



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału  
Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk  
Kierownik

tel.: 48 22 60 86 572  
e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl

**Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk**  
**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN**  
**Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału**  
**tel.: 48 22 60 86 572**  
**e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl**

**Warszawa, 02.04.2023**

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Anny Radlickiej**

**pt: „Molekularne mechanizmy związane z pozaruchowymi objawami choroby Parkinsona”**

**wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk**

**pod kierunkiem dr hab. Jana Rodrigueaza Parkitny, prof. Instytutu oraz prof. dr hab. Joanny Pery**

Choroba Parkinsona (ChP) jest postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym, w którym dochodzi do nieodwracalnego zaniku neuronów dopaminergicznych w części zbitej substancji czarnej śródmózgowia (*substantia nigra pars compacta*, SNpc), a także w mniejszym stopniu układu mezokortykolimbicznego oraz podwzgórza. Jest to choroba o złożonej i niejasnej etiopatogenezie, w której, poza najbardziej znanymi zaburzeniami ruchowymi takimi jak spowolnienie ruchowe, sztywność mięśni i drżenie spoczynkowe, obserwuje się także zespół objawów pozaruchowych obejmujących zaburzenia poznawcze, węchu, nastroju, depresję, lęk, dysfunkcje autonomiczne, bólowe i czuciowe oraz zaburzenia snu i czuwania. Z racji postępującego starzenia się społeczeństw przewiduje się, że częstość występowania ChP dramatycznie się zwiększy, podwajając się w ciągu następnych dwóch dekad. Częstość jej występowania wzrasta od 5 do 10 razy od szóstej do dziewiątej dekady życia. Dlatego niezwykle ważne wydaje się opracowanie naprawdę skutecznych metod leczenia, pozwalających chorym na dobre funkcjonowanie. Badania, które złożyły się na przedłożoną mi do oceny rozprawę doktorską są w pewnym stopniu próbą odpowiedzi na tę palącą potrzebę, są innowacyjne i wpisują się w nurt najnowszych poszukiwań czynników diagnostycznych i prognostycznych w ChP prowadzonych w wiodących ośrodkach badawczych na świecie. Nadrzędnym celem ocenianej pracy jest wyjaśnienie molekularnych mechanizmów związanych z pozaruchowymi objawami ChP.

Jest to opracowanie o sprawdzonej tradycyjnej formie, praca liczy 163 strony i zgodnie z przyjętymi normami została podzielona na kilka głównych rozdziałów: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, a także Bibliografia. Główne części pracy zostały

