

Wrocław, 5 marca 2014

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Jakubik pt. " Wpływ białka immunomodulującego Y na postęp zmian otępiennych w modelach zwierzęcych choroby Alzheimera"

Pomimo intensywnie prowadzonych badań wciąż nie są dokładnie poznane mechanizmy towarzyszące chorobie Alzheimera, a co za tym idzie skuteczne metody leczenia i profilaktyki. Prognozy przewidujące gwałtowny wzrost zachorowań mogący osiągnąć w 2050 roku około 130 mln przypadków są wyzwaniem do poszukiwania nowych środków terapeutycznych. Wiele proponowanych preparatów, ze względu na niekorzystne efekty uboczne, nie mogło być dopuszczone do stosowania. Wydaje się, że podglądnięcie i naśladowanie naturalnych mechanizmów obronnych roślinnych czy zwierzęcych stwarza szerokie możliwości poszukiwania nowych środków leczniczych. Obiecujące wyniki uzyskano stosując u chorych preparaty roślinne takie jak np. ekstrakt z Ginko biloba czy pochodzenia zwierzęcego jak np. izolowany z siary owczej i krowiej kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę (PRP/Colostrina) posiadający właściwości immunomodulatorowe i prokognitywne.

Składniki jaj mają podobne znaczenie dla rozwoju piskląt jakie ma siara dla rozwoju noworodków ssaków. I tak w jajach kur wykryty został przez Polanowskiego i współpracowników kompleks polipeptydów towarzyszący głównej frakcji immunoglobulinowej IgY – Yolkina. Doktorantka, zakładając analogię pomiędzy kompleksem PRP/Colostriną a Yolkiną podjęła się określenia wpływu preparatu izolowanego z jaj kurzych na funkcje poznawcze myszy i szczurów. Badania przeprowadzone zostały na prawidłowo dobranym modelu zwierzęcym, do oceny efektywności badanego preparatu zastosowano różne dawki i różne drogi podawania oraz szeroki wachlarz testów behawioralnych. Wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych na myszach i szczurach, niestety, nie przekonują jednoznacznie o możliwości zaproponowania Yolkiny jako preparatu poprawiającego funkcje pamięciowe i poznawcze w terapii choroby Alzheimera. W pewnych, wybranych testach uzyskano jednak statystycznie istotne różnice np. w przypadku skrócenia

czasu latencji w określaniu krzywych uczenia się myszy zarówno szczepu dzikiego jak i transgenicznego a też istotnie większą prędkość w labiryncie wodnym Morrisa u myszy przyjmujących Yolkinę drogą dootrzewnową. Gdy podawano myszom preparat drogą pokarmową statystycznie istotne, korzystne efekty Yolkiny wykazano w teście wodnym Morrisa, w zakresie wolnych ruchów. Korzystny, jakkolwiek nieistotny statystycznie efekt Yolkiny wykazano w przypadku skrócenia czasu poszukiwania platformy, precyzyjności dotarcia do platformy i liczby odwiedzin. Nie stwierdzono wpływu Yolkiny na stare i młode szczury. Tłumacząc brak efektów w przeprowadzonych przez siebie doświadczeniach, w moim odczuciu, doktorantka zbyt krytycznie odnosi się do wyników uzyskanych przez Popika i współpr. w przypadku Colostrininy. Zgadzam się z przedstawionymi w dyskusji, należy podkreślić dobrze przeprowadzonej, trudnościami związanymi z doświadczeniami na modelu zwierzęcym

Podsumowując stwierdzam, że na właściwie dobranym modelu przeprowadzono prawidłowo dobrane doświadczenia, których wyniki zostały poprawnie zinterpretowane. Doktorantka uzyskała odpowiedź na pytania postawione w założeniach pracy (str. 41). Uzyskane wyniki jednak tylko częściowo potwierdziły oczekiwania. Nie zawsze zakładane hipotezy uzyskują pełne potwierdzenie, a każdy uzyskany wynik pozwala na poznanie właściwości nowego preparatu jakim jest Yolkinina. Na obecnym etapie badań jest zbyt mało danych upoważniających do stwierdzenia zawartego w zakończeniu dyskusji na str. 100: „Można na tej podstawie postulować, że istnieje związek między właściwościami immunologicznymi kompleksu Yolkinina i wpływem na spowolnienie zmian otępiennych w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera.” Jak sugeruje Doktorantka powinny być dokładniej poznane właściwości przeciwtleniające i immunostymulujące - a może nie tyle właściwości immunostymulujące ale raczej immunoregulatorowe, wpływ na fagocytozę, czy na agregację białka amyloidu  $\beta$  oraz toksyczność preparatu.

