



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Samodzielna Pracownia Farmakodynamiki

Szczecin, 19.08.2024

prof. dr hab. Mateusz Kurzawski
Samodzielna Pracownia Farmakodynamiki
Katedra Farmakologii
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Łukasza Poniatowskiego

pt. „Wpływ domózgowych podań Atsttrin na procesy neurodegeneracyjne i rozwój reakcji zapalnej w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) u myszy.”

Choroba Parkinsona to przewlekła, postępująca choroba neurodegeneracyjna o częściowo tylko poznanym podłożu, której częstość występowania wzrasta w zaawansowanym wieku. Ze względu na starzenie się społeczeństwa, stanowi ona coraz większe wyzwanie dla systemu ochrony zdrowia, tymczasem, mimo postępu medycyny, nie jest nadal dostępne leczenie przyczynowe, a farmakoterapia ograniczona jest w praktyce do łagodzenia i opóźniania w czasie objawów choroby. Chociaż patogeneza choroby Parkinsona jest złożona i niejednorodna, badania ostatnich lat dostarczyły wiele dowodów na udział w rozwoju procesów neurodegeneracyjnych reakcji zapalnej, a zmiany aktywności poszczególnych elementów układu immunologicznego, zarówno systemowe jak i w obrębie ośrodkowego układu nerwowego są dość dobrze scharakteryzowane. W związku z powyższym, czynniki o selektywnym działaniu przeciwzapalnym stanowią obecnie atrakcyjny cel badań związanych z poszukiwaniem nowych rozwiązań terapeutycznych choroby Parkinsona, w który wpisuje się rozprawa doktorska lek. Łukasza Poniatowskiego. Progranulina (PGRN) jest białkiem układu odpornościowego

wytwarzanym także przez niektóre neurony, które reguluje m.in. funkcję lizosomów, przeżycie neuronów i stan zapalny. Mutacje w obrębie genu *PGRN* zostały powiązane z podwyższonym ryzykiem chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona. Z kolei Atsttrin to zmodyfikowane, rekombinowane białko będące analogiem *PGRN*, którego działanie przeciwzapalne wynika prawdopodobnie w części z bezpośredniego antagonizmu wobec receptorów dla TNF- α . Dotychczasowe dane eksperymentalne wskazują na potencjalne działanie terapeutyczne Atsttrin w chorobach, w których patogenezie kluczowa jest rola TNF- α (np. chorobie zwyrodnieniowej stawów, RZS, chorobach zapalnych jelit). Badania lek. Łukasza Poniatowskiego są, wg mojej wiedzy, pierwszą próbą oceny przeciwparkinsonowskiego działania Atsttrin, której dokonano na podstawie analizy ekspresji wybranych genów oraz stężeń neuroprzekaźników i ich metabolitów w mysim modelu choroby Parkinsona po domózgowym podaniu badanego białka.

Praca przedstawiona do recenzji ma typowy dla rozprawy doktorskiej układ, jednak niewątpliwie wyróżnia się objętością – wraz załącznikami liczy 427 stron, zawiera 75 rycin (głównie wykresów) oraz 4 tabele. Liczba wykorzystanych pozycji literaturowych jest imponująca (1040), zostały one merytorycznie dobrane i adekwatnie wykorzystane w pracy, w większości są to aktualne prace anglojęzyczne z ostatniej dekady opublikowane w czasopismach indeksowanych. Pod względem edytorskim praca jest przygotowana czytelnie, klarownie, spisy treści, tabel i wykresów ułatwiają nawigację po tekście, pomocny jest też załączony wykaz zastosowanych skrótów wraz z ich z objaśnieniami.

