



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Święcickiego 4
60-781 Poznań

tel.: + 48 61 854 66 20
fax: + 48 61 854 66 20
e-mail: vkrajka@ump.edu.pl

Poznań, 22 sierpnia 2019

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej
Magistra Michała Predeckiego

p.t. „*Poszukiwanie biomarkerów genetycznych i biochemicznych o możliwym znaczeniu diagnostycznym i terapeutycznym u chorych z chorobą Alzheimera*”

Choroba Alzheimera (chA) jest najbardziej powszechną formą demencji, a jej sporadyczne późne formy stanowią 95% wszystkich diagnozowanych przypadków. Diagnoza oparta jest najczęściej na ocenie beta-amyloidu (A β) i wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych tworzonych przez białko Tau. Ostatnie badania wskazują jednak, że największym czynnikiem ryzyka szczególnie późnych postaci charakterystycznych dla zaawansowanego wieku pacjentów są niektóre warianty apolipoproteiny E kodowanej przez gen *APOE*. Recenzowana praca, której jednym z celów była ocena polimorfizmów z klastra *APOE* dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy.

Rozprawa przedstawiona jest w formie cyklu trzech tematycznie powiązanych prac, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Zarówno Doktorant jak i wszyscy współautorzy zgodnie z Rozporządzeniem MNiSzW z dnia 19 stycznia 2018 Rozdział 1, § 4/2, złożyli stosowane oświadczenia dotyczące ich udziału w poszczególnych publikacjach.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej, poza wspomnianą wyżej analizą polimorfizmów klastra *APOE*, była próba ich powiązania z czynnikami stresu oksydacyjnego i poziomem biotiotoli, czyli jak to określił Doktorant powiązania czynników genetycznych i biochemicznych. Biorąc pod uwagę przeprowadzoną przez Doktoranta analizę niektórych miRNA można by mówić także o czynnikach epigenetycznych.

OKK

We wprowadzeniu do rozprawy, opartym o 54 publikacje, Doktorant opisuje epidemiologię chA, oraz czynniki genetyczne będące tematem rozprawy, czyli warianty genu *APOE*. Autor przedstawia krótko znaczenie miRNA w chA z jednoczesnym uzasadnieniem wyboru miR-107 i miR-650 do dalszych badań. Wskazuje także na istotną rolę stresu oksydacyjnego w chA, a szczególnie na znaczenie poziomu glutationu oraz homocysteiny. W tym monotematycznym wprowadzeniu, zabrakło jednak szerszego omówienia biotiolu, stanowiących istotny element rozprawy.

Dobór prac, które mają być podstawą do nadania stopnia doktora jest właściwy a poszczególne elementy układają się w logiczną całość.

Pierwsza publikacja cyklu (rozdział w monografii) jest częściowo rozwinięciem wprowadzenia i omawia molekularne podłoże chA z uwzględnieniem wariantów *APOE*, oraz możliwości ich wykorzystania do badań przesiewowych pacjentów. Część eksperymentalna tej publikacji przedstawia zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę qPCR, która może znaleźć zastosowanie do analizy genotypu *APOE* w laboratoriach badawczych. Szkoda, że Kandydat w podsumowaniu tego artykułu pisząc o metodzie qPCR i jej zaletach takich jak niski koszt i skrócony czas oczekiwania na wynik, nie wyjaśnił na czym polegała wprowadzona przez Niego modyfikacja.

Kolejna praca cyklu dostarcza unikalnych informacji na temat korelacji pomiędzy wariantami *APOE*, w tym patogennego allelu E4 i obniżonym stężeniem apoE oraz miRNA. Tę jak i kolejne publikacje poprzedza opis głównych tez i wyników przedstawionych w poszczególnych pracach. W tym omówieniu Doktorant uzasadnia bardziej szczegółowo analizę miR-650 w chA, czego nie przedstawił we wprowadzeniu do rozprawy. Przeprowadzone badania wykazały, że najniższe poziomy miR-650 występują u pacjentów z chA, którzy są nosicielami allelu *APOE E4*. Z kolei poziom miR-107 ulegał obniżeniu u wszystkich pacjentów bez względu na wariant *APOE E4*. Dostarczenie tych danych stanowi oryginalne osiągnięcie Doktoranta i może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych biomarkerów chA.