Podczas czytania pracy zwróciłam uwagę na błędy stylistyczne i literowe oraz niezbyt trafne lub precyzyjne określenia, z których wymienię tylko mające znaczenie dla sensu przekazywanej informacji np.:



- **str 8:** dla wyjaśnienia skrótu PRP zawsze stosowane jest: proline rich polypeptide complex – kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę a nie wprowadzona przez Autorkę nazwa Proline Rich protein – białko wysokoprolinowe
- **str 9:** proponowałabym limfocyty Th określać jako wspomagające, jak stosowane jest podręczniku immunologii (Gołąb i wsp.) a nie wspierające (określenie z Wikipedii)
- **str 10 i 11:** tylko niektóre właściwości Yolkiny i Colostriny są podobne, za mało właściwości immunoregulatorowych Yolkiny jest poznanych aby mówić o jej udowodnionym działaniu immunostymulującym
- **str 18:** właściwym skrótem nazwy receptora lipoprotein o niskiej gęstości (low density lipoprotein) jest symbol literowy LDLR, lub określenie receptor LDL, a nie LTR
- **str 19:** w informacji o mutacjach w genach kodujących zamiast CLN powinno być CLU, CLN jest skrótem nazwy Colostriny, której użycie w tym miejscu nie ma sensu
- **str 19- 20:** informacje należałoby zweryfikować z danymi z podręcznika immunologii, np. odporność wrodzona składa się z komórek
- **str 23:** zamiast nazwy limfocytów regulatorowych lepiej byłoby wprowadzić nazwę limfocytów supresorowych
- **str 25:** pominięcie przecinka (druga linijka od góry) sugeruje, że  $\alpha 2$ -makroglobulina jest peptydem trzustkowym
- **str 26:** Colostrina nie powinna być nazywana białkiem  
nie wydaje mi się zreczne określenie badań na modelu zwierzęcym jako badań z udziałem zwierząt
- **str 29:** labirynt Morrisa jest czuły, niezręczny skrót myślowy
- **str 35:** omawiając wpływ Colostriny na układ immunologiczny można było wspomnieć o efektach w hodowlach komórek pełnej krwi, informacja o indukcji wzrostu neuronów powinna być zawarta w oddzielnym zdaniu.
- **str 36:** odnośnik 133 nie dotyczy nonapeptydu tylko Colostriny  
należało sprecyzować na ekspresję jakich genów wpływa Colostrina
- **str 38:** lepiej używać określenia ciężar cząsteczkowy niż masa molowa

• **str.39-40:** dlaczego przedstawione zostały wyniki ze zgłoszenia patentowego a nie cytowanej przez Autorkę i dostępnej publikacji. Wyniki te należy zweryfikować zgodnie z wynikami zawartymi w publikacji (poz. 146 spisu literatury). Nieprawidłowy jest końcowy wniosek (str.40), że z przeprowadzonych badań wynika, że Yolkina posiada właściwości antygenu.

Ze względu na znaczną liczbę prezentowanych wyników (rozdz.6 „Wyniki”) korzystne byłoby umieszczenie dodatkowych, krótkich informacji przypominających: zasada testu, sposób traktowania, znaczenie symboli, spodziewane efekty i efekty uzyskane - szczególnie statystycznie istotne. Dobrze byłoby te ostatnio wymienione zaznaczyć na rycinach np. \*

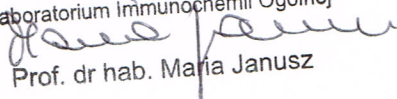
Szczególnie dla osób nie znających dokładnie testów behawioralnych korzystne byłoby podsumowanie grupy wyników np. uzyskanych w labiryncie wodnym. Taki końcowy wniosek przypominający co było oznaczane, czy badany preparat miał wpływ i jakiej funkcji to dotyczyło – czy i jak była ona zmieniona, poprawiłby przejrzystość przedstawianych wyników.

W rozdziale Dyskusja (str.94) znów pojawia się stwierdzenie:”...badania wskazują, że Yolkina posiada cechy antygenu..” Które badania uznaje Pani za świadczące o antygenowości Yolkiny. Proszę przypomnieć sobie definicję antygenu z podręcznika (Immunologia, Gołab i wsp.). Również na str. 95 w odniesieniu do Yolkiny nie powinno być użyte pojęcie „proces nabycia tolerancji na antygen”

W prawidłowo dobranym piśmiennictwie (za wyjątkiem poz. 133 dotyczącej Colostrininy a nie nonapeptydu) spośród 176 pozycji prawie 1/3 stanowią prace opublikowane po roku 2012. W kilkunastu cytowanych pracach (5, 25, 30, 36, 63, 90, 92, 93, 111, 114, 145, 152, 176) są niekompletne dane np. brak roku, numeru tomu i strony, podawany jest w nawiasie angielski tytuł prac przeglądowych publikowanych w języku polskim w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej i dostępnych w pełnej wersji on line.

Przedstawione uwagi nie wpływają w zasadniczy sposób na merytoryczną ocenę pracy. Uważam, że spełnia ona warunki stawiane pracom doktorskim. Przedkładam Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Akademii

Medycznej we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Marty Jakubik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Laboratorium Immunochemii Ogólnej  
  
Prof. dr hab. Maria Janusz