

Prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska
Pracownia Neurobiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71 C
60-625 Poznań

Poznań, 31.07. 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek
pt. „Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim
modelu choroby Alzheimera” wykonanej w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym
Standardzie Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem prof. dr
hab. Urszuli Wojdy i promotora pomocniczego dr Anny Mielęskiej-Porowskiej**

I. ZASADNOŚĆ PODJĘCIA TEMATU PRACY DOKTORSKIEJ

Praca doktorska dotyczy zagadnień związanych z chorobą Alzheimera (ang. Alzheimer's disease - AD), a w szczególności otyłości, który przyczynia się do jej rozwoju. Zagadnienie to jest niezwykle istotne we współczesnym świecie w związku ze wzrostem średniej długości życia i procesami starzenia się społeczeństw. Konsekwencją powyższych zmian demograficznych jest zauważalny wzrost problemów zdrowotnych np. chorób neurodegeneracyjnych i otępiennych, w tym AD. Dodatkowo zmiana stylu, której towarzyszy spożywanie tzw. „diety zachodniej” (ang. Western diet - WD) wywodzącej się z USA, a obecnie coraz powszechniejszej w Europie i Azji, prowadzi do rozwoju otyłości. Otyłość, uznana została przez WHO za chorobę cywilizacyjną, a dane literaturowe wskazują, że spożywanie takiej diety bogatej w węglowodany i tłuszcze może przyczyniać się do rozwoju AD. W obecnej sytuacji wobec braku skutecznych metod leczenia AD działania prewencyjne, w tym stosowanie tzw. „zdrowej diety” są powszechnie zalecane.

Ponadto konieczne jest zrozumienie mechanizmów działania czynników ryzyka, w tym niewłaściwej diety w patologii AD. Stąd też celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zweryfikowanie, czy niezdrowy sposób odżywiania, taki jak stosowanie WD, który wywołuje zespół metaboliczny i ogólnoustrojowy stan zapalny może przyspieszyć i/lub intensyfikować stan zapalny mózgu oraz zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla AD.

Temat rozprawy doktorskiej uważam za wysoce zasadny nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale także znaczenia dla rozwoju metod prewencji chorób otępiennych, w tym AD.

OCENA FORMALNA PRACY DOKTORSKIEJ

Praca doktorska ma formę monografii liczącą 167 stron i posiada typowy układ, tj. składa się z następujących rozdziałów: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów (1 3/4 strony), obszerny wstęp (str. 11-30), założenia i cele pracy (1 strona), materiały i metody (str. 33-46), wyniki (str. 47-107), dyskusja (str. 108-133), podsumowanie i wnioski (2 strony), bogata bibliografia (str. 138-166), spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz publikacji dodatkowych (1 strona).

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie publikacje:

1. **Więckowska-Gacek A**, Mietelska-Porowska A, Wydrych M, Wojda U. Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2021 Sep;70:101397. doi: 10.1016/j.arr.2021.101397. IF=10,616
2. **Więckowska-Gacek A**, Mietelska-Porowska A, Chutorański D, Wydrych M, Długosz J, Wojda U. Western Diet Induces Impairment of Liver-Brain Axis Accelerating Neuroinflammation and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2021 Apr 1;13:654509. doi: 10.3389/fnagi.2021.654509. IF=5,750

W obu publikacjach Doktoranta jest pierwszą autorką, co wskazuje na znaczący Jej wkład w ich powstanie. Artykuły ukazały się w bardzo dobrych czasopismach związanych z tematyką starzenia się (*Aging Res Rev.* oraz *Front Aging Neurosci*) o IF odpowiednio 10,616 i 5,750. Jedna pozycja jest pracą przeglądową opublikowaną przez wydawnictwo ELSEVIER, a druga oryginalną pracą twórczą wydaną przez Frontiers. Szkoda, że prace te nie zostały dołączone do rozprawy doktorskiej. Są one jednak dostępne w bazie PubMed.

Ponadto Doktorantka jest również współautorką trzech innych publikacji określonych w rozprawie doktorskiej jako „publikacje dodatkowe” (str. 167):

1. Mietelska-Porowska A, Domańska J, Want A, **Więckowska-Gacek A**, Chutorański D, Koperski M, Wojda U. Induction of Brain Insulin Resistance and Alzheimer's Molecular Changes by Western Diet. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 25;23(9):4744. doi: 10.3390/ijms23094744. IF= 5,924
2. Płatek R, Grycz K, **Więckowska A**, Czarkowska-Bauch J, Skup M. L1 Cell Adhesion Molecule Overexpression Down Regulates Phosphacan and Up Regulates Structural Plasticity-Related Genes Rostral and Caudal to the Complete Spinal Cord Transection. *J Neurotrauma.* 2020 Feb 1;37(3):534-554. doi: 10.1089/neu.2018.6103. IF = 5,269
3. **Więckowska A**, Gajewska-Woźniak O, Głowacka A, Ji B, Grycz K, Czarkowska-Bauch J, Skup M. Spinalization and locomotor training differentially affect muscarinic acetylcholine receptor type 2 abutting on α -motoneurons innervating the ankle extensor and flexor muscles. *J Neurochem.* 2018 Nov;147(3):361-379. doi: 10.1111/jnc.14567. IF= 4,066

Jedna z tych publikacji dotyczy zagadnień poruszanych w doktoracie i ukazała się w czasopiśmie należącym do MDPI. Publikacja ta nie została dołączona do doktoratu, ale jest dostępna w bazie PubMed. Natomiast dwie pozostałe prace nie dotyczą tematyki rozprawy doktorskiej i nie są dostępne poprzez bazę PubMed. W recenzowanej rozprawie doktorskiej nie zawarto informacji na temat wkładu Doktorantki w powstanie poszczególnych artykułów i oświadczeń współautorów. Stąd też moje pytanie, które konkretnie badania wchodzące w skład doktoratu Autorka przeprowadziła samodzielnie.

Na podstawie dostarczonej rozprawy doktorskiej oraz wyżej wspomnianych publikacji można jednoznacznie stwierdzić, że Doktorantka dobrze orientuje się w tematyce badawczej dotyczącej choroby Alzheimera, o czym również świadczy bogata literatura zamieszczona w rozprawie doktorskiej.

II. OCENA MERYTORYCZNA PRACY DOKTORSKIEJ

We wstępie Autorka przedstawia charakterystykę i przebieg AD, omawia progresję zmian patologicznych w mózgu w tym schorzeniu oraz przedstawia hipotezy i genetyczne czynniki ryzyka przyczyniające się do rozwoju choroby. Zgodnie z przyjętym modelem badawczym Doktorantka skupia się i szczegółowo omawia hipotezę stanu zapalnego mózgu w AD oraz analizuje literaturę dotyczącą wpływu zespołu metabolicznego i powstawania stanu zapalnego w rozwoju tej choroby. Ta część pracy została dobrze napisana, przedstawiono w niej założenia, skłaniające do podjęcia tematyki badawczej i postawienia hipotezy. Autorka w interesujący sposób, w oparciu o analizę literatury naukowej dokonuje wprowadzenia w zakres podejmowanych problemów badawczych. Wstęp w dużej mierze omawia zagadnienia przedstawione również w pierwszej publikacji – tj. pracy przeglądowej opublikowanej w Ageing Res Rev w 2021 r. Zarówno praca przeglądowa jak i wstęp są bogato ilustrowane rycinami, które ułatwiają zrozumienie treści.

