



ZAKŁAD PATOMORFOLOGII LEKARSKIEJ

UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

KATEDRA BIOSTRUKTURY

15-269 BIAŁYSTOK, UL. WASZYNGTONA 13,

TEL. 85 7485911, 5945 E-MAIL: patomorfologia.lekarska@umb.edu.pl

KIEROWNIK ZAKŁADU

DR HAB. N. MED. JOANNA RESZEĆ - GIEŁAŻYN

Białystok, dnia 10.07.2023

Dr hab. n. med. Joanna Reszeć - Giełażyn

Zakład Patomorfologii Lekarskiej

Uniwersytetu Medycznego

W Białymstoku

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Marzeny Skrzypa pt. „Metylacja DNA oraz polimorfizmy genetyczne w chorobie Alzheimerera”

Praca wykonana w Uniwersytecie Rzeszowskim pod opieką promotor prof. dr hab. Izabeli Zawlik

Ocena merytoryczna pracy.

Rozprawa doktorska mgr Marzeny Skrzypa porusza bardzo aktualny temat dotyczący diagnostyki choroby Alzheimerera. Jest to choroba cywilizacyjna, neurodegeneracyjna, której wczesne objawy bardzo często są na tyle dyskretne, że niekiedy umykają w rutynowej diagnostyce neurologicznej. Choroba ta objawia się zazwyczaj u pacjentów powyżej 65 r. ż. Jako tzw. postać sporadyczna (ok. 95%), zaś u pacjentów młodszych, tj. poniżej 60 r. ż. choroba ta spowodowana jest znaczącym wpływem zaburzeń genetycznych (familial Alzheimer disease – FAD z udziałem genów takich jak APP, PSEN1, PSEN2).

Choroba Alzheimera charakteryzuje się postępującą demencją oraz zaburzeniami pamięci. Ponadto pojawiają się zaburzenia zachowania, które z czasem uniemożliwiają całkowite funkcjonowanie w społeczeństwie i rodzinie.

W patogenezie choroby Alzheimera charakterystyczne jest odkładanie się białek patologicznych w istocie szarej ośrodkowego układu nerwowego takich jak beta-amyloid oraz białko tau. Powoduje to nieodwracalne zmiany w neuronach istoty szarej (zmiany degeneracyjne komórek wraz z następczą śmiercią neuronów).

Współistnienie chorób ogólnoustrojowych takich jak niewydolność krążenia czy nadciśnienie tętnicze krwi oraz cukrzyca typu 2, hiperlipidemia, mała aktywność społeczna i fizyczna zwiększają zagrożenie rozwojem choroby Alzheimera. Podobnie współistnienie depresji, pourazowe uszkodzenie mózgu oraz niedosłuch mogą przyczynić się do rozwoju zmian otępiennych.

Choroba Alzheimera jest najczęstszą przyczyną zmian demencyjnych u dorosłych. Częstość jej występowania wzrasta wśród osób po 65 r. ż. (65-85 lat i podwaja się średnio co 5 lat). Po 85 r. ż. odsetek chorych na chorobę Alzheimera zmniejsza się na rzecz otępienia naczyniopochodnego.

Objawy choroby Alzheimera nasilają się wraz ze stadium choroby, zaś w stadium zaawansowanym dołączają się takie zaburzenia jak zaburzenia ruchowe, tj. zwiększenie napięcia mięśniowego, spowolnienie ruchowe, nietrzymanie moczu i stolca. Tryb życia zmienia się najpierw na siedzący, zaś w stadium terminalnym choroby pacjent jest już chorym leżącym, często z powikłaniami w postaci odleżyn czy zapalenia płuc, co może stać się bezpośrednią przyczyną zgonu chorego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy oceny metylacji DNA oraz polimorfizmów genowych w chorobie Alzheimera. Temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i istotny z punktu widzenia diagnostyki, szczególnie wczesnej nieinwazyjnej diagnostyki choroby Alzheimera (zważywszy, iż obecnie do badań biochemicznych potrzeba jest pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego metodą wkłucia dolędźwiowego).

Doktorantka we wstępie pracy bardzo dokładnie opisała ogólną charakterystykę choroby Alzheimera, biorąc pod uwagę zarówno aspekty epidemiologiczne jak i patogenezę, diagnostykę oraz terapię zmian otępiennych. Doktorantka przedstawiła podział choroby ze względu na stopień zaawansowania, z uwzględnieniem objawów i możliwości diagnostycznych w poszczególnych fazach choroby. W kolejnych podrozdziałach wstępu Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje mechanizmy

genetyczne, biorące udział w rozwoju choroby Alzheimera, w tym polimorfizm genetyczny czy zmiany epigenetyczne.

