



dr hab. Magdalena Podlacha, prof. UG
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
e-mail: magdalena.podlacha@ug.edu.pl

Tel. (58) 523 6024 (Sekretariat)
Fax: (58) 523 6025 (Sekretariat)

Gdańsk, 16.12.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Ochnika zatytułowanej „Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych” wykonanej w Laboratorium Wirusologii Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Pana dr hab. Egberta Piaseckiego, prof. PAN i promotora pomocniczego Pani dr hab. Marty Sochockiej

Podstawa formalno-prawna

Ocenę pracy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Ochnika wykonałam w oparciu o pismo skierowane przez Dyrektora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk Pana prof. dr hab. Andrzeja Gamiana z dnia 4 listopada 2024 r., w którym w imieniu Rady Naukowej Instytutu, zwraca się z prośbą o przygotowanie recenzji w/w rozprawy.

Ogólna charakterystyka rozprawy i ocena merytoryczna

Postęp technologiczny, rozwój medycyny, zmiana stylu życia i świadomości społecznej przyczyniły się do znaczącego wydłużenia życia ludzi, a co za tym idzie starzenia się populacji światowej, zwłaszcza w krajach wysokorozwiniętych. Wraz z systematycznym starzeniem się społeczeństwa zwiększa się częstotliwość występowania chorób cywilizacyjnych nie tylko takich, jak: cukrzyca, choroba wieńcowa czy depresja, ale również chorób neurodegeneracyjnych, które dotykają coraz większą liczbę osób. Według WHO obecnie zdiagnozowanych jest ponad 55 milionów osób z demencją, a każdego roku przybywa około 10 milionów nowych przypadków. Według danych statystycznych jest to siódma najczęstsza przyczyna zgonu, a także jedna z głównych przyczyn



niepełnosprawności osób w podeszłym wieku. Choroby neurodegeneracyjne to nie tylko złożone symptomy, pogarszające jakość życia pacjenta, ale także schorzenia niosące negatywne konsekwencje psychologiczne i ekonomiczne, dotykające najbliższych członków rodziny pacjenta. Najczęściej diagnozowanym otępieniem jest choroba Alzheimera, dotykająca wiele milionów osób na świecie. Mimo wielu lat badań i zaangażowania ogromnej liczby zespołów badawczych nie tylko nie udało się opracować terapii, które byłyby wystarczająco skuteczne w tym wieloaspektowym schorzeniu, ale nawet nie w pełni udało się poznać/zrozumieć złożony patomechanizm tej choroby. Dlatego właśnie opracowania takie, jak rozprawa doktorska mgr inż. Michała Ochnika są niezbędne do pełnego poznania wszystkich czynników, mogących indukować bądź przyspieszać progresję tej choroby.

Jest to obszerna, blisko stusiedemdziesięciostronicowa praca, przygotowana w niezwykle staranny sposób, zawierająca opisy dobrze zaplanowanych badań wykonanych w zespole badawczym posiadającym doświadczenie i osiągnięcia w tej tematyce. Rozprawa skonstruowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim; wstępu, który przechodzi w założenia i cel pracy; rozdziału prezentującego materiały i metody; wyników; dyskusji oraz wniosków końcowych. Na podkreślenie zasługuje również umieszczenie przez Autora krótkiego rozdziału, opisującego przyszłe kierunki badań. Ponadto, zamieszczony został również spis rycin, tabel, wykaz skrótów oraz dodatek, zawierający szczegółowe wyniki licznych analiz statystycznych. Bibliografia obejmuje aż 266 pozycji, które w większości stanowią stosunkowo nowe prace, publikowane w prestiżowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. ***Brakuje jednak informacji o źródłach finansowania tak rozległych badań czy adnotacji o publikacji przynajmniej części uzyskanych wyników lub chociaż krótkiego wykazu komunikatów/plakatów, prezentowanych na międzynarodowych konferencjach, który potwierdzałby aktywność naukową Doktoranta.***

Wstęp obejmuje 3 główne podrozdziały, które w oparciu o studium odpowiednio dobranej literatury, wprowadzają czytelnika w zagadnienia związane z podjętą tematyką badawczą. W podrozdziale 1.1. opisane zostały czynniki ryzyka rozwoju oraz patofizjologia choroby Alzheimera. Kolejne dwa podrozdziały mają ścisły związek z podjętą tematyką badawczą, gdyż dotyczą potencjalnej roli układu odpornościowego w przebiegu opisywanego schorzenia oraz charakterystyki patogenów, które są uznawane za czynniki ryzyka rozwoju tej choroby. Warto podkreślić, że podrozdziały wstępu są wzbogacone rycinami, które stanowią wartościowe podsumowanie omawianych zagadnień.

