

prof. dr hab. Cezary Żekanowski  
Kierownik Pracowni Neurogenetyki  
Zespół Kliniczno-Badawczy Chorób Zwyrodnieniowych CUN  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

22 sierpnia 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Michała Predeckiego  
"Poszukiwanie biomarkerów genetycznych i biochemicznych o możliwym  
znaczeniu diagnostycznym i terapeutycznym u chorych z chorobą Alzheimer'a"**

Choroba Alzheimer (AD) jest najczęstszą przyczyną otępienia u osób powyżej 65 roku życia. Jak na razie leczenie AD jest wyłącznie objawowe i nie istnieją metody zapobiegania czy opóźniania procesu chorobowego. Szereg badań przedklinicznych i epidemiologicznych powiązało metaboliczne czynniki ryzyka z patogenezą AD. Niemniej mechanizmy molekularne leżące u podłoża wspomnianej zależności nie są w pełni zrozumiałe. Ponieważ tylko ok. 1% wszystkich przypadków AD można przypisać genetycznym czynnikom przyczynowym (mutacje konkretnych genów) rozpoznanie procesów molekularnych wiodących do AD czy wyznaczenie konkretnych markerów biochemicznych i genomowych dla czynników ryzyka AD stanowi niezbędny etap dla opracowania skutecznych metod diagnostyki i leczenia osób z chorobą Alzheimer'a.

Powszechnie występujące warianty genetyczne w *locus APOE* (E2: C112, C158; E3: C112, R158 i E4: R112, R158) są najsilniejszym znanym genetycznym czynnikiem ryzyka AD (związek z łagodnymi otępieniami poznawczymi, a zwłaszcza konwersją do AD, jest mniej wyraźny). Związek ma solidne podstawy, jako że białko APOE wpływa na wiele procesów fizjologicznych istotnych w AD: od metabolizmu cholesterolu, transportu i homeostazy lipidów, poprzez agregację oligomerów Aβ i odkładanie złogów amyloidowych, po mózgowy metabolizm glukozy. Allel *APOE4* w układzie heterozygotycznym zwiększa ryzyko zachorowania ok. 3x, natomiast ok. 14x w homozygotycznym (w porównaniu z nosicielami dwu alleli *APOE3*), a także obniża wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby. Podobnie – choć słabiej – wpływa allel *APOE3*. Zależności mają naturę probabilistyczną, stąd wiele osób z genotypem *APOE4/APOE4* nie rozwija AD. Wskazuje to na oczywistą redundancję procesów biologicznych oraz istnienie czynników ochronnych.

Badania z zastosowaniem sekwencjonowania całego eksomu lub genomu umożliwiły wstępne zidentyfikowanie wielu genów i wariantów (o częstości w populacji niższej niż *APOE*), modyfikujących w różny sposób działanie alleli *APOE* (np. *TREM2*, *TOMM40*, *SORL1*, *APOC1* czy *ABCA7*). Warianty wspomnianych genów wykrywane były wielokrotnie, w niezależnych badaniach asocjacyjnych, co wskazuje że wpływają na patogenezę AD poprzez różne mechanizmy molekularne.

Ryzyko AD modyfikują też czynniki pozagenetyczne, na przykład współwystępowanie u chorych zespołów metabolicznych (MetS), w tym np. otyłości, nadciśnienia, zaburzeń gospodarki lipidowej, czy cukrzycy typu 2. Związek MetS i AD wynika z deregulacji szeregu wspólnych szlaków sygnałowych, w których uczestniczą np.: Wnt, leptyna, angiotensyna. Od niedawna wiadomo też, że powiązanie następuje na poziomie epigenetycznym, poprzez regulacyjne RNA (miRNA) łączące różne elementy szlaków biochemicznych i sygnałowych.



W patogenezie AD istotna jest także płeć biologiczna, przykładowo: kobiety będące nosicielkami *APOE4*, są bardziej podatne na rozwój AD niż mężczyźni nosiciele tego samego allelu. Ponadto konkretny skład mikrobiomu jelitowego nie tylko współwystępuje z chorobą Alzheimera, ale też – jak się przypuszcza - moduluje ryzyko zachorowania na AD, być może w sposób zależny od płci.

