



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Bogusława Budziszewska
Zakład Biochemii Toksykologicznej
Katedra Toksykologii
Wydział Farmaceutyczny UJ CM

Kraków, 28. 11. 2023

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej pt. „The role of the blood-brain barrier, inflammation and endoplasmic reticulum stress in the mechanisms of susceptibility and resilience to early-life stress” wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Chocyk.

Wiele danych wskazuje, że stres we wczesnym okresie życia, wpływając na procesy dojrzewania mózgu, może w życiu późniejszym zwiększać ryzyko rozwoju chorób psychicznych, w tym głównie depresji, a także prowadzić do nadużywania substancji psychoaktywnych. Działanie niekorzystnych czynników środowiskowych we wczesnym okresie życia, w przeciwieństwie do działania stresu w życiu dorosłym, wywiera zwykle trwałe zmiany, głównie związane z zaburzonym programowaniem epigenetycznym. Mimo licznych badań dotyczących mechanizmów i konsekwencji działania czynników stresowych na zmiany istotne w patogenezie chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych, w tym także badań prowadzonych od wielu lat w zespole Pani Profesor Agnieszki Chocyk, ciągle brakuje odpowiedzi na kluczowe pytania dotyczące przyczyn podatności i oporności na stres. Podjęta przez mgr inż. Annę Solarz-Andrzejewską tematyka badawcza rozprawy doktorskiej mająca na celu określenie wpływu wczesnego stresu na kluczowe procesy mogące prowadzić do rozwoju chorób psychicznych jest w pełni uzasadniona i może przyczynić się w przyszłości

Katedra Toksykologii

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 56 30, faks +48 12 620 56 43, e-mail: toksykologia@cm-uj.krakow.pl
www.farmacja.cm.uj.edu.pl

do wprowadzenia leków kompensujących istotne zmiany wywołane stresem.

Przedstawiona do oceny praca doktorska oparta została o cykl czterech, spójnych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2021-2023 w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym w *Brain, Behavior and Immunity, Pharmacological Reports, Neuroscience and Development Neurobiology*. Sumaryczny współczynnik wpływu tych prac wynosi 26,3 (520 punktów MNiSW). We wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jej wiodącą rolę w ich powstaniu a fakt ten potwierdzają także zamieszczone oświadczenia współautorów.

Recenzowana rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, spis skrótów, wprowadzenie, cel badań, metodykę, wyniki badań uzupełniających (nie ujętych w publikacjach), dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Ponadto, praca zawiera spis i oryginały prac naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej, materiały uzupełniające do tych prac oraz wykaz źródeł finansowania pracy.

Głównym celem badań przedstawionych w ocenianej dysertacji było określenie wpływu separacji potomstwa od matki na funkcjonowanie bariery krew-mózg, przebieg odpowiedzi neurozapalnej wywołanej podaniem lipopolisacharydu oraz na procesy komórkowej odpowiedzi na stres. Wybór zarówno modelu wczesnego stresu jak i neurobiologicznych procesów, które mogą być istotne w patogenezie chorób psychicznych został przez Doktorantkę doskonale przedstawiony we wstępie pracy doktorskiej a także w poszczególnych publikacjach. Na podkreślenie zasługuje wybór zwierzęcego modelu stresu, polegającego na 3-godzinnej, codziennej, od 1 do 14 dnia po urodzeniu separacji miotów szczurzych od matki. Z jednej strony model ten jest dobrze scharakteryzowany, także przez zespół prof. Agnieszki Chocyk, który od wielu lat prowadzi z zastosowaniem tego modelu badania, między innymi określając wpływ tej procedury na dojrzewanie układu dopaminowego, procesy plastyczności synaptycznej w przyśrodkowej części kory przedczołowej oraz na związane z tą strukturą zachowania lękowe. Z drugiej strony wykazano, że stres we wczesnym okresie życia zwiększa ryzyko rozwoju nie tylko chorób psychicznych i uzależnień od narkotyków, ale także ryzyko rozwoju w życiu dorosłym zespołu metabolicznego, cukrzycy i chorób układu krążenia, a więc uzyskane wyniki mogą okazać się istotne także w kontekście patogenety tych coraz częściej występujących chorób cywilizacyjnych. We wstępie Doktorantka w sposób kompetentny przedstawiała główne neurobiologiczne mechanizmy modulowane przez stres i jednocześnie potencjalnie zaangażowane w patogenetę chorób psychicznych, co w pełni uzasadniło celowość przeprowadzonych badań.

Badania zostały logicznie zaplanowane i przeprowadzone w kompleksowy sposób. Wpływ stresu separacji na wybrane neurobiologiczne mechanizmy, markery biochemiczne, elektrofizjologiczne, immunohistochemiczne i behawioralne określano w różnych okresach życia zwierząt w różnych regionach mózgu a w wielu przypadkach badania prowadzono zarówno u samic jak i u samców szczura. Wszystkie procedury eksperymentalne wykonywane na zwierzętach uzyskały pozytywną opinię II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na zwierzętach.

