



Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎: (+12) 664-53-73
E-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pana magistra **Macieja DULEWICZA** pt.

*"The assessment of selected proteins related to synaptic plasticity in
Alzheimer's Disease"*

Przedstawiona do oceny dysertacja jest bardzo solidnym, pod względem merytorycznym i edytorskim, obszernym opracowaniem dotyczącym wybranych białek biorących udział w procesie plastyczności i transmisji synaptycznej, których dysfunkcja, może być jedną z przyczyn choroby Alzheimera i zaburzeń procesów poznawczych. Praca doktorska jest podsumowaniem pięciu oryginalnych, współautorskich publikacji z listy JCR, dwóch przeglądowych i trzech eksperymentalnych o wysokim współczynniku oddziaływania (łącznie IF 28.268, 700 pkt. MEiN), w których mgr Maciej Dulewicz jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Dołączone do rozprawy doktorskiej pisemne oświadczenia współautorów, potwierdzają dominujący (od 65-75%) udział doktoranta w ich powstaniu. Wszystkie prace są efektem realizacji projektu POWER Interdyscyplinarne Programy Studiów Doktoranckich, finansowanego przez Unię Europejską. Wyżej wymienione fakty są w zasadzie najlepszą, bardzo pozytywną oceną dysertacji Pana mgr. Dulewicza. Projekt bowiem, zanim został zaakceptowany do finansowania musiał uzyskać bardzo pozytywne oceny międzynarodowych ekspertów, podobnie jak i publikacje, które są efektem jego realizacji, a będące podstawą dysertacji.

Prezentowane wyniki dotyczą niezwykle ważnych zagadnień związanych z podłożem choroby Alzheimera, będącej od kilkadziesiąt lat przedmiotem badań wielu laboratoriów na świecie. Wystarczy tylko podać kilka cyfr i faktów, aby potwierdzić trafny, acz trudny wybór tematu badań przez doktoranta. Mimo, iż w ostatnich 30 latach przeprowadzono

około 200 prób klinicznych, nowych specyfików, to praktycznie ciągle nie ma leków, które mogłyby zapobiegać, zatrzymać czy leczyć tę najcięższą formę demencji, dotykającą ponad 50 milionów ludzi na całym świecie, a liczba ich ciągle rośnie. Zatem każda próba badawcza zbliżająca nas do wyjaśnienia choroby Alzheimerera jest niesłychanie cenna i godna szczególnej uwagi. **Podjęcie tego tematu uważam za jedną z wielu mocnych stron doktoratu Pana Macieja Dulewicza.** Rozpoczyna go dobrze przemyślany, logicznie napisany wstęp, który wprowadza czytającego w badane zagadnienia. Autor z charakterystyczną dla siebie swadą naukową pisząc cyt. *“... AD mechanisms are still unknown, which is one of the biggest challenges for modern neuroscience and medical diagnostics.”* zachęca do dalszego czytania. Omawia objawy patologiczne towarzyszące chorobie Alzheimerera, szczególnie udział białek β amyloidu i Tau, które toksycznie działają na aktywność synaptyczną. Opisuje metody diagnostyczne stosowane w rozpoznaniu tej choroby i łagodnych zaburzeń poznawczych, by w końcu przejść do omówienia stosowanych biomarkerów w wykrywaniu tych dysfunkcji. Ponieważ celem pracy mgr Macieja Dulewicza jest badanie udziału białek synaptycznych w patologii choroby Alzheimerera, w kolejnych rozdziałach wprowadzenia, autor opisuje mechanizm synaptycznej plastyczności, kończąc jednoznacznym, słusznym stwierdzeniem, że ulega ona zaburzeniu w warunkach patologicznych, wskazując na rolę tych dwu kluczowych białek β amyloidu i Tau - markerów zachodzących zmian. Ale, to nie one są przedmiotem badań doktoranta. Wymienia i omawia inne synaptyczne biomarkery, mogące służyć jako „sygnaliści” patologicznych zmian. Jednym z nich jest neurogranina (Ng), małe postsynaptyczne białko, biorące udział w regeneracji synaps, procesach LTP i LTD. Spadek jego poziomu u pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimerera, podkreśla słusność jego wyboru do dalszych badań. Ponownie, charakterystycznie dla autora kończy on: cyt. *„Currently the measurement of Ng in CSF is considered as one of the most promising synaptic biomarkers.”* Drugim badanym białkiem jest błonowy receptor neuronalnej pentraksyny (NPTXR), obecny w wielu strukturach i komórkach mózgowia. Także w przypadku tego białka, istnieją dowody potwierdzające jego spadek w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z Alzheimerem. Na bazie doniesień naukowych ostatnich 5 lat, wskazujących udział lipidów w chorobie Alzheimerera, doktorant przedstawia kolejny biomarker, białko wiążące kwasy tłuszczowe 3 (FABP3), który jako ostatni został przez autora wybrany do zaplanowanych badań eksperymentalnych. Wstępne rozważania, oparte o bogato cytowaną literaturę ostatnich lat i dodatkowo ilustrowane czytelnymi schematami, kończy bardzo jasna i

