

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

tel/fax:+48 887 440 018

e-mail: [ewa.balcerczak@umed.lodz.pl](mailto:ewa.balcerczak@umed.lodz.pl)

**prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak**

---

Łódź, 8 maja 2023 r.

### **Ocena**

**Rozprawy doktorskiej: „Metylacja DNA oraz polimorfizmy genetyczne w chorobie Alzheimera” mgr Marzeny Skrzypy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.**

Recenzję przygotowano w związku z pismem z dnia 21 kwietnia 2023, Prorektora ds. Kolegium Nauk Medycznych prof. dr hab. n. med. Artura Mazura.

Przedstawiona do recenzji praca poświęcona jest poszukiwaniu nowych markerów molekularnych przydatnych w rozpoznaniu i ocenie zaawansowania choroby Alzheimera.

Praca została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej, Przyrodniczo Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Izabeli Zawlik.

Założenia pracy wpisują się w jeden z istotnych klinicznie nurtów naukowych jakim jest poszukiwanie nowych molekularnych czynników przydatnych w ocenie ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera. W tym zakresie podjęte zostały działania mające na celu określenie znaczenia metylacji oraz polimorfizmów wybranych genów *APOE*, *APOC1*, *TOMM40* i *ACE*.

Do realizacji celu głównego zostały, przez Doktorantkę, określone 4 cele szczegółowe polegające na: analizie wybranych polimorfizmów w genach mogących mieć wpływ na rozwój choroby Alzheimera jakim są *APOE*, *APOC1*, *TOMM40* i *ACE*; poszukiwaniu zależności pomiędzy polimorfizmami a stopniem zaawansowania choroby Alzheimera; ocenie metylacji w promotorach genów: *APOE*, *TOMM40* i *ACE*, oraz weryfikacji wpływu metylacji na rozwój choroby Alzheimera. Ostatnim z celów szczegółowych była analiza zależności pomiędzy względnymi poziomami metylacji w promotorach wybranych genów, polimorfizmami genetycznymi a dodatkowymi czynnikami związanymi z rozwojem objawów typowych dla choroby Alzheimera.

Praca doktorska mgr Marzeny Skrzypy jest 244 stronicowym opracowaniem, składającym się z części teoretycznej zawierającej wstęp, części praktycznej w której umieszczono założenie i cel pracy, materiały i metodykę, wyniki, wnioski, dyskusję, podsumowanie dyskusji oraz ograniczenia pracy nazwane nieco niestandardowo limitacjami. Ostatnią część pracy stanowi streszczenie i piśmiennictwo obejmujące 212 pozycji, w tym większość z ostatnich dziesięciu lat, pozostałe publikacje stanowią istotne uzupełnienie, pokazując uzasadnienie podjęcia tematu badawczego i jego wagi na przestrzeni wielu lat badań naukowych. Do pracy zostały dołączone spisy: tabel, rycin i wykresów co w sposób istotny ułatwia poruszanie się po dysertacji.

We wstępie pracy przedstawiono charakterystykę Choroby Alzheimera, z uwzględnieniem różnych postaci tej jednostki chorobowej, omówiono w sposób rzetelny wybrane geny oraz badane przez Doktorantkę polimorfizmy. W ostatniej części Wstępu przedstawiono rolę metylacji w procesie regulacji ekspresji genów oraz dane na temat znaczenia tego zjawiska w Chorobie Alzheimera.

W jednym z podrozdziałów przedstawiono „patologiczne białka” oraz wywołane przez nie zaburzenia w funkcjonowaniu mózgu, warto byłoby również zamieścić więcej informacji na temat potencjalnych patomechanizmów. W podrozdziale (strona 15 Wstępu), w którym Doktorantka wymienia w punktach dostępne narzędzia diagnostyczne, niepotrzebnie zostały zamieszczone dane zawarte w punktach 4 i 5. To są nowe trendy badań naukowych, a nie już dostępne testy. We Wstępie zabrakło odrębnego podrozdziału o dostępnych terapiach, do których Doktorantka nawiązuje w różnych miejscach swojej dysertacji co jest jak najbardziej uzasadnione, gdyż przeprowadzone przez Panią Magister Skrzypę badania mogą znaleźć zastosowanie również w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych.

Pomimo drobnych uchybień, Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej.