Pełniąc rolę recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka kwestii dotyczących tej części doktoratu:

- 1) Na str. 11 napisano „Postęp naukowy spowodował w czasach współczesnych wzrost średniej długości życia ludzkiego w porównaniu z poprzednimi wiekami”. Sądzę, że Autorka użyła tutaj pewnego skrótu myślowego i pod pojęciem postępu naukowego rozumie również postęp w rozwoju diagnostyki chorób i metody ich leczenia.
- 2) Na stronie 12 Doktorantka napisała, że „w przyszłości jednym skutecznym narzędziem terapii AD będzie medycyna spersonalizowana”, prosiłabym aby Autorka szerzej odniosła się do tej kwestii i tego w jaki sposób wyobraża sobie takie podejście terapeutyczne.
- 3) Na str. 16 użyte zostało określenie „Podstawowe hipotezy oraz genetyczne czynniki ryzyka AD”, dlaczego wprowadzono pojęcie „podstawowe” ?
- 4) Na str. 21 Autorka wspomina o przedklinicznych modelach AD, jednak ich nie opisuje. Czy Doktorantka mogłaby przybliżyć kilka z tych modeli ?
- 5) Str. 25 - Doktorantka napisała, że tkanka tłuszczowa wydziela hormony jednak nie podała przykładów.
- 6) Str. 25 napisano: „Co więcej, typ rozwiniętej otyłości (otyłość metabolicznie zdrowa lub niezdrowa) wydaje się być istotnym elementem ryzyka wystąpienia AD”. Co Autorka rozumie pod pojęciem „otyłość metabolicznie zdrowa” ?
- 7) Na str. 27 Doktorantka napisała: „Ponadto, spożycie WD wiąże się ze zmniejszeniem objętości lewego hipokampa w badaniu przeprowadzonym u mężczyzn w przedziale wiekowym 60-64 lata (Jacka i in, 2015)”. Czy wiadomo dlaczego zmiany zaobserwowano tylko w obrębie lewego, a nie prawego hipokampa ?

Założenia i cele pracy umieszczony zostały na jednej stronie i zawierają wszystkie istotne informacje, tj. zarówno hipotezę badawczą, jak i pięć szczegółowych celów badawczych. Hipoteza i cele badawcze są jasno sformułowane.

Rozdział „**Materiały i metody**” rozpoczyna się spisem zastosowanych odczynników, roztworów, przeciwciał i urządzeń umieszczonym w tabeli, który uważam za bardzo pomocny.

W tym spisie znalazło się jednak kilka niedociągnięć:

- 1) Brak istotnych informacji dotyczących przeciwciał, tj. czy są one pochodzenia monoklonalnego czy poliklonalnego ?
- 2) Na str. 40 brak informacji o tym ile zwierząt przebywało w jednej klatce w opisanym doświadczeniu.
- 3) Str. 40 - Skąd wynika nierówna liczba zwierząt w grupach doświadczalnych i kontrolnych, np. 4W kontrola $n=7$, a grupy doświadczalne LPS $n=4$, WD $n=4$, WD+LPS $n=5$? Czy Doktorantka nie obawia się, że $n=4$ to stosunkowo nieliczna grupa. Czy przeprowadzana została analiza mocy testów (ang. power analysis) do oszacowania optymalnej liczebności grup ?
- 4) Na str. 41 napisano: „Uśmiercanie, perfuzja oraz pobieranie krwi i tkanek”. Potocznie tak się oczywiście mówi, ale jak wiadomo krew to też rodzaj tkanki, z tym że płynnej.
- 5) Str. 42 „....krew do analizy pobrano terminalnie bezpośrednio z serca znieczulonej myszy...” Czy znieczulenie nie miało wpływu na badanie parametry we krwi ?
- 6) Str. 43 – użyto następujące sformułowanie: „Preparaty z tkanki mózgu przygotowano ręcznie”. Czy Autorka może wyjaśnić na czym polegało „ręczne przygotowanie preparatów” ?
- 7) Na str. 45 zostały podane koordynaty stereotaktyczne dla hipokampa, ale nie powołano się na atlas mózgu, albo inne źródło jakim się posługiwano do ich określenia.
- 8) Na str. 46 napisano: „Istotność statystyczną określono przy użyciu niesparowanego testu t-Studenta oraz jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Do jakich analiz statystycznych użyto testu t-Studenta ?

Wyniki - Ta część rozprawy doktorskiej zawiera liczne wyniki przedstawione w postaci rycin (ryc. 11 - ryc. 44) i tabel (tab. 12 - tab. 25). Ze względu na liczbę badanych grup w poszczególnych doświadczeniach przedstawienie wyników nie jest zapewne łatwe. Jednak moja ogólna uwaga do dotyczy umieszczenia poziomu istotności na poszczególnych rycinach w postaci wartości p . Te oznaczenia są napisane małą czcionką i pomimo wyężdżania wzroku w wielu przypadkach trudne do odczytania. Alternatywnie można umieścić gwiazdki, np. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ itd. Natomiast trend można zaznaczyć, np. # lub innym symbolem. Opis oznaczeń w tym przypadku można umieścić w legendzie. To w znacznym stopniu ułatwia przejrzystość rycin. Ponadto może warto również stosować regułę zaokrąglania wartości p , a nie podawania pełnych wartości z dokładnością do trzech miejsc po przecinku. Poniżej umieszczam dodatkowo szczegółowe uwagi dotyczące tej części rozprawy doktorskiej.

- 1) Na str. 49 brak opisu NS w tabeli , który oznacza nieistotność statystyczną
- 2) Str. 51, ryc. 12a - Zdjęcia obrazujące balonowanie wątroby są bardzo małe. Czy Doktorantka może wyjaśnić na czym polega balonowanie komórek wątrobowych, gdyż na zamieszczonych rycinach nie jest ono dobrze widoczne.
- 3) Bardzo pomocne są prezentacje w postaci rycin podsumowujące chronologicznie zachodzące zmiany pod wpływem badanych czynników, tj. WD, LP i WD+LPS.
- 4) Str. 54, ryc. 14 - Wpływ WD oraz iniekcji LPS na rozwinięcie stanu zapalnego. Na tej rycinie widoczne są duże wartości odchylenia standardowego szczególnie w przypadku białych krwinek, monocytów i granulocytów. Z czego one mogły wynikać ?
- 5) Na str. 55 Doktorantka napisała: „Podsumowując, analiza hematologiczna krwi wykazała nieistotny wzrost poziomu białych krwinek, zwłaszcza granulocytów i monocytów, już po 3

tygodniach karmienia myszy”. Rozumiem, że ten wzrost był nieistotny statystycznie ? Czy był trend we wzroście ? Jeśli tak to jakie były wartości p ?

- 6) Str. 57 – Sposób przedstawienia wyników Western Blot jest niejednorodny. Np. na str. 57, 61 i w kilku innych miejscach przedstawiono tylko powycinane pojedyncze paski co nie jest zbyt przekonujące. Lepszy sposób przedstawienia wyników zaprezentowano np. na str. 60, czy na str. 95, 97, gdzie widać całe linie, a nie tylko wycięte fragmenty.
- 7) Str. 64 - Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające Iba1 i Hoechst są bardzo małe, a wstawione czarno-białe obrazy bardzo słabo widoczne.
- 8) Str. 65, ryc. 19 – Szczególnie w części A zależności pomiędzy grupami są nie do odczytania z ryciny. Prezentowane jest od 9-12 zależności z odpowiadającymi im wartościami p, które pomimo wytyżania wzroku są niemożliwe do odczytania. To samo dotyczy ryc. 20 (część A), ryc. 22 a (część B).
- 9) Jakie kontrole Doktorantka stosowała w przypadku badań immunofluorescencyjnych ?
- 10) Str. 75, ryc. 24 - W przypadku IL-1 beta w okresach 4 M i 8 M obserwuje się niższe stężenia w korze śródwęchowej w porównaniu z hipokampem, a w 12 M ta zależność jest odwrotna. Dlaczego ?
- 11) Str. 78, ryc. 26 a – Wpływ WD i iniekcji LPS na tworzenie płytek A beta - 3 rząd 3 mikrofotografia – widnieje tutaj czerwono smuga biegnąca przez środek – czy to jest artefakt polegający na zagięciu preparatu ?
- 12) Str. 79, ryc. 26 b - Brakuje mikrofotografii pokazującej wpływ WD na tworzenie się płytek A beta.
- 13) W kontekście przeprowadzonych badań uważam za bardzo cenne obok wyników przedstawionych z użyciem modelu zwierzęcego wykonanie eksperymentów na tkance mózgowej *post mortem* od 85-letniego pacjenta, u którego zdiagnozowano SAD (str. 84).
- 14) Str. 99 Doktorantka napisała: „neurony nieprawidłowe mają wyraźnie zmienioną morfologię, są obkurczone przez co przybierają kształt wrzecionowaty, ich cytoplazma jest wyraźnie wypełniona eozyną i nie są widoczne jadra komórkowe”. Do tego opisuj przydałby się przykładowy mikrograf.
- 15) Str. 100 – Przy porównaniu zmian morfologicznych neuronów w hipokampie oraz w korze śródwęchowej w opisie w obrębie pola CA3 hipokampa napisano: „wszystkie zaobserwowane zmiany, niezależnie od grupy doświadczalnej, były obecne w brzusznej części hipokampa”. Czy Doktorantka może zaproponować wyjaśnienie dlaczego powyższe zmiany obserwowano tylko w części brzusznej hipokampa ?