Poszukiwanie markerów użytecznych w diagnostyce i – być może – leczeniu choroby Alzheimera jest więc zadaniem trudnym metodologicznie, jak i merytorycznie. Wymienione powyżej elementy złożoności fenotypowej AD oraz skomplikowanej patogenezy (w tym udział współzależnych procesów biologicznych), przekładają się m.in. na trudności w uzyskaniu jednorodnej i odpowiednio licznej grupy badanej, komplikując uzyskiwanie jednoznacznych wyników.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. farm. Michała Prendeckiego *"Poszukiwanie biomarkerów genetycznych i biochemicznych o możliwym znaczeniu diagnostycznym i terapeutycznym u chorych z chorobą Alzheimera"* obejmuje prowadzone przez Autora badania genetyczne, biochemiczne i epigenetyczne, zmierzające do wyodrębnienia i oceny użyteczności praktycznej potencjalnych biomarkerów AD. Wybór ogólnego tematu pracy przez Doktoranta należy ocenić pozytywnie, jako zasadny naukowo i posiadający perspektywę przyszłego przeniesienia wyników do praktyki klinicznej.

Rozprawa jest zbiorem trzech artykułów oryginalnych, zaopatrzonych w spis treści, informację o finansowaniu badań, wykaz stosowanych skrótów, spis publikacji stanowiących rozprawę, omówienie publikacji (z określeniem założenia i celu pracy oraz uzyskanych wyników), streszczenie w języku polskim i angielskim, a także dołączonych trzech wspomnianych artykułów, opinii Komisji Bioetycznej, oświadczenia współautorów oraz życiorysu naukowego Doktoranta.

Pierwszy z artykułów (Prendecki M. et al. – „Normal aging and dementia.”), opublikowany jako rozdział 11. monografii „Update on dementia” pod red. Moretti DV, InTech 2016, łączy elementy przeglądu literaturowego (pierwsze dziewięć stron) oraz artykułu oryginalnego (pozostałe pięć, nie licząc cytowanej literatury). Wszystkie artykuły dotyczą podłoża molekularnego (przede wszystkim genetycznego oraz epigenetycznego) choroby Alzheimera. Spełnione zostały tym samym podstawowe, ustawowe wymogi odnośnie spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Wszystkie artykuły są pracami wieloautorskimi, a dwa z nich zostały opublikowane w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (*Folia Neuropathologica* IF 1.160; *Oncotarget* IF 2016: 5.168). Artykuł nr 3. był cytowany jeden raz (co zrozumiałe, biorąc pod uwagę datę publikacji), pozostałe były jedynie autocytowane. Do rozprawy dołączone są oświadczenia wszystkich współautorów, wskazujące na znaczący, indywidualny wkład Doktoranta przy opracowywaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników poszczególnych prac. Należy zwrócić uwagę, że we wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem (choć nie autorem korespondencyjnym).

W krótkim „Omówieniu cyklu publikacji” Doktorant podaje podstawowe fakty dotyczące epidemiologii choroby Alzheimera, cech fenotypu klinicznego, czynników ryzyka (w tym: wariantów genetycznych *APOE* i genów położonych w pobliżu, miRNA regulujących geny składników  $\alpha$ - i  $\beta$ -sekreazy oraz *APOE*), możliwego znaczenia antyoksydantów i ich metabolitów w patogenezie AD. Następnie mgr Prendecki podaje trzy zasadnicze cele pracy: - określenie częstości wariantów trzech genów (*TOMM40*, *APOE*, *APOC1*) w populacji polskiej – zbadanie czy ryzyko AD

może być związane z posiadaniem przez chorych konkretnych wariantów genetycznych APOE oraz poziomów dwu miRNA (107 i 650) – sprawdzenie czy parametry biochemiczne związane z metabolizmem antyoksydantów i stresem tlenowym mogą być czynnikami ryzyka AD i czy są skorelowane z jednoczesnym posiadaniem wariantów genetycznych *TOMM40* i *APOC1* w populacji polskiej.

W podrozdziale zabrakło syntetycznego przedstawienia liczebności i struktury grup badanych i kontrolnych (tak, jak to jest np. w publikacji nr 3). Ponadto w kontekście liczebności analizowanych grup termin „populacja polska” lepiej byłoby zastąpić konstrukcją „u chorych z populacji polskiej” „u osób zdrowych z populacji polskiej” lub podobnie.

W pierwszej pracy Doktorant analizował grupę neurologicznie zdrowych osób w wieku <60 lat (n=83; w tym 70 kobiet, (84.3%) średnia wieku  $51.9 \pm 7.2$  oraz 13 mężczyzn, średnia wieku  $44.9 \pm 11.7$ ). Do genotypowania powszechnie występujących alleli *APOE* (E2, E3 i E4) zastosował technikę ilościowego PCR, a wyniki potwierdzono sekwencjonowaniem sangerowskim. Jednocześnie, w osoczu krwi obwodowej, oznaczał stężenie białka *APOE* techniką ELISA. W ocenie istotności wyników wykorzystał poprawną metodologię statystyczną, choć zabrakło wyliczenia mocy testów (*power analysis*), co jest istotne zwłaszcza przy niewielkich grupach badanych – uwaga ta dotyczy wszystkich trzech artykułów.

