



Dr hab. Aneta R. Borkowska prof. UMCS

Lublin 2024-02-17

Katedra Psychologii Klinicznej i Neuropsychologii

Instytut Psychologii UMCS

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Patrycji Dzianok pt. Imaging genetics: APOE/PICALM genes are
associated with mild alterations in brain function in healthy, middle-ages
individuals
napisanej pod kierunkiem promotorki dr hab. Ewy Kubik

Wstęp

Podjęta przez Doktorantkę tematyka uwarunkowań nefizjologicznego starzenia się jest bardzo aktualna i potrzebna. W kontekście powszechnego zjawiska starzenia się społeczeństw rozpoznanie czynników znaczących, wpływających czy modyfikujących ten proces, jest nie do przecenienia. Szczególnie gdy podjęte badania mają tak wieloaspektowy charakter jak w ocenianej rozprawie doktorskiej. Choroby neurodegeneracyjne, w tym szczególnie choroba Alzheimera wzbudzają społeczny niepokój, głównie z powodu braku skutecznych metod leczenia czy terapii. Jedynie w niektórych przypadkach możliwe jest spowolnienie procesu neurodegeneracji. Choroby te stanowią obiektywnie czynnik obciążający finansowo, emocjonalnie i logistycznie chorych, ich najbliższych oraz całe społeczeństwo. Dlatego zbadanie znaczenia genów ryzyka choroby Alzheimera dla jakości struktur i funkcjonowania mózgowia, wybranych wskaźników zdrowia somatycznego i funkcji poznawczych, może okazać się istotne dla predykcji jakości starzenia się.

Cele badań Doktorantki są bardzo ambitne, a zrealizowane, pozwoliły na zebranie bogatego materiału poszerzającego aktualną wiedzę o mechanizmach nefizjologicznego starzenia się. Badania zaprezentowane w pracy mają charakter interdyscyplinarny, gdzie dyscyplina biologia została uzupełniona aspektami psychologicznymi.



Dysertacja napisana została w języku angielskim, zajmuje 131 stron, w tym główna treść 106 stron, pozostałe to literatura i załączniki. Zawartość merytoryczną stanowi sześć głównych części: wprowadzenie teoretyczne, opis celów badań, metody, wyniki, dyskusja oraz podsumowanie i konkluzje. Dysertacja zawiera także niezbędne elementy takie jak streszczenie, literaturę oraz załączniki zawierające tabele ze szczegółowymi wynikami, które nie są niezbędne w treści pracy. Zatem struktura jest zgodna z wymaganiami pracy naukowej i nie budzi zastrzeżeń.

Badania zaprezentowane w dysertacji są efektem niezwykle bogatego merytorycznie projektu. Jego cele były następujące: 1/ ocenić na ile obecność specyficznych alleli genów ryzyka LOAD czyli Late-onset Alzheimer Disease, APOE oraz PICALM ma wpływ na funkcje kognitywne u zdrowych osób w średnim wieku, 2/ ustalić na ile obecność wspomnianych genów koreluje z badanymi cechami krwi i mikroRNA 3/ ustalić na ile obecność genów APOE i PICALM jest związana z specyficznymi cechami aktywności mózgowej mierzonej zarówno poprzez EEG jak i fMRI w stanie spoczynkowym i podczas wykonywania zadań poznawczych (pamięciowych i wykonawczych) 4/ ocenić, czy istnieją zmiany strukturalne mierzone MRI w mózgach osób posiadających allele genów APOE i PICALM 5/ ocenić znaczenie genu APOE dla pojawienia się zmian, których dotyczą już wymienione cele oraz ustalić wpływ genu PICALM.

Ocena części teoretycznej

Doktorantka przyjęła w swojej pracy strategię doboru treści, typową dla sposobu pisania artykułów stanowiących raporty z badań. Jest to zrozumiałe z perspektywy faktu opublikowanie już części wyników w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Autorka syntetycznie przedstawiła konkretne, wąskie zagadnienia, poparte wybranymi publikacjami, kluczowe dla pracy.

Kolejność opisywanych zagadnień jest logiczna, autorka zaczyna od krótkiej charakterystyki istoty procesu starzenia się ze szczególnym uwzględnieniem zmian mózgowych, następnie nawiązuje do zjawisk rezerwy mózgowej i poznawczej oraz rezyliencji, które modyfikują przebieg starzenia się. Na tym tle została scharakteryzowana choroba Alzheimera, jej genetyczne źródła, z podkreśleniem znaczenia genów APOE i PICALM. Dalszy etap charakterystyki AD to przedstawienie najważniejszych hipotez etiologicznych jak dysfunkcji systemu cholinergicznego, hipoteza amyloidowa, hipoteza białka tau, czy roli chronicznej neuroinfekcji. Kolejne punkty zawierają omówienie jednego z typów choroby Alzheimera czyli LOAD (choroby o późnym początku), która jest przedmiotem zainteresowań, a zarazem badań

przeprowadzonych przez Doktorantkę. W charakterystyce LOAD znajdują się treści na temat czynników ryzyka i czynników protekcyjnych, które zostały przedstawione w formie czytelnego, przejrzystego diagramu. W treści autorka podkreśliła szczególne znaczenie diety, wskazała na różnice płciowe, ekspozycję na zanieczyszczenia powietrza i przedłużający się stres. Kolejny zakres merytorycznych treści odnosi się do prawdopodobnych biomarkerów LOAD. Zostały omówione wskaźniki uzyskiwane w testach z krwi, w tym miRNA oraz wskaźniki uzyskane z badań neuroobrazowych strukturalnych i funkcjonalnych MRI i EEG. Istotną część stanowią punkty poświęcone szczegółowemu omówieniu znaczenia genów PICALM i APOE.

