**Prof. dr hab. n. med.**
**Maria Barcikowska**
**Zespół Kliniczno-Badawczy**
**Chorób Zwyrodnieniowych CUN**
**IMDiK PAN**
**im. Mirosława Mossakowskiego**

**Warszawa 28.08.2017**

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Pawła Muszyńskiego pt. „Znaczenie białka YKL-40 w patogenezie choroby Alzheimera"**

**Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej**

1. **PRACA PRZEGLĄDOWA:**

**Muszyński P**, Groblewska M, Kulczyńska-Przybik A, Kułakowska A, Mroczko B. YKL-40 as a potential biomarker and a possible target in therapeutic strategies of Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 2017 (praca przyjęta do druku). **IF = 3.753; MNiSW = 35 pkt**

2. **PRACA ORYGINALNA:**

**Muszyński P**, Kulczyńska-Przybik A, Borawska R, Litman-Zawadzka A, Słowik A, Klimkowicz-Mrowiec A, Pera J, Dziedzic T, Mroczko B. The relationship between markers of inflammation and degeneration in the central nervous system and the blood-brain barrier impairment in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **7.673,** 2017. **IF = 3.920; MNiSW = 30 pkt**

Dane bibliograficzne dotychczasowego dorobku mgr Pawła Muszyńskiego z włączeniem prac wchodzących w cykl pracy doktorskiej w oparciu o dane Biblioteki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (stan na dzień: 14.06.2017)
http://biblioteka.umb.edu.pl/expertus/index.html

| Rodzaj publikacji* | Liczba* | Impact Factor* | Punktacja MNiSW* |
|---|---|---|---|
| Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej | 2 | 7.673 | 65 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Publikacje, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej** | **3** | **9.894** | **100** |
| **Polskie streszczenia zjazdowe** | **8** | **–** | **–** |
| **Zagraniczne streszczenia zjazdowe** | **8** | **–** | **–** |
| **Razem** | **21** | **17.567** | **165** |

**WSTĘP:** Zawiera lapidarny przegląd opublikowanej wiedzy na temat epidemiologii, patogenezy i zasad rozpoznawania choroby Alzheimera. Perspektywa konieczności zmierzenia się z populacją blisko 130 milionową otępiałych chorych już w roku 2050 powinna spowodować podjęcie już teraz starań o wypracowanie skutecznych i możliwie tanich metod jak najwcześniejszego rozpoznania choroby Alzheimera z jednej strony, a z drugiej opracowania metod, jeżeli nie leczenia, to odsunięcia jak najdalej w czasie stanu pełnej zależności pacjenta od pomocy osób drugich w tej szybko rosnącej populacji chorych.

Rola biomarkerów jako narzędzia w rozpoznawaniu choroby Alzheimera jest tym istotniejsza, że choroba ta charakteryzuje się bardzo długim okresem niemym klinicznie. Jeżeli kiedykolwiek będziemy dysponowali leczeniem przyczynowym powinno być ono zastosowane w okresie przedklinicznym, zanim zanikowi ulegnie krytyczna liczba neuronów. Okres przedkliniczny jest tym dłuższy im większa jest rezerwa poznawcza chorego, a także im lepszy jest stan naczyń mózgowych pacjenta. W przypadku najczęstszej postaci choroby Alzheimera, gdzie dominuje zespół objawów wynikających z uszkodzenia przyśrodkowych części płatów skroniowych, typowo pierwszym objawem są zaburzenia pamięci epizodycznej. Ostatnio obowiązujący podział zaburzeń, w przypadku rozwijającej się degeneracji alzheimerowskiej, rozpoczyna się od okresu subiektywnych zaburzeń poznawczych, w którym chory odczuwa już dolegliwości, ale są one nieuchwytne nawet w badaniu psychologicznym. Drugi okres to okres łagodnych zaburzeń poznawczych, kiedy to chory ma zaburzenia zarówno subiektywne jak i obiektywnie stwierdza się już pierwsze deficyty w badaniu klinicznym i okres trzeci kiedy chory spełnia już kliniczne kryteria dla choroby Alzheimera. Oczywiście tylko