Celem ostatniej publikacji cyklu było określenie powiązania między polimorfizmem genów klastra *APOE* i jak to określa Doktorant czynnikami biochemicznymi, czyli produktami białkowymi tych genów oraz poziomem GSH i homocysteiny. Ta praca dostarcza informacji o nowym, nieopisanym do tej pory niezależnym od *APOE E4* wpływie polimorfizmów genów

klastra *APOE*, *TOMM40*'650-G oraz *APOC1*'638-G na ryzyko ujawnienia się chA. Doktorant wykazał, że u osób z genotypem '523-S/S występują niższe stężenia GSH w osoczu krwi, co może wiązać się wyższym poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Ponadto u osób z tym genotypem chA ujawnia się w młodszym wieku z powodu indukcji stresu oksydacyjnego. Ważną obserwacją było też stwierdzenie, że poziom homocysteiny w osoczu powyżej 15µM predysponuje do rozwoju chA. Uszkodzenia oksydacyjne były już tematem podejmowanym przez Zespół Pracowni Neurobiologii, czego efektem jest szereg publikacji z udziałem Doktoranta. Z uwagi jednak na czasochłonne oznaczenie poziomu 8-oxo-dG w limfocytach krwi obwodowej zaproponowano analizę w osoczu krwi tego markera z wykorzystaniem techniki ELISA oraz enzymu zaangażowanego w jego naprawę glikozylazy 8-oksoguaniny, OGG1 (w wykazie skrótów błędnie nazwanej glikozylazy 8-oksoguanininy). Na uznanie zasługuje fakt wykazania możliwości wykorzystania szybkiej metody ELISA oraz markerów uszkodzeń oksydacyjnych do oznaczeń przesiewowych w osoczu krwi.

Interpretacja i omówienie wyników jest poprawne, ale zdarzają się pewne uproszczenia szczególnie w opisie powiązania glutationu z homocysteiną. Np. na stronie 11 Doktorant, pisze, że homocysteina ulega przemianie do metioniny i cysteiny a ta z kolei przekształca się do GSH. Cysteina może zostać wykorzystana do wielu innych przemian, a więc jej wykorzystanie do syntezy GSH, to przykład jednej z nich.

Pracę kończy „Podsumowanie” będące skróconą kompilacją wyników przedstawionych w publikacjach tworzących monotematyczny cykl. Zabrakło w nim jednak formalnych wniosków, które recenzent ma nadzieję, będą przedstawione w trakcie obrony pracy.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na zamieszczenie jeszcze kilku uwag dotyczących redakcji przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Kandydat w celu pracy pisze, że zamierza identyfikować biomarkery genetyczne i biochemiczne a w uzasadnieniu cyklu prac wskazuje na biomarkery genetyczne i fenotypowe. Te pojęcia nie są tożsame i należałoby je ujednoczyć.

Na stronie 14 niezrozumiałe jest zdanie dotyczące wykorzystania testów statystycznych do wyznaczenia obniżonego stężenia apoE.. Należałoby podać jakie testy zostały wykorzystane i co było podstawą ich wyboru.

Na stronie 15 zabrakło wyjaśnienia pojęcia skali MMSE.

Mimo powyższych uwag Komentarz Doktoranta do przedstawionego cyklu prac jest zredagowany bardzo starannie. Zdarzają się tylko drobne błędy literowe.

Całkowity dorobek Doktoranta jest znaczący. Składa się nań 17 publikacji zarówno oryginalnych jak i poglądowych, w większości opublikowanych w liczących się czasopismach z dziedziny będącej przedmiotem badań zespołu, w którym Doktorant pracuje. Odbyte 2 staże zagraniczne oraz szereg prestiżowych nagród wskazuje na ogromny potencjał naukowy Kandydata.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Doktorant zrealizował badania, które były celem dysertacji. Wszystkie eksperymenty zostały dobrze zaplanowane i przeprowadzone w sposób rzetelny. Przedstawione wyniki są bardzo wartościowe a ich uzyskanie wymagało zarówno dużej wiedzy i bardzo dobrego przygotowania laboratoryjnego, co dodatkowo podnosi jej wartość. Ponadto podkreślić należy konsekwentne dążenie do rozwiązania problemu badawczego.

Praca zawiera elementy nowości i stanowi o indywidualnym wkładzie Doktoranta do piśmiennictwa dotyczącego choroby Alzheimera. Oryginalnym odkryciem tych badań jest wskazanie nowych markerów procesu neurodegeneracyjnego w przebiegu chA takich jak miR107 i miR650 oraz warianty genetyczne klastra *APOE* takie jak *APOC1'638* oraz *TOMM40'650*.

Praca spełnia, więc wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, co pozwala mi wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. K. Marciniowskiego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magistra Michała Predeckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę jakość i zakres pracy wnioskuję o jego wyróżnienie, o ile pozwalają na to obowiązujące przepisy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu
Biochemii Farmaceutycznej

Dr hab Violetta Krajka-Kuźniak