następnie podzielone na szereg konsekwentnie ponumerowanych podrozdziałów. Wykaz skrótów oraz spis tabel i rycin ułatwia analizę dzieła. **Wstęp** pracy jest ściśle związany z jej tematem, Autorka charakteryzuje etiopatogenezę choroby, odnosi się do epidemiologii, opisuje objawy ruchowe i pozaruchowe. Znaczna część wstępu poświęcona jest omówieniu procesów neurozwyrodnieniowych w przebiegu tego dewastacyjnego schorzenia. Wybrane elementy obrazu klinicznego i zmiany anatomopatologiczne powstające w przebiegu choroby, Doktorantka obrazuje na schemacie, który niewątpliwie ułatwia analizę pracy. Skrupulatna charakterystyka i przegląd zwierzęcych modeli ChP jest doskonałym wprowadzeniem do tematu badań. Kończąc Wstęp Doktorantka podkreśla innowacyjność przeprowadzonych badań z zastosowaniem transkryptomiki przestrzennej, która do chwili obecnej nie została wykorzystana do identyfikacji efektów molekularnych leków przeciwparkinsonowskich. Reasumując, bardzo interesujący i logicznie poprowadzony Wstęp dowodzi, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę związaną z przedmiotem rozprawy, a także swobodnie porusza się w tym obszarze i umiejętnie wykorzystuje tę wiedzę do prowadzenia dyskusji oraz konstrukcji własnego podejścia do zagadnienia. Niestety nie udało się jej uniknąć drobnych, ale dość licznych błędów edytorskich, które są dość liczne w całej rozprawie. **Cele pracy** zostały szczegółowo i obszernie opisane, a celowość badań nie budzi wątpliwości. Głównym celem było zbadanie roli wydzielania dopaminy z neuronów śródmózgowia w rozwoju wybranych pozaruchowych objawów ChP. W badaniach wykorzystano genetycznie modyfikowane myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>, u których obserwuje się postępującą utratę neuronów dopaminergicznych śródmózgowia. Wybór genetycznego modelu TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> choroby, ukierunkowanego na uszkodzenie układu dopaminergicznego, pozwolił na zbadanie udziału tego konkretnego układu neuroprzekaźnikowego w zaburzeniach behawioralnych, funkcji poznawczych i molekularnych. Przeanalizowano typowe dla ChP zaburzenia behawioralne oraz zbadano wpływ L-DOPA na zmiany transkryptomu w różnych strukturach przodomózgowia myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>. Prowadzono również badania z udziałem pacjentów, których celem było zbadanie wpływu odstawienia leków dopaminergicznych na nasilenie objawów pozaruchowych i ruchowych choroby oraz na ekspresję wybranych genów we krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowaną i leczoną ChP. W rozdziale „Cel pracy” Autorka dość obszernie, w postaci jednolitego tekstu opisuje badania, które przeprowadziła. W opinii Recenzenta wyodrębnienie z jednolitego tekstu, głównego/nadrzędnego celu pracy i celów szczegółowych oraz przedstawienie ich w formie punktów byłoby znacznie korzystniejsze dla tego typu dzieła. Zarówno w tym rozdziale, jak i w kolejnych, Autorka wielokrotnie pisze w pierwszej osobie, np. „z badałam”, „jako główny model badawczy wybrałam”, „sprawdziłam”, itp. Podczas gdy w języku naukowym przyjęto stosowanie form bezosobowych, strony biernej, czasu przeszłego i form przypuszczających. Jak wynika z obszernych podziękowań zamieszczonych na samym początku dysertacji projekt realizowano we współpracy, zatem zdecydowanie powinna być użyta forma typu – zbadano, zaobserwowano, sprawdzono, itp. – co nie deprecjonuje udziału Doktorantki w projekcie, a nie pomija udziału zespołu badawczego w realizacji tak złożonego projektu. Rozdział **Materiały i Metody** został niezwykle skrupulatnie i rzetelnie przygotowany, a eksperymenty zostały bardzo starannie zaplanowane i logicznie poprowadzone. Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych niewątpliwie wskazuje na dobre ich opanowanie przez Autorkę.

Opis **Wyników** został podzielony na dwie części, pierwsza dotyczy badań przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy, w drugiej przedstawiono wyniki badań z udziałem pacjentów. Zastosowano odpowiednie testy behawioralne oceniające typowe dla ChP zaburzenia ruchowe oraz pozaruchowe. Przeprowadzone testy miały na celu ocenę sprawności ruchowej myszy, ich funkcji poznawczych i wykonawczych, umiejętności uczenia się i pamięci, zdolności węchowych, lęklivosti i preferencji picia słodkiej wody jako oznaki anhedonii. Doktorantka rozpoczęła pracę od oceny stopnia utraty neuronów dopaminergicznych u myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>, przeprowadzając w tym celu barwienia techniką immunofluorescencji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko hydroksylazie tyrozynowej (ang. Tyrosine Hydroxylase, TH), aby jakościowo potwierdzić efekty fenotypu u mutantów i zweryfikować efekty mutacji. W przodomózgowiu i śródmózgowiu sygnał fluorescencji świadczący o obecności białka TH był niższy u mutantów w porównaniu do kontroli, co sugeruje mniejszą gęstość zakończeń dopaminergicznych w tych strukturach (Rycina 9 a-b, c-d). Z kolei w opuszce węchowej nie wykazano różnic w fluorescencji TH u mutantów i w grupie kontrolnej, jednak Rycina 9 e-f, g-h wyraźnie wskazuje na większą fluorescencję u mutantów.

Schemat kolorystyczny (Rycina 8) wyjaśniający sposób prezentacji wyników jest bardzo pomocny w analizie uzyskanych wyników badań, niestety opis schematu jest nieco skomplikowany: „*Wyniki dla poszczególnych grup doświadczalnych przedstawiono na wykresach osobno, według stałego schematu kolorystycznego, w którym zwierzęta o genotypie kontrolnym są oznaczone kolorem szarym reprezentowane przez barwy szare a myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> przez dwa kolory właściwe dla danej kohorty.....*”

Analiza masy ciała wykazała, że utrata neuronów dopaminergicznych prowadzi do istotnego spadku masy ciała zwierząt, jednak na Ryc. 11 dla pierwszego doświadczenia nie zaznaczono znamienności, chociaż pomiary masy ciała u samców z doświadczenia I wykazały iż mutacja powodowała istotny spadek masy ciała w czasie, natomiast na Ryc. 13 przedstawiającej wyniki pomiarów masy ciała samców z doświadczenia II istotność została zaznaczona. Tak przedstawione wyniki badań budzą pewne trudności w ich analizie.

Ocena rozwoju zaburzeń ruchowych z zastosowaniem systemu CatWalk mierzącym parametry opisujące chód oraz zastosowaniu testu pręta obrotowego pozwalającego na ocenę koordynacji ruchu myszy w wymuszonych warunkach została przedstawiona bardzo skrupulatnie na rycinach i w formie tabel. Test CatWalk ujawnił niewielkie różnice w sposobie poruszania się myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>, test pręta obrotowego wykazał natomiast znaczące zaburzenia funkcji ruchowych u myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> w 13. tygodniu po podaniach tamoksyfenu.

Kolejna seria testów behawioralnych nie wykazała znaczących różnic w zachowaniach myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> w stosunku do kontrolnych. Mutanty nie wykazywały zachowań mogących świadczyć o upośledzeniu węchu lub anhedonii. Nie zaobserwowano także u nich zaburzeń uczenia się i przeuczania, zapamiętywania, odtwarzania zapamiętanych informacji w procedurach polegających na pamięci krótkotrwałej ani długotrwałej, upośledzenia funkcji wykonawczych. U zwierząt z uszkodzeniami układu dopaminergicznego wykazano natomiast zintensyfikowanie zachowań związanych z poszukiwaniem wrażeń, uzyskaniem napoju słodkiego lub wody, co może świadczyć o nasilonym działaniu ukierunkowanym na różnego rodzaju nagrodę. Ponadto, u mutantów traktowanych L-DOPA zanotowano zwiększoną lęklivość, a także zwiększoną aktywność ruchową. Zamieszczenie

tabeli podsumowującej wyniki badań behawioralnych doskonale porządkuje i ułatwia analizę uzyskanych wyników badań.

Opierając się na dotychczasowych danych literaturowych, w tym wcześniejszych badaniach własnych Doktorantka podjęła się bardzo ważnego badania, a mianowicie określenia wpływu L-DOPA na transkryptom komórek w poszczególnych obszarach przedomózgowia myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>. Wśród genów podlegających zmianom ekspresji wskutek podań L-DOPA znalazły się m.in. geny kodujące białko Arc, które jest kluczowym białkiem zaangażowanym w regulację plastyczności synaptycznej, geny zaangażowane w regulację rytmów okołodobowych (*Per1*, *Bhlhe40*), czy też kodujące białka biorące udział w egzocytocie pęcherzyków synaptycznych (*Stxbp6*). Jest to badanie bardzo nowatorskie. Profilowanie przestrzenne ekspresji genów pod wpływem L-DOPA u myszy transgeniczných z postępującą utratą neuronów dopaminergiczných pozwoliło na identyfikację struktur przedomózgowia, na które ten lek oddziałuje. W efekcie zidentyfikowano 15 klastrow, w których L-DOPA wpłynęła istotnie na ekspresję genów. Efekty leku zaobserwowano w prążkowie grzbietowym i jądrze półleżącym przegrody, w wybranych obszarach kory mózgu oraz w przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym, a także w komorze bocznej. Wpływ L-DOPA na ekspresję genów zaangażowanych w regulację kluczowych funkcji komórkowych, w tym plastyczności synaptycznej wskazuje, że wpływ tego leku może być bardzo szeroki i wieloaspektowy.

Doktorantka podjęła również próbę skorelowania nasilenia objawów ruchowych bądź pozaruchowych w kontekście odpowiedzi na leczenie dopaminergiczne ze zmianami w ekspresji wybranych genów we krwi żylną pacjentów z ChP. Opierając się na wcześniejszych badaniach własnych i danych literaturowych, do analizy qPCR wytypowano 10 genów (*CEBPA*, *DDIT4*, *IFNGR1*, *KLF4*, *MMP9*, *PER1*, *SGK1*, *FOS*, *EGR1* i *SNCA*). Jednak stosowanie leczenia dopaminergicznego nie wpłynęło na poziom ekspresji wybranych genów we krwi pacjentów, pozostając także bez wpływu na ekspresję genu kodującego  $\alpha$ -synukleinę, która jest biomarkerem choroby Parkinsona.