Dobrze napisany wstęp stanowi merytoryczne i aktualne wprowadzenie do tematyki podejmowanych badań. Jest to obszerne opracowanie (ok. 90 stron), napisane klarownym i precyzyjnym językiem, stanowiące kompendium wiedzy na temat choroby Parkinsona, obejmujące jej historię, patogenezę, aktualny stan wiedzy na temat możliwych mechanizmów leżących u jej podstaw, szczegółowy opis poszczególnych elementów teorii neurozapalnego podłoża choroby, zmian funkcji neuroprzekaźników, informacje na temat objawów choroby oraz dostępnych opcji terapeutycznych. Doktorant przedstawił także dokładną charakterystykę progranuliny, jej funkcje biologiczne oraz możliwe zastosowanie w leczeniu, a także opisał różne zwierzęce modele choroby Parkinsona, wykorzystywane do badań patogenezy, przebiegu choroby oraz testowania potencjalnych nowych farmaceutyków. W mojej

opinii ta część rozprawy mogłaby być z powodzeniem opublikowana w formie monografii lub (po skróceniu) pracy pogładowej. Byłoby to cenne, ponieważ w ostatnich latach postępy w badaniach nad chorobą Parkinsona są znaczące, brak aktualnych opracowań w języku polskim, szczególnie sięgających tak głęboko w szczegóły możliwych mechanizmów patogenezy choroby, a przedstawiony do recenzji tekst napisany jest w sposób zrozumiały, nawet dla osoby nie będącej specjalistą z zakresu neurologii czy immunologii.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane w sposób klarowny, precyzyjny i jednoznaczny. Doktorant postawił sobie siedem celów szczegółowych, których analiza wymagała od recenzenta szczególnej uwagi: pierwsze 5 celów dotyczy bezpośrednio spodziewanych wyników badań, natomiast pozostałe dwa (dotyczące potencjalnych możliwości zastosowania Atsttrin w terapii choroby Parkinsona oraz aplikacyjności bezpośredniej stereotaktycznej iniekcji domózgowej Atsttrin) wydają się z natury rzeczy zależeć nieco od subiektywnej oceny uzyskanych rezultatów.

W rozdziale „Materiał i metody” autor pracy opisał szczegółowo plan badań (podzielonych na dwa etapy), procedury wykonane z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych, metody analizy uzyskanych prób (w odniesieniu do amin katecholowych - wysokosprawną chromatografię cieczową - HPLC, w odniesieniu do ekspresji genów – PCR w czasie rzeczywistym) oraz metody analizy statystycznej uzyskanych wyników. Badania na zwierzętach zostały przeprowadzone z zachowaniem zasady 3R (ang. *replacement, reduction and refinement*). Należy podkreślić, że zastosowana w badaniach bezpośrednia stereotaktyczna iniekcja domózgowa stanowi procedurę niezwykle zaawansowaną i precyzyjną, wymagającą unikalnej bazy naukowej i umiejętności, której zastosowanie możliwe jest jedynie w nielicznych ośrodkach badawczych. Już samo przeprowadzenie podania badanego białka do wybranych struktur mózgu myszy zasługuje na szczególne uznanie. Panel badanych genów, których ekspresję oceniano na poziomie mRNA oraz neuromediatorów, mierzonych metodą HPLC, a w konsekwencji liczba przeprowadzonych pracochłonnych analiz, są również niezwykle imponujące.

Uzyskane wyniki przedstawiono w sposób czytelny, w postaci opisu oraz wykresów, podzielone są one na dwa etapy badania (1- analiza wpływu wzrastających dawek Atsttrin po podaniu do prądkowia u myszy traktowanych MPTP, 2 - analiza wpływu zoptymalizowanej wcześniej dawki Atsttrin do prądkowia oraz istoty czarnej);