Część doświadczalna pracy obejmuje 126 stron. Doktorantka przeprowadziła badania na grupie badanej liczącej 161 osób oraz grupie kontrolnej obejmującej 62 osoby. Z grupy badanej na potrzeby analiz statystycznych wyodrębniono podgrupę osób młodych. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki. Tytuł podrozdziału 5.1.1. powinien uwzględniać również grupę kontrolną. Materiał biologiczny biobankowano i przechowywano w temp. – 86°C.

W pracy badawczej wykorzystano metody z zakresu biologii molekularnej. W części poświęconej metodyce w sposób jasny omówiono między innymi procedury: izolowania DNA z krwi pełnej, oceny polimorfizmów typu SNP w genie *APOE* metodą PCR-RFLP, oceny polimorfizmu I/D w genie *APOC1* metodą PCR-RFLP, oceny polimorfizmu typu VNTR (nukleotydów poli-T) w genie *TOMM40* metodą PCR z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej, oceny polimorfizmu I/D w genie *ACE* metodą PCR, oceny metylacji w regionach promotorowych genów: *APOE*, *TOMM40* i *ACE* metodą qMSP. Przedstawiono również procedurę dla testu ELISA przeprowadzanego w materiale jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy. W ostatnim rozdziale omówione zostały narzędzia statystyczne.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam drobne uwagi dotyczące tej części pracy. W Tabelach 6 i 19 zamiast słowa kroki bardziej odpowiednie byłoby użycie słowa etapy. W niektórych opisach można było pominąć podstawowe informacje, jak na przykład: szczegółowa charakterystyka proteinazy K, charakterystyka buforu TBE czy też opis metody PCR i jej potencjalnego wykorzystania. W podrozdziale 5.2.2 zamiast słowa absorbanca/absorpcja użyto omyłkowo słowa adsorpcja, w podrozdziale 5.2.3 zamiast słowa „ratio” powinno się pojawić słowo współczynniki lub stosunek. Doktorantka powinna również unikać sformułowania „w rs11568822 genu *APOC1*”, zwykle podajemy rs, albo zamieszczamy informacje, że w określonej pozycji. Tytuł Tabeli 13 również powinien być przeredagowany. Słowo ampikon w kilku miejscach należałoby zastąpić określeniem produkt reakcji PCR.

W przypadku oceny metylacji mamy doczynienia ze względnym poziomem metylacji czyli poziomem znormalizowanym do liczby par CG w danym regionie lub innego genu a nie poziomem względnej metylacji, wymienne stosowanie tych dwóch określeń pojawia się w wielu miejscach rozprawy.

Szczegółowo opisaną metodykę wzbogaciłyby schematy podsumowujące proces techniczny otrzymywania wyniku w poszczególnych etapach badań, co byłoby dużym ułatwieniem dla czytelnika.

Należy podkreślić, że w pracy Doktorantka wykorzystwała z sukcesem szeroki wachlarz zróżnicowanych technik badawczych co pozwoliło na uzyskanie niezwykle ciekawych wyników i realizację celu pracy.

Wyniki uzyskane w recenzowanej pracy zostały bardzo dobrze udokumentowane w postaci 50 wykresów, 34 tabel oraz jednej ryciny obrazujących: zależności pomiędzy poziomami badanych białek a stadiami otępienia; częstości rozkładu genotypów, alleli, liczby nukleotydów dla badanych polimorfizmów w badanych grupach, częstości genotypów w zależności od parametrów klinicznych, poziomów metylacji, różnice w poziomach metylacji między grupą badaną i kontrolną, plus szereg innych zależności. W tytułach niektórych wykresów, na przykład Wykres 38 nie podano informacji o jaką podgrupę chodzi.

Ważnym podrozdziałem jest omówienie wpływu układów możliwych genotypów dla badanych w pracy genów, na ryzyko wystąpienia otępienia.

W rozprawie znalazły się również zdjęcia dokumentujące rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji PCR oraz produktów trawienia enzymami restrykcyjnymi. Sposób prezentacji wyników pozwala śledzić postępy pracy i realizację jej kolejnych celów.

Metodyka oraz wyniki stanowią niezwykle wartościowy element rozprawy. Nie zakłócają tego drobne niedociągnięcia typu: pojęcie punkt polimorficzny, określenie hydroliza restrykcyjna/mieszanina hydrolizująca dla metody RFLP; żargonowy termin marker masy, zamiast wzorzec masy molekularnej, gen targetowy czy też określenie typu genotyp heterozygotyczny. Wskazuję je po to aby Doktorantka zwróciła na nie uwagę przygotowując kolejne publikacje.

