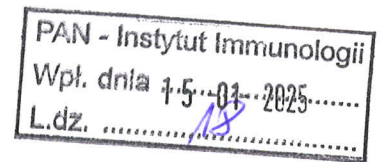




UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Klinika Psychiatrii
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Błażej Misiak



Wrocław, dn. 02.01.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Jerzego Ochnika

„Analiza współzależności stanu zapalnego przyzębia i choroby Alzheimera – rola czynników zakaźnych oraz aktywacji i odpowiedzi obwodowych komórek odpornościowych”

Promotor: dr hab. Egbert Piasecki, prof. PAN

Promotor pomocniczy: dr hab. Marta Sochocka

Starzenie społeczeństw jest postrzegane jako proces występujący globalnie i niosący szereg konsekwencji związanych z obciążeniem socjalnym, medycznym i ekonomicznym. Jedną z konsekwencji nieprawidłowego przebiegu procesów starzenia jest choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's Disease*, AD), uznawana obecnie za najczęstszy z zespołów otępiennych. Aktualnie stosowane leczenie AD jest oparte przede wszystkim o modulację neurotransmisji cholinergiczej i glutaminergiczej. Niemniej jednak jego efektywność pozostaje ograniczona.

Przez wiele lat patogenezę AD postrzegano głównie przez pryzmat procesów związanych z kaskadą amyloidową. Jednakże, badania przeprowadzone na przestrzeni

ostatnich lat dowodzą, że AD jest schorzeniem układowym, które charakteryzuje szereg nieprawidłowości biologicznych. Jedną z nich jest podprogowy stan zapalny, którego źródło i patogenezę nie zostały dotychczas jednoznacznie wyjaśnione. Potencjalną przyczyną procesów zapalnych w AD może być patologia jamy ustnej związana z zapaleniem przyzębia – paradontoza (PeD). Z uwagi na bliskie sąsiedztwo jamy ustnej i mózgu istnieje, przynajmniej teoretyczna, możliwość infiltracji mózgu przez peripatogeny i ich metabolity. Celem badań przeprowadzonych w ramach ocenianej pracy doktorskiej była analiza współzależności między AD i PeD na poziomie klinicznym, funkcjonowania obwodowego układu immunologicznego, molekularnym oraz mikrobiologicznym. Biorąc pod uwagę istniejący stan wiedzy, znaczenie kliniczne i społeczne podejmowanych zagadnień, tematykę pracy doktorskiej należy uznać za wysoce zasadną i interesującą w kontekście poznawczym i implikacyjnym.

Przedstawiona do oceny praca została prawidłowo skonstruowana i zawiera częściowo zwyczajowo przyjęte dla rozpraw doktorskich. Dysertacja liczy 169 stron. Pracę doktorską rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. We wstępie, Doktorant przedstawia syntetycznie i w przystępny sposób istniejący stan wiedzy na temat aspektów klinicznych i patogenetycznych AD, ze szczególnym uwzględnieniem koncepcji immunologiczno-zapalnej oraz znaczenia mikrobiomu jamy ustnej. Wstęp został również uzupełniony trafnymi rycinami, które ułatwiają czytelnikowi zrozumienie tematu. W kolejnym rozdziale przedstawia uzasadnienie badań, stawiane hipotezy oraz cele badawcze. Następne rozdziały opisują materiał i metody badań oraz uzyskane wyniki zaprezentowane w formie tabel i rycin. W dyskusji, Doktorant omawia uzyskane wyniki na tle istniejącego stanu wiedzy. Ostatnie rozdziały zawierają wnioski końcowe i przedstawienie przyszłych kierunków badań. Dysertacja zawiera również wykaz piśmiennictwa, spis tabel i rycin oraz tabele dodatkowe. Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o obszerną literaturę

obejmującą 266 pozycji piśmiennictwa. Piśmiennictwo obejmuje najważniejsze prace oryginalne i pogładowe reprezentujące stan wiedzy w obranym obszarze badań. Stosowna synteza informacji zwartych w piśmiennictwie jest dodatkowym atutem pracy doktorskiej. Trafność doboru piśmiennictwa oraz umiejętność interpretacji wyników przeprowadzonych badań w szerszym kontekście istniejącego stanu wiedzy z pewnością przemawiają za dojrzałością naukową Doktoranta.

Praca doktorska została napisana poprawną polszczyzną oraz przygotowana z należytą starannością formalno-językową. Styl przygotowania pracy świadczy również o umiejętności Doktoranta w zakresie posługiwania się językiem naukowym a także znajomością specyfiki pojęciowej, która jest stosowana w omawianym obszarze badań.