W tym miejscu chciałabym prosić Doktoranta o bardziej szczegółowe omówienie potencjalnych i najbardziej efektywnych sposobów translokacji periopatogenów z jamy ustnej do OUN.



Drugie pytanie dotyczy wpływu żywienia na bakterie, wywołujące choroby przyzębia. Czy poprzez modyfikację diety jesteśmy w stanie ograniczyć negatywne skutki oddziaływania periopatogenów na zdrowie naszego organizmu? Czy na przykład dieta bogata w polifenole mogłaby być szczególnie korzystna?

Rozdział 2 dotyczy celu pracy, który poprzedzony jest zestawieniem danych literaturowych, stanowiących kluczowe przesłanki, które skłoniły Doktoranta do podjęcia opisywanej tematyki badawczej. Nadrzędnym celem pracy była kompleksowa analiza współzależności między chorobą Alzheimera i zapaleniem przyzębia na różnych poziomach; klinicznym, funkcjonowania obwodowych komórek odpornościowych, molekularnym i mikrobiologicznym. Następnie, Doktorant sformułował pięć hipotez badawczych, po których przedstawione są cele szczegółowe, służące ich weryfikacji.

Rozdział 3 – Materiały i metody liczy 22 strony, a rozpoczyna go szczegółowe zestawienie użytych odczynników, płynów hodowlanych, komercyjnie dostępnych zestawów oraz wykaz aparatury badawczej. Badania przeprowadzono na grupie 68 uczestników, po uprzednim uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. *W mojej opinii charakterystyka grupy badawczej, obejmująca takie informacje, jak: wiek, płeć czy stopień zaawansowania choroby Alzheimera powinna zostać zawarta w rozdziale 3 materiały i metody, a nie w rozdziale, dotyczącym wyników.* Kolejne opisy, dotyczą pobrania próbek krwi i śliny. *Czy materiał pobrany był przechowywany i po czasie poddany był dalszej analizie czy analizowany był na „świeżo”?* Następne podrozdziały przedstawiają szczegółowe opisy stosowanych metod. *Czy przy ilościowym oznaczaniu stężenia badanych cytokin zachodziła konieczność ekstrapolowania uzyskanych wyników, czy Doktorant mógłby zaprezentować reprezentatywne krzywe wzorcowe, które uzyskał podczas analiz metodą elisa?*

Rozdział 4 – Wyniki liczy 48 stron i składa się z 13 podrozdziałów. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione bardzo szczegółowo, a zastosowane sposoby prezentacji były dobrze przemyślane, co ułatwia czytelnikowi ocenę i interpretację zawartych w nich licznych i niezwykle istotnych informacji. Rozdział ten napisany jest w sposób klarowny i logiczny, wskazując na ogrom pracy, którą wykazał się Doktorant. Wzbogacony jest licznymi i czytelnymi wykresami oraz tabelami, które ułatwiają czytelnikowi poruszanie się po tak dużej liczbie zaprezentowanych informacji. *W tym miejscu, chciałam prosić Doktoranta o komentarz dotyczący podwyższonej liczby erytrocytów u pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do osób zdrowych. Jak wiemy zwiększona produkcja erytrocytów może być na przykład wynikiem chorób płuc, serca, palenia papierosów, problemów z oddychaniem podczas snu czy nadmiernej produkcji erytropoetyny, która może występować w wyniku*



niektórych schorzeń nerek. Co spowodowało podwyższoną liczbę erytrocytów u pacjentów z AD? Parametry układu czerwonokrwinkowego i białokrwinkowego były oceniane na podstawie analizy automatycznej w analizatorze hematologicznym, czy uwzględniane były również krwinki niedojrzałe lub nieprawidłowe? Czy Doktorant obserwował zależność/korelację między stopniem zaawansowania choroby Alzheimera, nasiloną chorobą przyzębia i podwyższoną liczbą erytrocytów?

