



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

dr hab. Mariola Paściak, prof. nadzw.

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław, 12 lipca 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr inż. Mariusza Fleszara**

„Hepcydyna i wybrane metabolity przemian tlenu azotu w chorobie Alzheimera i otępieniu naczyniopochodnym” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Krzystek-Korpackiej

Otępienie definiuje się jako zespół objawów spowodowany chorobą mózgu, zwykle o charakterze przewlekłym lub o postępującym przebiegu, charakteryzujący się licznymi zaburzeniami funkcji poznawczych takich jak: pamięć, myślenie, planowanie, orientacja, rozumienie, liczenie, zdolność do uczenia się oraz umiejętność oceny sytuacji. Zaburzenia te wpływają na codzienne funkcjonowanie oraz utrudniają, a nawet uniemożliwiają samodzielne funkcjonowanie. W praktyce klinicznej najczęściej wyróżniane typy otępienia to otępienie w chorobie Alzheimera lub Parkinsona, otępienie naczyniopochodne, otępienie czołowo-skroniowe, otępienia mieszane i inne.

W związku ze starzeniem się społeczeństwa, choroby otępienne stanowią ważny problem medyczny, społeczny i ekonomiczny. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2030 roku będzie 65 milionów chorych na chorobę Alzheimera, a w roku 2050 już 115 milionów. Z danych Głównego Urzędu Statystycznego wynika, że w Polsce populacja osób w wieku powyżej 65 lat stanowi obecnie ok. 15 %, a w 2050 roku osiągnie ponad 30%. Szacuje się, że w Polsce na choroby otępienne choruje 500 tysięcy osób, z czego blisko 300 tysięcy cierpi z powodu choroby Alzheimera.

Jak dotąd rozpoznawanie choroby Alzheimera jest wyłącznie objawowe, na podstawie występowania typowych objawów, kolejności ich powstawania i szybkości progresji choroby, sporadycznie wykonywane są badania obrazowe mózgu. Z tego względu poszukuje się nowych markerów diagnostycznych, które ułatwiłyby rozpoznanie tej jednostki chorobowej we wczesnym etapie choroby, zwłaszcza że choroba może rozwijać się nawet 10-20 lat wcześniej przed wystąpieniem objawów klinicznych. Do uznanych biomarkerów w chorobie Alzheimera należy stężenie amyloidu (β_{42}), całkowity poziom białka tau i ufosforylowanego białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym. Markery te są stosowane w ocenie skuteczności leczenia, ale ze względu na brak powszechnej dostępności i standaryzacji ich wykonania, nie są jeszcze stosowane rutynowo. Dlatego też biomarkery chorób otępiennych pozwalające na szybkie postawienie diagnozy i rozpoczęcie odpowiedniego postępowania terapeutycznego, oznaczane w łatwo dostępnych materiałach takich jak surowica czy osocze, są bardzo potrzebne.

Postęp w badaniach metabolomicznych, w tym lipidomicznych i proteomicznych daje nadzieję na znalezienie w najbliższym czasie nowych markerów ułatwiających rozpoznanie konkretnych jednostek chorobowych. Praca mgr inż. Mariusza Flecera doskonale wpisuje się w tematykę poszukiwania nowych biomarkerów zaburzeń otępiennych.

Przedstawiona do recenzji praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych i zawiera 174 strony maszynopisu, w tym 38 rycin i 46 tabel, wykaz stosowanych skrótów i terminów, 319 pozycji piśmiennictwa, ponad połowa (56%) z ostatniej dekady, dalej, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz rysunków i tabel, oraz załączone opinie komisji bioetycznej.