Dysertacja posiada typowy układ, zawiera 243 strony, 16 podrozdziałów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz zastosowanych skrótów w pracy doktorskiej, spis tabel, spis rycin oraz spis wykresów. Załączona została także zgoda komisji bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Praca Doktorska zawiera 4 sprecyzowane cele badania, zakończona jest 4 obszernymi wnioskami, z których każdy zawiera bardzo szczegółowe opisy poszczególnych wniosków. Doktorantka zamieściła także rozdział dotyczący ograniczeń (limitacje) związanych z przeprowadzonymi badaniami oraz rozdział Dyskusja, w którym zamieściła 212 pozycji literatury dotyczącej tematu badania. Większość z nich to publikacje z ostatnich 5 lat.

Ocena metodologii pracy.

Doktorantka szczegółowo opisała prace badawcze, opisała badany materiał biologiczny (krew pełna oraz płyn mózgowo-rdzeniowy). Na uwagę zasługuje bardzo dobre przygotowanie materiału do badań genetyczno-molekularnych. Szczegółowo została opisana grupa badana, włącznie z określeniem kryteriów włączenia i wyłączenia z grupy badanej oraz grupy kontrolnej.

W podrozdziale Metody Doktorantka bardzo dokładnie opisała zastosowane metody badawcze, w tym izolację genomowego DNA z krwi pełnej, opis zastosowanych testów ELISA do określenia poziomu białek typowych dla choroby Alzheimera (B – amyloid 1-40, B- amyloid 1-42, ufosforylowane białko Tau) metody PCR do amplifikacji wybranych fragmentów DNA, PCR – RLFP dla polimorfizmu typu SNP wybranych genów APCE, APOC1, PC2 z elektroforezą kapilarną dla genu TOMM40, PCR dla polimorfizmu w genie ACE.

Doktorantka zawarła także opis zastosowanych metod elektroforezy żelowej, kapilarnej, metod stosowanych w badaniach poziomu względnej metylacji DNA (w tym bisulfidacji i oczyszczania DNA), reakcje qMSP – PCR w ocenie poziomu względnej metylacji w promotorach wybranych genów. Ponadto doktorantka opisała metody statystyczne zastosowane w ocenie wyników przeprowadzonych badań.

Ocena uzyskanych wyników badań dla nauki i praktyki.

Wyniki opisane są w 9 podrozdziałach i przedstawiają w sposób bardzo szczegółowy osiągnięte przez Doktorantkę rezultaty zastosowanych metod badawczych.

Doktorantka przedstawiła charakterystykę grupy badanej i kontrolnej. Grupę badaną stanowiło 161 osób z otępieniem typu alzheimerowskiego oraz 62 osoby bez otępienia stanowiących grupę kontrolną. Klasyfikację przeprowadzono na podstawie wstępnej diagnozy testów ELISA i testu MMSE. 53 osoby z zdiagnozowanym MCI, 108 prób od pacjentów z demencją typu AD: ADI – 50 prób, ADI – 48 prób, ADIII – 10 prób.

Doktorantka w bardzo szczegółowy i analityczny sposób przedstawiła uzyskane wyniki badań z zastosowaniem wykresów i tabel.

Wyniki badań uważam za bardzo ważne i znaczące w rozwoju nowych metod diagnostycznych, szczególnie nowych postaci choroby Alzheimerera. Wyniki przedstawionych badań pozwoliły na osiągnięcie bardzo ważnych i interesujących wniosków końcowych, które mogłyby pozwolić na odkrycie nowych skutecznych markerów genetycznych uzyskanych metodami mniej inwazyjnymi (z krwi pełnej, surowicy lub osocza). Markery te mogłyby służyć do określenia predyspozycji i możliwych szans wystąpienia objawów otępienia jeszcze przed wystąpieniem pełnoobjawowej choroby.

Wnioski z przeprowadzonych analiz pozwoliły na wyodrębnienie genotypów genów APOE, APOE 1, genu TOMM4O (wyodrębniono typy alleli predysponujących do rozwoju choroby Alzheimerera), genu ACE (wyodrębniono allele zwiększające szanse wystąpienia choroby Alzheimerera). Doktorantka wysunęła także bardzo znaczące wnioski co do występowania polimorfizmów w podgrupie osób młodych (w tym allele genu APOE, APOC1, genu TOMM4O oraz genu ACE). Doktorantka analizując podgrupę osób młodych stwierdziła, że dodatkowymi czynnikami wpływającymi na rozwój choroby Alzheimerera mogłyby być, oprócz podłoża genetycznego, choroby współistniejące w tym depresja i hiperlipidemia. Wnioski wynikające z zależności pomiędzy polimorfizmami w wybranych genach a stopniem zaawansowania choroby otępiennej są bardzo szczegółowo opisane w podrozdziałach. Natomiast wnioski wynikające z zależności pomiędzy polimorfizmami w wybranych genach w podgrupie osób młodych pokazują istotność zależności genotypów i polimorfizmu badanych genów (w typie E3/E3 w genie APOE vs genotyp L/L w genie TOMM4O oraz genotypu E4/E4 w genie APOE vs genotyp L/L w genie TOMM4O). Ma to duże znaczenie w typowaniu predyspozycji do rozwoju choroby Alzheimerera w młodym wieku. Doktorantka zamieściła także istotne wnioski dotyczące analizy poziomu względnej metylacji w promotorach badanych genów i ich względnych polimorfizmów (3 podtypy). Bardzo istotnym w praktycznym

zastosowaniu wydaje się być wynik pokazujący, że wraz z wzrostem poziomu metylacji w promotorze genu APOE (hipermetylacji) maleje stężenie białka całkowitego hTau. Taki wynik, istotny statystycznie, Doktorantka otrzymała w stadium poprzedzającym chorobę Alzheimera.

