałych pochodzących ze spalania paliwa w ruchu ulicznym. Stosunkowo niewiele danych w tym kontekście odnosi się do cząstek stałych powstających w trakcie spalania drewna, mimo, że jego udział w powstawaniu tych zanieczyszczeń w niektórych rejonach świata jest znaczący. Dlatego, też postanowiliśmy sprawdzić jaki wpływ na poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA i aktywność enzymów naprawczych będzie miała krótkotrwała ekspozycja na dym drzewny. Trzydzieści zdrowych dorosłych osób w specjalnej komorze było poddanych ekspozycji na filtrowane czyste powietrze przez 4 godziny, a następnie po upływie 7 dni na dym drzewny przez taki sam okres. Po 3 godzinach od ekspozycji od uczestników badania pobrano krew i po 20 godzinach krew i mocz. Ocenie poddano pęknięcia nici DNA i miejsca FPG powstałe po działaniu enzymu usuwającego uszkodzone puryny w DNA leukocytów, aktywność glikozylazy OGG1, poziom mRNA

enzymów naprawczych i uczestniczących w obronie antyoksydacyjnej oraz poziom 8-oksyoGua i 8-oksyoGuo w moczu. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji genu hOGG1, odpowiedzialnego za usuwanie 8-oksyoguaniny z DNA na drodze naprawy BER po 20 godzinach od ekspozycji. W przypadku pozostałych parametrów nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic, jednakże na uwagę zasługuje relatywny wzrost aktywności glikozylazy 8-oksyoguaniny w obu punktach kontrolnych, jak również prawie 80% wzrost poziomu 8-oksyoGua w moczu po 20 godzinach.

Dane te wskazują, że ekspozycja na cząsteczki stałe zawarte w dymie drzewnym wywołuje efekt systemowy, nie prowadzi to jednak do zmian genotoksycznych, tak jak w przypadku ekspozycji na cząstki stałe pochodzące z silników spalinowych. Może to być spowodowane zwiększoną aktywnością systemu naprawy przez wycinanie zasad (BER – base excision repair).

4. **Rozalski R, Migdalski A, Gackowski D, Guz J, Siomek A, Foksinski M, Szpila A, Zarakowska E, Majer M, Jawien A, Olinski R.** Does morphology of carotid plaque depend on patient's oxidative stress? Clin Biochem. 2013 Aug;46(12):1030-5.

Miażdżycza stanowi istotny problem zdrowotny i jest jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach wysoko uprzemysłowionych. Wyniki badań wskazują, że chroniczny stan zapalny wpływa na rozwój zmian miażdżycowych. Z kolei związek stresu oksydacyjnego ze stanem zapalnym jest bardzo dobrze udokumentowany, podwyższone poziomy 8-oksyoG zaobserwowano w wielu badaniach dotyczących procesów zapalnych. Jeżeli rozwój choroby jest związany ze stresem oksydacyjnym i nadmierną ekspozycją na wolne rodniki tlenowe to ich działanie powinno skutkować zwiększonym poziomem tworzących się uszkodzeń DNA.

Obecność oksydacyjnych uszkodzeń DNA stwierdzono w płytkach miażdżycowych i leukocytach osób chorych na miażdżycę. Uważa się, że stabilność blaszki miażdżycowej jest jednym z najważniejszych czynników definiujących ryzyko sercowo-naczyniowe. Istnieją jednak sprzeczne dane dotyczące czynników wpływających na jej stabilność. Morfologia blaszki decyduje czy dojdzie do oderwania się fragmentu zmiany miażdżycowej, co skutkuje ostrymi stanami klinicznymi.

W kierowanym przez mnie projekcie postanowiliśmy sprawdzić, czy istnieje zależność pomiędzy:

- poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA, markerami zapalenia, a drobnocząsteczkowymi antyoksydantami,
- poziomem uszkodzeń DNA w leukocytach i w blaszce miażdżycowej,