Dyskusja napisana jest w interesujący sposób i zawiera liczne ryciny podsumowujące poszczególne wyniki, które znakomicie ją uzupełniają. W pierwszej części tego rozdziału Autorka powraca raz jeszcze do celu pracy. Przedstawia myślny model i dokonuje krótko jego walidacji. Następnie Doktorantka przedstawia najważniejsze wyniki (str. 109), uprawniające do zaproponowania przebiegu wydarzeń, które mają miejsce w rozwoju AD w prezentowanych modelach badawczych. Ta część napisana jest w bardzo jasny sposób. W tym miejscu warto przedstawić w tabeli dla porównania zmiany zachodzące w hipokampie i w korze śródwęchowej.

- 1) Na str. 111 Doktorantka wspomina o dysfunkcjach mitochondriów i stresie oksydacyjnym w przebiegu AD. Czy te procesy były badane przez Autorkę albo zespół naukowy, w którym pracuje ?
- 2) Na str. 112 Autorka napisała: „Otrzymane wyniki sugerują, że dotychczas zbyt małe znaczenie przypisywano roli astrocytów w patogenezie AD”. Jak wygląda zaangażowanie astrocytów w patogenezie innych chorób neurodegeneracyjnych ? Czy Doktorantka mogłaby podać konkretne przykłady badań ?
- 3) Str. 113 i w innych miejscach rozprawy doktorskiej Autorka powołuje się zmiany w przepuszczalności bariery krew mózg w patogenezie AD. Czy tego typu badania prowadzone

były w modelu mysim w zespole naukowym, w którym pracuje Doktorantka ? Jeśli tak to jakie są ich wyniki. Jeśli nie, to czy Autorka doktoratu mogłaby zaproponować tego typu badania ?

- 4) Str. 114 Doktorantka powołując się na badania Wilsona z 1997 r. napisała, że karmienie WD prowadzi do zmian w poziomie leptyny natomiast w prezentowanych badaniach nie oceniano poziomu tego hormonu, który jest niezwykle istotny w rozwoju otyłości. Dlaczego ?
- 5) Na str. 119 Autorka napisała: „w niniejszym badaniu w analizie ilościowej nie zaobserwowano istotnego wpływu WD na obniżenie poziomu markera synaptycznego PSD95 i neuronalnego NeuN, zarówno w hipokampie, jak i w korze śródwęchowej”. Natomiast napisano dalszej części pracy, że na podstawie analizy mikroskopowej wykazano zmiany w morfologii neuronów. Te wyniki, jak zauważa Doktorantka są odmienne od dostępnych danych literaturowych (np. Liu i in., 2014; Hong i in., 2020). Jako możliwy powód rozbieżności podano różnice w składzie diety i zastosowanie różnych modeli zwierzęcych. Czy Autorka mogłaby wytłumaczyć jakie składniki diety były różne ?
- 6) Str. 119 napisano: „Neurony, o zmienionej morfologii, sugerujące uruchomienie mechanizmów prowadzących do śmierci komórki widoczne były w hipokampie i korze śródwęchowej głównie u starzejących się myszy ” Czy Doktorantka mogłaby zaproponować przeprowadzenie badań, które by pozwoliły potwierdzić powyższe stwierdzenie ?
- 7) Umieszczony na str. 130 schemat przedstawiający proponowane mechanizmy i zależności między wywołanymi przez WD zaburzeniami metabolicznymi i ogólnoustrojowymi, a zmianami patologicznymi w mózgu prowadzącymi do przyspieszonego rozwoju AD uważam za bardzo pomocny. Stanowi on dobre podsumowanie wyników i wniosków z przeprowadzonych badań.

Podsumowanie i wnioski są napisane w sposób zwięzły. Na szczególną uwagę zasługują nowatorskie wyniki otrzymane w czasie realizacji doktoratu, tj.:

Przeprowadzenie szczegółowej analizy sekwencji patologicznych zdarzeń zachodzących w mózgu wywołanych przez WD na różnych etapach przedobjawowego stadium AD, oraz wykazanie szczególnej wrażliwości hipokampa na działanie powyższej diety w porównaniu do kory śródwęchowej. Po raz pierwszy wykazano również, że występuje korelacja pomiędzy zaburzeniami metabolicznymi wywołanymi przez WD i zmianami zachodzącymi w mózgu na różnych etapach przedobjawowego stadium AD. Ponadto stwierdzono, że w badanym mysim modelu silniejszy był wpływ WD niż LPD na neuropatologię AD.

Powyższe wyniki i wnioski z nich płynące mają na nie tylko znaczenie dla badań podstawowych, ale również mogą mieć zastosowanie w diagnostyce tej choroby. Ponadto podkreślają one dobitnie wpływ niezdrowej diety typu WD przyczyniającej się do rozwoju AD.

Str. 137 - We wnioskach końcowych napisano, że obserwowane w niniejszej pracy zmiany w modelu AD związane są a uszkodzoną BBB. Na podstawie badań zaprezentowanych w doktoracie nie zostały przedstawione jednoznaczne dowody na uszkodzenie BBB. Czy w innych badaniach niezaprezentowanych w recenzowanej pracy badano przepuszczalność tej błony ?

Oprócz wyżej opisanych nowatorskich wyników i wniosków przeprowadzone w pracy badania doprowadziły do sformułowania 10 innych wniosków, które w syntetyczny sposób przedstawiono na str. 136 i 137.

Bibliografia jest obszerna i została umieszczona na str. 138-166. Zawiera ona zarówno starsze, jak i najnowsze pozycje oraz wskazuje na dobrą znajomość tematyki badawczej przez Doktorantkę. Została ona starannie przygotowana, mam jedynie kilka drobnych uwag.

- 1) Na str. 157 widnieje pozycja NFZ o zdrowiu. Alzheimer 2022 – brak informacji o wydawnictwie lub odnośnika do strony internetowej
- 2) Na str. 164 znajduje się pozycja literaturowa Wang LM et al. Z 2018 r., w której brak numeru doi.

Podsumowanie części merytorycznej rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana językiem naukową z dużą starannością. Autorka wykazała się znajomością tematyki badawczej dotyczącej choroby Alzheimera. Powyższy wniosek wyciągam na podstawie lektury wstępu, dyskusji, bogatej literatury oraz opublikowanych dwóch artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i jednego dodatkowego z zakresu tej tematyki badawczej.

Rozprawa doktorska zawiera liczne rycyny podsumowujące poszczególne etapy badań, które uważam za szczególnie pomocne w zrozumieniu otrzymanych wyników. Badania zostały przeprowadzone w oparciu o jasno sformułowaną hipotezę badawczą i cele. Metody zostały dobrze dobrane i przeprowadzone na właściwym mysim modelu. Za szczególnie cenne uważam również przeprowadzanie badań *post mortem* na ludzkiej tkance mózgowej.

Wyniki przedstawione w sposób jasny (z drobnymi uwagi omówionymi powyżej). Eksperymenty przeprowadzone w ramach doktoratu doprowadziły do uzyskania nowatorskich wyników, które są istotne nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale mogą mieć również znaczenie w prewencji AD.

Pracę dokorską oceniam bardzo dobre, a powyższe krytyczne uwagi napisane z racji pełnienia funkcji recenzenta, nie umniejszają jej merytorycznej wartości.

