

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejda

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

Lublin, 10 listopada 2020 r.

Recenzja

Pracy doktorskiej lek. med. Jolanty Kwiatek-Makusiak pt.:

„Rola białek regulujących metabolizm żelaza oraz związanych z procesami przewlekłego zapalenia w patogenezie choroby Parkinsona i choroby Alzheimerera”

pod promotorstwem dr hab. n. med. Dariusza Koziorowskiego.

Choroba Alzheimerera i choroba Parkinsona to dwie najczęstsze choroby neurodegeneracyjne występujące na świecie. Wobec starzenia się populacji należy się spodziewać, że częstość tych schorzeń będzie wzrastać w nadchodzących latach i stanowić będzie coraz bardziej istotny problem kliniczny. Dlatego tematyka pracy podjęta przez Doktorantkę, a zogniskowana wokół mechanizmów leżących u podłoża neurodegeneracji, wydaje mi się jak najbardziej właściwa.

Badania nad mechanizmami neurodegeneracji mają charakter wielokierunkowy i obejmują wpływ czynników genetycznych, toksycznych, ale także stres oksydacyjny oraz wpływ przewlekłego procesu zapalnego, który prowadzi do aktywacji mikrogleju oraz licznych cytokin biorących udział w procesach zapalnych. Wiadomo także, że u podłoża neurodegeneracji leży związana z wiekiem dysfunkcja mitochondriów oraz utrata połączeń synaptycznych. Bez wątplenia jednak rola stresu oksydacyjnego oraz mechanizmów zapalnych to jedne z najważniejszych obecnie kierunków badawczych w chorobach neurodegeneracyjnych, a podjęcie takiej tematyki badawczej w rozprawie doktorskiej świadczy o doskonałej znajomości literatury przedmiotu.

Bardzo ciekawy wydaje się również podjęty przez Doktorantkę wątek badawczy poświęcony wpływowi głębokiej stymulacji mózgu na aktywność białek związanych z metabolizmem żelaza. Pomimo że DBS jest metodą stosowaną w leczeniu różnych schorzeń układu nerwowego od kilkudziesięciu lat, a w

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejdak

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

chorobie Parkinsona od prawie 30 lat, to nadal niejasne pozostają dokładne mechanizmy działania DBS na układ nerwowy. W literaturze można znaleźć doniesienia na temat potencjalnie neuroprotektynowego działania tej metody leczniczej w chorobach neurodegeneracyjnych, głównie poprzez ograniczanie dysfunkcji synaptycznej oraz hamowanie procesu degeneracji neuronów. Badania na modelach zwierzęcych i obserwacje poczynione na pacjentach u których stosowano DBS wskazują, że głęboka stymulacja mózgu może modulować lokalnie aktywność neuronów, poprzez bezpośrednią stymulację aksonów oraz dendrytów. Istnieją doniesienia wskazujące na to, że DBS wpływa na reorganizację połączeń neuronalnych poprzez poprawę plastyczności mózgu oraz wpływ na neurogenezę, a także prawdopodobnie chroni przed wpływem czynników o działaniu neurotoksycznym. Dane te sugerują zatem możliwość potencjalnego działania neuroprotektynowego tej metody leczniczej, a nawet działania spowalniającego przebieg choroby. Dlatego podjęcie tego wątku badawczego w niniejszej rozprawie doktorskiej jest jak najbardziej trafne i ma charakter nowatorski.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest cykl 3 prac poświęconych roli białek regulujących metabolizm żelaza oraz związanych z procesami przewlekłego zapalenia jako mechanizmów zaangażowanych w patogenezę choroby Parkinsona i choroby Alzheimerera. Cykl 3 prac został zatytułowany: „Rola białek regulujących metabolizm żelaza oraz związanych z procesami przewlekłego zapalenia w patogenezie choroby Parkinsona i choroby Alzheimerera”. Celem przeprowadzonych badań była odpowiedź na pytanie czy zaangażowanie żelaza w procesy neurodegeneracji wiąże się ze zmianami białek regulujących jego metabolizm w 2 najczęstszych chorobach, chorobie Parkinsona i chorobie Alzheimerera. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają zaangażowanie żelaza oraz białek regulujących jego metabolizm w procesy neurodegeneracji.