W oparciu o lekturę treści wprowadzenia, z pełną odpowiedzialnością mogę stwierdzić, że Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym, udowodniła swoje świetne odczytanie w literaturze przedmiotu, umiejętności analityczne i dobre kompetencje w zakresie syntetycznego, a jednocześnie bogatego merytorycznie przedstawienia informacji. Doktorantka w pełni uzasadniła sensowność podjętych przez siebie badań.

Ocena części badawczej

W punkcie AIMS autorka wskazała 5 pytań badawczych oraz sformułowała trzy hipotezy. Te dwa elementy czyli pytania i hipotezy nie są w pełni spójne w tym sensie, iż w poszczególnych pytaniach autorka wskazywała na różne aspekty czyli wskaźniki zdrowia somatycznego np. z krwi, funkcje mózgu i strukturę mózgu w dwóch grupach badanych. Nie ma w nich odniesienia do podobieństwa ewentualnych cech osób z allelami APOE i PICALM do osób z objawami LOAD. Natomiast hipotezy dotyczą po pierwsze różnic pomiędzy osobami posiadającymi i nieposiadającymi allele APOE i PICALM we wszystkich badanych aspektach, po drugie porównania cech osób zdrowych do wzorca obserwowanego u pacjentów z LOAD. W pytaniach brakuje także odniesienia do zmiennych psychologicznych, badanych podczas procedury np. osobowości. Ale też muszę dodać, iż w części teoretycznej nie znalazłam uzasadnienia dla oczekiwania różnic w zmiennych psychologicznych takich jak osobowość czy sposoby radzenia sobie ze stresem.

Praca pod względem metodologicznym jest bardzo dobrze dopracowana. Plany eksperymentów, zastosowane metody i narzędzia badawcze, łącznie z badaniami neuroobrazowymi, zaawansowane analizy statystyczne są na wysokim poziomie.

Badania zostały zrealizowane dwuetapowo. W pierwszym etapie przebadano N=200 osób zbierając dane socjodemograficzne, historię obecności demencji w rodzinie oraz przeprowadzając testy psychologiczne: osobowości NEO FFI, depresji BDI-II, samooceny

Skalą Samooceny Rosenberga, kwestionariuszem radzenia sobie ze stresem, funkcjonowania poznawczego tablicami Ravena, pamięci i uczenia się CVLT, uzależnienie od alkoholu skalą AUDIT i ręczność. Wszyscy badani poddani zostali także testom genetycznym APOE i PICALM. Do drugiej części projektu wyselekcjonowano 80 badanych posiadających odpowiedni materiał genetyczny, czyli osoby z ryzykownymi wariantami tylko w zakresie genu APOE (A+, P-), ryzykiem odnoszącym się do obu genów czyli APOE i PICALM (A+, P+) oraz osoby bez wariantów ryzykownych genów czyli grupę kontrolną. Te osoby poddano ocenie neuroobrazowej (MRI anatomiczny i funkcjonalny i EEG), w warunkach resting state oraz wykonywania zadań poznawczych pamięciowych i wykonawczych oraz badaniom krwi. Jak wynika z tego skrótowego wypunktowania zastosowania procedur badawczych, projekt był bardzo bogaty, skomplikowany i wielowątkowy. Procedury zostały bardzo dokładnie opisane na 24! stronach. Do tej części rozprawy mam uwagę następującą. Mam wrażenie, że badania psychologiczne, nazwane nawiasem mówiąc przez Autorkę testami psychometrycznymi, co nie do końca mnie przekonuje, bowiem w tym określeniu nie widać iż są to jednak narzędzia oceny psychologicznej, a fakt obecności ich walorów psychometrycznych jest drugorzędny, są potraktowane marginalnie i nie znalazłam nawet wyjaśnienia sensowności i wartości ich zastosowania. Dlaczego badani zostali poddani ocenie osobowości? Depresji? Samooceny? Ręczności? Dlaczego zastosowano AUDIT? We wprowadzeniu teoretycznym znalazłam jedynie dwa zdania na temat cech osobowości i depresji lub zmian nastroju (s.13) skorelowanych z chorobą Alzheimera. Natomiast w części metodologicznej takiego uzasadnienia nie ma. Uzasadnienie znalazło badanie intelektu i badania pamięci testem CVLT ponieważ zaistniała konieczność potwierdzenia, że badani nie wykazują żadnych oznak zaburzeń poznawczych.

Autorka uzyskała bardzo dużo zróżnicowanych wyników w pełni uzasadnionych postawionymi pytaniami i zastosowanymi metodami badań. Rezultaty przedstawione zostały w formie czytelnych i klarownych tabel, wykresów, barwnych grafik, co ułatwiło odbiór tego złożonego i bogatego materiału.

Część wyników okazała się nieprzewidziana i zaskakująca. Przykładem takiego wyniku jest istotnie niższa aktywność fizyczna osób posiadających pojedyncze ryzyko genetyczne (A+P-), w porównaniu do pozostałych dwóch grup. Także badani z pojedynczym ryzykiem genetycznym (ale nie z podwójnym) wykazywali rodzinną historię demencji. Wyróżnione trzy grupy nie różniły się pod względem większości analizowanych szczegółowych wskaźników zdrowia i charakterystyk psychologicznych. Jednakże grupa A+, P- okazała się istotnie różnić