IV. UWAGI DOTYCZĄCE STYLU PRACY

- 1) Na str. 20 użyto ponownie angielskiego określenia neuroinflammation, które było już wprowadzone na str. 18, stąd jest ono zbędne.
- 2) Str. 23 - Dieta zachodnia jest raz używana na tej stronie w cudzysłowie, a raz bez.
- 3) Str. 23 - Ostatnie zdanie jest bardzo długie i mieści się na 7 liniach.
- 4) Str. 25 - Użyto terminu „szerokie dane” może lepiej zastąpić określeniami liczne dane lub bogata literatura.
- 5) Str. 26 - Zdanie rozpoczynające się od: „Liczne badania na zwierzętach i ludziach wykazują, że.....” jest bardzo długie i mieści się na 5 i pół liniach. Można je zastąpić dwoma zdaniami.
- 6) Str. 27 - Zdanie zaczynające się od słów: „ Co ciekawe, w badaniach na gryzoniach odnotowano takie zjawiska, jak gorsze uczenie się.....” zajmuje 5 linii. To zdanie można podzielić na dwa.
- 7) Str. 28 - Błąd w pisowni „udowo-dniono” i „zapa-lnego” . Zbędne są myślniki.
- 8) Na str. 33 zamiast „odczynniki różnicujące barwę niebieską” zostało napisane „odczynniku”.
- 9) Str. 41 - Po (Gasparotto i in, 2017) należałoby postawić kropkę, a następne zdanie zacząć z dużej litery od Wg.
- 10) Str. 43 - „ Przygotowanie tkanek do znakowania histologicznego” można zastąpić „do badania histologicznego”.
- 11) Str. 43 - „W celu przygotowania bloczków parafinowych przygotowane w procesie fragmenty tkanek zatopiono w parafinie...” ten fragment jest napisany niejasno.
- 12) Str. 43 - Po wymienieniu stężeń alkoholu zastosowano skrót myślowy „aż do wody”.
- 13) Str. 53 - W tekście brak akapitów, poza pierwszym akapitem.
- 14) Str. 56 - „astro-cytów” – Niepotrzebny jest myślnik.

V. PODSUMOWANIE

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek pt. „Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu choroby Alzheimera” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

Jednocześnie ze względu na dużą wartość merytoryczną rozprawy zwracam się do rady Naukowej Instytutu Nenckiego o jej wyróżnienie.

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska



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, 18.08.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek

pt: „Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu
w mysim modelu choroby Alzheimer’a”

wykonanej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk,
w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie

PROMOTOR: Prof. dr hab. Urszula Wojda; PROMOTOR POMOCNICZY: dr Anna Mietelska-Porowska

Choroba Alzheimer’a (chA) jest najczęściej występującą postacią demencji na świecie i dotyczy przede wszystkim osób starszych. Szacuje się, że do 2030 r. liczba chorych osiągnie 82 mln, a w 2050 r. 152 mln. Dlatego schorzenie to jest bardzo poważnym obciążeniem ekonomicznym dla starzejących się społeczeństw. Oprócz kosztów ekonomicznych pociąga za sobą ogromne koszty społeczne. Rodziny i opiekunowie chorych są obciążeni psychicznie i fizycznie, zwłaszcza w późniejszych stadiach choroby, kiedy dochodzi do pełnego uzależnienia chorego od opiekuna. Mimo wielu dekad badań zmierzających do zrozumienia patogenezы tej dewastacyjnej choroby jej przyczyny pozostają nadal niewyjaśnione. Badania ostatnich lat wskazują, że jest to choroba wieloczynnikowa, co słusznie podkreśla Autorka recenzowanej pracy. Poza niemodyfikowalnymi czynnikami ryzyka, takimi jak wiek, płeć czy też mutacje genetyczne, coraz więcej badań wskazuje na istotną rolę modyfikowalnych czynników ryzyka chA, związanych ze stylem życia, w tym brak aktywności fizycznej, otyłość, czy niezrównoważona dieta. Doktorantka w swojej pracy skupia się na roli czynników infekcyjnych w patogenezы chA. Przewlekłe infekcje wirusowe czy bakteryjne mogą być ważnym, modyfikowalnym czynnikiem ryzyka chA oraz

innych zaburzeń neuropsychiatrycznych, dlatego praca wpisuje się w nurt najnowszych badań zmierzających do zrozumienia etiopatogenezy chA i wyjaśnienia molekularnych mechanizmów procesów neurodegeneracyjnych.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek jest obszernym opracowaniem o tradycyjnej formie, liczy 167 stron, 49 Rycin (w tym Wykresy i Schematy) oraz 25 Tabel. Została podzielona na Rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografia oraz Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i dodatkowe, umieszczono również wykaz najważniejszych skrótów.

We **Wstępie** liczącym 21 stron Autorka wprowadza czytelnika w istotę problemu podjętego w pracy. Kolejne podrozdziały Wstępu, Charakterystyka i przebieg choroby Alzheimerera, Progresja zmian patologicznych w mózgu w chA, Podstawowe hipotezy oraz genetyczne czynniki ryzyka chA, wskazują na doskonałą znajomość proponowanych obecnie mechanizmów tego zaburzenia neurodegeneracyjnego. Ryciny przedstawiające rozprzestrzenianie się patologii A β oraz białka Tau w różnych obszarach mózgu u pacjentów z chorobą Alzheimerera i przebieg stadiów choroby oraz ścieżki proteolizy białka APP, amyloidogenna i nieamyloidogenna są przygotowane bardzo starannie i doskonale obrazują omawiane zagadnienia (Ryciny 1-4). W pierwszej części Wstępu, w podrozdziale dotyczącym hipotez choroby przedstawiono dwie najpopularniejsze, amyloidową, która wiąże chorobę z odkładaniem się w mózgu blaszek starczych oraz związaną z obecnością splątków neurofibrylnych białka Tau. Mimo toczących się ostatnio dyskusji nad znaczeniem peptydów A β w patologii chA, nadal jest to najważniejsza hipoteza, dlatego Doktorantka powołując się na najnowszą literaturę omawia molekularne mechanizmy toksyczności beta amyloidu uwzględniając znaczenie zależnej od A β aktywacji mikrogleju i astrocytów, oraz rozwój neurozapalenia, umiejętnie przechodząc do alternatywnych mechanizmów choroby. Doktorantka doskonale orientuje się w najnowszych badaniach w tym obszarze, które sugerują powiązanie chA z przewlekłymi stanami zapalnymi obejmującymi układ nerwowy, i w dalszej części Wstępu skupia się na roli neurozapalenia w rozwoju chA, powołując się na najnowszą literaturę. To rozważanie jest wyjątkowo interesujące, Autorka sugeruje iż przyczyną aktywacji gleju i rozwoju neurozapalenia może być oligomeryzacja peptydów A β . Z drugiej strony tocząca się reakcja zapalna może prowadzić do oligomeryzacji, a następnie agregacji A β , co sugeruje, iż A β jest czynnikiem koniecznym do rozwoju chA, ale nie nadrzędnym. Zgodnie z podjętą tematyką badań, w kolejnym obszernym podrozdziale Doktorantka charakteryzuje dietę typu zachodniego (ang. western diet, WD) i przedstawia konsekwencje jej stosowania jako czynnika inicjującego rozwój zespołu metabolicznego oraz przewlekłego ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Logicznie poprowadzone rozważania we Wstępie przekonują, iż pod wpływem długotrwale utrzymującego się i powtarzającego się stanu zapalnego mogą rozwijać schorzenia takie jak cukrzyca, miażdżycy, choroby układu krążenia oraz choroby neurodegeneracyjne, w tym chA, a przyczyną rozwoju procesów prozapalnych może być właśnie stosowanie diety zachodniej.