zdecydowana konkluzja autora, będąca jednocześnie hipotezą roboczą dysertacji, iż synaptyczna degeneracja jest jednym z pierwszych sygnałów choroby Alzheimera, a jej markery mogą mieć zastosowanie kliniczne. **Ciekaw jestem, co autor myśli o innych hipotezach, np. tej mówiącej, że choroba Alzheimera to przewlekła choroba autoimmunologiczna atakująca mózg, w której beta amyloid, jako przekaźnik układu odpornościowego, źle rozpoznaje „wroga” i niszczy własne komórki?** Jasno i logicznie postawiony cel pracy sprowadza się do analizy ilościowej wybranych białek, ich potencjalnego zastosowania w diagnozowaniu choroby Alzheimera i łagodnych zaburzeń poznawczych. Jego realizacja oparta została na określeniu zmian stężenia wybranych białek, również w stosunku do siebie u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Wpływ badanych białek i klasycznych biomarkerów na zaburzenia poznawcze doktorant oceniał testami neuropsychologicznymi. Dokonał też analizy diagnostycznej biorąc pod uwagę udział białek w plastyczności synaptycznej, a także bioinformatycznej oceny wzajemnego związku między procesami biologicznymi synaptycznej patologii w chorobie Alzheimera.

Badania prowadzone były na wybranych, zgodnie z przyjętymi międzynarodowymi kryteriami, pacjentach dotkniętych chorobą Alzheimera i grupie kontrolnej. Analizy biochemiczne wybranych białek prowadzone były w płynie mózgowo-rdzeniowym, odpowiednio przygotowanym i zgodnie z zatwierdzonymi procedurami, klasyczną metodą ELISA, oraz technologią multiplexingu xMAP na platformie Luminex 200. Zarówno metody badawcze, jak i statystyczna analiza otrzymanych wyników nie budzą zastrzeżeń. **Można by tylko uściślić czas doby, w której pobierany był płyn mózgowo-rdzeniowy, co wiąże się z pytaniem, czy badane białka wykazują okołodobowy profil swojej aktywności, a jeśli tak, to czy mogłyby to wpływać na otrzymane wyniki?**

W pierwszej publikacji cyklu składającego się na dysertację autor na podstawie szerokiego przeglądu literatury z zastosowaniem meta-analizy określił, które z białek zależnych wapniowo-kalmodulinowo, mogą być biomarkerem choroby Alzheimera. Wyniki przeprowadzonych analiz wielu publikacji i liczby badanych osób, jednoznacznie wskazały na wzrost poziomu białka neurograniny (Ng) i Visin like protein 1 (VILIP-1), choć tego drugiego w mniejszym stopniu u pacjentów z Alzheimerem w stosunku do grupy kontrolnej. Stężenie tych białek było podwyższone w pierwszych stadiach choroby i zmieniało się wraz z postępem choroby. Ten podwyższony poziom Ng w płynie mózgowo-rdzeniowym, autor tłumaczy zaburzeniami sygnalizacji synaptycznej, które występują wcześniej niż zmiany w cytoplazmie neuronów zależne od białka wrażliwego na wapń. Meta-analiza pacjentów z

patologicznym β amyloidem, także wykazywała podwyższony poziom Ng. Wyniki te sugerują i jest to konkluzja pierwszej publikacji, że Ng może być dobrym markerem wczesnego rozpoznania zaburzeń w synaptycznej transmisji spowodowanej nagromadzeniem beta amyloidu w przestrzeni synaptycznej, zwiastującym chorobę Alzheimera.

Założeniem badań trzeciej publikacji była sugestia, że rozwojowi choroby Alzheimera towarzyszy zaburzenie równowagi kwasów tłuszczowych i lipidów. Wyznacznikiem tej równowagi jest drugi badany biomarker, białko wiążące kwasy tłuszczowe 3 (FABP3), którego wyższy poziom obserwowano w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z Alzheimerem i łagodnym zaburzeniem poznawczym, choć nie było statystycznie istotnej różnicy między tym łagodnym zaburzeniem, a grupą kontrolną. A zatem i ten biomarker, choć tylko pośrednio, może wskazywać na neuropatologię synaptyczną.