od pozostałych pod względem samooceny, poziomu objawów depresyjnych i strategii radzenia sobie ze stresem. Grupa z ryzykiem genetycznym LOAD uzyskała także odmienne niż grupa bez ryzyka wyniki w miRNA w osoczu i odmienną sygnaturę EEG. Jednak spowolnienie EEG i obniżenie złożoności sygnału stwierdzono tylko w grupie podwójnego ryzyka A+P+. Podczas wykonywania zadania poznawczego zaobserwowano subtelne różnice w wynikach behawioralnych, w postaci wydłużonego czasu reakcji, ale tylko w grupie A+P-. W potencjałach wywołanych stwierdzono odmienne wzorce mechanizmów w każdej z grup. W prawym biegunie skroniowym stwierdzono zmniejszenie grubości kory, ale tylko w grupie A+P-. W badaniach fMRI podczas zadania poznawczego uzyskano różnice w aktywacji okolic związanych z siecią tylną części zakrętu obręczy, okolicą związaną z siecią spoczynkową DMN, zakrętem kątowym, skroniowym i nadbrzeżnym. Zauważone w badaniach zmiany anatomiczne i funkcjonalne są zgodne z tymi opisywanymi w literaturze jako typowymi dla LOAD.

Jednakże wydaje się, iż najciekawszym ogólnym wnioskiem jest ten wskazujący na zależność obrazu funkcjonowania badanych od dwu analizowanych genów APOE i PICALM. Wydawać by się mogło, że podwójne ryzyko wynikające z obecności obu ryzykownych genów powinno powodować większe różnice w stosunku do grupy bez genów ryzyka, tymczasem okazuje się że to grupa pojedynczego ryzyka A+P- okazała się być bardziej różniąca się od kontrolnej.

W dyskusji ogólnej podsumowującej, Autorka zebrała i podsumowała dane ze wszystkich etapów i aspektów badania. Bardzo profesjonalnie przeprowadziła analizę wyników w kontekście aktualnej literatury wyjaśniając poszczególne rezultaty. Doskonale poradziła sobie z tym zadaniem wykazując pogłębioną refleksję, wskazując ograniczenia badań i perspektywy z nich płynące. Z тезami zawartymi w dyskusji będę polemizować w jednej kwestii. Na str. 94 autorka twierdzi, iż żałuje braku danych na temat diety oraz wyników badań poziomu witamin oraz mikro i makroelementów, co pozwoliłoby uzupełnić przeprowadzone analizy. Mam nieco odmienne zdanie. Wiele informacji z badań zrealizowanych w przedstawionej pracy jest w pełni wystarczająca, a odpowiedzi na wszystkie pojawiające się pytania, nie można udzielić w jednym projekcie.

Na zakończenie chcę podjąć jeszcze kwestię etyczną – czy badani, u których stwierdzono krytyczne/ryzykowne allele genów otrzymywali informację o tym, że mają zwiększone ryzyko zachorowania na LOAD? Czy osoby, które wykazywały pewne deficyty poznawcze – dowiedziały się o tym, a jeśli tak, czy dostały jakieś wskazówki, pomoc psychologiczną?

Jeśli Doktorantka posiada wykształcenie wyższe z kognitywistyki, nie z psychologii, nie ma uprawnień do prowadzenia badań psychologicznych. Pojawia się zatem pytanie, kto je wykonywał i taka informacja powinna zostać zamieszczona w pracy.

Warto też podkreślić, iż badania zostały sfinansowane z grantu PRELUDIUM 2018/31/N/HS6/03551, którego Doktorantka była kierownikiem.

Podsumowując ocenę całości pracy, analizując jej bez wątpienia wiele mocnych stron i zalet oraz uwzględniając wskazane niedociągnięcia i problemy formalne uważam, że rozprawa doktorska udowadnia bardzo dobry poziom wiedzy teoretycznej Doktorantki w dyscyplinie biologia a także psychologia. Doktorantka wykazała w swojej pracy umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a Jej praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, który ma też istotną wartość aplikacyjną. To sprawia, iż rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. Poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Patrycji Działek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie doceniając znaczenie projektu, a zwłaszcza jego wysoką jakość i wielość oraz zróżnicowanie dobrze zebranych danych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



OCENA
pracy doktorskiej mgr Patrycji Dzianok
„Imaging genetics: *APOE/PICALM* genes are associated with mild alterations in brain function in healthy, middle-aged individuals”

Rozprawa doktorska porusza istotny z punktu widzenia diagnostycznego i terapeutycznego problem znalezienia przyczyny wystąpienia choroby Alzheimera (chA), nieuleczalnego schorzenia neurozwyrodnieniowego.

Wydłużanie się średniej długości życia, obserwowane obecnie na świecie prowadzi do zwiększenia liczby zachorowań na schorzenia typowe dla wieku starczego, w tym na chA będącą jednocześnie najczęstszą przyczyną otępienia u osób starszych i stanowiącą ponad 50% jego przypadków. ChA jest powoli postępującym procesem neurozwyrodnieniowym, który dotyka ok. 1-2% populacji i występuje najczęściej wśród osób po 65 r.ż.

Objawy kliniczne chA są związane z rozległym zanikiem kory mózgu oraz hipokampa prowadzącym zasadniczo do osłabienia funkcji poznawczych. Choroba rozwija się nawet przez ok. 10-20 lat nie dając istotnych objawów klinicznych. 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. W patofizjologii chA obserwowane są odkładające się blaszki amyloidu złożone z amyloidu β ($A\beta$) oraz splątki neurofibrylarne składające się z hiperfosforylowanego białka tau.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w zakres obecnie prowadzonych badań nad patogenezą chA, szczególnie w kontekście zapobiegania jej wystąpieniu. Obecnie znanych jest około 20 genów związanych z patogenezą chA, a *APOE* uważany jest za gen o najwyższym ryzyku zachorowania na chA, wynoszącym 4,89. Natomiast niżej w tym zestawieniu sklasyfikowany jest gen *PICALM*, a ryzyko zachorowania na chA w przypadku posiadania wariantu patogenne tego genu wynosi 0,87 (Lambert et al., 2013). Wiadomo, że zarówno *APOE*, jak i *PICALM* przyczyniają się do patologii $A\beta$ przez odkładanie się tego patogenne białka w mózgu oraz zaburzenie funkcjonowania struktur ośrodkowych. Co więcej mniej znane jest znaczenie tych genetycznych czynników ryzyka w okresie przedklinicznym. Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest zatem celny i praktycznie uzasadniony.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i ma strukturę klasycznej dysertacji naukowej. Liczy 131 stron wydruku komputerowego i jest