Analizując wpływ diety zachodniej na upośledzenie pamięci i markery chA w mózgu Autorka stwierdza, że sposób odżywiania może wpływać na poziom białek zaangażowanych w plastyczność synaptyczną (str. 27) i wymienia między innymi neuroprzekaźniki takie jak acetylocholina, dopamina, czy serotonina oraz białko

synaptyczne - PSD-95 i czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF). Jest to błąd, prawdopodobnie redakcyjny, ponieważ wymienione neuroprzekaźniki, acetylocholina, czy dopamina nie są białkami. Acetylocholina, to ester kwasu octowego i choliny, a dopamina należy do katecholamin. Chociaż we Wstępie nie udało się Autorce uniknąć dość licznych, ale drobnych błędów redakcyjnych (np. strony: 28, 31, 43), nie mają one wpływu na wartość merytoryczną i ocenę pracy. Podsumowując ocenę tej części pracy stwierdzam, że Wstęp bardzo dobrze koresponduje z założeniami pracy i uzasadnia cel podjętych badań, który został jasno sformułowany w kolejnym rozdziale pracy. Głównym **celem** pracy było bowiem przeprowadzenie szczegółowej analizy sekwencji patologicznych zdarzeń wywołanych przez dietę zachodnią podczas przedobjawowego stadium chA w dwóch kluczowych dla tej choroby strukturach mózgu: w hipokampie oraz w korze śródwęchowej. Dodatkowym celem pracy było porównanie sekwencji patologicznych zdarzeń w mózgu wywołanych przez dietę zachodnią z sekwencją wywołaną dootrzewnowym podaniem endotoksyny bakteryjnej, lipopolisacharydu (LPS), odzwierciedlającym przejście ostrej infekcji bakteryjnej. Ten główny ogólny cel, został następnie szczegółowo opisany w 5 punktach, prezentujących kolejne cele szczegółowe.

Rozdział **Materiały i Metody** rozpoczął od zamieszczenia kilku Tabel, w których kolejno zestawiono spis odczynników, roztwory do immunohistochemii oraz do Western blottingu, następnie spis przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych, stosowane leki i środki do znieczulenia ogólnego oraz zastosowane urządzenia i oprogramowania. Takie ujęcie wykorzystywanych odczynników i materiałów jest bardzo przejrzyste i porządkujące ten rozdział, choć nie udało się Autorce uniknąć w tym miejscu pomyłki w numeracji Tabel (Tabela 5, następnie Tabela 9 i Tabela 6, w dalszej części pracy znowu pojawia się Tabela 9, w efekcie tym samym numerem oznaczono dwie różne Tabele). Ponadto, pojawił się błąd na Rycinie 9 przedstawiającej chronologię patologicznych zmian zachodzących w mózgu myszy APPswe, ostatnim punktem powinien być wiek zwierząt odpowiadający 18-miesięcznym myszom, a jest 15 miesięcy. Poza tym przebieg eksperymentu poparty schematem doświadczalnym został opisany perfekcyjnie, odniesienie wieku myszy do wieku ludzi bardzo ułatwia zrozumienie zachodzących w mózgu zmian. Podsumowując tę część pracy stwierdzam, że opis zastosowanych metod jest wyczerpujący i jasno przedstawiony i dowodzi, że Doktorantka potrafi dobrze zaplanować i przeprowadzić badania posługując się wachlarzem odpowiednich technik badawczych. Pewne nieprawidłowości pojawiły się w opisie statystycznej analizy danych, które zostały powielane wielokrotnie w całej pracy, Autorka stwierdza, że „w wynikach uwzględniono także wartości p mieszczące się w przedziale $0,1 < p \leq 0,05$ oznaczone jako tendencja, - podany przedział jest nieprawidłowo wyznaczony, p powinno mieścić się w przedziale $0,05 \leq p < 0,1$.

Kolejny i najważniejszy rozdział to **Wyniki**, który Doktorantka rozpoczyna od przedstawienia wpływu diety zachodniej i dootrzewnowej iniekcji LPS na rozwinięcie zespołu metabolicznego u myszy APPswe 4-, 8- i 12-miesięcznych. Analiza mikroskopowa stopnia stłuszczenia wątroby wykazała narastające z wiekiem uszkodzenia wątroby w miarę karmienia dietą zachodnią, nie wykazano natomiast zmian po podaniu LPS. Opis tej części wyników zawiera pewne niedociągnięcia, jak podaje Autorka w tekście, odpowiednie wakuole tłuszczowe zaznaczono kropkowanymi strzałkami, a hepatocyty przerostowe strzałkami, nie widać takich strzałek na

opisywanej Rycinie 12a A, poza tym „Rycina 12b B i C, strzałki” – nie ma takiej Ryciny. Analizując następnie wpływ diety zachodniej i LPS na rozwinięcie ogólnoustrojowego stanu zapalnego Doktorantka bada poziom odpowiednich frakcji leukocytów we krwi obwodowej i zauważa pewne tendencje do wzrostu w poszczególnych populacjach białych krwinek już po 3 tygodniach karmienia myszy dietą zachodnią, nie są to jednak zmiany istotne statystycznie. Na str. 53 Autorka stwierdza, że *„analiza grup z dootrzewnową iniekcją LPS nie wykazała żadnych różnic ani tendencji w stężeniu analizowanych populacji białych krwinek co świadczy, że ostry stan zapalny wywołany poprzez dootrzewnową iniekcję LPS daje silną, ale krótkotrwałą reakcję komórek immunokompetentnych bezpośrednio po podaniu czynnika infekcyjnego, a następnie dość szybko komórki układu odpornościowego prowadzą do redukcji tej reakcji w celu obrony przed jej negatywnymi konsekwencjami”*. Wniosek jest słuszny, ponieważ odpowiedź układu odpornościowego na LPS jest bardzo dobrze udokumentowana w literaturze, niemniej jednak, w recenzowanej pracy nie został poparty oznaczeniem markerów stanu zapalnego bezpośrednio po podaniu LPS, np. oznaczeniem cytokin prozapalnych we krwi obwodowej (np. TNF- α , IL-6 i inne) po 2-3h od podania toksyny. Mam również uwagę dotyczącą analizy poziomu akwaporyny-4. Autorka stwierdza, że wykazano zależne od struktury mózgu zmiany w występowaniu izoform tego białka o masie 50 i 30 kDa w hipokampie i prezentuje przykładowe membrany, na których widoczne są obie izoformy tego białka (Rycina 18a A), natomiast w przypadku kory śródwęchowej zamieszczono tylko wycięty fragment membrany na wysokości odpowiadającej masie 50kDa (Rycina 18b B), co uniemożliwia pełną analizę obrazu. W tym miejscu chciałabym również zapytać, czy porównując zmiany w hipokampie i w korze śródwęchowej analizowano membrany Western blot jednocześnie w identycznych warunkach eksperymentalnych.

W dalszej części pracy Autorka konsekwentnie bada zmiany mikrogleju, w tym aktywację i zdolności fagocytarne. Analizując obszar znakowania Iba1 w korze śródwęchowej, na stronie 62 pisze, że *„9 miesięcy stosowania diety WD spowodowało znaczny wzrost aktywacji mikrogleju, natomiast poziom ten nie różnił się istotnie od dopasowanej wiekowo kontroli”*, jest to niefortunne sformułowanie i wymaga wyjaśnienia, sugeruje, że skoro poziom Iba1 nie różnił się od kontroli, to dieta zachodnia nie wpływa na aktywację mikrogleju w tej strukturze mózgu, a wzrost poziomu tego białka może być związany ze wzrastającym wraz z wiekiem poziomem peptydów amyloidu beta w mózgu myszy APPswe. Podsumowanie wyników na zakończenie tego podrozdziału zobrazowane dodatkowo na dwóch schematach porządkuje uzyskane wyniki badań i ułatwia ich analizę. Analizę aktywacji procesów prozapalnych kontynuowano poprzez oznaczenie poziomu kluczowych cytokin prozapalnych, IL-6 i IL-1 β oraz receptora TLR4. Silniejszą odpowiedź zapalną zaobserwowano w hipokampie w porównaniu do kory śródwęchowej i wykazano zależne od wieku zmiany poziomu badanych cytokin.

