



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin

tel. (081) 448 7250,

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej

pt.

„Rola bariery krew-mózg, procesów zapalnych i stresu siateczki śródplazmatycznej w mechanizmach podatności bądź oporności na stres we wczesnym okresie życia”

wykonanej w Pracowni Farmakologii i Biostruktury Mózgu Zakładu Farmakologii

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja

Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Chocyk

Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu badań

Wieloletnie badania wskazują, że związek między stresującymi doświadczeniami a stanem zdrowia zależy zarówno od czynników genetycznych, jak i środowiskowych. Podatność na stres jest sprawą bardzo indywidualną i reakcja na stres oraz uciążliwość późniejszych jego konsekwencji mogą różnić się między osobnikami. Stres przewlekły może wywoływać w mózgu zmiany funkcjonalne i strukturalne. Niektóre z nich wydają się być odwracalne. Dokładniejsze poznanie mechanizmów tych zmian może stanowić szansę na opracowanie nowych form terapii chorób związanych ze stresem.

Problematyka pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej wpisuje się w niezwykle ważny obszar badań dotyczący negatywnych konsekwencji *stresu we wczesnym okresie życia* (ELS) na zdrowie psychiczne i fizyczne w dorosłości. Najnowsze badania dowodzą, że stres przeżywany w okresie dzieciństwa zwiększa ryzyko wystąpienia w dorosłym życiu licznych zaburzeń czy chorób, takich jak np. depresja, choroby układu krążenia, niektóre nowotwory, zaburzenia metaboliczne, a także powoduje przyspieszenie procesów starzenia [Finlay i wsp., 2022]. Do tej pory mechanizm tych korelacji nie został w pełni wyjaśniony.

Recenzowana rozprawa doktorska podejmuje niezwykle ważny oraz do dziś nierozwiązany problem roli bariery krew-mózg (BBB), procesów zapalnych i stresu komórkowego w mechanizmach oporności oraz podatności na stres w pierwszych dniach życia. Wybór tematyki badawczej uważam za bardzo zasadny. Problematyka pracy jest oryginalna, interesująca poznawczo i niezwykle aktualna.

W swojej pracy Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego i prawidłowego formułowania problemu naukowego i stawiania pytań badawczych. Wiele z tych problemów znalazło odpowiedź w po raz pierwszy wykonanych przez Doktorantkę badaniach, dlatego uzyskane wyniki należy uznać za nowatorskie. Praca wypełnia lukę badawczą w zakresie podjętej tematyki.

Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia

Rozprawa doktorska składa się z liczącego 76 stron autoreferatu i opiera się na czterech oryginalnych artykułach stanowiących jej podstawę, w których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. **Solarz A, Majcher-Maślanka I, Kryst J, Chocyk A.** *A Search for Biomarkers of Early-life Stress-related Psychopathology: Focus on 70-kDa Heat Shock Proteins.* Neuroscience. **2021**;463:238-253. doi: 10.1016/j.neuroscience.
2. **Solarz A, Majcher-Maślanka I, Chocyk A.** *Effects of early-life stress and sex on blood-brain barrier permeability and integrity in juvenile and adult rats.* Dev Neurobiol. **2021**;81(7):861-876. doi: 10.1002/dneu.22846.
3. **Solarz A, Majcher-Maślanka I, Kryst J, Chocyk A.** *Early-life stress affects peripheral, blood-brain barrier, and brain responses to immune challenge in juvenile and adult rats.* Brain Behav Immun. **2023**;108:1-15. doi: 10.1016/j.bbi.2022.11.005.
4. **Solarz-Andrzejewska A, Majcher-Maślanka I, Kryst J, Chocyk A.** *Modulation of the endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response mitigates the behavioral effects of early-life stress.* Pharmacol Rep. **2023**;75(2):293-319. doi: 10.1007/s43440-023-00456-6.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) w/w prac wynosi 26,3 a liczba punktów MNiSW-520. Do autoreferatu dołączono również badania uzupełniające, które obejmują ilościowe oznaczenie przepuszczalności BBB oraz metody immunohistochemiczne (IHC) wraz z analizą statystyczną uzyskanych wyników.