podzielona na rozdziały: abstract, streszczenie w języku polskim, table of contents, abbreviations, introduction, aims, methods, results, discussion, summary and conclusion, references. Piśmiennictwo tej pracy (w liczbie 318 pozycji) jest w dużej części bardzo aktualne. Praca zawiera 54 tabele oraz 29 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 procesy towarzyszące starzeniu się organizmu, w tym ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz wskazała, że starzejące się społeczeństwo stanowi obecnie poważny problem społeczny zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Ponadto, mgr P. Dzianok podkreśliła, że skutkiem rosnącej liczby osób w podeszłym wieku jest zwiększenie zachorowań na choroby neurozwyrodnieniowe, w tym chA i chorobę Parkinsona. W dalszej części rozdziału scharakteryzowała chA pod względem objawów klinicznych oraz podłoża molekularnego. Jednak informacje na temat patogenezy chA należy doprecyzować. Zdanie „EOAD dotyczy osób pomiędzy 40 a 50 r.ż.” (str. 11) wymaga poprawy. EOAD raczej zależy od oznaczonych wariantów w genach przyczynowych chA, czyli *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*. Jeśli u chorego na chA stwierdza się mutacje w genie *PSEN1* a nawet *PSEN2*, to choroba występuje ok. 40 r.ż. Natomiast w przypadku wykazania obecności wariantów genetycznych w *APP* choroba może ujawnić się ok. 60 r.ż. Kolejne zdanie wymaga również uzupełnienia „Mutacje w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* dotyczą EOAD” (str. 15). Należy również doprecyzować zależności pomiędzy chA a LOAD. Proponuję podzielić chA na rodzinną, FAD czyli najczęściej EOAD oraz sporadyczną SAD czyli LOAD. Przyczyny FAD upatruje się w genach przyczynowych chA, natomiast SAD w genetycznych czynnikach ryzyka (w 70%). W przypadku SAD, jak słusznie podkreśliła Doktorantka pozostałe 30% stanowią czynniki środowiskowe i inne.

W dalszej części wstępu Autorka przybliżyła analizowane genetyczne czynniki ryzyka chA, *APOE* ε4 oraz *PICALM* GG związane kaskadą amyloidową i powstawaniem patogennego Aβ. Należy zaznaczyć, że za patomechanizm chA związany z kaskadą amyloidową odpowiadają zasadniczo geny przyczynowe, ale geny ryzyka również mogą w tym mechanizmie uczestniczyć (str. 16). Jak wiadomo, odkładane złogi Aβ śródnaczyniowo i w parenchymie są przyczyną uszkodzeń neuronów oraz pojawienia się objawów klinicznych, w tym zaburzeń pamięci. W dalszej części rozdziału Doktorantka przedstawiła zaburzenia w przekąźnictwie cholinergicznym jako przyczynę zaburzeń pamięci oraz omówiła możliwości terapeutyczne w zakresie poprawy tych funkcji.

Jak trafnie podkreśliła, patomechanizm chA jest obecnie wyjaśniany w oparciu o kilka hipotez, m.in. zaburzeń na poziomie jonów wapnia, teorię stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego, czynników naczyniowych oraz infekcyjnych, które mogą wzajemnie się uzupełniać. Autorka podkreśliła również znaczącą rolę metod neuroobrazowych w diagnostyce chA, które zwłaszcza obecnie mają istotne znaczenie w związku z nową definicją chA z 2018 roku (Jack et al., 2018).

Wydaje się, że dogłębna analiza czynników ryzyka chA wraz badaniami neuroobrazowymi, w tym fMRI zwiększa poziom wiedzy na temat chorób neurozwyrodnieniowych oraz potencjalnych czynników ryzyka. Ponadto, szerokie omówienie tematyki, na której opiera się część doświadczalna pracy zasługuje na podkreślenie, ponieważ przybliży czytelnikowi zrozumienie podstaw teoretycznych analizowanych zagadnień.

Doktorantka jasno sformułowała cele pracy. Założeniem pracy było zbadanie mechanizmów prowadzących do zaburzenia funkcji poznawczych u osób bez chorób neurologicznych i cech otępienia, w wieku odpowiadającym ujawnieniu się chA o późnym początku czyli około 60 r.ż., u których wykazano brak lub obecności genetycznych czynników ryzyka tej choroby zwyrodnieniowej. Wśród genetycznych czynników ryzyka wybrano powszechnie uznany allel *APOE* ε4 oraz mniej przebadany specyficzny allel G genu *PICALM*. W celu potwierdzenia udziału *APOE* ε4 oraz *PICALM* GG w powstawaniu zaburzeń poznawczych, podstawowego objawu w chA, badaniu poddano biomarkery krwi i profile miRNA a także przeprowadzono badania psychologiczne oraz analizę neuroobrazową z wykorzystaniem fMRI i badanie aktywności mózgu za pomocą EEG.