w drugim etapie do badania dołączono dodatkowe grupy kontrolne, które umożliwiły analizę wpływu Atsttrin na badane parametry u myszy nie poddanych intoksykacji MPTP. W każdym z etapów analizowano kolejno: ekspresję wybranych cytokin, enzymów i czynników wzrostu w wybranych strukturach mózgu myszy; stężenia wybranych neurotransmiterów (monoamin, ich metabolitów oraz wybranych aminokwasów). Jak już wspomniano, liczba przeprowadzonych analiz oraz uzyskanych wyników jest niezwykle duża, co wyróżnia pozytywnie rozprawę doktorską. W badaniu zaobserwowano istotne zmiany, zarówno w ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym (oraz innych, potencjalnie związanych z patogenezą choroby Parkinsona), jak i stężeń neuromediatorów oraz ich metabolizmu, ocenianego poprzez analizę stosunku stężeń neuromediatorów i ich metabolitów. Pozwoliło to niewątpliwie wnioskować o aktywności biologicznej białka Atsttrin, chociaż kierunek obserwowanych zmian nie zawsze był jednoznaczny i zgodny z hipotezą postawioną w pracy, czego najbardziej bezpośrednim przykładem było niespodziewanie mniejsze stężenie dopaminy w prążkowie myszy poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL po podaniu Atsttrin w porównaniu do myszy, którym nie podano analogu progranuliny.

W rozdziale „Dyskusja” uzyskane wyniki zostały przez Doktoranta szerzej omówione na tle dostępnej literatury. Dyskusja przeprowadzona jest precyzyjnie, rzeczowo i w prawidłowy sposób przedstawia najważniejsze osiągnięcia pracy w kontekście wcześniejszych badań, także tych dotyczących działania progranuliny (którego pochodną jest rekombinowane białko Atsttrin) w modelu choroby Parkinsona. Doktorant przeanalizował także wyniki niezgodne z pierwotną hipotezą pracy i podjął próbę wytłumaczenia podłoża obserwowanych niezgodności.

Na podstawie uzyskanych wyników lek. Łukasz Poniatowski sformułował siedem wniosków, odpowiadających wcześniej postawionym szczegółowym celom rozprawy. Wnioski w pełni wynikają z przeprowadzonych badań. Jedynie wniosek nr 7 („...stereotaktyczna iniekcja domózgowa Atsttrin w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 stanowi optymalną metodę podania związku...”) wydaje się nie do końca uprawniony, ponieważ w pracy nie analizowano innych/alternatywnych dróg podania badanego białka.

Najważniejsze uwagi, wymagające ustosunkowania się do nich Doktoranta podczas obrony pracy, są następujące:

- W celu przygotowania recenzowanej rozprawy przeprowadzono niezwykle dużą, imponującą wręcz liczbę badań i analiz, co należy jeszcze raz podkreślić, zasługuje na specjalne wyróżnienie. Każde badanie charakteryzuje się jednak pewnymi ograniczeniami, wynikającymi choćby z przyjętej metodyki, dostępności aparatury czy środków finansowych. W dyskusji pracy brak jest wskazania ograniczeń badania, które niewątpliwie mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki i późniejsze wnioskowanie. Dotyczy to np. zastosowania metody PCR w czasie rzeczywistym do oceny ekspresji genów, podczas gdy zawartość mRNA nie zawsze ściśle koreluje z zawartością kodowanych białek, których analiza (stężenia i lokalizacja) wymagałaby zastosowania innych metod. Można by także wspomnieć o braku oceny histopatologicznej czy badań behawioralnych. Jedyne, do czego doktorant jednoznacznie odnosi się w tekście pracy, to ograniczenia wynikające z przeprowadzenia oceny skutków działania badanego białka w jednym punkcie czasowym. Inną kwestią jest charakterystyka modelu użytego w pracy (intoksykacja MPTP), zarówno jego nie do końca jasny wpływ na reakcję zapalną, jak i brak występowania tzw. ciałek Lewy'ego. Sposób podania badanego białka (najpierw Atsttrin, potem MPTP) może też przekierowywać interpretację wyników z wnioskowania na temat leczenia w stronę potencjalnego działania profilaktycznego/protekcyjnego. Analiza ograniczeń jest w mojej opinii cenna i często pokazuje, o co można w przyszłości rozszerzyć badania w celu uzyskania dodatkowych danych.
- Druga uwaga dotyczy analizy ekspresji genów, a w szczególności wyboru genu referencyjnego (ang. *house-keeping gene*), którym w recenzowanej pracy był bardzo często stosowany gen *GAPDH*. Obecnie wiadomo, że geny referencyjne, chociaż podlegają ekspresji we wszystkich tkankach, nie zawsze wykazują stałą i niezmienną ekspresję w komórkach różnego typu. Może to wpływać na uzyskane wyniki ekspresji innych genów, szczególnie, jeśli obserwowane różnice dotyczące genu badanego są niewielkie. Ta obserwacja dotyczy także tkanek różnych struktur mózgu i chorób neurodegeneracyjnych (np. Rydbirk R et al. Assessment of brain reference genes for RT-qPCR studies in neurodegenerative diseases. Sci Rep. 2016;6:37116). Przy dostępności wysokoprzepustowych technik analizy