W analizie pomiędzy poziomem metylacji w promotorze genu TOMM40 i stężeniem białka fosforylanowego – pTau Doktorantka zauważyła, że wraz ze wzrostem metylacji w promotorze genu TOMM40 (hipermetylacji) wzrasta stężenie białka pTau. Tę zależność Doktorantka otrzymała również w zestawieniu dla stadium otępienia typu MCI (łagodne zaburzenie poznawcze).

Wnioski z analizy zależności pomiędzy poziomem względnej metylacji w promotorach wybranych genów, ich polimorfizmów a czynnikami takimi jak wiek, obecność depresji, nadciśnienia tętniczego, podniesionych stężeń lipidów we krwi pokazują ich wpływ na rozwój lub pogłębienie stadium otępienia alzheimerowskiego. Doktorantka w rozdziale Dyskusja porównała otrzymane wyniki badań przedstawionych w najnowszej literaturze. Wykazała się doskonałą znajomością zagadnienia, przedstawiła argumentację potwierdzającą słuszność stawianych tez oraz wyciągniętych wniosków. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę korelują z wynikami przedstawionymi przez innych autorów. Doktorantka dyskutując z dostępnymi w literaturze wynikami badań przedstawia wiele istotnych aspektów przeprowadzonego badania, między innymi przedstawia konkretne genotypy, polimorfizmy genowe oraz metylacje promotorów genów, które wg otrzymanych wyników badania i zgodnie z danymi literaturowymi, wielokrotnie zwiększają możliwość rozwoju choroby Alzheimera zarówno w postaci sporadycznej jak i postaci uwarunkowanej genetycznie. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób logiczny chronologicznie co do uzyskanych wyników badań oraz porównuje uzyskane wyniki badań tłumacząc zbieżności lub rozbieżności do danych literaturowych.

Bardzo ważnym rozdziałem jest rozdział Limitacje, w którym Doktorantka przedstawia ograniczenia związane z doбором grupy badawczej, zastosowanych metod, czy uzyskanych wyników. W ramach piśmiennictwa zawarty jest opis publikacji zgodny z tematem rozprawy.

Po zapoznaniu się z tematem pracy doktorskiej mgr Marzeny Skrzypa oceniam ją bardzo dobrze. Jest to obszerna i szczegółowa analiza profili molekularnych mogących mieć wpływ na rozwój i progresję choroby Alzheimera. Różnorodność metod zastosowanych w badaniu, dobór grupy kontrolnej i badanej, opis szczegółowy uzyskanych wyników oraz logicznie wyciągnięte wnioski z badania

stanowią niewątpliwy atut dysertacji. Na uznanie zasługuje szczegółowość opisu zastosowanych metod, co potwierdza dogłębną znajomość metod biologii molekularnej w badaniach medycznych, zastosowanych przez Doktorantkę. Liczne szczegółowe wykresy oraz tabele znacznie ułatwiają poznanie uzyskanych wyników badań.

Praca mgr Moniki Skrzypa jest napisana w sposób odpowiadający pracy doktorskiej, przedstawione wyniki badań i zawarte wnioski są przedstawione trafnie i logicznie.

Recenzowana praca doktorska wymaga od Doktorantki nie tylko bardzo doskonałej znajomości metod biologii molekularnej, ale także wiedzy dotyczącej patogenezы, diagnostyki i leczenia choroby Alzheimera. W odniesieniu do pracy nasuwają mi się 2 pytania do Doktorantki:

- 1) Jakie możliwości praktycznego zastosowania mogłoby mieć oznaczanie genów predysponujących do choroby Alzheimera u pacjentów poniżej 60 roku życia, u których w wywiadzie stwierdzono występowanie rodzinnej postaci choroby.
- 2) Rozważenie wykonania analizy badań genetyczno – molekularnych przedstawionych w dysertacji w tkance mózgowej zabezpieczonej od pacjentów zmarłych z chorobą Alzheimera (badanie zarówno retrospektywne jak i prospektywne na tkance zabezpieczonej w procesie autopsji do blochków parafinowych lub/i zamrożonej w – 80 stopni C) i porównanie uzyskanych wyników z obrazem morfologicznym istoty szarej.

W podsumowaniu stwierdzam, iż praca doktorska mgr Marzeny Skrzypa spełnia warunki określone w art. 13 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami). Jak również stosowne zapisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Rzeszowskiego z prośbą o dopuszczenie mgr Marzeny Skrzypa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Zakładu Patomorfologii Lekarskiej UMB

dr hab. n. med. Joanna Reszeć - Giełżyn