Badaniami objęto 68 uczestników: 36 pacjentów z rozpoznaniem AD oraz 32 kognitywnie zdrowe osoby, które stanowiły grupę kontrolną. Nasilenie deficytów funkcjonowania poznawczego zostało przeprowadzone za pomocą testów MMSE (ang. *the Mini-Mental State Examination*) oraz MoCA (ang. *the Montreal Cognitive Assessment*). U wszystkich uczestników wykonano szczegółową ocenę periodontologiczną. Materiał biologiczny stanowiła krew żylna oraz próbki śliny. Związek pomiędzy PeD, odpowiedzią immunologiczną a parametrami klinicznymi w AD analizowano z wykorzystaniem modelu izolowanych leukocytów krwi obwodowej *ex vivo*, które poddawano aktywacji i ocenie odpowiedzi na antygeny bakteryjne i wirusowe. Jako antygen bakteryjny zastosowano lipopolisacharyd pochodzący z periopatogenu *Porphyromonas gingivalis*. Z kolei, antygenem wirusowym był wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. *vesicular stomatitis virus*, VSV). Aktywację leukocytów oceniono poprzez pomiar stężenia cytokin (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz IL-15) a także ekspresję genów powiązanych z odpowiedzią immunologiczną (*COX1*, *COX2*, *SOCS1*, *SOCS3*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF3*, *AP-1*, *PI3KR1* i *NF- κ B*). Oceniono także polimorfizmy genów związanych z odpowiedzią

immunologiczną (*HLA-DRB1*, *HLA-DRA*, *HLA-DQA1* i *FCGR2A*) oraz *APOE*. Mikrobiom jamy ustnej analizowano z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji ampliconów regionów zmiennych V3-V4 i V7-V9 genu 16S rRNA. Analiza statystyczna została przeprowadzona w środowisku R z wykorzystaniem szeregu statystyk parametrycznych i nieparametrycznych zachowując stosowne założenia. Mikrobiom jamy ustnej analizowano zgodnie z przyjętymi standardami w kontekście różnorodności alfa i beta. Do oceny różnorodności alfa wykorzystano znane wskaźniki (obserwowane cechy, entropię Shannona, wskaźniki Pielou, Faitha i Simpsona). Różnorodność beta analizowano z wykorzystaniem odległości Jaccarda, odległości Braya-Curtisa, parametrów „*Unweighted UniFrac*” oraz „*Weighted UniFrac*”. Abundancję poszczególnych składowych mikrobiomu oceniano na trzech poziomach klasyfikacji filogenetycznej (tj. typ, rodzina i rodzaj).

Wykazano istotne związki pomiędzy występowaniem AD i PeD a obciążeniem zapalnym przyzębia. Stwierdzono istotnie niższy poziom komórek układu immunologicznego u pacjentów z AD (leukocyty, limfocyty i monocyty) oraz erytrocytów i płytek krwi. Wyjściowo stężenie cytokin TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10 było istotnie niższe u pacjentów z AD w porównaniu do grupy kontrolnej. Po stymulacji lipopolisacharydem stwierdzono silniejszą odpowiedź immunologiczną w kontekście stężenia TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10 u osób z AD. Jeden ze wskaźników PeD (wskaźnik higieny międzyzębowej) był związany z odpowiedzią IL-10 i IL-6 wyłącznie u osób z AD. Leukocyty w grupie kontrolnej charakteryzowała wyższa, względna ekspresja genów *SOCS1*, *STAT1*, *IRF1*, *PI3KR1* i *NF- κ B*. Poziom ich ekspresji okazał się skorelowany ze wskaźnikami PeD w obu grupach. Infekcja VSV była związana ze słabszą odpowiedzią produkcji cytokin prozapalnych (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β i IL-6) u osób z AD. Poziom odpowiedzi nieswoistej na VSV był istotnie skorelowany ze wskaźnikami PeD w obu grupach uczestników badań.

W odniesieniu do badanych wariantów polimorficznych nie wykazano odstępstw od prawa Hardy'ego-Weinberga. Nie obserwowano jednak istotnych statystycznie różnic w zakresie dystrybucji poszczególnych genotypów pomiędzy pacjentami z AD a grupą kontrolną (choć dystrybucja alleli APOE w grupie pacjentów z AD różniła się w porównaniu do dystrybucji zaobserwowanej we wcześniejszych badaniach osób reprezentujących etniczność kaukaską). Dla zdecydowanej większości wariantów polimorficznych nie wykazano istotnych statystycznie związków ze wskaźnikami PeD (wyjątkiem był związek polimorfizmu rs3135344 w genie HLA-DRA ze wskaźnikiem ilości płytki nazębnej w przestrzeniach międzyzębowych). Niektóre z wariantów polimorficznych były powiązane z odpowiedzią immunologiczną leukocytów na stymulację lipopolisacharydem (np. *HLA-DRB1*).

