Dr hab. n.med. Piotr Walczak

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Pauli Chlebanowskiej

Tytuł rozprawy: „ Określenie patomechanizmów rozwoju idiopatycznej formy choroby Parkinsona z wykorzystaniem technologii indukowanych komórek pluripotencjalnych"

Rozprawa składa się z dwóch prac opublikowanych w roku 2020 w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences (IJMS). W obydwu pracach autorka jest pierwszym autorem i zgodnie z załączonym oświadczeniem wniosła wiodący wkład w planowanie i wykonywanie prac eksperymentalnych oraz pisanie wyżej wymienionych manuskryptów. Publikacje stanowią tematycznie i konceptualnie powiązany materiał z dziedziny modelowania *in vitro* choroby Parkinsona. Autorka przedstawiła zbiorczo wstęp, cele pracy, materiały i metody, bibliografię, streszczenia artykułów, wyniki i wnioski oraz podsumowanie.

Doktorantka za temat pracy doktorskiej wybrała chorobę Parkinsona i jest to wybór trafny, gdyż jest to choroba o dużym i narastającym znaczeniu w dobie starzenia się społeczeństwa. Zastosowana metodologia bezpośrednio implementuje najnowsze trendy w dziedzinie chorób neurodegeneracyjnych i medycyny precyzyjnej. Technologia indukcji pluripotencjalności (iPS), na której autorka w znacznym stopniu opiera swoją pracę to jedno z największych osiągnięć nauk medycznych ostatnich lat okraszone nagrodą Nobla dla Profesora Yamanaki. Odkrycie Yamanaki pozwala zmienić zróżnicowane komórki somatyczne w komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells - iPS) o potencjale dorównującym potencjałowi komórek embrionalnych. Te z kolei można efektywnie różnicować do praktycznie każdego typu komórek somatycznych. Doktorantka wykorzystuje potencjał komórek iPS w celu lepszego zrozumienia patomechanizmu idiopatycznej postaci choroby Parkinsona. To właśnie wydaje się być idealnym zastosowaniem dla technologii iPS, gdyż komórki nerwowe ośrodkowego układu nerwowego są niedostępne, a ich pozyskiwanie drogą biopsji wiązałoby się z ogromnym ryzykiem dla pacjenta. Istnieją metody otrzymywania neuronów dopaminergicznych z różnych typów komórek prekursorowych ale zastosowana przez doktorantkę technologia iPS pozwala na uzyskanie neuronów dopaminergicznych od pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona bez konieczności pobierania tkanki nerwowej.

Jeden z komponentów rozprawy doktorskiej to materiał opublikowany w czasopiśmie IJMS jako artykuł zatytułowany "Origin of the Induced Pluripotent Stem Cells Affects Their Differentiation into Dopaminergic Neurons". Celem tej pracy było zbadanie zjawiska pamięci epigenetycznej, sprawdzenie czy jakość komórek iPS, szczególnie w kontekście różnicowania w kierunku neuronów dopaminergicznych, zależna jest od rodzaju komórek wyjściowych. Rzeczywiście

literatura jest pełna kontrowersji co do tej kwestii i szczegółowe prace są tu jak najbardziej uzasadnione. Autorka testowała komórki iPS wytworzone z keratynocytów (pochodzenie ektodermalne) oraz jednojądrzastych komórek krwi (pochodzenie mezodermalne) przy zastosowaniu nieintegrującego wirusa Sendai dla uzyskania ekspresji czynników reprogramujących. Oba typy komórek pozwoliły na wytworzenie komórek iPS jednak zaobserwowano różnice zarówno w charakterystyce niezróżnicowanych komórek iPS jak również komórek indukowanych w kierunku fenotypu dopaminergicznego. Zaobserwowano różnice w ekspresji takich markerów jak FOXA2, LMX1A, NURR1, TUBB i TH.
O ile doceniam, że autorka zauważa, że te różnice są zapewne ważne i w dyskusji właściwie odnosi je do wyników opublikowanych prac , brakuje tu jednak bardziej wyrazistej interpretacji. Wyniki sugerują ze pamięć epigenetyczna ma znaczenie i jest to element który należałoby wykorzystywać. Jednak w konkluzji nie jest to jasno wyrażone, a wręcz przedstawiono to ambiwalentnie. Nieco zaskakujące jest w tym kontekście również to, że w drugiej pracy autorka zdecydowała użyć leukocytów a nie keratynocytów. Ciekaw jestem jakie były podstawy takiej decyzji.