- stresem oksydacyjnym/uszkodzeniami DNA, a morfologią blaszki miażdżycowej

Grupa badana składała się z osób chorych na miażdżycę, u których wykonano zabieg usunięcia blaszki miażdżycowej z tętnicy szyjnej. Wykonano analizę produktów naprawy DNA w postaci 8-oksyoGua i 8-oksyoGua wydalonych do moczu oraz 8-oksyoGua w DNA leukocytów i blaszki miażdżycowej (tylko grupa badana). Oprócz tego zostały oznaczone stężenia witamin antyoksydacyjnych (retinol, kwas askorbinowy i α -tokoferol) i kwasu moczowego w osoczu, aby ocenić status antyoksydacyjny na poziomie całego organizmu. Dodatkowo oznaczono stężenie białka C-reaktywnego w osoczu jako markera stanu zapalnego. Stabilność blaszki miażdżycowej była oceniana ultrasonograficznie z wykorzystaniem systemu GSM (gray-scale scoring), grupa badana została podzielona w zależności od echogeniczności blaszki miażdżycowej (GSM < 25, GSM 25–50, GSM > 50). Blaszki z niskim wskaźnikiem GSM były kwalifikowane jako bardzo niestabilne. Na podstawie uzyskanych wyników został obliczony indeks redoks jako stosunek statusu antyoksydacyjnego do statusu prooksydacyjnego. Status antyoksydacyjny został obliczony jako średnia geometryczna ze stężenia molowego antyoksydantów, natomiast status prooksydacyjny jako średnia geometryczna stężenia 8-oksyoGua i 8-oksyoGua w moczu. Dlatego też, wyższe wartości indeksu redox wskazują na mniejsze nasilenie stresu oksydacyjnego na poziomie całego organizmu.

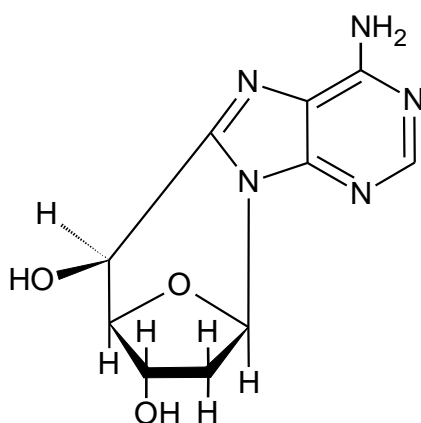
Zaobserwowaliśmy znacząco wyższy poziom białka C-reaktywnego w osoczu oraz 8-oksyoGua w moczu w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie w osoczu wszystkich antyoksydantów było niższe w grupie badanej, jednak tylko w przypadku kwasu askorbinowego, retinolu i kwasu moczowego różnice były istotne statystycznie. Dodatkowo, indeks redoks w przypadku grupy badanej był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. **Powyższe wyniki wskazują, że osoby w grupie badanej są narażone na stan silnego stresu oksydacyjnego.**

Biorąc pod uwagę fakt, że skala GSM odzwierciedla ryzyko wystąpienia ostrych stanów sercowo-naczyniowych można spodziewać się, że u osób z niestabilną blaszką (GSM<25) stres oksydacyjny powinien być bardziej nasilony. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy jednak zupełnie odwrotny trend. Wraz ze wzrostem skali GSM płytek miażdżycowych obniżał się indeks redox i stężenie antyoksydantów, co wskazuje, że najbardziej nasilony stres oksydacyjny występuje u pacjentów z uwapnioną, stabilną blaszką. Trend ten został potwierdzony również w przypadku białka C-reaktywnego, którego poziom rośnie wraz ze wzrostem skali GSM. **Otrzymane wyniki sugerują, że parametry opisujące stres**

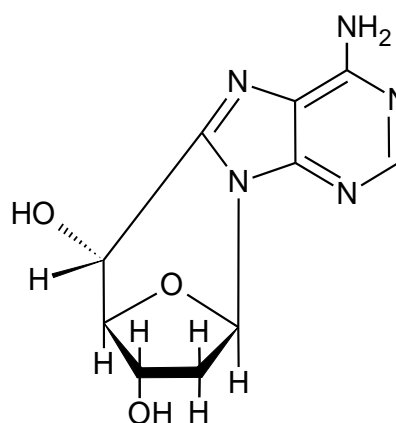
oksydacyjny (index redoks) i stan zapalny (białko CRP) odzwierciedlają progresję choroby na poziomie całego organizmu, natomiast czynniki odpowiadające za serię zdarzeń prowadzących do stabilizacji blaszki lub jej rozpadu mogą zależeć od środowiska w bezpośrednim otoczeniu samej blaszki.

5. Jaruga P, **Rozalski R**, Jawien A, Migdalski A, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA damage products (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. *Biochemistry*. 2012 Mar 6;51(9):1822-4.