Wyniki genotypowania potwierdziły dane literaturowe rozkładu alleli *APOE* dla różnych populacji europejskich, a korelacja genotypu *APOE* z poziomami białka w osoczu wykazała najwyższe stężenie *APOE* u posiadaczy genotypu *APOE3/APOE3*, a najniższe u osób z genotypem *APOE4/APOE4* (w badanej grupie nie wykryto nosicieli homozygotycznych *APOE2*, co jest spodziewane przy tak małej liczebności grupy badanej). U jednej osoby *APOE2/APOE4* Doktorant zaobserwował zwiększony poziom *APOE* w osoczu (nie jest jednak podane w porównaniu z poziomem w osób z jakim genotypem, wynik nie został ponadto potwierdzony ponownym oznaczeniem). Obserwowane poziomy *APOE* u osób z takim samym genotypem różniły się w zależności od płci osoby badanej. W tabelach nie podano jednak bezwzględnych wartości dla liczebności osób z konkretnym genotypem i płcią, co utrudnia ocenę znaczenia wyników.

Wyniki potwierdzają zasadniczo dane uzyskane dla innych populacji np. zacytowanej przez Doktoranta pracy Rasmussen KL et al. *Ann Neurol.* 2015; 77:301–311 czy tegorocznym uzupełnieniu: Rasmussen KL et al. *Eur Heart J.* 2019 Jun 24. pii: ehz402. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są ciekawe, choć wstępne i wymagające dalszych badań, z zastosowaniem większej grupy osób zdrowych, w wieku poniżej 60 lat, bardziej jednolitej pod względem wiekowym oraz bardziej zrównoważonej pod względem płci biologicznej.

W drugiej pracy Doktorant skoncentrował się na określeniu związku genotypu *APOE*, poziomu osoczkowego *APOE* oraz poziomów dwu miRNA, wytypowanych na podstawie analizy *in silico* (programem miRWalk ver. 2.0; nie podano jednak bliższych wyników, poza wzmianką w Dyskusji) oraz danych literaturowych, wskazujących na ich możliwy udział w procesach neurodegeneracyjnych, w tym związanych z  $\beta$ -amyloidem. Poziomy miRNA w osoczu oznaczano techniką ilościowego PCR w sposób standardowy. Grupa badana obejmowała 196 osób, w tym: 64 chorych z AD (spełniających kryteria NINCDS-ADRDA dla prawdopodobnego AD; w wieku 76.0 lat, 68.8% kobiet), 74 osób zdrowych (bez schorzeń neurologicznych i historii rodzinnej AD, w wieku powyżej 60 lat (średnia 71.4, w tym 78.4% kobiet) oznaczonych skrótem UC, a także 58 osób powyżej 60 r. z z historią

rodzinną AD (jednak bez objawów otępienia i chorób neurologicznych; w wieku 65.5 lat, 70.7% kobiet), oznaczanych w pracy skrótem RC.

Doktorant wykazał, że średnie stężenie APOE jest zmniejszone u osób z AD (o 28.7% w porównaniu do UC oraz 49.2% w porównaniu do RC). Ponadto 62.5% pacjentów AD cechuje obniżone stężenie osoczowego APOE (< 1.315 mg/dl), zaznaczone zwłaszcza w porównaniu do grupy UC. Najniższe poziomy korelowały z genotypem *APOE4/APOE4*, natomiast osoby z genotypem *APOE3/APOE3* cechował najwyższy średni poziom APOE (za wyjątkiem osoby *APOE2/APOE2* z grupy UC). Analiza statystyczna wskazuje, że stężenie osoczowe APOE może być związane z wiekiem pojawienia się pierwszych objawów AD.

Doktorant zaobserwował także tendencję bliską istotności statystycznej zmniejszania się stężenia miRNA-107 u chorych z AD w porównaniu z obiema grupami kontrolnymi (a zwłaszcza z grupą RC). Zaobserwował także możliwy (nadal na poziomie trendu) pozytywny związek niskiego poziomu miRNA-107 z liczbą alleli *APOE4*. Poziom miRNA-107 korelował także negatywnie z wiekiem pojawienia się pierwszych objawów AD, a także ostrością objawów choroby.