Badania dotyczące wpływu diety zachodniej i zależnej od LPS aktywacji układu odpornościowego na markery charakterystyczne dla chA są bardzo ważne w kontekście wyjaśnienia udziału czynników środowiskowych w rozwoju tego zaburzenia. Autorka zbadała dwa kluczowe dla chA markery, odkładanie się peptydów amyloidu beta w postaci blaszek starczych oraz fosforylację białka Tau i zależne od tego białka zmiany cytoszkieletu. Analiza immunofluorescencyjna wykazała, że dieta zachodnia znacznie przyspiesza pojawienie się blaszek starczych zarówno w hipokampie jak i w korze śródwęchowej, podczas gdy nie zaobserwowano takiego efektu po podaniu

LPS. Zaobserwowano również wzrost poziomu APP oraz produktów jego proteolizy w hipokampie 4-miesięcznych zwierząt pozostających na diecie zachodniej. Analizując zmiany w fosforylacji białka Tau Autorka pracy skupiła się na zmianie potranslacyjnej dotyczącej fosforylacji treoniny w pozycji 231, uzasadniając wybór tym, iż jest to powszechnie uznany marker diagnostyczny chA. W tym przypadku największe zmiany uzyskano u zwierząt 4-miesięcznych. Ostatni etap badań, to analiza poziomu białek synaptycznych, których zmiany wskazują na zaburzenia funkcji synaps. Zbadano m.in. białko gęstości postsynaptycznej PSD95 oraz marker NeuN i chemokinę CX3CL1. Wykazano, że zmiany poziomu PSD95 pojawiają się wcześniej w hipokampie niż w korze śródwęchowej. Również w hipokampie w wieku 12 miesięcy nastąpił spadek poziomu NeuN, sugerujący spadek liczby neuronów z wiekiem. W tej strukturze mózgu zaobserwowano również zmianę proteolizy chemokiny CX3CL1 wydzielanej przez neurony. Zmiany tych białek zależne są od wieku zwierząt. Pracę zakończono badaniem zmian morfologicznych w obrębie hipokampa i kory śródwęchowej oraz porównano do zwierząt typu dzikiego.

W **Dyskusji** (str. 108-135) konsekwentnie podzielonej na podrozdziały poruszające kluczowe zagadnienia tej pracy Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki badań i konfrontuje je z najnowszą literaturą. Autorka słusznie zauważa, że nadekspresja APP i uwalnianie peptydów A β , które narasta wraz z wiekiem jest czynnikiem kluczowym prowadzącym do dysfunkcji synaps w badanym modelu. Jednak jej badania niezbicie dowiodły, że dieta zachodnia prowadzi do aktywacji procesów prozapalnych, które mogą przyspieszać dysfunkcję zakończeń synaptycznych i neurodegenerację. Choć mechanizmy aktywacji gleju zależne od stosowania diety zachodniej pozostają niewyjaśnione, to Autorka pracy na podstawie uzyskanych wyników badań oraz najnowszej literatury proponuje ścieżki aktywacji gleju i stawia hipotezę, że aktywacja kompleksu CD14-TLR4-MD2, a następnie aktywacja czynnika transkrypcyjnego Nf κ B prowadzi do uwalniania cytokin prozapalnych i neurozapalenia. Podchodzi jednak do uzyskanych wyników badań z dużą ostrożnością i krytycyzmem.

Podsumowanie i Wnioski umieszczone po zakończeniu dyskusji są prawidłowo skonstruowane, stanowią jasne i logiczne streszczenie głównych osiągnięć Autorki rozprawy i odpowiadają na postawione cele.

Analiza pracy nasunęła mi jednak drobne uwagi i kilka pytań:

1. Przedstawienie wyników w postaci bardzo małych i prawie nieczytelnych wykresów utrudnia ich analizę;
2. Ponieważ w pracy wywoływano u badanych zwierząt ogólnoustrojowy stan zapalny, chciałabym zapytać, czy po pobudzeniu układu odpornościowego LPS obserwowano u zwierząt typowe dla infekcji bakteryjnej zachowania i objawy chorobowe (ang. sickness behavior), np. zmiana temperatury ciała (gorączka lub spadek), zaburzenia łaknienia, aktywności lokomotorycznej lub zachowań społecznych. Czy jakiegokolwiek „sickness behavior” obserwowano w przypadku myszy pozostających na diecie zachodniej?
3. Czy Doktorantka planuje przeprowadzić badania z wykorzystaniem zwierząt typu dzikiego na diecie zachodniej, po podaniu LPS oraz na diecie zachodniej i po podaniu LPS w analogicznych punktach czasowych i ocenę typowych dla chA zmian patologicznych w mózgu oraz porównanie z wynikami uzyskanymi w ocenianej pracy? Badania z wykorzystaniem zwierząt typu dzikiego pozwoliłyby na odniesienie do sporadycznej postaci choroby Alzheimera, występującej znacznie częściej niż postać rodzinna.

Ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek jest bardzo obszernym, wyczerpującym opracowaniem dotyczącym wpływu diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu choroby Alzheimerera. Praca zawiera oryginalne, nowatorskie wyniki badań, które niewątpliwie przyczyniają się do zrozumienia mechanizmów neurodegeneracji w chorobie Alzheimerera, spełniając tym samym podstawowe wymagania stawiane pracy doktorskiej w zakresie wkładu w rozwój wiedzy. Wysnute z badań wnioski mają znaczenie nie tylko teoretyczne ale i praktyczne, m.in. dla opracowania sposobów zdrowego stylu życia, który może opóźnić pojawienie się objawów neurodegeneracji, szczególnie w dobie starzejących się społeczeństw. Wskazane uchybienia w pracy mają charakter drobnych błędów, trudnych do uniknięcia w tak obszernym opracowaniu. Podsumowując, rozprawa doktorska Pani Angeliki Więckowskiej-Gacek oparta jest o wartościowe, oryginalne wyniki naukowe, przedstawione w interesujący sposób. Cele pracy zostały zrealizowane przy użyciu odpowiednich metod badawczych. Wyniki omówiono w logiczny sposób i przedyskutowano w oparciu o najnowszą dobrze dobraną literaturę. Na uwagę zasługuje fakt, że część wyników została opublikowana w piśmie o wysokim współczynniku oddziaływania, Doktorantka jest również pierwszym autorem znakomitej pracy poglądowej opublikowanej w renomowanym piśmie o IF = 10,616.

Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Więckowskiej-Gacek p.t. „Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu choroby Alzheimerera” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

**OCENA****pracy doktorskiej mgr inż. Angeliki Więckowskiej-Gacek****„Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu choroby Alzheimera”**

Rozprawa doktorska porusza istotny z punktu widzenia diagnostycznego i terapeutycznego problem nieznanych dróg w patogenezie choroby Alzheimera (chA), powszechnie występującego nieuleczalnego schorzenia neurozwyrodnieniowego.

Choroba Alzheimera charakteryzuje się nabytym, postępującym zaburzeniem funkcji poznawczych, które znacząco przyczyniają się do pogorszenia jakości codziennego życia pacjentów dotkniętych tym schorzeniem. W zdecydowanej większości przypadków, objawy rozpoczynają się w późnym wieku tj. po 65 r.ż. Natomiast w przypadku 1% pacjentów mówimy o rodzinnej postaci chA (RchA), w której objawy rozpoczynają się nawet około 30 r.ż. Początkowa faza choroby przebiega skąpoobjawowo, co nie wpływa w znaczny sposób na spadek komfortu codziennego funkcjonowania. Wraz z rozwojem choroby, wśród występujących zaburzeń funkcji poznawczych wyróżnia się zaniki pamięci, zaburzenia odbierania bodźców wizualnych, a także upośledzoną zdolność mowy, co wynika z postępującego zaniku kory mózgu i hipokampa. W patofizjologii chA obserwowane są odkładające się blaszki amyloidu złożone z amyloidu β ($A\beta$) oraz splątki neurofibrylarne składające się z hiperfosforylowanego białka tau. Towarzyszącymi zjawiskami są także: pilśń nerwowa, astrocytoza, aktywacja mikrogleju oraz mózgowa angiopatia amyloidowa. Proces wiążący kaskadę amyloidu i białko tau wciąż jest jeszcze tematem badań.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w zakres obecnie prowadzonych badań nad patogenezą chA. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania stanowią próbę wyjaśnienia procesu zwyrodnieniowego toczącego się w przebiegu chA, w oparciu o wzajemne zależności pomiędzy procesem zapalnym a aktywacją komórek glejowych i tworzeniem się toksycznych oligomerów $A\beta$ oraz blaszek amyloidowych. Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest zatem celny i praktycznie uzasadniony.