Autorka również wyznaczyła trzy hipotezy badawcze, w których założyła, że osoby bez stwierdzonych chorób neurologicznych i cech otępienia, z genetycznymi czynnikami ryzyka chA będą miały zróżnicowany poziom parametrów morfologicznych, profilu lipidowego, miRNA oraz będą się różniły zachowaniem neuropsychiatrycznym od osób bez czynników predysponujących do zachorowania na tę chorobę otępienną. Założyła również, że posiadanie genetycznych czynników ryzyka może wpłynąć na pojawienie się u tych osób zmian w obrazie EEG, EEG ERP, różnic integralności sieci fMRI i nieprawidłowości strukturalnych mózgu. Moja drobna uwaga, użycie określenia „Zdrowe osoby w średnim wieku” (str. 30) wydaje się być nieuprawnione, ponieważ osoby badane posiadały nieprawidłowości ze strony innych narządów, takie jak: choroba tarczycy, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i inne, co zostało ujęte w kryteriach włączenia do grupy badanej (str. 40).

Badania przeprowadzono u około 70 osób w wieku 53-60 lat, kobiet i mężczyzn, wybranych spośród początkowej grupy 200. W celu uniknięcia przypadkowości w doborze

grup badanych u 200 osób przeprowadzono wstępną klasyfikację obejmującą zbieranie danych demograficznych oraz informacji na temat historii rodzinnej. U tych osób wykonano również przesiewową analizę genów *APOE/PICALM*, a także przeprowadzono badania psychologiczne. Wstępna weryfikacja pozwoliła na wydzielenie trzech grup, 31 osób bez wariantów wskazujących na ryzyko zachorowania na chA (A-P-) oraz dwie kolejne grupy, 27 osób z ryzykownymi wariantami tylko w zakresie genu *APOE* (A+P-) oraz 21 osób z ryzykiem zachorowania na chA dotyczącym genów *APOE* oraz *PICALM* (A+P+). W dalszym etapie badano osoby z wydzielonych trzech grup z wykorzystaniem metod neuroobrazowych: strukturalnych (magnetyczny rezonans jądrowy, MRI) i funkcjonalnych (elektroencefalografia, EEG; oraz funkcjonalny MRI, fMRI). Przeprowadzono również rozszerzone badania krwi oraz badanie panelu mikroRNA związanych z chA.

W badaniach wykorzystano metody molekularne ELISA oraz panel miRNA obejmujący miR-29b-3p, miR-30-5p, miR-34a-5p, miR-125b-5p, miR-135a-5p, miR-142-3p, miR-146-5p, miR-200a-3p, miR-483-5p, miR-486-5p i miR-502-3p pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników. Należy podkreślić, że badania miRNA wykonano w Pracowni Badań Przedklinicznych Wyższego Standardu, kierowanej przez prof. Urszulę Wojdę w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, będące znaczącym osiągnięciem Pracowni kierowanej przez Panią Profesor. Opierano się również na szpitalnych badaniach laboratoryjnych w zakresie morfologii i profilu lipidowego. Wykonano także testy psychometryczne w celu oceny inteligencji (RAVEN), pamięci werbalnej (CVLT), cech osobowości (NEO-FFI), strategii radzenia sobie ze stresem (Mini-Cope), poziomu depresji (BDI) i poczucia własnej wartości (SES). Analizowane cechy są uważane za czynniki ryzyka chA. Na podkreślenie zasługuje również przeprowadzanie badań MRI/fMRI w Centrum Badań Bioimaging w Instytucie Fizjologii i Patologii Słuchu w Polsce pod kierunkiem prof. Tomasza Wolaka, uznanego autorytetu w tej dziedzinie. Natomiast badania EEG odbywały się w laboratorium EEG Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN. 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 graficznych podsumowań. Przedstawiono je bardzo szczegółowo i wysoce merytorycznie.

Zgodnie z założeniami pracy przeprowadzono analizę częstości występowania alleli genu *APOE/PICALM*. W przypadku genu *APOE* $\epsilon 4$ wykazano, że patogenny genotyp w połączeniu z populacyjnym $\epsilon 3/\epsilon 4$ występował wielokrotnie częściej w porównaniu do genotypu składającego się z dwóch patogennych alleli $\epsilon 4/\epsilon 4$. Uzyskany rozkład genotypów

potwierdził dane dla rasy kaukaskiej pochodzenia europejskiego. W przypadku genu *PICALM* GG wykazano występowanie tego genotypu ze znaczącą częstością, 41,5% co może wskazywać, że jego udział w patogenezie chA wymaga dodatkowego czynnika.

W przypadku badań psychometrycznych oceniających pamięć werbalną, poziom depresji, strategię radzenia sobie ze stresem i poczucie własnej wartości wykazano minimalne różnice pomiędzy badanymi grupami w skalach związanych z depresją/nastrojem i samooceną. Jednakże pogorszenie funkcji uzyskano w grupie A+P-, które najprawdopodobniej było związane z posiadaniem patogennego allelu $\epsilon 4$. Jak wiadomo u nosicieli tego allelu stwierdza się większe deficyty poznawcze. Ponadto, posiadanie patogennego allelu $\epsilon 4$ wiązało się z obniżeniem poziomu miR-29b-3p. Jak wiadomo, rodzina miR-29 potencjalnie odpowiada za stany zapalne układu nerwowego, a obniżony poziom miR-29b-3p we krwi wykazano do tej pory jedynie u pacjentów z chA. Odkryciem Doktorantki jest wykazanie obniżonego poziomu tego miRNA u osób z predyspozycjami do wystąpienia chA.

Co więcej posiadanie nawet obu patogennych alleli A+P+ nieznacznie zmieniało parametry krwi obwodowej. Brak istotnych zmian na poziomie czynników układu krążenia u badanych osób może wskazywać, że w organizmie nie toczyły się ostre procesy patologiczne.