Podobne obserwacje Doktorant poczynił dla poziomów miRNA-650, który u osób z AD był średnio najniższy w porównaniu do obu kontroli. Ostrość objawów AD korelowała z niskim poziomem miRNA-650.

Doktorant przedyskutował w świetle wyników własnych i literatury przedmiotu możliwe drogi oddziaływania obu miRNA z procesami istotnymi w patogenezie AD. Nie prowadził jednak badań funkcjonalnych. Badania funkcjonalne, zmierzające do określenia znaczenia i wpływu miRNA-650 w modelu *in vitro* neurodegeneracji są aktualnie prowadzone przez Doktoranta w ramach działań Pracowni Neurobiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i mogą stać się podstawą kolejnej publikacji.

Podsumowując: wyniki uzyskane przez mgr. Predeckiego i przedstawione w publikacji 2 są interesujące, wnoszą pewne nowe elementy do wiedzy o znaczeniu alleli *APOE*, białka apolipoproteiny E oraz epigenetycznych regulatorów procesów komórkowych. Mogą wskazywać kierunek i stanowić podstawę dalszych badań nie tylko epidemiologicznych, lecz i funkcjonalnych, z wykorzystaniem zdecydowanie większych grup osób z chorobą Alzheimera oraz grup osób neurologicznie zdrowych, dając wyniki już statystycznie znaczące.

Trzecia, najbardziej rozbudowana praca obejmuje analizę parametrów biochemicznych związanych z chorobą Alzheimera, przede wszystkim związków chroniących przed reaktywnymi formami tlenu: homocysteiną (Hcy) i glutationem (GSH), a także markerów stresu oksydacyjnego: 8-oxo-2'-deoxyguanozyny (8-oxo2dG) i glikozylazy 8-oxoguaninowej DNA (OGG1). Analiza biochemiczna została uzupełniona genetycznymi badaniami asocjacyjnymi polimorfizmów trzech genów (*APOE*, *APOC1* oraz *TREMM40*). Grupa badana obejmowała łącznie 230 osób: 88 pacjentów AD (jak poprzednio spełniających kryteria NINCDS-ADRDA), 80 osób zdrowych neurologicznie bez historii AD (UC) oraz 62 osoby zdrowe, z historią rodzinną AD (RC). Określenie genotypów badanych genów wykonano metodami opisanymi w literaturze, poziomy OGG1 i 8-oxo2dG wyznaczono techniką ELISA, a Hcy, GSH techniką HPLC/EC.

Doktorant wykazał, że ponad 60% chorych z AD posiada zwiększony poziom Hcy w osoczu (porównując z UC,  $p < 0.01$ , oraz porównując z RC,  $p < 0.001$ ), natomiast zmniejszone poziomy GSH ( $p < 0.01$ , w porównaniu z grupą UC), 8-oxo2dG (w porównaniu z UC  $p < 0.01$ , oraz w porównaniu z RC,  $p < 0.001$ ). Dla badanych genów trzy allele *TOMM40* allel L, allel G *APOC1* rs4420638-G oraz *TOMM40* allel G rs2075650 występowały z częstością większą w grupie AD. W przypadku wariantów



*APOC1* rs4420638-G i *TOMM40* rs2075650-G związek pozostawał istotny statystycznie dla osób nie niosących allelu E4. Nieprawidłowe poziomy Hcy, GSH oraz 8-oxo2dG i OGG1 cechowały przede wszystkim osoby posiadające warianty *TOMM40* rs10524523-S/VL, *APOC1* rs4420638-A oraz *TOMM40* rs2075650-A.

Wyniki wskazują, że badane warianty *APOC1* oraz *TOMM40* (rs2075650) mogą być czynnikami ryzyka AD, powiązanymi z metabolizmem Hcy i GSH oraz mniej sprawną naprawą DNA. Są to wyniki i sugestie interesujące, które znajdują zapewne kontynuację nie tylko w badaniach Doktoranta.

W części polskojęzycznej rozprawy znajdują się parę literówek, obecny jest niekiedy laboratoryjny styl pisania, jest trochę skrótów myślowych, co jednak nie wpływa na ogólną ocenę rozprawy. W angielskojęzycznych artykułach znajdują się również błędy językowe i literówki (np. NINCDS-ADRDRDA), trudno mi jednak globalnie ocenić poprawność językową artykułów.

Podsumowując: stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia podstawowe wymogi formalne stawiane pracom na tytuł doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. **W związku z powyższym zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie magistra farmacji Michała Prendeckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



**IMDIK PAN**  
Zespół Kliniczno-Badawczy  
Chorób Zwyrodnieniowych CUN  
02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5  
tel. 22 608-65-38, 22 608-64-85