8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyna (cdA) powstaje w wyniku działania rodnika hydroksylowego na 2'-deoksyadenozynę, co prowadzi do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pomiędzy węglem C5' 2'-deoksyrybozy i węglem C8 adeniny. Obecność 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny w DNA może powodować zniekształcenia helisy spowodowane kowalencyjnym wiązaniem C8-C5'. Prowadzi to do zablokowania transkrypcji i polimeraz DNA, co ostatecznie może powodować mutacje transkrypcyjne czy delecje nukleotydowe. Podwyższone poziomy 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny stwierdzono w DNA pacjentów z różnymi stanami chorobowymi, co może wskazywać na możliwy udział tych pochodnych w procesach związanych z rozwojem stanów patologicznych. Większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest naprawiana przez glikozylazy na drodze BER, natomiast w przypadku 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny głównym szlakiem jest naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER). W pracy #5 postanowiliśmy porównać poziom 8-oksyoGua i 8-oksyoGuo oraz 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny w postaci dwóch diastereoizomerów (5'R) i (5'S) u pacjentów z rozpoznaną miażdżycą i w grupie kontrolnej.



(5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoksyadenozyna



(5'R)-8,5'-cyclo-2'-deoksyadenozyna

W moczu grupy badanej wykazano obecność R-cdA i S-cdA w znacznie wyższym stężeniu w porównaniu do grupy kontrolnej. Również w przypadku 8-oksydGuo wykazano znaczący wyższy poziom w moczu, jednakże w przypadku 8,5'-cyklo-2'-nukleozydów istotność statystyczna zmian była wyższa (odpowiedni $p=0.0008$ i $p < 0.0001$). Nie wykazano różnic w przypadku 8-oksyaGua.

Wzrost stężenia R-cdA i S-cdA w moczu pacjentów jest dowodem na zwiększone tworzenie się tych pochodnych w DNA spowodowane nasileniem stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Dlatego też, wspomniane powyżej niepożądane skutki biologiczne obecności cyklopuryn w DNA mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju choroby. Otrzymane wyniki wskazują, że (5'R)-8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyna i (5'S)-8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyna mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery stresu oksydacyjnego w miażdżycy.

6. **Rafał Rozalski**, Daniel Gackowski, Agnieszka Siomek-Gorecka, Marta Starczak, Martyna Modrzejewska, Zbigniew Banaszekiewicz and Ryszard Olinski. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. Biomarkers. 2015

Rak jelita grubego jest trzecim najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim u kobiet. Diagnoza na wczesnym etapie jest krytycznie ważna dla ograniczenia śmiertelności z tego powodu. Nowotwór rozwija się przez transformację komórek nabłonkowych jelita, co prowadzi do powstania łagodnego gruczolaka (polip), który w konsekwencji może przekształcić się w inwazyjną formę. Związek stresu oksydacyjnego z rozwojem rak jelita grubego został opisany przez kilka zespołów badawczych. Również w naszych wcześniejszych badaniach obserwowaliśmy nasilony stres oksydacyjny u pacjentów z rozpoznaniem nowotworem złośliwym jak i u osób z łagodną, wczesną postacią choroby w postaci gruczolaka, co manifestowało się zwiększonym poziomem 8-oksydGuo w leukocytach i w moczu (praca 7, załącznik nr 4, pkt IIA).

Aby ocenić użyteczność diagnostyczną biomarkerów stresu oksydacyjnego oznaczanych w moczu i ich związek z rozwojem nowotworu, postanowiliśmy porównać poziom 8-oksyaGua, 8-oksydGuo i 5-hydroksymetylowouracylu (5-hmUra) w moczu pacjentów z rozpoznaniem rakiem jelita grubego, u osób z nowotworem łagodnym oraz w grupie kontrolnej.

Zaobserwowaliśmy wzrost poziomu 8-oksyaGuaniny i 8-oksya-2'-deoksyguanozyny w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku grupy

osób z łagodną postacią nowotworu, jednak różnice nie były istotne statystycznie. Natomiast poziom 5-hydroksymetylouracylu był istotnie wyższy w grupie osób zdrowych.

Siła diagnostyczna oznaczanych biomarkerów została oceniona przy użyciu testu ROC (receiver operating characteristic). Pole pod krzywą (AUC – area under the curve) dla wszystkich związków było niższe niż 0.7. Ponieważ poziom 8-oksyoGua i 8-oksyoGuo rośnie w grupie badanej w przeciwieństwie do 5-hmUra zdecydowaliśmy się sprawdzić potencjał diagnostyczny dla kombinacji (8-oxoGua+8-oxodGuo)/5-hmUra. Pole pod krzywą dla takiego współczynnika wyniosło 0.778. **Bardzo prawdopodobne, że oznaczanie poziomu uszkodzonych zasad/nukleozydów w moczu pozwala na wskazanie w badanej grupie osób z nasilonym stresem oksydacyjnym (8-oksyoGua i 8-oksyoG) i obniżoną zdolnością do usuwania błędnie sparowanego 5-hydroksymetylouracylu w parze z guaniną. Natomiast wartość diagnostyczna wszystkich trzech oznaczanych związków dla wczesnego wykrywania raka jelita grubego jest umiarkowana.**