Pierwsza praca z cyklu zatytułowana: „Relationships between typical histopathological hallmarks and the ferritin in the hippocampus from patients with Alzheimer’s disease” autorstwa J. Kwiatek – Majkusiak, D. W. Dickson, P. Tacik, N. Aoki, R. Tomasiuk, D. Koziorowski, A. Friedman, została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Acta Neurobiol Exp.* w 2015 roku i posiada wskaźnik wpływu w wysokości 1,708 oraz punktację MNiSW w wysokości 15 punktów. Udział Doktorantki w powstaniu wyżej wymienionej pracy jest znaczący i wynosi 55% wg oświadczeń współautorów. Warto podkreślić, że praca powstała w ramach współpracy z prestiżowym ośrodkiem zagranicznym Department of Neuroscience, Mayo Clinic w Stanach Zjednoczonych. Celem pracy była

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejdak

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

ocena zależności pomiędzy strukturą ferrytyny a nasileniem typowej patologii alzheimerowskiej tj. obecności złogów β -amyloidu zewnątrzkomórkowo oraz zwyrodnień neurofibrylarnych wewnątrzkomórkowo, w hipokampach osób chorych na chorobę Alzheimera. Badania mają charakter unikatowy, jako że były prowadzone z wykorzystaniem tkanki nerwowej hipokampów pochodzących od 10 osób z chorobą Alzheimera, a wyniki zostały przeanalizowane w odniesieniu do wyników uzyskanych w oparciu o badania tkanki nerwowej mózgu pochodzącej pośmiertnie od 20 osób zdrowych (bez chorób neurodegeneracyjnych w wywiadzie). Należy podkreślić, że badania tego typu pojawiają się nieczęsto nawet w literaturze światowej. Uzyskane wyniki pokazały, że stężenie łańcuchów lekkich L ferrytyny jest podwyższone w tkance nerwowej mózgu pochodzącej z obszaru hipokampa osób z chorobą Alzheimera oraz że koreluje dodatnio z nasileniem tzw. patologii alzheimerowskiej t.j. liczbą blaszek starczych w hipokampie, jak również ze stopniem utraty neuronów w badanym obszarze. Jako że łańcuchy lekkie ferrytyny obecne są głównie w komórkach gleju, to uzyskane wyniki badań wskazują na możliwy współdziałanie aktywacji mikrogleju w procesie neurodegeneracji w przebiegu choroby Alzheimera.

Kolejna praca z cyklu to praca oryginalna zatytułowana: "Higher serum levels of pro-hepcidin in patients with Parkinson's disease treated with deep brain stimulation" autorstwa J. Kwiatek-Majkusiak, M. Geremek, D. Koziorowski, R. Tomasiuk, S. Szlufik, A. Friedman. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy, posiada 60% wkład w powstanie w/w pracy. Praca została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym „Neuroscience Letters”, posiadającym wskaźnik wpływu 2,173 i punktację MNiSW w wysokości 20 punktów.

W pracy tej oceniono poziom prohepcydyny -prekursora białka regulującego poziom żelaza, badania przeprowadzono na grupie 52 osób z chorobą Parkinsona (w tym 37 osób leczonych tylko farmakologicznie oraz 15 chorych poddanych dodatkowo leczeniu operacyjnemu za pomocą głębokiej stymulacji mózgu -DBS). Uzyskane wyniki przeanalizowano w odniesieniu do grupy 31 osób stanowiących grupę kontrolną. Poziom prohepcydyny w surowicy osób chorych był znacznie wyższy w grupie osób z chorobą Parkinsona w porównaniu do grupy kontrolnej. Co ciekawe poziom prohepcydyny był znacznie wyższy w podgrupie osób z chorobą Parkinsona poddanych DBS, w porównaniu do grupy osób poddanych leczeniu zachowawczemu. Wnioski sformułowane przez Doktorantkę wskazują, że DBS może mieć działanie immunomodulujące poprzez wpływ na zwiększone wydzielanie cytokin prozapalnych co prowadzi do aktywacji astrogleju i mikrogleju. Uzyskane wyniki wydają się niezwykle

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejda

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

interesujące, a prowadzone badania mają charakter nowatorski. Rezultaty tych badań wymagają jednak z pewnością potwierdzenia na większej grupie pacjentów.