Publikacja czwarta, jest logiczną konsekwencją poprzedniej, a podyktowana została, jak sam autor pisze, pewnym niezadowoleniem („złością naukową”) z wyników tej ostatniej. Ciągłe bowiem brakowało markera bezpośrednio związanego z plastycznością synaptyczną. Takim wg autora i słusznie, który lepiej opisuje zaburzenia synaptyczne jest stosunek ilości neurograniny (Ng) do liczby receptora neuronalnej pentraksyny (NPTXR). U osób z chorobą Alzheimera, ta korelacja jest ujemna, co oznacza mniej neurotransmitera, więcej receptorów. To pierwsze tego typu porównawcze badania, które zdaniem autora i słusznie lepiej obrazują synaptyczną patologię w chorobie Alzheimera.

W ostatniej pracy mgr Dulewicz na podstawie analizy bioinformatycznej z wykorzystaniem Gene Ontology (GO), dokonał oceny zależności między biologicznymi procesami patologii synaptycznej choroby Alzheimera, funkcjami molekularnymi, a zmianami stężenia białek, także tych wcześniej badanych, jako wskaźnikami patologicznych zmian synaptycznych. Analiza wykazała, że β amyloid i białko Tau, ale także te badane przez doktoranta neurogranina i białko receptorowe pentraksyny, zaangażowane są w dwa synaptyczne procesy: chemiczną transmisję i sygnalizację transsynaptyczną.

Cześć merytoryczną pracy kończy kilku punktowa, bardzo jasna konkluzja, będąca powtórką wcześniejszych cząstkowych wniosków omawianych prac. Autor zwraca wyraźnie uwagę, że najwyższą wartość diagnostyczną w badanych próbkach wykazuje stosunek receptora pentraksyny do neurograniny. Najniższą natomiast białko wiążące kwasy tłuszczowe 3, co wynika z jego pośredniego udziału w plastyczności synaptycznej.

Niezwykle cennym osiągnięciem dysertacji, które związane było z dużym nakładem pracy, są wyniki analizy bioinformatycznej. Pokazała ona udział badanych białek w wspólnych szlakach procesów synaptycznych, co daje nowe spojrzenie i możliwości do lepszego, pełniejszego i „głębszego”, jak pisze autor zrozumieniu mechanizmów biologicznych choroby Alzheimera.

Praca oznaczona, jako druga w dołączonym do dysertacji wykazie, nie została w szczególności omówiona, gdyż dotyczy przeglądu aktualnej wiedzy na temat ewolucji biomarkerów stosowanych w diagnostyce choroby Alzheimera. Część informacji zawartej w tej pracy autor wykorzystał we wstępie pracy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam, że Pan mgr Maciej Dulewicz w przedstawionej dysertacji osiągnął zamierzone cele. Wynikami swojej pracy, będącej efektem logicznie zaplanowanych, a następnie konsekwentnie wykonanych badań i analiz bioinformatycznych, znacząco uzupełnił wiedzę dotyczącą nowych biomarkerów dysfunkcji synaptycznej, mogących być sygnałem wczesnych zmian towarzyszących chorobie Alzheimera, czy łagodnym zaburzeniom poznawczym. Wyniki te mogą być zatem dobrym zaczątkiem, zmierzającym do rozwoju nowych metod terapeutycznych, które mogą zapobiegać, zwalniać, zatrzymywać, a w najbardziej optymistycznej i oczekiwanej perspektywie, leczyć tą najcięższą formą demencji.

Do pracy dołączone są publikacje będące podstawą dysertacji, a także lista 7 dodatkowych oryginalnych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF=38.196, 980 pkt. MEiN) publikacji naukowych, doniesień konferencyjnych, w których mgr Maciej Dulewicz jest współautorem. **Imponujący dorobek naukowy, biorąc pod uwagę początek kariery naukowej mgr. Dulewicza, uzupełnia bogata lista odbytych międzynarodowych staży i udział w szkołach naukowych.**

Praca napisana jest w języku angielskim bez rażących błędów edytorskich, choć wyjaśnienia wymaga liczba badanych osób, która wg autora wynosiła **70, ale suma kobiet i mężczyzn daje 73, a w rozbiciu na poszczególne badane grupy wynosi 71?** – str. 27. Poza tym pomyłona (niewłaściwa) jest **numeracja Figury 1 i Figury 4 w tekście – str. 32 i brakuje odnośników w tekście do Figur 11-21.**

Te drobiazgi nie mają jednak wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną dysertacji Pana mgr. Macieja Dulewicza.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t. j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.) i zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr. Macieja DULEWICZA do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę znaczenie podjętego przez doktoranta tematu badań, otrzymane bardzo jednoznaczne wyniki wskazujące na 3 nowe biomarkery synaptycznej dysfunkcji w rozpoznaniu choroby Alzheimera oraz to że wszystkie wyniki opublikowane zostały w renomowanych czasopismach naukowych, a także że praca wykonywana była w ramach ocenianego europejskiego projektu, uważam dysertację Pana mgr Macieja Dulewicza za wyróżniającą.

Kraków dnia 23 października 2022.

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski