



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 Rodrigueza Parkitny, prof. Instytutu oraz prof. dr hab. Joanny Pery.

Choroba Parkinsona jest drugim co do częstości (po chorobie Alzheimera) schorzeniem zwyrodnieniowym ośrodkowego układu nerwowego. Charakterystyczną cechą choroby Parkinsona jest śmierć neuronów dopaminergicznych, których ciała zlokalizowane są w istocie czarnej śródmózgowia, a aksony tworzą nigrostriatalny szlak dopaminergiczny do prążkowie. W efekcie, dochodzi do obniżenia stężenia dopaminy w prążkowie, co powoduje nierównowagę pomiędzy transmisją dopaminergiczną a cholinergiczną, prowadzącą do objawów choroby. Działające na układ dopaminergiczny leki stosowane w chorobie Parkinsona to przede wszystkim stosowany obwodowo prekursor dopaminy L-3,4-dihydroksyfenyloalanina (L-DOPA), inhibitory rozkładających L-DOPA enzymów, takie jak benserazyd, oraz agoniści receptorów dopaminergicznych.

W obrazie choroby Parkinsona dominują objawy ruchowe: spowolnienie ruchowe, sztywność mięśniową i drżenie spoczynkowe. U znacznego odsetka pacjentów dodatkowo występują objawy pozaruchowe, w tym zaburzenia poznawcze i psychiatryczne, przy czym mogą być one także nieporządanymi skutkami leczenia, dlatego bardzo istotne jest lepsze poznanie molekularnych mechanizmów działania leków stosowanych w chorobie Parkinsona oraz ich wpływu na objawy pozaruchowe.

U większości ludzi z chorobą Parkinsona przyczyna śmierci neuronów dopaminergicznych istoty czarnej pozostaje nieznana. Dlatego w badaniach nad tą chorobą stosuje się modele zwierzęce, w których bada się konsekwencje mechanicznego, chemicznego, lub genetycznego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych istoty czarnej.

W ten nurt badań wpisuje się rozprawa doktorska mgr Anny Radlickiej. Doktorantka jako swój główny model badawczy wybrała genetycznie zmodyfikowane myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2}, u których po osiągnięciu dorosłości indukcja mutacji powoduje degenerację neuronów dopaminergicznych. Celem pracy było zbadanie roli wydzielania dopaminy z neuronów śródmózgowia w rozwoju wybranych pozaruchowych objawów choroby Parkinsona, a także wpływu podania L-DOPA na objawy choroby i ekspresję genów w przedmózgowiu badaną metodą transkryptomiki przestrzennej. Wyniki uzyskane w modelu mysim zostały zestawione z wynikami uzyskanymi u pacjentów z chorobą Parkinsona w trakcie leczenia dopaminergicznego oraz po przerwaniu podawania leków.

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana w języku polskim i ma klasyczny układ. Ogółem liczy 163 strony, w tym: 13-stronicowy Wstęp, przedstawiony 1 stronie Cel pracy, 29-stronicowe Materiały i metody, liczące 60 stron Wyniki, liczące 22 strony Dyskusja, zawarte na 1



stronie Wnioski. Praca zawiera obowiązkowe streszczenie w języku polskim i angielskim, 30 rycin, 16 tabel oraz 20 stron (ok. 380 pozycji) nienumerowanej Bibliografii.

Praca jest niezwykle starannie przygotowana pod względem językowym. Doktorantka posługuje się pięknym a jednocześnie precyzyjnym językiem naukowym, w którym znalazłem tylko nieliczne, drobne błędy: na stronie 18 "komórki eozynofilowe" zamiast "eozynofilne"; kilkakrotnie użyta mała litera "i" zamiast rzymskiej liczby "I" w numerze doświadczenia; "na grup", zamiast "na kilka grup" na stronie 20. Znalazłem jeden błąd redaktorski: Na stronach 32, 34 i na górze strony 35, czas przeprowadzenia oceny sposobu poruszania się w doświadczeniu II opisano jako: "godzinę po otrzymaniu drugiego zastrzyku." To, o jaki drugi zastrzyk chodzi, staje się jasne dopiero na dole strony 35: "po godzinie od wykonywania drugiego zastrzyku (L-DOPA lub sól fizjologiczna)".

We Wstępie Doktorantka przedstawia epidemiologię, objawy i przebieg oraz procesy zwyrodnieniowe i różnorodność fenotypową choroby Parkinsona u ludzi. Stanowi to dobre wprowadzenie do wykonanych w projekcie badań z udziałem ludzi, jednak omówienie różnorodności fenotypowej mogłoby trafić do Dyskusji. Następnie, w sposób niezwykle jasny, Doktorantka przedstawia modele zwierzęce choroby Parkinsona z ich podziałem grupy: modele oparte o stosowanie neurotoksyn, takie jak 6-hydroksydopamina (6-OHDA); modele genetyczne, których fenotyp często odbiega jednak od choroby Parkinsona; oraz modele transgeniczne oparte o system Cre/loxP, w których dochodzi do śmierci komórek dopaminergicznych wyrażających transporter dopaminy DAT. Wstęp kończy krótkie wprowadzenie do metod transkryptomicznych.

Rozdział "Materiały i metody" zawiera szczegółowy opis bogatego zestawu wykorzystanych w projekcie metod doświadczalnych, a także, co nie mniej ważne, specjalny podrozdział dotyczący analiz statystycznych. Niezbędny pomocniczy udział innych wykonawców w realizacji opisanych w rozprawie badań został precyzyjnie opisany.

W rozdziale "Wyniki" Doktorantka przedstawiła kolejno: wyniki badań behawioralnych i transkryptomicznych w modelu mysim, a następnie wyniki badań z udziałem pacjentów. W odbiorze wyników behawioralnych uzyskanych w modelu zwierzęcym bardzo pomagają przejrzyste kodowanie grup (poziomów badanych czynników, czyli genotypu i leku) za pomocą kolorów i symboli, zilustrowane na Rycinie 8. Bardzo cenne jest również podsumowanie wyników badań behawioralnych przedstawione w Tabeli 11 na stronie 91. Wśród 10 wykonanych procedur trzy dotyczące aktywności ruchowej potwierdzają fenotyp parkinsonowski u myszy, natomiast pozostałe umożliwiły scharakteryzowanie pozaruchowych objawów choroby Parkinsona.

W badaniach transkryptomiki przestrzennej uzyskano klastry punktów na skrawkach (Visium spots), których rozmieszczenie jest zgodne z anatomią przodomózgowia myszy, co pozwoliło na wykonanie porównań w obrębie tych samych klastrow/struktur anatomicznych, pomiędzy mutantami traktowanymi L-DOPA i benserazydem a traktowanymi solą fizjologiczną. Zidentyfikowano w ten sposób 20 genów, których ekspresja ulegała zmianie w obrębie danego klastra/struktury po podaniu L-DOPA, co zilustrowano na Rycinie 27.

W badaniach kwestionariuszowych pacjentów z chorobą Parkinsona stwierdzono występowanie korelacji pomiędzy pozaruchowymi objawami choroby mierzonymi na skalach apatii, lęku i

zaburzeń zachowania. Natomiast – co ciekawe – wyniki w testach mierzących objawy pozaruchowe i ruchowe nie były ze sobą istotnie skorelowane. W zgodzie z powyższym, leki zwiększające przewodnictwo dopaminergiczne u pacjentów wpłynęły u nich na poprawę funkcji ruchowych, a w mniejszym zakresie na zaburzenia pozaruchowe, poprawiając zdolności poznawcze i obniżając odczuwanie lęku. We krwi obwodowej pacjentów nie wykryto zmian ekspresji badanych genów pod wpływem leków dopaminergicznych.

W Dyskusji Doktorantka dokonała szczegółowego omówienia przedstawionych w rozprawie wyników i ich porównania z danymi literaturowymi, w tym wynikami publikacji z 2020 roku z eNeuron, której Doktorantka jest pierwszym autorem. W Dyskusji Doktorantka wykazała się gruntowną znajomością badanej tematyki, a także dojrzałym i krytycznym podejściem do uzyskanych przez siebie wyników, umiejętnie wskazując zarówno ich nowatorskie elementy, jak i aspekty wymagające dalszych badań.

Mam do rozprawy następujące uwagi:

1. We Wstępie zabrakło mi krótkiego omówienia i ilustracji szlaków dopaminergicznych mózgu, które stanowią anatomiczny substrat dla powiązań pomiędzy uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych a objawami w chorobie Parkinsona, a także dla działań nieporządkanych stosowanych w tej chorobie leków.

2. W rozdziale “Materiały i metody” na stronie 43 podano, że metodą transkryptomiki przestrzennej zbadano 12 skrawków z 3 grup doświadczalnych z użyciem 3 szkiełek Visium. Celowe byłoby pokazanie, jaki był udział każdej z grup na każdym ze szkiełek Visium.

3. W podrozdziale “Dopasowanie odczytów do nowej anotacji genomu” na stronie 46 podano, że współrzędne genomowe pików uzyskanych metodą transkryptomiki przestrzennej zostały porównane do danych z sekwencjonowania RNA wyizolowanego z prądkowia myszy (samca i samicy) na platformie Oxford Nanopore generującej długie odczyty, dzięki czemu możliwa jest dokładniejsza identyfikacja izoform RNA. Dalej napisano, że w ten sposób “wyeliminowano z dalszych analiz fragmenty o niepewnym dopasowaniu do genomu”, jednak sposób przeprowadzenia tej eliminacji nie został opisany.

4. Tej samej kwestii dotyczy przypis na dole strony 95, w którym napisano: “Szczegółowy opis metodyki związanej z wykorzystaniem techniki Nanopore do poprawy referencyjnego genomu znajduje się w pracy magisterskiej mgr Magdaleny Chrószcz (Chrószcz, 2022).” Cytowana praca magisterska okazała się niezwykle ciekawa, jest ona jednak poświęcona analizie ekspresji w mózgu izoform RNA jednego genu (*Oprm1*, kodującego receptor opioidowy μ) i, choć – być może – stanowiła motywację do poprawy referencyjnego genomu, nie zawiera jednoznacznego opisu związanej z tym metodyki.

5. Jako uzupełnienie wykresu na Rycinie 26a, na którym za pomocą koloru zaznaczono przynależność punktów do klastrów, celowe byłoby zaznaczenie kolorem, na tym samym (powtórzonym) wykresie UMAP, przypisania punktów do poszczególnych próbek.



Mam do Doktorantki dwa pytania:

1) Na stronie 29, wśród genotypów kontrolnych w doświadczeniu I wymieniony jest genotyp [Cre Tg/0; flox/wt]. Czy dobrze rozumiem, że oznacza to zwierzęta, w których ekspresji ulega rekombinaza CreERT2 a jednocześnie w jednym z dwóch alleli genu *TIF1A* fragment tego genu jest oflankowany przez sekwencje loxP? Czy zatem, u zwierząt o tym genotypie w neuronach dopaminergicznym dochodzi do rekombinacji w obrębie tego allelu, a w konsekwencji wyłączenia jednej z dwóch kopii tego genu? Jeżeli tak, to czy wiadomo jaki ma to wpływ na żywotność neuronów, i czy nie byłoby celowe wyłączenie zwierząt o tym genotypie z grupy kontrolnej?

2) Czy filtracja wyników transkryptomiki przestrzennej w oparciu o dane Nanopore z prążkowania była założeniem przyjętym *a priori* – w takim razie jaka była jego motywacja, czy też była to decyzja podjęta w trakcie analiz, motywowana wcześniej uzyskanymi wynikami uzyskanymi w oparciu o domyślny referencyjny genom myszy?

Powyższe uwagi i pytania wynikają z obowiązku oraz ciekawości recenzenta i nie wpływają na wysoką ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej. *Poniżej przechodzę do kwestii formalnych.*

Wstęp i Dyskusja, napisane w oparciu o obszerną (liczącą ok. 380 pozycji) i biegłą cytowaną bibliografię, uzasadniają ocenę, że rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

W toku realizacji projektu, Doktorantka zaprojektowała i wykonała szereg doświadczeń, posługując się szerokim zestawem nowoczesnych narzędzi badawczych. Uzasadnia to ocenę, że rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora.

W rozprawie doktorskiej po raz pierwszy przeprowadzono analizę objawów pozaruchowych w badanym mysim modelu choroby Parkinsona, a także wpływu podawania leków na te zaburzenia. W tym samym modelu po raz pierwszy zastosowano metodę transkryptomiki przestrzennej, co pozwoliło zidentyfikować specyficzne dla określonych rejonów mózgu efekty podawania L-DOPA na ekspresję genów. Ponadto, w rozprawie przeanalizowano wpływ leków na objawy ruchowe i pozaruchowe oraz ekspresję genów we krwi obwodowej pacjentów z chorobą Parkinsona. Uzasadnia to ocenę, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W konkluzji, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki 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.) i wnioskuję do 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.

dr hab. Michał Dąbrowski