**Dyskusja** została podzielona na podrozdziały, w których Autorka konfrontuje wyniki badań własnych z istniejącą literaturą. Analizuje i wyjaśnia rozbieżności dotyczące aktywności lokomotorycznej zwierząt w różnych modelach zwierzęcych choroby Parkinsona dokonując jednocześnie przeglądu literatury w tym obszarze badań. Krytycyzm z jakim Doktorantka odnosi się do badań własnych świadczy o jej ogromnej dojrzałości naukowej, Autorka słusznie zauważa iż grupy doświadczalne mutantów cechowała mała liczebność (odpowiednio 3 i 4 osobniki w grupie mutantów traktowanych solą fizjologiczną i L-DOPA). Podobnie, brak wpływu postępującej utraty neuronów dopaminergiczných na zachowania mogące świadczyć o anhedonii pozostaje w sprzeczności z badaniami prowadzonymi z wykorzystaniem innych modeli zwierzęcych ChP, w których obserwuje się zachowania świadczące o obniżonym nastroju. Autorka podejmuje próbę wytłumaczenia tych rozbieżności i dostrzega konieczność prowadzenia dalszych badań.

Analizując wpływ L-DOPA na wzmocnienie ekspresji genów zaangażowanych w regulację kluczowych funkcji komórkowych Doktorantka słusznie wnioskuje iż podania L-DOPA poprzez aktywację ekspresji szeregu genów związanych z regulacją transkrypcji, może dodatkowo modulować wiele procesów w komórce, niezależnie od bezpośredniej aktywacji genów zaangażowanych w regulację egzocytoty, plastyczności synaptycznej czy zegara

biologicznego. Z dużą ostrożnością odnosi się również do zależnych od podania L-DOPA zmian w ekspresji genu *Ubl5*, które mogą sugerować jej neuroprotektoryjne działanie.

Porównując wyniki doświadczenia profilowania przestrzennego przodomózgowia myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> po podaniach L-DOPA z wynikami badania efektów leczenia dopaminergicznego na ekspresję wybranych genów we krwi pacjentów z chorobą Parkinsona Doktorantka stwierdziła, że przeprowadzone badania prowadzą do odmiennych wniosków. W opinii Recenzenta poszukiwanie jakichkolwiek zależności pomiędzy tymi badaniami (w mózgu szczura i ludzkiej krwi obwodowej) jest niezwykle trudne i nie oczekiwałabym jednakowych wniosków płynących z obu tych badań, o czym zresztą Doktorantka pisze w dalszej części dyskusji. W końcowej, najbardziej interesującej części dyskusji Doktorantka interpretuje uzyskane wyniki badań w sposób bardzo dojrzały, wyciąga wnioski i proponuje mechanizmy, które mogą leżeć u podłoża zmian indukowanych leczeniem L-DOPA w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona i u pacjentów z tą chorobą.

Rozdział **Wnioski** to podsumowanie i bardzo interesująca interpretacja uzyskanych wyników badań. Niemniej jednak, przedstawienie ich w formie punktów skorelowanych z celami pracy byłoby korzystniejsze dla odbioru tego typu dzieła.

Podsumowując, wymienione w recenzji uwagi nie wpływają na pozytywną i bardzo wysoką ocenę merytoryczną przedłożonej mi do recenzji dysertacji. Pani mgr Anna Radlicka przedstawiła się jako doświadczona badaczka, która doskonale potrafi zaprojektować i przeprowadzić eksperymenty oraz wyciągnąć prawidłowe wnioski, a przede wszystkim odnieść się do własnych badań z dużym krytycyzmem. Prowadzone badania we współpracy z wieloma badaczami świadczą o wszechstronności i nowatorskim podejściu Doktorantki do postawionego problemu badawczego. Wobec powyższego stwierdzam iż przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska wskazuje na bardzo dobre opanowanie wiedzy teoretycznej przez mgr Annę Radlicką ubiegającą się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne, a rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane wyniki zapewne zainspirują Kandydatkę do dalszych badań nad udziałem układu dopaminergicznego w powstawaniu objawów pozaruchowych ChP i przyczynią się do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów zaburzeń ruchowych i pozaruchowych w tej chorobie.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska mgr Anny Radlickiej spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2022, poz. 574 z późn. Zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Anny Radlickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.