ekspresji genów, najczęściej przyjmowaną strategią jest obecnie włączenie do wstępnej analizy kilku genów referencyjnych, a następnie selekcja podlegających najbardziej stabilnej ekspresji do dalszej analizy. Stąd pytanie, dlaczego Doktorant nie zdecydował się na rozszerzenie panelu genów referencyjnych oraz, czy w jego opinii mogło to wpłynąć na uzyskane wyniki oraz wnioski z pracy.

Ponadto, mam następujące pomniejsze uwagi, które w większości nie mają charakteru merytorycznego, ale z obowiązku recenzenta powinny być przytoczone, choćby w celu potwierdzenia, że recenzent uważnie przeczytał tekst rozprawy:

- Niektóre użyte w pracy terminy w języku polskim (głównie tłumaczenia z języka angielskiego) nie są powszechnie stosowane, być może stanowią element akceptowalnego języka wśród specjalistów lub stanowią element żargonu, co ciężko mi ocenić. Używany przez doktoranta termin „kinetyka wpływu” w odniesieniu do badań efektu różnych stężeń białka Atsttrin na analizowane parametry w tym samym punkcie czasowym może stanowić taki przykład. W farmakologii zazwyczaj przyjmujemy, że termin „kinetyka” donosi się do zmian badanego parametru w czasie, a nie w konsekwencji podania wzrastających dawek substancji – może warto zastąpić ten termin sformułowaniem „dawka-efekt” lub „analiza efektu wzrastających dawek Atsttrin” ?
- Innym przykładem nie do końca jasnego dla mnie użycia terminów z zakresu farmakologii/biochemii mózgu jest „poziom obrotów” w odniesieniu do porównania stężenia neuromediatora i jego metabolitu. Proponowałbym pozostawienie terminu „turnover” bez tłumaczenia lub zastosowanie innej terminologii (np. szybkość metabolizmu neuromediatora / stosunek stężenia neuromediatora do jego metabolitu). Innym przykładem zastosowania tłumaczenia z języka angielskiego, które budzi wątpliwości jest termin „receptor członek TNFRSF 25 (str. 135); proponuję użycie terminu: „receptor TNFRSF25”
- W rozdziale 4.1.2.1.1. Ewaluacja i ocena poziomu stężenia DA. podano nieprawidłowy opis wpływu Atsttrin na stężenie dopaminy: „Wykonanie domózgowego stereotaktycznego podania Atsttrin do ST w dawce 0.125 µg/µl (P2) u zwierząt poddanych intoksykacji MPTP-HCL było związane z istotnym statystycznie ($p=0.0481$) wzrostem poziomu stężenia DA w obrębie ST w porównaniu do grupy kontrolnej (K2)” Według danych dostępnych na wykresie załączonym do pracy (ryc. 24), stężenie dopaminy było niższe (a nie wyższe). Błąd ten nie wpłynął na

interpretację wyników (niższe stężenia dopaminy były prawidłowo dyskutowane w pracy), ale został powielony w artykule naukowym opublikowanym w czasopiśmie *Molecular Neurobiology*.