Drugi komponent rozprawy to opublikowana praca w tym samym czasopiśmie zatytułowana „Use of 3D Organoids as a Model to Study Idiopathic Form of Parkinson's Disease". Cel tej pracy to opracowanie organoidowego modelu idiopatycznej formy choroby Parkinsona. Są to pionierskie badania i z pewnością jedna z pierwszych publikacji charakteryzująca organoidy wytworzone przy użyciu komórek somatycznych pacjentów cierpiących na idiopatyczną formę choroby Parkinsona. Tu właśnie w całej okazałości przedstawiony jest ogromny potencjał technologii iPS dla medycyny precyzyjnej. Z komórek somatycznych (leukocyty) pobranych od dwóch osób zdrowych i dwóch pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona wytworzono komórki iPS, które później zostały poddane procesowi różnicowania w kierunku komórek śródmózgowia. Uzyskane organoidy zostały scharakteryzowane pod kątem różnicowania do neuronów dopaminergicznych. Zaobserwowano różnice co do ilości i jakości powstałych komórek progenitorowych i dojrzałych neuronów dopaminergicznych. Autorka pisze „Wystąpiły istotne statystycznie różnice w poziomach ekspresji genów TH, PTX3, LMX1A oraz FOXA2 pomiędzy organoidami od pacjenta z PD i zdrowego wolontariusza". Takie obserwacje są bardzo ważne szczególnie biorąc pod uwagę znaczenie tych markerów w rozwoju i funkcji komórek dopaminergicznych jednak nasuwa się tu pytanie czy wyniki oparte są o dane z N=1? Nawet zakładając, że pochodzą one do dwóch pacjentów na grupę zgodnie z opisem w metodologii interpretacja przy tak małej próbie może być wyzwaniem.

Zbiorcze przedstawienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej robi duże wrażenie. W części wstępnej doktorantka obszernie opisała aktualny stan wiedzy odnośnie znanych patomechanizmów w chorobie Parkinsona oraz opisała najnowsze trendy w metodologii badań.

Cele pracy to synteza dwóch tematycznie powiązanych publikacji które w naturalny sposób tworzą logiczną całość. Pewne wątpliwości budzi ostatni cel: „Wytypowanie nowych czynników mogących odpowiadać za rozwój idiopatycznej formy choroby Parkinsona." Trudno mi odnaleźć miejsce gdzie takie nowe, wcześniej nie zbadane cele terapeutyczne byłyby badane. Analizom poddano raczej typowe dla linii dopaminergicznej markery.
Metodologia badawcza jest jasno przedstawiona, zastosowane techniki zgodne z najnowszymi trendami w biomedycynie i sądząc po jakości uzyskanych wyników doktorantka opanowała wszystkie przedstawione techniki.
Wyniki, wnioski i podsumowanie przedstawione są w sposób przejrzysty i czytelny jednak jak już wcześniej wspomniałem brakuje bardziej jednoznacznej interpretacji uzyskanych wyników które przedstawione są w sposób ambiwalentny.

Podsumowując, rozprawa doktorska przedstawiona przez doktorantkę stanowi materiał o dużej wartości poznawczej. Zastosowana metodologia jest właściwa (poza drobnymi elementami wymagającymi raczej wyjaśnienia niż korekty) a uzyskane wyniki solidne, oryginalne i wiarygodne. Dlatego bez wahania wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktorantki Pauli Chlebanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Piotr Walczak