



Kraków, 13.11.2024

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej

Pana lek. Łukasza Adriana Poniatońskiego

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

Promotor: dr hab. n. med. Ilona Joniec_Maciejak
Promotor pomocniczy: dr n. med. Adriana Wawer

Praca doktorska Pana lek. Łukasza Adriana Poniatońskiego, będąca przedmiotem niniejszej recenzji, opiera się na badaniu skuteczności potencjalnej, nowej terapii w chorobie Parkinsona, opartej na celowaniu w mechanizmy neurotroficzne, przeciwzapalne oraz immunomodulujące powiązane z progranuliną (PGRN). Białko to wykazuje ekspresję na powierzchni neuronów oraz nieaktywnego mikrogleju, nie obserwuje się natomiast ekspresji PGRN na powierzchni astrocytów oraz na ependymocytach. Co więcej, PGRN stanowi istotny czynnik immunomodulujący reakcje neurozapalne, wykazując działanie przeciwzapalne oraz hamuje aktywność mikrogleju. Mutacja w genie kodującym białko PGRN jest związana z predyspozycją do wystąpienia otępienia czołowo-skroniowego (FTD), ale także – jak Autor słusznie sugeruje – potencjalnie innych chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, w tym choroby Alzheimera i Parkinsona.

Przedmiotem badań zawartych w niniejszej pracy była zmodyfikowana cząsteczka PGRN o nazwie Attsttrin, która cechuje się odpornością przy ekspozycji na enzymy proteolityczne rozszczepiające PGRN, co pozwala zachować powinowactwo do inicjujących różne ścieżki przekazywania receptorów TNFR1 oraz TNFR2, a także uniknąć efektów biologicznych charakterystycznych dla działania cytokin i czynników wzrostu.



Przesłanką dla zwrócenia uwagi na Attstrin w kontekście badania właściwości neuroprotektoryjnych, były opisane badania postulujące potencjał tej cząsteczki jako innowacyjnego leku o właściwościach przeciwzapalnych, do stosowania w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) czy choroby zwyrodnieniowej stawów, właśnie poprzez bezpośrednie wiązanie się z receptorami TNFR1 i TNFR2, równoległe z działaniem antagonistycznym względem czynnika TNF-alfa.

Celem pracy doktorskiej była ocena wpływu bezpośredniego, bilateralnego domózgowego podania Attstrin, w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona, opartym o podanie neurotoksyny MPTP u myszy. W ramach tak postawionego celu Autor założył:

- zglebienie farmakologicznych mechanizmów działania Attstrin;
- zoptymalizowanie alternatywnej metody podania związku, obejmującej bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję do mózgu;
- zweryfikowanie czy stosowanie Attstrin może być potencjalnie skuteczne w terapii choroby Parkinsona poprzez zakładane działanie neuroprotektoryjne związku w modelu zwierzęcym;
- wykazanie, na bazie skuteczności działania Attstrin, czy rokuje on dla rozwoju w przyszłości nowych, celowanych terapii neuroprotektoryjnych w praktyce klinicznej;

Powyższe cele zostały ujęte przez Autora w nieco innej kolejności, jednak zdaniem recenzenta, właściwa kolejność jest raczej od zagadnień metodycznych i badania mechanizmu do implikacji skuteczności działania Attstrin i jego potencjału translacyjnego, co zresztą zostało odzwierciedlone w pracy eksperymentalnej.

Układ rozprawy doktorskiej jest klasyczny, praca została napisana w języku polskim. Zawartość pracy została podzielona na **Wstęp** (str. 54 – 143, podzielony na dwa główne rozdziały, poświęcone chorobie Parkinsona oraz progranulinie), **Założenia i cele pracy** (str. 144 – 145), **Materiał i metody** (str. 146 – 170), **Wyniki** (str. 171 – 323) oraz **Dyskusję** (str. 324 – 359) i **Wnioski** (str. 360). Całości pracy dopełnia imponujący wykaz **1140 pozycji piśmiennictwa** (str. 361 – 422), wykazy stosowanych skrótów, rycin, tabel oraz obowiązkowe streszczenia w języku polskim i angielskim.

Jak widać z powyższego zestawienia, praca doktorska charakteryzuje się ponadprzeciętną objętością i liczy łącznie 422 strony (nie uwzględniając załączonych na końcu skanów opinii komisji etycznej czy raportu z procedury antyplagiatowej). Muszę przyznać, iż będąc zwolennikiem bardziej syntetycznego prezentowania wyników w pracach doktorskich, początkowo podchodziłem do zgromadzonego w ten sposób materiału z nieufnością. Lektura pracy rozwiała jednak te wątpliwości. Tekst czyta się dobrze, choć oczywiście przy tak dużej objętości nie sposób ustrzec się drobnych błędów edytorskich czy pewnych uproszczeń.