Doktorantka rozpoczęła badania od określenia wpływu stresu separacji na funkcję bariery krew-mózg, poprzez pomiar jej przepuszczalności z zastosowaniem fluorescencyjnego znacznika soli sodowej fluoresceiny oraz przeprowadzając badania ilościowe ekspresji genów i poziomu wybranych białek budujących tę barierę, między innymi takich jak klaudyna 3 i 5, okludyna, transporter glukozy typu 1, akwaporynowy kanał transportu wody (AQP-4) (**Publikacja 1**). Ponadto, we krwi oznaczano poziom markera świadczącego o rozszczelnieniu bariery krew-mózg, białka S100 β a w ramach badań uzupełniających (nieopublikowanych) analizowano gęstość naczyń mózgowych poprzez pomiar metodą immunohistochemiczną ekspresji białka śródbłonna naczyń w obszarach bariery krew-mózg (EBA). Ponieważ funkcję bariery krew-mózg badano nie tylko w różnych obszarach mózgu, ale także w różnych okresach życia zwierząt i to zarówno u samic jak i u samców szczura, pozwoliło to Doktorantce na wykazanie szybszego dojrzewania bariery krew-mózg z wiekiem u samic niż u samców oraz wykazanie szczególnie dużych różnic w przepuszczalności tej bariery pomiędzy badanymi płciami w 22 dniu życia. Dogłębnie i bardzo krytycznie Doktorantka przedyskutowała uzyskane wyniki świadczące o tym, że stres izolacji nie wywołuje jednoznacznie negatywnego wpływu na funkcję bariery krew-mózg, a niektóre zmiany, głównie obserwowane u samic, mogą nawet prowadzić do słabszego działania w późniejszym okresie życia niekorzystnych czynników. Co istotne, postawioną hipotezę Doktorantka weryfikowała w kolejnej pracy określając wpływ stresu izolacji na indukowany podaniem lipopolisacharydu przebieg odpowiedzi zapalnej u młodych (22-dniowych) i dorosłych (70-dniowych) szczurów (**Publikacja 2**). Podobnie jak w przypadku bariery krew-mózg, także efekty stresu izolacji na procesy neurozapalenia były zależne od płci i wieku zwierząt. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła Doktorantce na stwierdzenie, że stres izolacji nasila indukowaną LPS odpowiedź neurozapalną u samców, szczególnie u młodych osobników, natomiast u dorosłych samic nie wywołuje takiego efektu, a nawet niektóre badane markery zapalne w mózgu i we krwi obniża. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wysunęła hipotezę, że stres we wczesnym okresie życia poprzez wywoływanie zależnych od płci zmian adaptacyjnych w układzie immunologicznym może determinować słabszą lub silniejszą odpowiedź na niekorzystne czynniki działające w późniejszym okresie życia. Celem kolejnych badań Doktorantki, była zatem próba zidentyfikowania zmian wywołanych stresem izolacji, które mogłyby odpowiadać za nasilenie czy osłabienie odpowiedzi na kolejne bodźce środowiskowe (**Praca 3 i 4**). Jest to bardzo istotny problem, ponieważ mimo wielu badań wskazujących, że narażenia we wczesnym okresie życia na stres i tym samym uwalnianie w stresie glikokortykoidy, zwiększa ryzyko rozwoju chorób psychicznych (głównie depresji) w późniejszym życiu, to wyniki te nie są jednoznaczne a ponadto dotychczas nie wiadomo, które ze zmian indukowanych stresem determinują podatność na rozwój choroby oraz dlaczego immunosupresyjnie działające na obwodzie glikokortykoidy mogą w niektórych warunkach nasilać aktywację układu immunologicznego w mózgu. Na podstawie wcześniej prowadzonych badań w zespole Pani prof. Agnieszki Chocyk oraz danych literaturowych Doktorantka wybrała do badań i określiła wpływ stresu izolacji na ekspresję mRNA i/lub poziom białek szoku cieplnego (HSP70), markery stresu retikulum endoplazmatycznego, markery odpowiedzi na nieprawidłowo zwinięte białka, markery apoptozy oraz na liczbę neuronów, astrocytów i komórek glejowych w przyśrodkowej korze przedczołowej samców szczura w różnym wieku. Na podstawie wyników tych bardzo obszernych badań Doktorantka wytypowała białka z rodziny HSP70 (HSPA5 i HSPA1A/1B)

jako potencjalne mózgowo i obwodowe biomarkery zaburzeń związanych z działaniem stresu we wczesnym okresie życia oraz określiła wpływ stresu izolacji na markery stresu retikulum endoplazmatycznego i markery odpowiedzi na nieprawidłowo zwinęte białka.