Oceniana rozprawa doktorska ma strukturę klasycznej dysertacji naukowej. Liczy 167 stron wydruku komputerowego i została podzielona na rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz najważniejszych skrótów, wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski. Piśmiennictwo tej pracy (w liczbie ponad 350 pozycji) jest w dużej części bardzo aktualne (około 40% pozycji z ostatnich pięciu lat). Praca zawiera 25 tabel oraz 49 rycin. Wykaz stosowanych skrótów został

umieszczony na początku pracy. Układ pracy jest czytelny i logicznie zestawiony, z licznymi autorskimi schematami ułatwiającymi zrozumienie analizowanych zagadnień.

We wstępie Doktorantka przybliżyła problemy związane ze starzeniem się społeczeństw oraz wydłużeniem średniej długości życia w krajach uprzemysłowionych i w Polsce. Jak wiadomo, następstwem wydłużenia długości życia było zwiększenie populacji osób po 65 r.ż. oraz liczby zachorowań na choroby typowe dla tego wieku, w tym choroby zwyrodnieniowe ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Mgr A. Więckowska-Gacek wśród chorób o podłożu neurozwyrodnieniowym wyróżniła choroby otępienne. Otępienie dotyka 18 milionów ludzi na całym świecie. Należy podkreślić, że otępienie nie jest schorzeniem, ale zespołem objawów spowodowanych chorobą mózgu, zwykle przewlekłą lub postępującą, klinicznie charakteryzującą się licznymi zaburzeniami wyższych funkcji korowych, takich jak pamięć, myślenie, orientacja i uczenie się. Ponadto, w przebiegu otępienia obserwuje się deficyty poznawcze, które często utrudniają aktywność zawodową, funkcjonowanie społeczne i wykonywanie codziennych czynności. Najczęstsze typy otępienia to chA i otępienie z ciałami Lewy'ego (DLB). Wyróżnia się także otępienie naczyniowe (VaD) i otępienie czołowo-skroniowe (FTD). Do czynników ryzyka otępienia zalicza się wiek, niski poziom wykształcenia, nadciśnienie tętnicze i inne czynniki naczyniowe. W kontekście „otępienia” (str. 11), we wstępie należałoby wspomnieć również o innych chorobach otępiennych, których przebieg niejednokrotnie jest podobny. Należy jednocześnie zaznaczyć, że w języku polskim używa się słowa „otępienie”, a „demencja” (str. 11) jest zapożyczeniem z języka angielskiego, chociaż dość często pojawiającym się w piśmiennictwie.

Doktorantka przedstawiła również podstawowe zmiany neuropatologiczne w przebiegu chA w sposób szczegółowy, poprawny merytorycznie i przystępny dla czytelnika. Należy jedynie dodać, że zarówno odkładanie się złogów A β , jak i fosforylacja białka tau (str. 16) nie są spotykane jedynie w patologii chA, ale pojawiają się również w innych chorobach neurozwyrodnieniowych, co w znacznym stopniu utrudnia diagnostykę chorób o podobnej etiologii, zwłaszcza na wstępnym etapie rozwoju schorzenia.

Jak wiadomo chA jest chorobą wieloczynnikową, genetyczną (70%) i środowiskową (30%). Doktorantka przybliżyła podłoże genetyczne chA, wspomniała o genach przyczynowych (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) związanych z RchA. Należy zaznaczyć, że mutacje w genie *APP* mogą prowadzić do ujawnienia się choroby z późnym początkiem (po 65 r.ż.), w okresie charakterystycznym dla sporadycznej chA (SchA) (str. 17). Natomiast mutacje w genie *PSEN1* a nawet *PSEN2* odpowiadają za chA o wczesnym początku, przed 60 r.ż.

Doktorantka wspomina również o genie ryzyka *chA*, wraz ze szczegółową charakterystyką alleli, w tym wariantu patogenicznego *APOE ε4*.

W dalszej części rozdziału Doktorantka przedstawiła zaburzenia w układzie immunologicznym i zwróciła uwagę na istotną rolę astrogliu i mikroglu w rozwoju zmian zwyrodnieniowych w przebiegu *chA*. Co więcej, podkreśliła, że komórki glejowe są miejscem odkładania się złogów *Aβ* a stan zapalny inicjuje rozwój procesów prowadzących do uszkodzenia ośrodkowych neuronów. Przedstawiła również dwie alternatywne hipotezy zmian w przebiegu *chA*, „hipotezę amyloidową” typową dla *RchA* oraz „hipotezę podwójnego szlaku”, w której stan zapalny odgrywa istotną rolę. Ta druga teoria stała się podstawą przygotowania ocenianej rozprawy doktorskiej. W dalszej części omówiła modyfikowalne czynniki ryzyka *chA*, w znacznej części zależne od stylu życia. Zwróciła szczególną uwagę na stosowaną dietę.

Wydaje się, że dogłębna analiza wpływu odżywiania się i innych czynników ryzyka *chA* na rozwój zmian zwyrodnieniowych w OUN ma aspekt zarówno kliniczny, jak i edukacyjny. Ponadto, szerokie omówienie tematyki, na której opiera się część doświadczalna pracy zasługuje na podkreślenie, ponieważ przybliży czytelnikowi zrozumienie podstaw teoretycznych analizowanych zagadnień.

Doktorantka określiła założenia i cele pracy. Głównym celem pracy było przeprowadzenie pierwszej szczegółowej analizy sekwencji patologicznych zdarzeń wywołanych przez „dietę zachodnią” (WD) podczas „przedobjawowego stadium *chA*” w dwóch strukturach mózgu: w hipokampie i korze śródwęchowej. Moja drobna uwaga. Badania były wykonywane na zwierzęcym modelu doświadczalnym, dlatego w celu pracy nie powinno odnosić się do „przedobjawowego stadium *chA*”. Cele szczegółowe zostały jasno sformułowane i zawarte w 5 punktach obejmujących wytyczone zadania.

Badania przeprowadzono na myszach APPswe (linia Tg #1349; B6;SJL-Tg(APPswe)2576Kha) zakupionych z TACONIC BIOSCIENCES Laboratory, USA. Na podkreślenie zasługuje fakt, że model transgenicznych myszy APPswe charakteryzujący się nadekspresją zmutowanego APP, jest wysokiej jakości i powszednie używany w badaniu patogenezy *chA*. Należy również podkreślić, że praca doktorska ma w pewnym zakresie znaczenie kliniczne. Eksperymenty na modelu zwierzęcym zaprojektowano uwzględniając wiek ludzki oraz okresy rozwoju *chA*. Myszy podzielono na pięć grup wiekowych 4, 8, 12, 16 i 20 miesięcy, co odpowiadało u człowieka 25, 35, 45, 65, 75 lat. Uwzględniono również stadia rozwoju choroby: prodromalne, łagodne zaburzenia funkcji poznawczych, trzy stadia otępienia, łagodne, umiarkowane i ciężkie. Wiek 4 - 12 miesięcy, odpowiadał stadium

przedobjawowemu choroby, w którym zachodzą procesy patologiczne prowadzące do agregacji peptydów A β , natomiast nie występują złogi A β w postaci płytek starczych. Blaszki starcze u zwierząt pojawiają się w 16-miesiącu życia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie etapy przełomowe dla rozwoju chA zostały wyznaczone doświadczalnie.

W badaniach wykorzystano metody histologiczne, immunohistochemiczne, mikroskopowe, w tym mikroskop konfokalny pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników. Na podkreślenie zasługuje dobór przez Doktorantkę metod i opis procedur badawczych. Może on świadczyć o dużej znajomości technik z zakresu biologii molekularnej, dobrym przygotowaniu merytorycznym i doświadczeniu w pracy laboratoryjnej. Zastosowane metody są nowoczesne i spełniają kryteria naukowe wymagane dla tego rodzaju prac. Dobrze dobrano również metody do oceny statystycznej uzyskanych wyników.