Obserwowano większe zróżnicowanie mikrobiomu jamy ustnej w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z AD. U pacjentów z AD stwierdzono istotnie wyższą abundancję względną w odniesieniu do *Bacteroidetes*, *Porphyromonadaceae* i *Porphyromonas spp.* U osób zdrowych wykazano istotnie wyższą abundancję względną *Proteobacteria*.

Badania przeprowadzone w toku realizacji pracy doktorskiej zostały dobrze przemyślane a uzyskane wyniki starannie opisane i przedstawione w szerszym kontekście istniejącego stanu wiedzy. Wnioski płynące z pracy doktorskiej dobrze korespondują z uzyskanymi wynikami. Bez wątpienia praca doktorska przyczyniła się do istotnego poszerzenia wiedzy na temat uwarunkowań nieprawidłowości odpowiedzi immunologiczno-zapalnej w AD. Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę dla zaprojektowania kolejnych badań w tym obszarze, szczególnie w większych populacjach. Poniższe uwagi nie mają znaczącego wpływu na pozytywny odbiór pracy doktorskiej, ale z pewnością wymagają odniesienia:

- W sekcji 3.2.2. nie zostało omówione w jaki sposób rozpoznano AD w grupie badanej oraz co było podstawą stwierdzenia statusu prawidłowego funkcjonowania poznawczego w grupie kontrolnej (nie opisano wyników badań testami analizującymi funkcje poznawcze w tej grupie).
- W sekcji 3.2.18. należałoby lepiej odnieść się do uzasadnienia dla procedur imputacji danych. Czy należy uznać, że braki danych pojawiły się w pełni losowo (ang. *missing data at random*)? Czy może jednak należałoby uznać, że braki danych wynikały z nieprawidłowości odpowiedzi immunologicznej? Dodatkowo, nie jest jasne w jaki sposób stosowano poprawkę na wielokrotne testowanie. Doktorant wspomina o zastosowaniu poprawki Benjamini-Hochberg, jednakże nie raportuje poziomu FDR (ang. *false discovery rate*) a także liczby uwzględnionych testów.
- W rozdziale poświęconym omówieniu wyników przedstawiono porównanie obu grup uczestników badania pod względem zmiennych socjodemograficznych i klinicznych (Tabele 15 i 16). Nie jest jednak jasne, które z tych zmiennych wykazywały istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem AD i grupą osób kognitywnie zdrowych. Przykładowo, mediana wieku jest niższa w populacji osób kognitywnie zdrowych. Jest to o tyle istotne, że sam wiek może korelować z odpowiedzią immunologiczno-zapalną. Należałoby wówczas zastanowić się, czy te zmienne nie powinny zostać uwzględnione jako czynniki potencjalnie zakłócające (tzw. kowarianty) w przyjętych modelach analitycznych.
- Tabela 17 byłaby bardziej czytelna po dodaniu statystyk opisujących istotność statystyczną.
- W ograniczeniach badania Doktorant porusza kwestię mocy statystycznej, co jest zaletą i z pewnością świadczy o krytycznym spojrzeniu na uzyskane wyniki. Niemniej jednak, warto byłoby poruszyć również inne ograniczenia badania. Przykładowo przekrojowy

charakter badania uniemożliwia wskazanie związków przyczynowo-skutkowych. Ponadto, warto podnieść także brak wglądu i uwzględnienia zakłócającego wpływu współistniejących schorzeń somatycznych, stosowanej farmakoterapii, czy diety. Należy także pamiętać o ograniczonej rozdzielczości przyjętej metody analizy mikrobiomu (brak wglądu w poziom poszczególnych gatunków mikroorganizmów).

- Niektóre z wniosków końcowych (1, 2 i 5) są możliwymi implikacjami klinicznymi, do których należy podejść z pewną dozą ostrożności biorąc pod uwagę ograniczony zakres przeprowadzonych badań. W tej sekcji raczej należało odnieść się wyłącznie do zidentyfikowanych procesów i zaobserwowanych zmian odpowiedzi immunologiczno-zapalnej w AD z uwzględnieniem PeD.

W świetle przedstawionej pozytywnej oceny, stwierdzam, że **rozprawa doktorska mgr. inż. Michała Jerzego Ochnika 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 tym, stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Michała Jerzego Ochnika do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