Przykładem jest choćby różna forma rodzajnika w przypadku odnoszenia się do Attastrin w zdaniach złożonych lub następujących po sobie, określenie SEM (Standard Error of Mean) jako błędu standardowego (poprawnie: błąd standardowy średniej), niekiedy pewne kolokwializmy, jak na str. 55, 111 czy 346 – „autor odwołuje się do opisów przedstawionych **przez takie postacie jak...**” „**przeważna śmierć neuronów**” „podania **na modelu** choroby Parkinsona”.

Bynajmniej nie przywołuję tych przykładów z chęci udowodnienia braków edytorskich w niniejszej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie – tak nieliczne potknięcia językowe na ponad 400 stronach tekstu (sic!) świadczą bardzo dobrze o jakości rozprawy doktorskiej i starannym przygotowaniu jej przez Autora. Jedyna sugestia z mojej strony dotyczy opisu wyników, gdzie niepotrzebnie – w mojej opinii – Autor za każdym razem opisowo odnosi się do negatywnych wyników („nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji / poziomie stężeń...” itp.). O ile taki zbiorczy zapis jest uzasadniony w przypadku analiz, w których nie wykazano żadnych zmian, to wydaje się zbędny w przypadku wyników, gdzie zaobserwowane statystycznie znamienne różnice, które stanowią o późniejszych wnioskach (w takim przypadku zbędne jest opisywanie pozostałych, negatywnych zmian, które nie są przesłanką konkluzji). Podobnie, na wielu rycinach pozostawiono w opisie całe spektrum wzajemnych relacji pomiędzy grupami w kontekście ich poziomu znamienności statystycznych, podczas gdy często jedynie nieliczne grupy wykazywały względem siebie różnice znamienne statystycznie. Nie jest to oczywiście błędem, ale zwyczajowo nie praktykuje się takiej formy opisu rycin.

Wstęp pracy jest bardzo obszerny. W pierwszej części Autor wyczerpująco omawia historię odkryć dotyczących charakterystyki choroby Parkinsona, kolejno wprowadzanych prób jej leczenia oraz teorii etiopatogenezy, wraz z najnowszymi, współczesnymi odkryciami dotyczącymi propagacji alfa-synukleiny przez nerw błędny, związanej z tzw. aktywacją osi mózgowo-jelitowej. Sporo miejsca – i słusznie – poświęcono kwestii neurozapalnej w tym opisie i charakterystyce cytokin prozapalnych, a także roli mikro- i astrogleju. Podobnie dogłębnie opracowana jest część dotycząca progranuliny oraz związanych z nią receptorów i szlaków sygnałowych, zakończona kompendium aktualnej wiedzy, dotyczącej roli PGRN w chorobach neurodegeneracyjnych. Przy tak dogłębnym podejściu do tematu (wstęp liczy blisko 90 stron) zaskakuje całkowite pominięcie odniesienia do modeli transgenicznych choroby Parkinsona. Wspominając inne modele zwierzęce choroby Parkinsona, Autor poświęca tylko jeden podrozdział krótkiej charakterystyce modeli farmakologicznych (6-OHDA, rotenon, parakwat, rezerpina), podczas gdy wiele modeli genetycznych dostarczyło cennej wiedzy o mechanizmach choroby Parkinsona, jak choćby myszy z delecją mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego Tfam (tzw. myszy MitoPark).

Autor nieco arbitralnie przekonuje też, że „modele z użyciem MPTP-HCL stanowią swoisty złoty standard dla eksperymentów i badań nad patofizjologią śmierci neuronów dopaminergicznych w przebiegu choroby Parkinsona, najpełniej odwzorowując zarówno symptomy choroby, jak również powstający ubytek funkcji szlaku nigrostriatalnego”.



Należy zaznaczyć, że o ile faktycznie modele oparte o podania MPTP doskonale odzwierciedlają późne etapy rozwoju choroby Parkinsona, to jednak nie oddają – poza dość trudnymi eksperymentalnie do przeprowadzenia – powolnej degeneracji neuronów dopaminowych, a przede wszystkim, innej kinetyki degeneracji w rejonie SN i VTA, obserwowanej u ludzi. Ponadto, model ten nie ma wiele wspólnego z etiologią choroby, jest po prostu najbardziej powszechnie stosowanym modelem opartym o podania neurotoksyn. Oczywiście, nie umniejsza to wartości pracy Autora, po prostu jest faktem, który warto podkreślać, ponieważ poszukiwanie doskonałego modelu choroby Parkinsona, charakteryzującego się zgodnością przyczyn, objawów i odpowiedzi na farmakoterapię pozostaje wciąż sprawą otwartą.