We **Wstępie** autor opisuje choroby otępienne: chorobę Alzheimera, otępienie naczyniopochodne oraz otępienie mieszane z uwzględnieniem podtypów i czynników ryzyka. Następnie przechodzi do opisu hepcydyny i związków biorących udział w metabolizmie tlenu azotu, zwracając uwagę na ich powiązanie z chorobami otępiennymi. Kolejny rozdział zapoznaje czytelnika z techniką spektrometrii mas uwzględniając jonizację typu ESI i stosowane w tej technice analizatory mas, skrótowo podane zostały informacje dotyczące metabolomiki i proteomiki. Wstęp pracy jest napisany w sposób syntetyczny, czytelny, oparty o dobrze dobrane piśmiennictwo i świadczy o dużej wiedzy Doktoranta. Zabrakło w nim jednak osobnego podrozdziału dotyczącego stosowanych i potencjalnych markerów chorób otępiennych, z uwzględnieniem zarówno związków białkowych jak i lipidowych.

Głównym **celem badań**, jaki założono w pracy było opracowanie metody oznaczania stężenia hepcydyny oraz metabolitów powiązanych z przemianami tlenu azotu w surowicy przy użyciu spektrometrii mas jako techniki analitycznej. Cele te zostały jasno sformułowane.

W rozdziale **Materiały** Doktorant opisał badaną populację, stosowane odczynniki i aparaturę. Mocną stroną pracy jest dobrze dobrany i scharakteryzowany materiał badawczy: grupy pacjentów z poszczególnymi typami chorób otępiennych są porównywalne pod względem liczby pacjentów i warte podkreślenia, że stanowią stosunkowo duży materiał badawczy, w porównaniu do grup opisywanych w piśmiennictwie. Ponadto są one bardzo dobrze scharakteryzowane pod względem parametrów demograficznych, jak również klinicznych. Wykonane zostały badania neuroobrazowania i oceniono globalny zanik kory mózgu (GCA), płata skroniowego (MTA) oraz zmian hiperintensywnych istoty białej (WMH). Co ważne, stosując wskaźnik niedokrwienny Hachińskiego można było zróżnicować grupę pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi od grupy z otępieniem naczyniopochodnym oraz wyróżnić grupę pacjentów z otępieniem mieszanym. Grupa kontrolna honorowych krwiodawców jest dobrze dobrana ilościowo i z przyczyn obiektywnych stanowi nieco odbiegającą pod względem wieku grupę kontrolną. Na uwagę zasługuje również stosunkowo niewielka, ale istotna grupa kontrolna osób z bólami lub zawrotami głowy lecz bez demencji.

Dobór metod jest trafny dla realizacji zadań. **Metody** użyte w pracy są poprawnie opisane i podane w sposób wyczerpujący. Szczegółowo opisane jest przygotowanie próbek do analiz hepcydyny oraz metabolitów przemian tlenu azotu jak również warunki ich rozdziału za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii UHPLC.

Wyniki przedstawiono w sposób jasny i rzeczowy, ilustrując je licznymi dobrze opracowanymi tabelami i rycinami. Na uwagę zasługuje bardzo dobre opracowanie statystyczne wyników.

Kluczowym etapem badań było ustalenie metody oznaczania hepcydyny oraz metabolitów przemian tlenu azotu: L-argininy, L-cytruliny, symetrycznej i asymetrycznej dimetyloargininy (SDMA) i (ADMA) oraz dimetyloaminy (DMA) w surowicy a następnie ich analiza za pomocą spektrometrii mas.

Doktorant przeprowadził szereg testów w celu optymalizacji parametrów ekstrakcji (z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz lub ekstrakcji do fazy stałej) i upochodnienia badanych analitów. Opracował własną, szybką metodę ekstrakcji hepcydyny techniką ciecz-ciecz, umożliwiającą uzyskanie odzysków na poziomie co najmniej 78%. W przypadku oznaczania metabolitów przemian tlenu azotu, bazując na wcześniejszych doświadczeniach Doktoranta, można było stosunkowo łatwo dobrać warunki poprzez zamianę czynnika upochodniającego z chlorku pentafluorobenzoilu na chlorek benzoilu. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego środowiska reakcji można było uzyskać satysfakcjonujący rozdział pięciu metabolitów tlenu azotu w czasie 5 min, co znacząco obniżyło koszty analizy.