pewien procent chorych z subiektywnymi i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi skonwertuje do pełnoobjawowej choroby Alzheimera. **Czasowa zależność toczącego się procesu alzheimerowskiego i objawów klinicznych, w pracy doktoranta na temat biomarkerów, według mnie powinna być wyraźnie podkreślona jako kluczowa już we wstępie i takiego opisu mi na tym etapie zabrakło. Nie mogę się też jako neuropatolog pogodzić z używaniem określenia „splątki" jako nazwy dla zwyrodnienia alzheimerowskiego neuronów, nawet jeżeli twórcą tego określenia jest Pan Profesor Jerzy Vetulani. Opis kryteriów rozpoznawania choroby Alzheimera powinien według mnie w mniejszym stopniu dotyczyć archaicznych kryteriów z 1984 roku - a na pewno powinien przytaczać kryteria Bruno Duboisa (IW2), które w całości opierają kliniczną diagnozę o oznaczanie stężeń klasycznych biomarkerów.** Według doktoranta w nauce, w której celem często są badania odkrywcze, znane biomarkery neurochemiczne nie zawsze spełniają wszystkie oczekiwania stąd potrzeba poszukiwania nowych innych niż klasyczne. Coraz więcej dowodów z najnowszych badań wskazuje, że procesy patologiczne toczące się w chorobie Alzheimera łączą się z reakcjami immunologicznymi w ośrodkowym układzie nerwowym. Dowiedziono także, że w tkance mózgowej pacjentów z chorobą Alzheimera oraz innymi chorobami neurodegeneracyjnymi dochodzi do przewlekłego procesu zapalnego, wykazano też, że w mózgach osób z chorobą Alzheimera sama tylko śmierć lub dysfunkcja neuronów może wywołać proces zapalny. Dodatkowo, patologiczne agregaty Aβ są rozpoznawane jako materiał obcy, co może powodować aktywację reakcji zapalnych. Pogłębianie wiedzy na temat neurozapalenia i regulacji mechanizmów odpornościowych według doktoranta może utorować drogę do powstania nowych terapii, które mogą być skierowane na zahamowanie rozwoju choroby Alzheimera lub opóźnienie pogorszenia funkcji poznawczych. Stąd zainteresowanie mgr Pawła Muszyńskiego znaczeniem w procesie alzheimerowskim nowego biomarkera YKL-40, czyli ludzką chrząstkową glikoproteiną 39 (HC-gp39; CHI3L1) lektyną wiążącą chitynę, która należy do rodziny 18 hydrolaz glikozylowych. Fizjologiczna rola YKL-40 i jego swoistego receptora na powierzchni komórek nie została do tej pory odkryta. Sugeruje się, że to białko jest zaangażowane w przebudowę tkanek podczas procesów zapalnych. W szczególności wskazuje się je jako czynnik, który zapobiega uszkodzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na cytokiny prozapalne. Doktorant, i wielu jego poprzedników założyli, że YKL-40 może odgrywać potencjalną rolę w procesie zapalnym obejmującym komórki OUN u pacjentów z AD jako wczesnego biomarkera rozwoju choroby Alzheimera.

**Cele pracy**

- Oznaczenie stężeń YKL-40 w PMR pacjentów z chorobą Alzheimera (AD) oraz łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI) i porównanie tych stężeń z grupą kontrolną osób bez zaburzeń funkcji poznawczych.

- Oznaczenie stężeń klasycznych markerów biochemicznych AD ($A\beta_{1-42}$ i współczynnika $A\beta_{42/40}$ oraz białka t-tau i jego fosforylowanej formy $pTau_{181}$) w PMR oraz albumin i immunoglobulin w PMR i surowicy krwi w badanych grupach.

- Określenie zależności pomiędzy stężeniami YKL-40 a stężeniami klasycznych biomarkerów AD w PMR w badanych grupach.

- Określenie zależności pomiędzy stężeniami YKL-40 a parametrami neuroimmunologicznymi (współczynnik albuminowy Qalb oraz współczynniki immunoglobulinowe QIgG, QIgM, QIgA) w badanych grupach.

## MATERIAŁ I METODY:

### Grupa badana

Do badań zostali włączeni pacjenci diagnozowani i leczeni w Klinice Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania zostały zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną UJ (nr zgody: KBET/288/B/2011).

Grupę badaną stanowiły 63 osoby: 45 pacjentów z chorobą Alzheimera (36 kobiet i 9 mężczyzn) w wieku od 51 do 89 lat oraz 18 chorych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (10 kobiet i 8 mężczyzn) w wieku od 63 do 81 lat.

### Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 23 osoby bez zaburzeń funkcji poznawczych (15 kobiet i 8 mężczyzn) w wieku od 51 do 83 lat.