WNIOSKI KOŃCOWE:

Analiza poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu jest dobrym, nieinwazyjnym sposobem oceny stresu oksydacyjnego/naprawy DNA i może być zastosowana w badaniach epidemiologicznych w kontekście wielu stanów patologicznych. Należy jednak pamiętać, że na kompleksową ocenę składać się powinny markery opisujące zarówno status prooksydacyjny jak i antyoksydacyjny organizmu.

Chromatografia cieczowa z detektorem elektrochemicznym, jak również techniki chromatograficzne wykorzystujące detekcję spektrometrii masowej stanowią wiarygodne narzędzia do oznaczania zmodyfikowanych zasad i nukleozydów w moczu. Dodatkową zaletą w przypadku spektrometrii masowej jest zastosowanie izotopowo znakowanych standardów wewnętrznych, co pozwala na uniknięcie błędów związanych z identyfikacją badanego związku, zapewnia również ilościową kompensację oraz kontrolę podczas całego procesu analitycznego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje 40 prac w czasopismach polskich i zagranicznych, w tym 34 prace oryginalne oraz 6 poglądowych. Sumaryczny impact factor czasopism w których opublikowano prace według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z datą opublikowania wynosi 155,572. Liczba cytowań publikacji bez autocytowań wynosi 1241, a

indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS) wynosi 21. Szczegółowa analiza bibliometryczna znajduje się w załączniku nr 5.

5.A. Udział w międzynarodowych i krajowych projektach badawczych:

Kierowanie projektem badawczym:

1. MNIł: 0081/B/P01/2008/35 – Znaczenie stresu oksydacyjnego w rozwoju miażdżycy tętnic szyjnych. Okres realizacji 19.09.2008. – 18.09.2010. Kierownik i wykonawca projektu.

Udział w 2 projektach badawczych międzynarodowych:

1. 6.PR UE “Enviromental cancer risk, nutrition and individual susceptibilty (ECNIS)” – FOOD-CT-2005-513943.” Ryzyko zapadalności na choroby nowotworowe: wpływ środowiska, diety i indywidualnej podatności”. Okres realizacji: 2005–2010. Wykonawca
2. 7.PR UE Towards ECNIS Centre for Research and Education on Cancer, Environment and Food (ECNIS2), FP7-KBBE-2010-4 nr 266198. Okres realizacji 2011-2013r. Wykonawca

Udział w 13 projektach badawczych krajowych:

1. KBN: 6 P05D 060 20, „Analiza genotoksycznych produktów reperacji DNA: 8-oksyguaniny i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny w moczu człowieka. Okres realizacji: 15.02.2000-31.12.2002. Wykonawca.
2. KBN: 6 P05D 076 21, „Czy endogenne poziomy 8-oksyguaniny (genotoksycznego produktu ataku wolnych rodników tlenowych na DNA) zależy od aktywności enzymów naprawiających uszkodzenia DNA? Rola 8-oksyG w patogenezie raka płuc”. Okres realizacji: 01.07.2001-30.06.2003. Wykonawca
3. MNIł: 2 P05D 062 27, „Znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń DNA w rozwoju choroby Alzheimera”, okres realizacji: sierpień 2004- luty 2006r, Wykonawca.
4. KBN: PBZ-KBN-091/P05/2003/55, pakiet: „Badania nad molekularną patogenezą nowotworów oraz wykorzystanie metod biologii molekularnej, genomiki i proteomiki dla wczesnego wykrywania, optymalizacji leczenia i rozwoju nowych metod terapii nowotworów złośliwych”. Zadanie: „Zdolność reperacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA jako czynnik predysponujący do nowotworów płuc oraz jelita grubego i odbytnicy”. Okres realizacji 01.11.2003–31.10.2006 – Wykonawca
5. KBN: PBZ-KBN-094/P06/2003 „Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego”. Zadanie: „Badania kliniczne na ludziach mające na celu powiązanie spożycia antyoksydantów przez osoby zagrożone chorobami nowotworowymi i chorobami układu krążenia z poziomem biomarkerów i rozwojem tych chorób”. Okres realizacji 01.12.2003–31.11.2006 -Wykonawca
6. KBN: Grant PBZ KBN-093/P06/2003 „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego”. Zadanie: „Wpływ bioaktywnych składników diety na proliferację i apoptozę w procesie dojrzewania nabłonka jelitowego oraz