Doktorant dobrał parametry rozdziału chromatograficznego stosując ultra wysokosprawną chromatografię UHPLC oraz parametry odpowiednie do detekcji w źródle jonów uzyskanych metabolitów. Ponadto jednoczesne oznaczanie aż pięciu markerów pozwala na istotne obniżenie błędów eksperymentalnych. Obie metody zostały poprawnie poddane walidacji, a następnie posłużyły do wyznaczenia poziomu badanych substancji w surowicach pacjentów z chorobami otępiennymi i u osób zdrowych.

Opracowanie metod oznaczania stężenia hepcydyny oraz metabolitów powiązanych z przemianami tlenu azotu za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej ze spektrometrią mas, uważam za bardzo ważne osiągnięcie Doktoranta. W tym miejscu nasuwa się pytanie dotyczące dostępności tak zaawansowanych technik analitycznych w laboratoriach diagnostycznych. Problem ten porusza Vialaret i współpr. w ostatnio opublikowanej pracy (**J Chromatogr B 2018, 1086, 110-117**) dotyczącej ilościowego oznaczania hepcydyny w surowicy ludzkiej za pomocą LC-MS/MS. Celem pracy było porównanie zastosowanego w technice LC-MS nanoprzepływu (0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$) ze standardowym przepływem (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) stosując taką samą metodę detekcji. Używając obu systemów autorzy uzyskali porównywalne wyniki i konkludują, że zastosowanie standardowej techniki LC-MS jest równoważne technice nano LC-MS i może być również z powodzeniem użyte do celów diagnostycznych. Proszę Doktoranta o porównanie wad i zalet standardowej techniki LC-MS z techniką tandemową oraz próbę oszacowania kosztów opracowanych przez Pana metod analiz, w odniesieniu do wspomnianej pracy.

W drugiej części wyników Doktorant ustalił zakres referencyjny stężeń hepcydyny i metabolitów tlenu azotu w grupie osób zdrowych (krwiodawcy) oraz w grupie osób zdrowych z bólami/zawrotami głowy bez demencji i następnie porównywał z grupą pacjentów z chorobami otępiennymi traktowaną jako całość i w rozbiciu na podgrupy chorych z patologią alzheimerowską, naczyniową i mieszaną. Kolejno szczegółowo porównywane były uzyskane stężenia badanych

metabolitów w poszczególnych grupach pacjentów uwzględniając wiek, płeć, poziom edukacji, BMI, zaburzenia funkcji poznawczych oraz zmiany w mózgu. Rezultaty porównań opracowane statystycznie zostały przedstawione na licznych rycinach i w tabelach. Doktorant ocenił również korelacje pomiędzy analizowanymi parametrami zarówno w badanej populacji, jak i w rozbiciu na grupy pacjentów. Ostatni etap wyników stanowi ocena potencjału diagnostycznego badanych metabolitów jako biomarkerów w demencji.

Za najważniejsze rezultaty tej części pracy uważam:

- wykazanie wzrostu stężenia hepcydyny i spadek stężenia argininy w demencji naczyniopochodnej, zmiennie wyższy niż w demencji o patologii Alzheimerowskiej
- obserwację, że stężenia hepcydyny oraz ADMA i SDMA rosną wraz z pogorszeniem funkcji poznawczych w chorobach otępiennych, przy czym w chorobie Alzheimera występuje zależność dla hepcydyny, a w patologii naczyniopochodnej dla ADMA i SDMA
- pokazanie po raz pierwszy, że ze wzrostem zaawansowania zmian zanikowych kory mózgu, rośnie stężenie ADMA i SDMA
- wykazanie, że w zmianach o etiologii naczyniopochodnej występują wyższe stężenia hepcydyny, DMA i cytruliny, a jednocześnie niższe argininy, wyrażające się zależnością ze stopniem zaawansowania zmian hiperintensywnych istoty białej mózgu (hepcydyna i arginina) lub od występowania zawałów strategicznych (DMA i cytrulina).