Metodyka została opisana niezwykle szczegółowo, łącznie z słusznymi uwagami o bezpieczeństwie pracy z MPTP, który to związek charakteryzuje się znacznie większą toksycznością w przypadku ekspozycji na niego naczelnych w porównaniu do gryzoni. Do części metodycznej moja jedyna uwaga odnosi się do wyboru genu reporterowego (*Gapdh*), który nie zawsze jest uważany za złoty standard. Co więcej, wiele doniesień sugeruje raczej o konieczności normalizacji wyników w technice Real-Time PCR w stosunku do genów *B2m* czy *Rplp0*, w zamian do klasycznie używanych *Gapdh* czy *Hprt1*. Ponieważ normalizacja wyników na tzw. gen reporterowy jest istotnym czynnikiem determinującym wnioski z oznaczeń techniką RealTime-PCR, warto temu zagadnieniu poświęcić nieco więcej miejsca w opisie i dyskusji. Dobrym zwyczajem jest też pokazanie wyników z samej analizy ekspresji genu reporterowego, która co do zasady nie powinna wykazać znamienne statystycznych różnic między grupami.

Wyniki zostały zebrane na 63 rycinach obejmujących podsumowanie analiz wykonanych metodą HPLC, oznaczeń poziomu aminokwasów oraz analiz ekspresji genów wykonanych metodą RealTime-PCR. Wyniki przedstawiono w sposób bardzo czytelny, zachowując konsekwentnie szatę graficzną i dobór kolorów dla grup eksperymentalnych, co bardzo ułatwia odbiorcy interpretację. Wyjaśnienia wymaga kwestia braku osiągnięcia jednoznacznego, wyjściowego poziomu bazowego dla grup kontrolnych (oczekiwana wartość *fold* = 1) w przypadku niektórych wyników dotyczących badania ekspresji genów techniką RealTime-PCR (przykładowo – ryc. 45D, 50, 55D).

Dobrym zwyczajem, zalecanym przez większość czasopism naukowych, jest także pokazywanie na wykresach rozkładu wyników w formie punktowej, nie tylko jako graficznego obrazu średniej wraz z odchyleniami.

Dyskusja zawiera słuszne konkluzje i dowodzi, że Autor zrealizował zamierzone cele pracy. W ramach przeprowadzonych badań dobrano jako optymalną dawkę 0.5 µg (0.125 µg/µl) dla Atsttrin, jak również wykazano efekt podania Atsttrin w tej dawce, powiązany z zahamowaniem reakcji zapalnej w obrębie prążkowie, hipokampa, kory oraz mózdzku w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona u myszy szczepu C57BL/6 poddanych dootrzewnowej intoksykacji MPTP-HCL.



Przy braku zaobserwowanych działań niepożądanych w obrębie mikrośrodowiska tkanki, dowodzi to potencjału terapeutycznego dla tego związku, z pewnością w kontekście neuroprotekcijnym. Oczywiście, konieczne są dalsze badania, które udowodnią potencjał translacyjny tego typu terapii.

W tym kontekście szkoda, że Autor nie pokusił się o wykonanie dość prostych oznaczeń immunohistochemicznych i zliczenia densytometrii po barwieniach z użyciem przeciwciała anti-TH. Byłoby to wartościowe w kontekście stwierdzonego z jednej strony braku zmian w poziomie ekspresji mRNA dla TH po zastosowaniu Atsstrin w dawce 0.5 µg, a jednocześnie efektem przywrócenia w obrębie ST funkcji syntezy dopaminy. Tym bardziej, że w interpretacji sugerowane jest słusznie osiągnięcie częściowej regeneracji komórek dopaminergicznych lub aktywacja w pierwotnie nieuszkodzonych neuronach, mechanizmów kompensacyjnych uzupełniających niedobory TH. Barwienie immunohistochemiczne i zliczenia stereologiczne komórek lub prosta densytometria, będące już analizą ilościową na poziomie białka, być może dałoby bardziej precyzyjną odpowiedź w tej kwestii. Oczywiście, zrozumiałe jest, iż przy tak dużym nakładzie pracy nie można eksplorować wszystkich możliwych podejść metodycznych. Zapewne może to być pomysłem na kolejny projekt, poświęcony weryfikacji uzyskanych wyników w oparciu o techniki proteomiczne i być może również badania behawioralne na modelu zwierzęcym.

Podsumowując, stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie naukowej oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Pana lek. Łukasza Adriana Poniatowskiego są wartościowe merytorycznie, zawierają duży element nowatorstwa i są dowodem biegłej znajomości skomplikowanych zagadnień dotyczących teorii udziału białka PGRN w mechanizmach choroby Parkinsona. Recenzowana 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).

Mając na uwadze konsekwentnie i dogłębnie wykonane badania, dostarczające nowej wiedzy do mechanizmu i efektów działania Atsstrin w kontekście możliwej terapii choroby Parkinsona, wnoszę o wyróżnienie przedłożonej do oceny pracy doktorskiej Pana lek. Łukasza Adriana Poniatowskiego.

dr hab. n med. Grzegorz Kreiner
Kierownik Zakładu Biochemii Mózgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
31-343 Kraków, Smetna 12