Doktorantka wykazała również, że posiadanie genetycznych czynników ryzyka chA może wpłynąć na pojawienie się zmian w obrazie EEG, fMRI i w nieprawidłowościach strukturalnych mózgu. Obserwowane zmiany w badaniach EEG i fMRI zasługują na podkreślenie ponieważ wnoszą nowe informacje do badań w zakresie grup ryzyka chA związanych z posiadaniem patogennych alleli.

W omówieniu Doktorantka ustosunkowała się do uzyskanych wyników i porównała je z właściwie dobranymi danymi z piśmiennictwa. Może to świadczyć o dużej znajomości prezentowanych zagadnień. Co więcej na wyróżnienie zasługuje stwierdzenie Doktorantki, że u osób w średnim wieku, które mogą być predysponowane do rozwoju chorób otępiennych, na funkcjonowanie OUN wpływają patogene allele *APOE* i *PICALM* oraz że u tych osób mogą występować subtelne zmiany w parametrach molekularnych i neuroobrazowych. Wydaje się, że osoby z predyspozycjami genetycznymi do zachorowania na choroby otępienne powinny znaleźć się w grupie ryzyka i podlegać dalszej obserwacji.

Rozprawa doktorska została podsumowana krótkim opisem uzyskanych wyników oraz kilkoma wnioskami. Wnioski oparto na przeanalizowanych zależnościach pomiędzy genetycznymi czynnikami ryzyka a parametrami molekularnymi oraz wynikami badań czynnościowych EEG i fMRI w okresie wieku odpowiadającemu okresowi prodromalnemu.

Praca zastała przygotowana z dużą starannością i dobrą dokumentacją wyników oraz dojrzałością naukową. Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca jest wykonana z wykorzystaniem różnorodnych, najnowszych metod z zakresu biologii molekularnej oraz metod czynnościowych. Badania wymagały ogromnego nakładu pracy. Co istotne, dały odpowiedź na wiele do tej pory nieznanych zależności odnośnie okresu poprzedzającego wystąpienie choroby.

Uzyskane wyniki badań poszerzają naszą wiedzę na temat patogenezы chA. W przyszłości mogą pomóc w opracowaniu strategii wczesnego wykrywania chorób otępiennych lub różnicowania chorób o podobnej etiologii. Jednocześnie przez ocenę ryzyka, mogą przyspieszyć i ulepszyć zapobieganie rozwojowi otępienia na wczesnym etapie choroby. Co więcej mogą pomóc w opracowywaniu programów badań przesiewowych i przyczynić się do powstania skuteczniej farmakoterapii.

W pracy pojawiły się drobne błędy edytorskie. 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 ma również dorobek naukowy z punktacją IF.

Biorąc pod uwagę dobór 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 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Przedstawione powyżej uzasadnienie pozwala przedstawić Radzie Naukowej wniosek o dopuszczenie mgr Patrycji Dzianok do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem,



Prof. dr hab. Jolanta Dorszewska

prof. dr hab. Michał Harciarek
Wydziału Nauk Społecznych
Instytut Psychologii
Zakład Neuropsychologii

Gdańsk, 20.03.2024 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Dziańok
pt. *“Imaging genetics: APOE/PICALM genes are associated with mild*
alternations in brain function in healthy, middle-aged individuals“

Promotor: dr hab. Ewa Kublik

Starzenie się, choć naturalnie wpisane w nasz rozwój, nie zawsze przebiega w optymalny sposób, czego przykładem są charakterystyczne dla tej fazy naszego życia różnego rodzaju choroby neurozwyrodnieniowe. W efekcie u części ludzi proces starzenia się układu nerwowego przybiera patologiczną postać, co w rezultacie istotnie zaburza poznawczo-emocjonalne funkcjonowanie dotkniętej taką chorobą jednostki. Jak dowodzą liczne badania, najczęściej dzieje się tak w następstwie choroby Alzheimera, która - poprzez swoją specyfikę - przyczynia się przede wszystkim do znacznego pogarszania się pamięci, funkcji wzrokowo-przestrzennych i procesów wykonawczych, prowadząc ostatecznie do rozwoju pełnoobjawowego otępienia.

W ostatnich dekadach coraz więcej uwagi poświęca się czynnikom ryzyka chorób otępiennych, w tym także choroby Alzheimera o późnym początku (ang. *late-onset Alzheimer's disease* - LOAD). Fakt ten wynika zarówno z nowych możliwości technologicznych (np. rozwoju technik neuroobrazowania), postępu w zakresie badań genetycznych, jak i ogromnych społecznych i finansowych kosztów związanych między innymi z opieką osób z otępieniem. Choć jednak w dość szybkim tempie przybywa publikacji na temat czynników ryzyka LOAD, złożona etiologia tejże choroby powoduje, że lista pytań w tym zakresie pozostaje znacząco dłuższa niż liczba odpowiedzi. Jedno z tych pytań, stanowiące zapewne inspirację do przeprowadzenia przez mgr Patrycję Dziańok badań będących podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, dotyczy tzw. genów ryzyka LOAD. Mgr Patrycja Dziańok podjęła się bowiem próby oceny związku między obecnością dwóch genów ryzyka LOAD (tj. APOE i genu PICALM) a strukturą i funkcjonowaniem mózgu osób w średnim wieku bez objawów otępienia. W swoim interdyscyplinarnym projekcie, obok przesiewowych badań genetycznych i neuroobrazowych, Doktorantka uwzględniła także rolę wybranych czynników demograficznych i psychologicznych. Poniżej przedstawiam szczegółowe uwagi/komentarze, koncentrując się zarówno na ocenie strony formalnej, jak i merytorycznej pracy.