Trzecia praca z cyklu zatytułowana : „Serum levels of hepcidin and interleukin 6 in Parkinson’s disease” autorstwa J. Kwiatek-Majkusiak, M. Geremek, D. Kozirowski, R. Tomasiuk, S. Szlufik i A. Friedman, to także praca opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym Acta Neurobiol Exp, posiadającym wskaźnik pływu 1,541 oraz punktację MNiSW 70 punktów. Doktorantka jest również pierwszym autorem tej pracy i posiada znaczny, bo 60% wkład w powstanie tej pracy, wg oświadczeń współautorów. W pracy tej Doktorantka wraz z zespołem Współautorów analizowała poziomy hepcydyny oraz Il-6 w surowicy 60 osób z chorobą Parkinsona łącznie (w tym 47 było leczonych zachowawczo oraz 13 pacjentów zostało poddanych dodatkowo leczeniu za pomocą DBS, a wyniki były analizowane w odniesieniu do grupy kontrolnej 28 osób. Uzyskane wyniki pokazały, że stężenia hepcydyny i Il-6 były znacznie wyższe w grupie chorych z chorobą Parkinsona leczonych za pomocą DBS w porównaniu nie tylko do grupy kontrolnej ale także w porównaniu do grupy osób z chorobą Parkinsona leczonych zachowawczo. Dodatkowo Doktorantka wraz zespołem Współautorów wykazała istnienie zależności pomiędzy osoczymymi stężeniem hepcydyny i Il-6 w grupie osób z chorobą Parkinsona, co we wnioskach sformułowanych przez Doktorantkę może wskazywać na wpływ mechanizmów immunologicznych na metabolizm żelaza i nasilenie stresu oksydacyjnego w badanej grupie chorych. Wyniki te mogą wg Doktorantki wskazywać również na możliwą przeciwzapalną i neuroprotekcijną rolę hormonu hepcydyny, a jednocześnie na obecność zaburzeń metabolizmu żelaza w grupie osób z chorobą Parkinsona.

Podsumowując, z uznaniem odnoszę się do dokładnego i logicznego sposobu zaprojektowania każdego z wątków badawczych omawianych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Przyjęte metody badawcze zgodne są z międzynarodowymi standardami przyjętymi dla tego typu badań naukowych. Metody badawcze jak również analiza statystyczna w każdej z prac zostały prawidłowo dobrane. Opis wyników w każdej z trzech prac przedstawionego cyklu jest bardzo staranny i klarowny stanowiąc logiczną konsekwencję podjętych metod badawczych. W podobnym układzie Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników odnosząc się do dostępnej literatury w piśmiennictwie światowym. Dyskusja w każdej z przedstawionych prac jest przeprowadzona w sposób bardzo szczegółowy i staranny oraz wieloaspektowy, co świadczy o dogłębnej znajomości literatury przedmiotu.

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejda

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

Z obowiązku recenzenta pragnę wyrazić także swoje uwagi dotyczące niniejszej pracy doktorskiej. Wobec dużego nakładu pracy oraz przestudiowania znacznej ilości literatury, czego wyrazem są 43 stron tekstu i 40 pozycji piśmiennictwa w Omówieniu cyklu prac, Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów stylistycznych oraz interpunkcyjnych. Niemniej jednak te drobne błędy oraz nieścisłości, w niczym nie umniejszają niezwykle nowatorskiego i odkrywczego charakteru przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Pragnę podkreślić również krytyczne wskazanie badawczych przez Doktorantkę słabych punktów każdego z analizowanych wątków badawczych, co dowodzi Jej dojrzałości naukowej.