Układ autoreferatu ma klasyczny charakter: Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim i Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Cel badań z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, Badania uzupełniające, w tym Metodyka i Wyniki tych badań, Dyskusja, Wnioski końcowe oraz Piśmiennictwo (201 pozycji anglojęzycznych w przeważającej części opublikowanych w ostatnim dwudziestoleciu). Konstrukcję pracy należy uznać za logiczną i podkreślającą kolejność zagadnień, którymi zajmowała się Doktorantka. Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że nie wszystkie skróty znalazły się w wykazie skrótów (brak np. mRNA Slc2a1). Drobny błąd wystąpił także w polskim tytule pracy, myślę powinien znakować się pomiędzy słowami 'krew-mózg' a nie 'bariery-krew'.

Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki i współautorów w/w publikacji.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział zatytułowany **Wstęp**. W tej części Doktorantka w wielowątkowy sposób uzasadnia wybór tematu. Przedstawia w tym miejscu informacje zaczerpnięte z piśmiennictwa dotyczące stresu siateczki śródplazmatycznej, bariery krew-mózg (BBB) oraz procesów neurozapalnych w stresie. Końcowy rozdział dotyczy roli modulacyjnej przewlekłego stresu w procesach zapalnych, stresie siateczki śródplazmatycznej i funkcji BBB jako wspólnego mianownika w patofizjologii i/lub progresji chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych.

Podsumowując tę część pracy należy stwierdzić, że jest ona napisana ciekawie. Zakres merytoryczny przedstawiony we wstępie dobrze koresponduje z celem pracy. Świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązywania podjętego zadania badawczego.

Cel pracy

Celem głównym pracy doktorskiej było wykazanie „*roli bariery krew-mózg (BBB), procesów zapalnych i stresu siateczki śródplazmatycznej w mechanizmach oporności lub podatności na stres we wczesnym okresie życia*”. Cel główny doprecyzowano celami cząstkowymi, które zostały sformułowane w sposób jasny i zrozumiały. Są ściśle powiązane z tytułem rozprawy i określają zakres realizowanych kolejno etapów badań. Ułatwia to dokonanie oceny, czy poczynione założenia zostały w pracy zrealizowane. Reasumując, rozprawę doktorską od strony postawionych celów oceniam pozytywnie.

Metodyka badań

Metodyka badań bezpośrednio uzasadnia wagę podjętej w doktoracie tematyki. Jest to kluczowa część pracy w kontekście podjętych przez Doktorantkę badań. Z publikacji wynika, że badania przeprowadzono na młodocianych (PND 15, 21/22, 26) i dorosłych (PND70/71) szczurach stada Wistar, obu płci. Model separacji macierzyńskiej (MS) indukowano poprzez izolowanie nowonarodzonych szczurów od matek (PND1-14, 3 godziny/dzień). W pracy Doktorantka wykorzystwała szeroką gamę testów behawioralnych oraz nowoczesne metody biochemiczne (ELISA oraz Western blot), elektrofizjologiczne (LTP), molekularne (np., mRNA TJP) i immunohistochemiczne (gęstość naczyń mózgowych EBA-IR) używane w farmakologii doświadczalnej do realizacji założeń pracy. Analizy przeprowadzono w wybranych strukturach mózgu (mPFC, grzbietowe prążkowie (dSTR), hipokamp (HP)) oraz surowicy krwi. Badania zostały wykonane w ramach grantu Preludium (2016/23/N/NZ4/01148), którego Doktorantka była kierownikiem oraz grantu Opus 13 (2017/25/B/NZ7/00174), oba finansowane przez NCN oraz z działalności statutowej Pracowni Farmakologii i Biostruktury Mózgu Instytutu Farmakologii.

W celu realizacji założeń pracy Doktorantka przeprowadzała badania o znacznym stopniu złożoności; warto zaznaczyć, że planując je uwzględniono więcej niż jedną przyczynę tych zmian albo możliwość nakładania się różnych efektów. Uznanie budzi sposób zaprojektowania badań.

Pod względem doboru modeli doświadczalnych i realizacji badań część praktyczna rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Zwraca uwagę bogaty warsztat badawczy Doktorantki, konieczny do przeprowadzenia badań o różnym charakterze – od oznaczenia białek i badań molekularnych aż po eksperymenty o charakterze behawioralnym.

Wyniki badań zostały omówione syntetycznie w rozdziale zatytułowanym **Dyskusja**.

W pierwszej części dyskusji Doktorantka omawia ważność bariery krew-mózg, jej dojrzewanie i dymorfizm płciowy. Na uwagę zasługuje nowatorski charakter tych badań. Wykazano między innymi, że BBB dojrzewa i ulega uszczelnieniu wcześniej u samic niż u samców (w takich strukturach mózgu jak mPFC, dSTR i HP). Jednakże Doktorantka zaznacza, że schemat eksperymentu, wielkość kohorty zwierząt czy czynniki wybrane do analizy mogą mieć wpływ na ostateczny wynik.