Ocena strony formalnej pracy (m.in. układu pracy, strony graficznej)

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Dziańok, napisana w całości w języku angielskim, liczy łącznie 131 stron i ma względnie klasyczny układ rozpraw doktorskich, składając się z dwóch głównych części: wprowadzenia teoretycznego (rozdział 1) i badań własnych (rozdziały 2-4), zakończonych dyskusją (rozdział 5)

i podsumowaniem (rozdział 6). Całość wieńczy spis cytowanej literatury wraz z załącznikami. Na początku rozprawy Doktorantka zamieściła także streszczenie pracy (zarówno w języku angielskim, jak i polskim) oraz informację o źródle finansowania; projekt stanowiący podstawę opracowania ocenianej rozprawy doktorskiej był bowiem sfinansowany przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs Preludium).

Wprowadzenie teoretyczne, składające się z czterech podrozdziałów, zostało bardzo dobrze opracowane pod względem edytorskim. Analogicznie, strona formalno-językowa części obejmującej opis badań własnych wraz z dyskusją uzyskanych wyników nie budzi najmniejszych zastrzeżeń. Zrozumienie rezultatów ułatwiają także precyzyjnie opracowane ryciny i tabele, których zawartość doskonale koresponduje z tekstem. Pozytywnie oceniam również pomysł wyróżnienia samych celów projektu jako osobnego rozdziału; bazując na treściach rozdziału pierwszego sformułowano tu pięć pytań badawczych i trzy główne hipotezy; na marginesie, fakt wyróżnienia tego rozdziału znacznie ułatwił mi lekturę pracy. Przyjemność czytania wynikała jednak nie tylko z przyjętego porządku prezentowanych zagadnień i doskonałego języka, jakim praca została napisana, ale również z rodzaju papieru, na którym wydrukowano rozprawę (niby mało istotna/ wręcz banalna kwestia, a jednak sprzyjająca lekturze). Ponadto, przyjęty przez Doktorantkę sposób cytowania prac innych autorów jest spójny i zgodny z obowiązującymi standardami dla rozpraw doktorskich. Wszystko to sprawia, że formalną stronę rozprawy mgr Patrycji Działok oceniam zdecydowanie pozytywnie.

Ocena merytoryczna pracy

Rozpoczynając rozprawę doktorską mgr Patrycji Dziańok wprowadzenie teoretyczne (rozdział 1) zawiera podstawowe informacje ważne z punktu widzenia celu badania, w tym przedstawionych w kolejnym rozdziale pytań i hipotez. W części tej Doktorantka opisała między innymi, czym charakteryzuje się proces starzenia się układu nerwowego, jak również jaką rolę w tym procesie odgrywa kwestia rezerwy mózgowej oraz rezerwy poznawczej. Mając na uwadze temat swoich badań, w rozdziale tym mgr Patrycja Dziańok wprowadza czytelnika w problematykę choroby Alzheimera jako przykładu patologicznego starzenia się mózgu. Doktorantka nakreśla przy tym złożoną etiologię tej właśnie choroby, poświęcając szczególnie dużo uwagi potencjalnym biomarkerom LOAD (także w kontekście wyników dotychczasowych badań neuroobrazowych). Ogólnie można zatem stwierdzić, że wszystkie zaprezentowane w rozdziale 1 treści (uzupełnione o rycinę 1 i 2 – diagramy obrazujące fazy rozwoju i czynniki ryzyka LOAD) w wystarczającym stopniu uzasadniają podjętą przez mgr Patrycję Dziańok tematykę badań własnych. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy funkcjonowania mózgowia, w rozdziale 1.1. zabrakło mi zdefiniowania procesu starzenia się w ujęciu bardziej neuropsychologicznym. Doktorantka ograniczyła się tu bowiem przede wszystkim do kwestii biologicznych, pomijając aspekty (neuro)psychologiczne. Oczywiście mam pełną świadomość, że w swojej rozprawie mgr Patrycja Dziańok akcentuje głównie biologiczne uwarunkowania LOAD, jednak nie pomija ona przy tym w przeprowadzonych analizach uwzględnienia czynników demograficznych czy nawet czysto psychologicznych (jak inteligencja i wybrane funkcje poznawcze,

osobowość, nastrój). Tym samym, dziwi fakt dość wąskiego zdefiniowania procesu starzenia w części teoretycznej pracy.

Jak już wspominałem, w rozdziale nr 2 mgr Patrycja Działok prezentuje pytania i hipotezy badawcze. W rozdziale nr 3 Doktorantka przedstawia metodologię badań własnych, gdzie opisuje zarówno sposób rekrutacji osób do projektu (Doktorantka zadbała tu o kontrolę szeregu zmiennych zakłócających), jak i każdą z dwóch faz badania: 1) badania screeningowe (obejmujące badania genetyczne, kwestionariuszowe, testy psychologiczne), 2) badania krwi i badania neuroobrazowe. W części tej scharakteryzowano także zastosowane testy statystyczne (wraz z analizą mocy) oraz dokładnie opisano analizowane zmienne (zarówno demograficzne, kwestionariuszowe, jak i neuroobrazowe). Co istotne, i godne uznania, w pierwszej fazie badań uczestniczyło aż 200 osób zdrowych w średnim wieku, w drugiej zaś aż 79 osoby, które (na podstawie wyników badania genetycznego dotyczącego genów APOE i PICALM) podzielono na trzy grupy: 1) A+P+, 2) A+P-, 3) N (tj. grupę neutralną, genetycznych czynników ryzyka). Cały plan metodologiczny doskonale obrazuje rycina 3 (str. 33).