Wyniki badań przedstawiono w postaci wykresów, rycin i zdjęć mikroskopowych. Przedstawiono je bardzo szczegółowo, niekiedy z autorskimi rycinami wyjaśniającymi zachodzące procesy patologiczne. Zmiany morfologiczne potwierdzono profesjonalnie przygotowaną dokumentacją mikroskopową. Doktorantka podjęła próbę wykazania wpływu czynników środowiskowych na generowanie stanu zapalnego o różnym nasileniu, jako przyczynę rozwoju neurodegeneracji. W tym celu wykorzystwała WD, dietę bogatą w związki lipidowe, jako model przewlekłego stanu zapalnego oraz lipopolisacharyd (LPS) jako silny czynnik wyzwalający reakcję naurozapalną. Wykazała, że WD i LPS w zróżnicowany sposób wpływają na poziom parametrów molekularnych. WD wywołuje hipercholesterolemię i hiperglikemię. Prowadzi do zmian ośrodkowych, zwiększając poziom IL-1 β oraz aktywując astrocyty w hipokampie, a także przyspiesza prozapalną polaryzację mikrogleju i upośledza proces fagocytozy w hipokampie. Wykazała również, że przewlekły stan zapalny prowadzi do zwiększenia poziomu białka APP i jego fragmentów CTFs w hipokampie oraz przyspiesza odkładanie płytek A β zarówno w hipokampie, jak i korze śródwęchowej, w strukturach istotnych dla rozwoju otępienia. Co więcej, nie wpływa istotnie na poziom markerów PSD95, NeuN i CX3CL1, a zmiany neurodegeneracyjne w poszczególnych obszarach hipokampa przebiegają relatywnie wolno. Stwierdziła także, że przewlekły stan zapalny w połączeniu z genetyczną predyspozycją do zachorowania na chA nasila procesy neurodegeneracyjne, ponieważ żadne zwierzę doświadczalne karmione WD nie osiągnęło wieku 16 miesięcy. Natomiast silny stres (LPS) w odróżnieniu od przewlekłego nie prowadzi do zmian metabolicznych i nie jest związany z przyspieszeniem procesów amyloidogenezy co może świadczyć o istnieniu silnych mechanizmów adaptacyjnych i obronnych organizmu.

Uzyskane wyniki badań są niewątpliwie osiągnięciem autorskim, zwłaszcza w odniesieniu do stwierdzenia, że aktywacja astrogleju wyprzedza zmiany w mikrogleju oraz że toksyczne oligomery A β wyprzedzają odkładanie się blaszek złożonych z A β . Doktorantka wskazuje również, że blaszki A β są konsekwencją uruchomienia procesów ochronnych w organizmie przed toksycznymi oligomerami A β uszkadzającymi synapsy i neurony.

W omówieniu Doktorantka ustosunkowała się do uzyskanych wyników i porównała je z właściwie dobranymi danymi z piśmiennictwa krajowego i światowego. Może to świadczyć o dużej znajomości prezentowanych zagadnień. Należy podkreślić, że Doktorantka po raz pierwszy przedstawiła szczegółową sekwencję zmian ogólnoustrojowych i metabolicznych oraz zmiany neurozapalne i patologię A β w obszarze hipokampa i kory śródwęczowej wywołane przez przewlekły stan zapalny. Co więcej, wykazała, że przewlekły stan zapalny zaburza gospodarkę cholesterolu oraz usuwanie A β , co wydaje się być jednym z głównych czynników przyspieszających rozwój choroby otępiennej. Obserwowane zmiany na poziomie molekularnym mogą tłumaczyć pojawiające się w badaniach klinicznych objawy u chorych z chA na różnych etapach rozwoju schorzenia.

Rozprawa doktorska została podsumowana krótkim opisem uzyskanych wyników oraz kilkoma wnioskami. Wnioski oparto na przeanalizowanych zależnościach pomiędzy procesem zapalnym a aktywacją komórek glejowych i tworzeniem się toksycznych oligomerów A β oraz blaszek amyloidowych.

Praca jest napisana poprawnym językiem polskim, z dużą starannością edytorską i dobrą dokumentacją wyników oraz dojrzałością naukową. Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca jest wykonana z wykorzystaniem różnorodnych, najnowszych metod z zakresu biologii molekularnej, wymagających doświadczenia w pracy laboratoryjnej. Badania wymagały ogromnego nakładu pracy. Co istotne, dały odpowiedź na wiele do tej pory nieznanych zależności w patomechanizmie chA. Uzyskane wyniki badań, zwłaszcza w odniesieniu do aktywacji astrogleju i zaburzeń funkcji mikrogleju powodują, że praca jest ponadprzeciętna.

Z racji obowiązku recenzenta muszę jednak wspomnieć o pewnych uchybieniach:

Zamiast sformułowania *tkanka mózgowa* (m.in. str. 7) proponowałabym użycie struktury mózgu lub komórki nerwowe lub glejowe, a zamiast *demencja* (m.in. str. 11) otępienie.

Str. 14, zamiast „*progresja zmian patologicznych*” rozwój zmian patologicznych.

Str. 17, „*osoby z kombinacją alleli*” osoby z genotypem

Str. 21, należy doprecyzować stwierdzenie „*Wykazano, że AD może rozwijać się jako długotrwały efekt urazu mózgu, w tym operacji*”.

Str. 29, należy uzupełnić „*w osoczu pacjentów z AD jest 3-6 razy większe niż normalnie*”

Str. 31, „zaburza procesy uczenia się i pamięci zależne od hipokampa oraz wzmacnia wymieranie neuronów”, umieranie neuronów czy raczej zanik neuronów.

W pracy pojawiły się również drobne błędy edytorskie, zwłaszcza w Bibliografii.

Przedstawione spostrzeżenia nie umniejszają wartości przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Chciałabym podkreślić, że w moim przekonaniu dysertacja ma wartość naukowo-poznawczą, a w niektórych aspektach nowatorską i odkrywczą.

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka oparła swoją pracę doktorską częściowo na artykułach opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych: Więckowska-Gacek i wsp. *Ageing Res Rev.* 2021 (IF 10,616); Więckowska-Gacek i wsp. *Front Aging Neurosci.* 2021 (IF 5,750).

Biorąc pod uwagę dobór i znajomość metod badawczych, dobrze wykonaną dokumentację pracy doktorskiej oraz aktywność naukową wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

Przedstawione powyżej uzasadnienie pozwala przedstawić Radzie Naukowej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Angeliki Więckowskiej-Gacek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Prof. dr hab. Jolanta Dorszewska

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Klinika Neurologii Pracownia Neurobiologii

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 61 86 91 439, -134
fax . 61 86 91 697

Poznań, 26.08.2023

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Dyrektor
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
Ul. Ludwika Pasteura 3
02-093 Warszawa

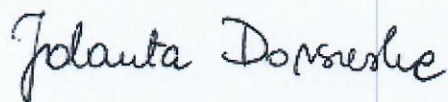
Szanowna Pani Profesor,

Dołączam uzasadnienie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Angeliki Więckowskiej-Gacek „Wpływ diety zachodniej na rozwój stanu zapalnego i patologicznych zmian w mózgu w mysim modelu choroby Alzheimera”.

Praca doktorska jest wykonana z wykorzystaniem różnorodnych, najnowszych metod z zakresu biologii molekularnej, wymagających doświadczenia w pracy laboratoryjnej. Badania były bardzo logicznie zaprojektowane i wymagały ogromnego nakładu pracy. Co istotne, dają odpowiedź na wiele nieznanych do tej pory zależności w patomechanizmie choroby Alzheimera i innych otępień. Chciałabym podkreślić, że w moim przekonaniu dysertacja ma wartość naukowo-poznawczą, a w niektórych aspektach nowatorską i odkrywczą.

Biorąc pod uwagę dobór i znajomość metod badawczych, dobrze wykonaną dokumentację pracy doktorskiej oraz aktywność naukową wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Łączę wyrazy szacunku,



Prof. dr hab. Jolanta Dorszewska