Część druga dyskusji koncentruje się na ocenie wpływu stresu we wczesnym okresie życia (MS) na przepuszczalność i integralność BBB na różnych etapach ontogenezy. Szczególnie istotne wydaje się tutaj wykazanie, iż ELS nie ma wpływu na funkcje BBB, a nawet występują pewne mechanizmy adaptacyjne (biorąc pod uwagę TJP, a zwłaszcza wzrost ekspresji *Cldn5*), zwłaszcza u samic.

Następnie Doktorantka analizuje swoje wyniki pod kątem wpływu płci i MS na przebieg odpowiedzi neurozapalnej wywołanej podaniem lipopolisacharydu (LPS). Badania wykazały u młodych samców nasilenie reakcji zapalnej, a u samic osłabienie (adaptacja), szczególnie w okresie dorosłości. Rzutując te badania na ludzi, wynika z nich, że ELS może powodować wrażliwość czy oporność na choroby psychiczne czy neurodegeneracyjne nie tylko zależnie od płci, ale również od wieku.

W ostatniej części Dyskusji, Doktorantka omówiła poszukiwanie mechanizmów i biomarkerów podatności bądź oporności na ELS w mPFC uwzględniając białka rodziny HSP70, stres ER i białko niesfałdowane (UPR). Na uwagę zasługuje propozycja uznania białka rodziny HSP70 potencjalnym kandydatem na biomarkera zaburzeń związanych z ELS. Co więcej, Doktorantka konkluduje, że HSP70, ale też stres ER i UPR mogą stanowić wspólne ścieżki molekularne i mechanizmy leżące u podstaw współwystępowania chorób psychicznych, sercowo-naczyniowych i metabolicznych u osób doświadczonych ELS. W badaniach Doktorantka wykazała również, że modulacja markerów stresu przez inhibitor stresu ER, salubriinal (lub jego rozpuszczalnik?), łagodzi niektóre skutki MS na poziomie biochemicznym i behawioralnym, co wg. mnie może nie być reakcją specyficzną, gdyż w badaniach tych rozpuszczalnik działa podobnie jak inhibitor stresu RE.

Podsumowując tę część pracy należy stwierdzić, że Doktorantka wnikliwie analizuje wyniki oraz szczegółowo uzasadnienia przyjęte w pracy rozwiązania. Dyskusja została przeprowadzona formalnie poprawie i uwzględnia wszystkie ważniejsze wątki, jednakże zabrakło mi tutaj szerszej analizy korelacji między zmianami biochemicznymi/molekularnymi a zmianami behawioralnymi. Nie przedstawiono też informacji, dlaczego badania w dwóch ostatnich publikacjach prowadzone były tylko u samców.

Po zakończeniu Dyskusji Doktorantka (rozdział 9) sformułowała wnioski podsumowujące przeprowadzone badania oraz podjęła się podkreślenia znaczenia tych badań. Wnioski nie budzą zastrzeżeń.

Podsumowanie

Merytoryczna strona rozprawy nie budzi wątpliwości. Na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane badania. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego o wysokim stopniu trudności. Szereg przeprowadzonych

badania zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wskazuje na doskonale manualne przygotowanie Doktorantki, umiejętność organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych.

Pracę doktorską Pani mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej oceniam od strony merytorycznej bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokich IF, a jedna z prac w czasopiśmie o IF=15,1 (Brain, Behavior and Immunity). Doktorantka wykazała, że bariera krew-mózg, procesy zapalne i stres siateczki śródplazmatycznej podczas dojrzewania mózgu mogą odrywać ważną rolę w podatności lub oporności na działanie stresu we wczesnym okresie życia. Ponadto, Doktorantka po raz pierwszy, w tak szerokim zakresie, analizowała zależną od płci i wieku ekspresję genów kodujących białka związane z integralnością i funkcjonowaniem BBB oraz oceniła przepuszczalność BBB w różnych obszarach mózgu.

Rozprawa doktorska **mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742). Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, ich wysoki poziom merytoryczny oraz wykorzystanie bardzo dobrego warsztatu badawczego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o nadanie Pani mgr inż. Annie Solarz-Andrzejewskiej stopnia naukowego doktora z **wyróżnieniem**.



Prof. dr hab. n. farm. Jolanta H. Kotlińska

Lublin, 27.11.2023