Oczywiście bezspornym atutem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Działok jest fakt, że w przeprowadzonych badaniach Doktorantka zdecydowała się na względnie kompleksową próbę odpowiedzi na postawione przez siebie pytania. W projekcie zaplanowano bowiem nie tylko badanie genetyczne, które pozwoliło na wyodrębnienie trzech wspomnianych powyżej podgrup, ale także badania neuroobrazowe z zastosowaniem takich metod, jak strukturalny i funkcjonalny rezonans magnetyczny oraz elektroencefalografia. Przyjęte podejście pozwoliło zatem porównać, czy analizowane czynniki ryzyka rozwoju LOAD mogą faktycznie wiązać się ze

strukturalnymi i/lub funkcjonalnymi zmianami w mózgu jeszcze przed wystąpieniem jakichkolwiek objawów klinicznych choroby Alzheimera.

Mimo powyższych atutów planu metodologicznego, pewien niedosyt i pytania/ wątpliwości budzą jednak następujące kwestie. Po pierwsze, choć Doktorantka zbierając wnikliwie dane demograficzno-klinicznie kontrolowała takie zmienne, jak wykształcenie, a badane grupy nie różniły się między sobą w zakresie tego czynnika, zastanawia mnie, dlaczego poziom wykształcenia nie był mierzony w latach (a jedynie kontrolowany rodzajem wykształcenia, tj.: matura, licencjat, magisterium). Przyjęty podział jest w mojej ocenie bardzo mało informatywny i ogranicza możliwości analiz (np. analizy zamieszczone w tabeli nr 8, str. 58) oraz samą interpretację uzyskanych wyników. Przykładowo, w kontekście rozdziału 1.1.1 (poświęconego między innymi rezerwie poznawczej) Doktorantka mogłaby wówczas zweryfikować, czy zaobserwowany brak różnic między grupami w funkcjonowaniu pamięci nie jest czasem efektem, za który odpowiada właśnie liczba lat nauki szkolnej. Po drugie, nie jest dla mnie jasne, dlaczego do pomiaru inteligencji mgr Patrycja Dzianok zastosowała Test Matryc Ravena a nie np. podtest Słownik ze Skali Inteligencji Wechslera dla Dorosłych? To, co bowiem mogłoby potencjalnie modyfikować uzyskane rezultaty, będąc jednocześnie dodatkowym i miarodajnym wskaźnikiem rezerwy poznawczej, to właśnie test pozwalający ocenić inteligencję skryzalizowaną, a nie płynną (względnie niezależną od zdobytego przez jednostkę doświadczenia), jak bada to Test Matryc Ravena. Po trzecie, biorąc pod uwagę postawione pytania badawcze, nie jest dla mnie jasne, dlaczego Doktorantka zdecydowała się oceniać osobowość czy poziom samooceny badanych? Jaka była motywacja/ teoretyczne uzasadnienie zastosowania takich narzędzi, jak NEO-FFI? Bez takiego solidnego podłoża

teoretycznego, fakt, że jedną z badanych grup cechował podwyższony poziom neurotyzmu zdaje się nie mieć żadnego znaczenia. Innymi słowy, tak jak trudno doszukać się jakiś istotnie słabszych stron w części projektu zorientowanej bardziej biologicznie (np. w pomiarach neuroobrazowania i powiązanych z nimi analizach), strona psychologiczna rozprawy jest trochę niedopracowana. Szkoda, bo taka drobna zmiana, jak ocena wykształcenia liczbą lat nauki szkolnej lub zastosowanie podtestu Słownik pozwoliłoby na przeprowadzenie dodatkowych analiz, w efekcie czego bardziej optymalną interpretację zebranego materiału.

Jednym z głównych wyników rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Działek było wykazanie, że osoby z genetycznie wyższym ryzykiem rozwoju LOAD cechowały się mniejszą złożonością sygnału EEG oraz jego spowolnieniem. Stwierdzono też, że osoby z wyższym ryzykiem LOAD, mimo prawidłowości udzielanych odpowiedzi, miały wydłużone czasy reakcji, jednak tylko w przypadku trudniejszych wariantów zadania poznawczego. Dodatkowo, u badanych z grupy ryzyka wykryto zmniejszenie grubości kory prawego bieguna skroniowego, jak również stwierdzono zmiany aktywacji w zakręcie kątowym, skroniowym dolnym i nadbrzeżnym. Tym samym, uzyskane w ramach analiz wyniki, choć nie wyczerpują podjętego przez Doktorantkę tematu, są naukowo wartościowe, wskazując na brak liniowej komunikacji efektów wzdłuż osi poziomu ryzyka. Opisane w rozprawie rezultaty stanowią jednocześnie istotny przyczynek do kolejnych prac pozwalających bardziej precyzyjnie nakreślić najistotniejsze predyktory rozwoju LOAD. Szczególnie ważne byłyby w tym względzie badania longitudinalne, co też podkreśla sama mgr Patrycja Działek w ciekawie napisanym rozdziale nr 5 (Dyskusja) oraz rozdziale 6.

Podsumowując, mimo pewnych niejasności i ograniczeń psychologicznej strony badań (co jednocześnie względnie ograniczyło możliwość wykonania określonych analiz statystycznych i bardziej jednoznaczną interpretację uzyskanych efektów), część empiryczną niniejszej rozprawy doktorskiej oraz opracowaną na jej podstawie dyskusję wyników oceniam pozytywnie.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Mimo kilku uwag, które przedstawiłem powyżej, rozprawę mgr Patrycji Działok oceniam pozytywnie. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania oraz sposób prezentacji uzyskanych wyników dowodzą bowiem, że mgr Patrycja Działok posiada kompetencje badawcze, jakich oczekuje się od kandydatów na stopień naukowy doktora. **Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. Zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Patrycji Działok do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