### Materiał biologiczny do badań

Od pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej pobierano płyn mózgowo-rdzeniowy przy użyciu punkcji lędźwiowej oraz krew żylną na czczo. PMR i krew

dzielono do probówek polipropylenowych i przechowywano zamrożone w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

**Metody oznaczania białek**

Stężenia klasycznych biomarkerów AD oraz YKL-40 zmierzono przy użyciu techniki immunoenzymatycznej (ELISA) na analizatorze ETI-MAX firmy DiaSorin, natomiast stężenia albumin i immunoglobulin oznaczono przy użyciu metody nefelometrycznej na aparacie Immage 6000 firmy Beckman Coulter, a następnie wyznaczono współczynniki albuminowe (Qalb) i immunoglobulinowe (QIg).

## PODSUMOWANIE NAJISTOTNIEJSZYCH WYNIKÓW

Stężenia YKL-40 w PMR różniły się istotnie statystycznie między badanymi grupami (AD, MCI i grupa kontrolna).

Stężenia YKL-40 w PMR były znamiennie podwyższone u chorych z MCI i AD w porównaniu do kontroli.

Najwyższe stężenia YKL-40 zaobserwowano w PMR u pacjentów z MCI.

Stężenia YKL-40 w PMR w całej grupie badanej wykazywały istotnie statystyczną korelację z wiekiem, Erlangen Score, $A\beta_{42/40}$ ratio, stężeniami t-tau i $pTau_{181}$.

Stężenia YKL-40 w PMR w grupie chorych na AD wykazywały istotnie statystyczną korelację z $A\beta_{42/40}$ ratio, stężeniami t-tau, $pTau_{181}$ oraz wiekiem pacjentów.

Stężenia YKL-40 w PMR u osób z MCI wykazywały znaczącą statystycznie zależność ze stężeniami $A\beta_{1-42}$, t-tau i $pTau_{181}$.

Stężenia YKL-40 w PMR osób z grupy kontrolnej wykazywały korelację istotnie statystyczną z wiekiem, stężeniami t-tau i $pTau_{181}$.

Wykazano tendencję do wyższych wartości współczynnika Qalb (będącego wskaźnikiem integralności bariery krew płyn mózgowo-rdzeniowy) oraz QIgG (markera syntezy

wewnątrzoponowej IgG) u pacjentów z MCI i AD w porównaniu do osób bez zaburzeń funkcji poznawczych.

Wykazano istotną statystycznie korelację między stężeniami YKL-40 a Qalb w grupie osób z AD.

**Wnioski**

Występowanie różnic istotnych statystycznie pomiędzy stężeniami YKL-40 w PMR pacjentów z chorobą Alzheimera oraz łagodnymi zaburzeniami poznawczymi a grupą kontrolną osób bez zaburzeń funkcji poznawczych oraz najwyższy wzrost stężenia YKL-40 u pacjentów z MCI w porównaniu do grupy kontrolnej może wskazywać na udział tego białka w patogenezie ww. schorzeń.

Występowanie korelacji pomiędzy stężeniami YKL-40 a stężeniami biomarkerów klasycznych w PMR u chorych z MCI i AD sugeruje współistnienie procesów zapalnych oraz neurodegeneracyjnych w tkance mózgowej podczas rozwoju choroby Alzheimera.

Podwyższone wartości współczynnika albuminowego i QIgG u pacjentów z MCI i AD mogą świadczyć o aktywacji odpowiedzi immunologicznej oraz nieprawidłowej funkcji bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy w przebiegu ww. schorzeń.

Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania oznaczania stężeń YKL-40 we wczesnej diagnostyce choroby Alzheimera i sugerują możliwość powstania nowych form terapii w oparciu o regulację mechanizmów immunologicznych towarzyszących zmianom neurodegeneracyjnym oraz uzasadniają prowadzenie dalszych badań w tym obszarze.

Należy podkreślić, że całkowity dorobek naukowy mgr Pawła Muszyńskiego na jego etapie rozwoju kariery naukowej jest wyróżniająco duży. Rozprawę doktorską mgr Pawła Muszyńskiego pt. „Znaczenie białka YKL-40 w patogenezie choroby Alzheimera" oceniam bardzo dobrze, jest to praca o praktycznej przydatności klinicznej, stanowi samodzielny dorobek naukowy, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim nawet jeżeli jest to praca wykonana w oparciu o niewielką grupę chorych. Ocena moja jest w sposób oczywisty wtórna do oceny wymagających recenzentów znaczących pism o wysokim wskaźniku

oddziaływania (7.673), stąd moja ocena jest wtórna. Ważne jest podkreślenie, że w obu pracach mgr Paweł Muszyński jest pierwszym autorem.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku prośbę o dopuszczenie mgr Pawła Muszyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zespołu Kliniczno-Badawczego
Chorób Zwyrodnieniowych CUN
Prof. dr hab. med. Maria Barcikowska-Kotowicz

Maria Barcikowska