- Kwestia ta ma jedynie nomenklaturowe znaczenie, w niczym nie umniejsza wyników recenzowanej pracy, ale autor często stosuje terminy „wzrost” i „spadek” w odniesieniu do wyników badań. Najbardziej prawidłowe byłoby zastosowanie terminów „większe stężenie”, lub „mniejsze stężenie”, ponieważ wzrost i spadek dotyczy zwyczajowo parametrów analizowanych u tych samych osobników w osi czasu, a nie różnych osobników, poddanych odmiennym procedurom eksperymentalnym.
- Przy projektowanych *de novo* metodach analizy ekspresji genów przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym i barwników interkalarnych (np. SYBR Green), często dokonuje się nie tylko analizy wydajności procesu amplifikacji DNA, ale także swoistości uzyskanego produktu PCR (np. przez analizę rozdziału na żelu agarozowym, rozdział kapilarny lub analizę profilu topnienia). Czy taka analiza została wykonana w przypadku badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej?
- Dlaczego niektóre analizy ekspresji genów wykonano jedynie w tkance prążkowania (ST)? Nie stanowi to zarzutu, jednak wybór genów badanych tylko w ST wymaga uzasadnienia.
- W przesłanym do recenzji pliku pdf są błędy w wykresach - brak słupków obrazujących poszczególne wartości (np. ryc. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 58, 59). Opis słowny jest wystarczający do napisania recenzji rozprawy, jednak konieczne jest upewnienie się, że w/w wykresy są czytelne w ostatecznej/podlegającej archiwizacji wersji pracy.
- Stwierdzenia użyte często w opisie wyników pracy, np. że „intoksykacja dootrzewnowa MPTP-HCL u myszy szczepu C57BL/6 była związana z obserwowanym ogólnym średnim spadkiem/wzrostem poziomu ekspresji mRNA w obrębie wszystkich ocenianych struktur neuroanatomicznych” nie zawsze jest prawdziwa. Brak jest na wykresach i/lub w tekście pracy wartości p dotyczących porównania kontroli nie traktowanej MPTP z wartościami obserwowanymi w przypadku myszy po dootrzewnowym podaniu MPTP.
- Zmiany genetyczne (polimorfizm w populacji) w genie *BDNF* opisywane przez doktoranta: Val66 Met i rs6265 to w istocie ta sama zmiana genetyczna, jedynie nomenklatura użyta w pracach jest inna (str. 99)
- Użycie terminu „rasa” w odniesieniu do populacji ludzkiej jest kontrowersyjna, lepiej posłużyć się terminem: populacja, grupa etniczna (np. str. 63)

- Streszczenie: „Wykonanie bezpośredniego domózgowego podania Atsttrin wywiera efekt neuroprotekcyjny na uszkodzone neurony wchodzące w skład szlaku nigrostriatalnego” – czy o nie za daleko idąca interpretacja przeprowadzonych badań, biorąc pod uwagę metodykę użytą w pracy ?
- Sformułowanie: „Wykonanie bilateralnego domózgowego podania Atsttrin w dawce 0.5 µg (0.125 µg/µl) do struktur ST lub SN za pomocą metod stereotaktycznych u myszy szczepu C57BL/6 niepoddanych jakiegokolwiek innej procedurze eksperymentalnej było związane ze wzrostem wartości poziomu stężenia 5-HT” (str. 355) w dyskusji jest błędne, nie odpowiada danym przedstawionym na ryc. 66.

Przytoczone uwagi nie mają wpływu na ostateczną pozytywną ocenę pracy i dotyczą głównie drobnych niedoskonałości, których trudno się ustrzec, szczególnie w przypadku tak obszernej rozprawy. Badania przeprowadzone przez Doktoranta stanowią, w moim przekonaniu, istotny i cenny wkład we współczesny stan wiedzy na temat choroby Parkinsona.

Podsumowując, **przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)**, tj. prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie, potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana lek. Łukasza Poniatowskiego do dalszych etapów postępowania.

Ponadto, ze względu na ogrom eksperymentów i analiz wykonanych nowoczesnymi metodami, nowatorski charakter badań, a także fakt, że najważniejsze wyniki pracy zostały opublikowane jako artykuł w czasopiśmie *Molecular Neurobiology* (IF=4.6, 100 pkt MNiSW), zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy, jeśli tylko spełnia ona kryteria dot. wyróżnień obowiązujące w dyscyplinie nauk medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.