W odniesieniu do wyników przedstawionych w drugiej pracy badającej osoczowy poziom hepcydyny u osób z chorobą Parkinsona, nasuwa się jednak pewne pytanie. Czy jeśli cytokiny prozapalne takie jak Il-6 czy TNF zwiększają ekspresję hepcydyny w astrocytach i komórkach mikrogleju, a to z kolei jest przyczyną zwiększonej akumulacji żelaza w neuronach i komórkach mikrogleju, te natomiast mechanizmy przyczyniają się do progresji procesu degeneracyjnego w komórkach nerwowych mózgu, to jak w takim razie wytłumaczyć sugerowaną przez Doktorantkę we wnioskach rolę neuroprotekcijną DBS w świetle uzyskanych wyników, które wskazują na najwyższe stężenie pro-hepcydyny u pacjentów poddanych DBS? Wg wniosków sformułowanych przez Doktorantkę stężenie pro-hepcydyny było znacznie wyższe w surowicy osób z chorobą Parkinsona poddanych leczeniu operacyjnemu metodą DBS w porównaniu do grupy osób z chorobą Parkinsona leczonych zachowawczo. Jednocześnie w Omówieniu cyklu prac Doktoranta pisze, że zwiększona synteza hepcydyny prowadzi do zwiększenia zawartości żelaza wewnątrzkomórkowego, które stanowi źródło wolnych rodników tlenowych i może przyczynić się do nasilenia procesu neurodegeneracji.

Wydaje się, że w trzeciej pracy z cyklu Doktorantka koryguje swoje wnioski, stwierdzając, że istotnie wyższy poziom hepcydyny w surowicy osób z chorobą Parkinsona poddanych dodatkowo leczeniu operacyjnemu za pomocą DBS i poddanych stymulacji o wysokiej częstotliwości, może być raczej związany z przeciwzapalną i neuroprotekcijną rolą hepcydyny niż neuroprotekcijnym działaniem DBS. Istotnie, dane z badań na modelach zwierzęcych istotnie sugerują, że metoda DBS może mieć działanie neuroprotekcyjne w chorobach neurodegeneracyjnych między innymi poprzez wpływ na uwolnienie czynników neurotroficznych, remodeling połączeń synaptycznych, hamowanie apoptozy komórek nerwowych, zmniejszenie procesu zapalnego w ośrodkowym układzie nerwowym, redukcję ekcytotoksyczności kwasu glutaminowego, czy też wspomaganie oczyszczania mózgu z nieprawidłowych białek. Warto jednak pamiętać, że dane z badań klinicznych przeprowadzonych na pacjentach poddanych

**Klinika Neurologii z Pododdziałem Udarowym
i Wczesnej Rehabilitacji Poudarowej**
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 4 Lublinie

Kierownik:
Prof. dr hab. med. Konrad Rejda

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel (81) 724 47 20
fax (81) 7244 540

leczeniu za pomocą DBS, nie dostarczyły dotychczas ewidentnych dowodów na rolę neuroprotekcijną tej metody leczenia. Wydaje się zatem, że na chwilę obecne wnioski dotyczące potencjalnie neuroprotekcijnego działania metody DBS powinny być formułowane z dużą ostrożnością.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi kontynuację szeroko zakrojonych badań na schorzeniach neurodegeneracyjnymi mózgu prowadzonych w Klinice Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w ramach prac zespołu kierowanego przez Pana Prof. dr hab. n med. Andrzeja Friedmana oraz Pana dr hab. n med. Dariusza Koziorowskiego. Jest to znany i ceniony w kraju i zagranicą ośrodek naukowy specjalizujący się z schorzeniach neurodegeneracyjnych, a niniejsza dysertacja stanowi kolejny przykład wysokiego poziomu naukowego tego ośrodka naukowego.

Dlatego też mam zaszczyt wnieść do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. med. Jolanty Kwiatek-Majkusiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także z uwagi na bardzo nowatorski charakter prowadzonych przez Doktorantkę badań o przyznanie wyróżnienia tej pracy doktorskiej.

Jednocześnie potwierdzam, że niniejsza rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zmianami) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r., Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Z poważaniem,

Dr hab. n. med. Ewa Papuć

Specjalista neurolog

Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

dr hab. n. med. Ewa Papuć
specjalista neurolog
6364561