- zewnątrzydzielniczą funkcję trzustki u nowo narodzonych prosiąt”. Okres realizacji 01.12.2003–31.11.2006 -Wykonawca
7. MNIł: 2 P05D 082 26, “Analiza oksydacyjnych uszkodzeń DNA u pacjentów chorych na nowotwory poddanych chemioterapii; czy oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą być biomarkerami oceniającymi skuteczność terapii?” Okres realizacji: 24.03.2004-23.03 2006. Wykonawca.
 8. MNIł: PBZ-MNIł-2/1/2005 „Badania zaburzeń w szlakach przekazywania informacji komórkowej w patogenezie nowotworów z wykorzystaniem metod genomiki integracyjnej” Zadanie „Badania procesów oksydacyjnych w patogenezie nowotworów z wykorzystaniem metod genomiki integracyjnej” Okres realizacji 21.11.2006- 2.11.2009 - Wykonawca
 9. MNIł: N301 2052 33, Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz aktywność szlaku sygnalizacji komórkowej NFκB u myszy pozbawionych dysmutazy ponadtlenkowej, heterozygot oraz szczepów „dzikich”. Okres realizacji: 09.10.2007 -09.10.2009. Wykonawca.
 10. MNIł: N401 055 32/1380, – Czy mutacje konstytucyjne genu BRCA1 wpływają na poziom stresu oksydacyjnego/oksydacyjnych uszkodzeń DNA? Okres realizacji: 18.05.2007 – 17.11.2009. Wykonawca.
 11. MNiSW: N N401 280039 – Badanie związku pomiędzy aktywnością oraz ekspresją polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) a poziomem stresu oksydacyjnego/oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz stopniem zaawansowania oraz progresją nowotworu u pacjentów z rakiem jelita grubego. Okres realizacji: od 08.11.2010 – 07.05.2103. Wykonawca.
 12. MNiSW: NN407171439 – Ocena wpływu stresu oksydacyjnego/modyfikacji DNA na płodność mężczyzn. Okres realizacji: 3.11.2010– 2.05.2014. Wykonawca
 13. NCN: 2013/09/B/NZ5/00767 - 5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodna 5-hydroksymetylouracyl – nowe biomarkery kancerogenezy? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu. Okres realizacji 19.03.2014 – 18.03.2016. Wykonawca.

5.B. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną:

1. Zespołowa Nagroda Naukowa Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk za cykl prac pt. ” Rola reaktywnych form tlenu w patogenezie niektórych chorób człowieka”, Warszawa, 09.12.2004.
2. Stypendium naukowe prezydenta Miasta Bydgoszczy , Bydgoszcz 2005r.
3. Stypendium Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych pracowników dwukrotnie, w latach 2004 i 2005.
4. Indywidualna Nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2005 roku. Toruń, 22.11.2006.
5. Zespołowa Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za współautorstwo cyklu prac pt. „Znaczenie uszkodzeń DNA indukowanych reaktywnymi formami tlenu w patogenezie raka płuc” Warszawa, 02.10.2006.
6. Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2007 roku. Toruń, 11.01.2008.
7. Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia za cykl sześciu publikacji z zakresu biochemii

kwasów nukleinowych p.t. "Kliniczne znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń DNA". Warszawa, 16.07.2008.

8. Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2008 roku. Toruń, 17 listopada 2009.
9. Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2009 roku. Toruń, 9 listopada 2010.
10. Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2010 roku, Toruń, 14 listopada 2011.
11. Zespołowa Nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2013 roku, Bydgoszcz, 25 listopada 2014.

5.C. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

1. „Wydalanie 8-oksoguaniny i 8-okso-2'-deoksyguanozyny w moczu człowieka nie jest zależne od diety” XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Toruń, 10-14 września 2001.
2. „8-oxo-7,8-dihydroguanine in urine - noninvasive biomarker of oxidative stress” 42nd EEMS annual conference, Warsaw, Poland. 16-20 September 2012.
3. "Oxidatively modified DNA lesions in urine as biomarkers of oxidative stress" ECNIS2/EIEC course: Nutrition and Environmental Carcinogens. Lodz, May 6-9th, 2013.

5.D. Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych

1. ECNIS WP6 Workshop " A biological meaning of oxidatively damaged DNA" 3-4 czerwca 2009, Bydgoszcz.
2. Session 1: "DNA Modifications and Epigenetics" w ramach 48th Congress of the Polish Biochemical Society. Toruń, Poland, 2-5 IX 2013.

15.07.2015 Refat Kiszka