Na podstawie uzyskanych w pracy doktorskiej wyników Autorka wykazała, że dla genu *APOE* najczęściej występującym allelem jest  $\epsilon 3$ , ale to obecność allelu  $\epsilon 4$  zwiększa iloraz szans wystąpienia otępienia o 4,3 razy, co wskazuje na potencjalną możliwość wykorzystania w diagnostyce. Dla genu *APOC1* obecność allela insercyjnego (I), rs11568822 zwiększa iloraz szans wystąpienia AD o 4,2 razy zarówno u homozygot II i heterozygot ID. Dla genu *TOMM40* allel S ma prawdopodobnie działanie ochronne przed wystąpieniem otępienia ale tylko w układzie homozygotycznym: S/S.

Stwierdzono istotne zależności pomiędzy genotypem DD genu *APOC1* (rs11568822) a genotypem S/VL genu *TOMM40* (rs10524523) oraz pomiędzy genotypem DD genu *APOC1* vs. VL/VL dla genu *TOMM40*, a występowaniem umiarkowanego otępienia w chorobie

Alzheimerera. Stwierdzono również istotne zależności pomiędzy genotypem II w genie *ACE* (rs1799752) a genotypem S/S w genie *TOMM40* (rs10524523) oraz pomiędzy genotypem ID w genie *ACE* i genotypem S/VL w genie *TOMM40* a występowaniem łagodnego otępienia.

Doktorantka zaobserwowała również, że w badanej podgrupie osób młodych ( $\leq 60$  r.ż.) czynnikiem decydującym o wystąpieniu objawów otępienia przed 60. rokiem życia była przyczyna genetyczna.

Niezwykłe interesująca jest obserwacja pokazująca, że poziom metylacji w promotorze genu spada we wczesnym stadium AD, natomiast wraz z zaawansowaniem choroby poziom metylacji ponownie wzrasta osiągając wartości takie jak w grupie kontrolnej. Badanie poziomu metylacji pozwala na rozróżnienie grupy osób zdrowych od osób z łagodnym otępieniem – AD I. Dla innych genów nie zaobserwowano takich zależności. Doktorantka w sposób wyważony zinterpretowała uzyskane wyniki uwzględniając dynamikę procesu metylacji w odniesieniu do wieku pacjentów i innych czynników współistniejących.

Te ciekawe i nowatorskie obserwacje mogą stanowić obiecujący wstęp do dalszych badań, mają też potencjał aplikacyjny jako potencjalne nowe narzędzia diagnostyczne.

Mgr Marzena Skrzypa w sposób prawidłowy zaplanowała, zaprojektowała i przeprowadziła badania oraz z sukcesem w sposób czytelny zaprezentowała w postaci logicznej całości wyniki i dokonała ich interpretacji. Postawiony cel główny oraz cele szczegółowe zostały osiągnięte dzięki dobrej organizacji pracy, jak i wsparciu oraz doświadczeniu Promotora w osobie Pani Profesor Izabeli Zawlik.

Uzyskane wyniki zostały omówione w dyskusji oraz rozdziale podsumowującym dyskusję, które są wartościowym elementem recenzowanej pracy i pokazują dojrzałość naukową mgr Marzeny Skrzypy. Doktorantka przedstawiła w niej przekonujące omówienie wyników wpływających z własnych badań, w porównaniu z danymi dostępnymi w cytowanych publikacjach.

Dorobek naukowy Doktorantki stanowi współautorstwo w 10 pracach oryginalnych i 1 pracy przeglądowej, gdzie w trzech mgr Marzena Skrzypa jest pierwszym autorem. Sumaryczny IF wynosi 28.608, a punktacja MEiN 1050. Wyniki zostały również zaprezentowane na konferencji krajowej.

Podsumowując praca została przygotowana w sposób właściwy, a pojedyncze błędy nie wpływają na jej ostateczną, wysoką ocenę. Należy podkreślić, że rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat Choroby Alzheimera, a uzyskane wyniki są możliwe do klinicznego wykorzystania w diagnostyce medycznej po przeprowadzeniu walidacji.

Z ogromną przyjemnością stwierdzam zatem, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Marzeny Skrzypy i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Magister Marzeny Skrzypy stosowną nagrodą ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników jak i możliwość ich praktycznego wykorzystania.

z poważaniem,

Ewa Balcerczak