W rozdziale 5 zawarte jest omówienie wyników i dyskusja. Autor z niezwykłą wnikliwością i dojrzałością omawia oraz interpretuje wyniki przeprowadzonych badań oraz zestawia je z rezultatami innych zespołów naukowych. *W tym miejscu chciałam prosić Doktoranta o komentarz dotyczący roli limfocytów T w chorobie Alzheimera. W dyskusji Doktorant powołuje się na prace mówiące o spadku liczby limfocytów T (CD3+) przy niewielkim wzroście subpopulacji CD4+ i spadku liczby CD8+. Jak w takim razie Doktorant skomentowałby fakt, że reaktywność limfocytów T obniża się z wiekiem, a w przypadku pacjentów z AD obserwuje się niekiedy zwiększoną liczbę reaktywnych limfocytów T we krwi obwodowej. Jakie są hipotezy dotyczące rodowodu tych autoreaktywnych komórek? W tego typu badaniach warto by było wykonać immunofenotypowanie limfocytów oraz sprawdzić ich reaktywność po stymulacji peptydami β -amyloidu o różnej długości. Prosiłabym również o rozwinięcie sformułowania znajdującego się na stronie 122 „(...) że zmiany ilościowe erytrocytów mogą być związane z postępującymi zmianami neurodegeneracyjnymi (...)” Jak wiemy w chorobach neurodegeneracyjnych dochodzi do szeregu zmian patologicznych w obrębie naczyń, które skutkują m.in. uszkodzeniem bariery krew-mózg, mikrokrwawieniami czy wynaczynieniem erytrocytów, prowadzącym do nagromadzenia białek takich, jak: np. hemosyderyna.* W końcowej części dysertacji Doktorant formułuje pięć wniosków, które podsumowują uzyskane wyniki badań. Niewątpliwie interesującym wnioskiem jest zwrócenie uwagi środowiska naukowego na paradontozę jako czynnik dodatkowo obciążający i tak już osłabiony układ odpornościowy pacjentów z różnymi typami zaburzeń poznawczych, w tym z chorobą Alzheimera. Obserwacje dotyczące wyczerpania i nadmiernej pobudliwości komórek odpornościowych pacjentów demencyjnych wydają się zatem być niezwykle ciekawym i nowatorskim kierunkiem badań, który powinien być uwzględniany w analizach, dotyczących nie tylko choroby Alzheimera, ale być może również innych chorób neurodegeneracyjnych.



Podsumowanie i wniosek końcowy

Stwierdzam, że Pan mgr inż. Michał Ochnik w całości zrealizował zadania badawcze. Podjęta przez Doktoranta tematyka jest bardzo aktualna, a szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów, jak również imponujący dobór metod i analiz statystycznych, pozwolił na uzyskanie nowatorskich i niezwykle interesujących wyników. Rozprawa doktorska jest bardzo starannie napisana. Na podstawie powyższego opracowania można bezsprzecznie stwierdzić, że Doktoranta cechuje dojrzałość naukowa, widoczna poprzez umiejętność formułowania hipotez badawczych, syntetyczne i precyzyjne opisy uzyskanych wyników, a także świadomość ich ograniczeń.

Podsumowując stwierdzam, że wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, a przedłożona mi do oceny dysertacja pt. „Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wnioski o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr inż. Michała Ochnika do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Pomimo braku w rozprawie informacji o publikacji chociaż części tak wartościowych wyników, analizując dorobek Doktoranta w dostępnych bazach danych można znaleźć pracę, w której Doktorant jest drugim autorem, a która zawiera część zawartych w niniejszym opracowaniu wyników, co daje mi podstawę do wystąpienia z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej dysertacji. Mam nadzieję, że tak nowatorski i obszerny materiał wynikowy zostanie niebawem udostępniony szerszemu gronu odbiorców w postaci większej liczby publikacji w prestiżowych czasopismach naukowych. **W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Ochnika.**

 Wydział Biologii
Katedra Biologii Molekularnej
Podlacha
dr hab. Magdalena Podlacha

dr hab. Magdalena Podlacha, prof. UG