W mojej ocenie najbardziej wartościową część pracy stanowi **Dyskusja**, świadcząca o dobrej znajomości tematyki badawczej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników, świetnie napisana i świadcząca o dojrzałości naukowej Doktoranta. Interesująca jest obserwacja, że najlepszym indywidualnym markerem dyskryminującym pacjentów z demencją od osób zdrowych jest arginina, natomiast panel markerów składający się z metabolitów przemian tlenu azotu i hepcydyny charakteryzował się doskonałą skutecznością.

Wynik świadczący o tym, że panel złożony z wielu markerów ma lepszą moc diagnostyczną niż pojedynczy marker ma również potwierdzenie w danych literaturowych. W pracy opublikowanej przez Fiandaca i współpr. (**Frontiers in Neurology 2015, 6, 237**) oceniano panel złożony z 24 metabolitów jako markerów predysponujących do rozwinięcia choroby Alzheimera. Badania były prowadzone przez co najmniej 5 lat na stosunkowo dużej i bardzo dokładnie scharakteryzowanej grupie pacjentów. Co ciekawe, w panelu markerów oprócz najliczniejszej grupy związków jakie stanowiły fosfolipidy, użyto również **argininę i ADMA**. W tym kontekście uzyskane przez Doktoranta wyniki wpisują się w światowy nurt badań. Proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tej pracy i krótkie uzupełnienie informacji o lipidowych biomarkerach choroby Alzheimera.

Odnośnie uwag krytycznych dotyczą one strony redakcyjnej i to zaledwie kilku punktów.

- Należy zmienić podpis Rys. 18, gdyż przedstawia on całkowity prąd jonowy oraz chromatogramy wybranych jonów metabolitów tlenu azotu, a nie hepcydyny

- str 110 wers 9, w wyrażeniu „Zastosowany w nim TFA, dzięki lepszym właściwościom do parowania jonów w porównaniu z kwasem mrówkowym” powinno być „TFA jako silniejszy czynnik tworzenia par jonowych z cząsteczkami analitu, w porównaniu do kwasu mrówkowego”

- str 115 wers 6 brakuje jednostki dla argininy

- w pracy znalazły się niefortunne sformułowania jak np. na stronie 76 „związek edukacji ze stężeniem hepcydyny...”, czy na stronie 31 „wyniki neuroobrazowania były oceniane przez zaślepionego lekarza radiologa”

- w spisie piśmiennictwa w pozycji [97] nie podano rocznika, a pozycje 44, 71, 162 i 168 mają niepełne dane bibliograficzne.

Uwagi te wynikają z obowiązku recenzenta, ale nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy.

Podsumowując pragnę podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane. Uzyskane rezultaty oprócz niewątpliwego znaczenia w naukach podstawowych, mają także wymiar praktyczny. Mogą posłużyć do opracowania panelu diagnostycznego opartego na oznaczaniu stężenia hepcydyny i metabolitów przemian tlenu azotu w surowicach pacjentów, zarówno w chorobach otępiennych, jak i innych jednostkach chorobowych. Jak wskazuje Autor w dyskusji panel złożony z SDMA i ADMA, po uprzednim przetestowaniu, mógłby posłużyć do monitorowania funkcji nerek. Opracowane metody oznaczania stężeń biomarkerów w surowicy za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej ze spektrometrią mas typu ESI i z detekcją Q-TOF są uniwersalne i można je zastosować zarówno do oznaczania tych metabolitów w surowicach pacjentów a po walidacji metody także w innych płynach ustrojowych np. w płynie mózgowo-rdzeniowym, czy w moczu.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgr inż. Mariusza Fleszara uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne, bardzo wartościowe wyniki i spełnia warunki określone w art. 13 (ust. 1) Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Mariusza Fleszara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na względzie dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej, przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Mariusza Fleszara stosowną nagrodą, przewidzianą przez regulamin Uczelni.

dr hab. Mariola Paściak