Ogólne wnioski przedstawione przez Doktorantkę, wskazujące że spośród wielu badanych przez nią czynników, mechanizmy podatności czy oporności na stres izolacji mogą być związane z ekspresją klaudyny 5, receptora TLR4 i białek HSP70, są dobrze uzasadnione i logiczne. Należy podkreślić, że badania prowadzone przez mgr inż. Annę Solarz-Andrzejewską nie obejmują tylko efektów stresu izolacji na markery biochemiczne lecz równolegle prowadzone były także badania behawioralne, elektrofizjologiczne i immunohistochemiczne, co pozwoliło na pełniejszą interpretację uzyskanych wyników. Dużym osiągnięciem przedstawionej pracy jest wykazanie, że zmiany w strukturach mózgu wywołane stresem izolacji w dużym stopniu zależą od płci zwierząt a także od ich okresu rozwojowego i badanej struktury mózgu. Dane te, będą zapewne bardzo pomocne i ułatwiające wybór zwierząt w odpowiednim wieku do kolejnych badań prowadzonych w tym modelu eksperymentalnym nie tylko przez zespół prof. Agnieszki Chocyk ale także przez innych badaczy.

Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematu badawczego, właściwie opisała i przedyskutowała uzyskane wyniki konfrontując je z prawidłowo dobranymi pozycjami piśmiennictwa. Dyskusja prowadzona jest poprawnie i wielokierunkowo a Autorka zwraca uwagę na konieczność wykonania kolejnych badań w celu wyjaśnienia niektórych kontrowersji dotyczących wpływu stresu na neurobiologiczne procesy istotne w patogenezie chorób psychicznych, co świadczy, że Jest świadoma zarówno ograniczeń metodycznych jak i ciągle za mało poznanych mechanizmów uruchamianych w stresie. Szczególne uznanie budzi fakt, że Doktorantka omawia wszystkie istotne wyniki swoich badań, także te, które wskazują że stres we wczesnym okresie życia nie zawsze nasila wpływ niekorzystnych czynników działających w późniejszym życiu, lecz może także osłabiać działanie kolejnych czynników środowiskowych. Szukając przyczyn takiego działania stresu w kompetentny sposób Doktorantka rozważa udział badanych w swojej pracy oraz przez innych autorów potencjalnych czynników, równocześnie wskazując nowe kierunki lub potrzebę rozszerzenia obecnych badań celem wyjaśnienia tego problemu. Moim zdaniem, bardzo interesujące i warte dalszych badań wydaje się powiązanie efektów stresu izolacji z aktywacją TLR4, być może aktywowanego właśnie, jak sugeruje Doktorantka, przez białka HSP70. **Mam pytanie do Doktorantki** - rozważając możliwy udział receptora TLR4 w działaniu stresu we wczesnych okresach życia jaki kierunek dalszych badań uważa za najbardziej obiecujący (np. wpływ TLR4 na metabolizm lipidów, udział białka HMGB1 w aktywacji TLR4, aktywacja szlaku sygnałowego TLR4/NFκB/NLRP3, interakcje mikrogleju z neuronami, czy inne?).

Proszę także o krótki komentarz, dlaczego badania dotyczące wpływu stresu izolacji na barierę krew-mózg i przebieg odpowiedzi neurozapalnej prowadzono na samicach i samcach a wpływ stresu izolacji na procesy komórkowej odpowiedzi na stres tylko na samcach.

Chciałabym także poznać opinię Doktorantki jak można wytłumaczyć fakt, że badania epidemiologiczne wskazują, że depresja występuje 2-razy częściej u kobiet niż u mężczyzn, natomiast stres izolacji w obecnej pracy wywierał niekorzystne działanie na barierę krew-mózg i przebieg odpowiedzi neurozapalnej raczej u samców niż u samic.

Podsumowując, wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej dotyczący istotnego problemu badawczego uważam za w pełni uzasadniony aktualnym stanem wiedzy. Założone cele pracy zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki są oryginalne, mają duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład w badania zmierzające do ustalenia mechanizmów zaangażowanych w działanie stresu na neurobiologiczne mechanizmy istotne w patogenezie chorób psychicznych. Doktorantka realizując pracę doktorską wykazała dużą wiedzę teoretyczną, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz właściwego przedstawiania, interpretacji i dyskusji wyników, a więc spełniła wszelkie wymogi obowiązujące osoby ubiegające się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U.2023, 742). W związku z powyższym, wnioskuję 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.

Ponadto, biorąc pod uwagę dużą wartość merytoryczną przeprowadzonych badań, zastosowanie wielu, nowoczesnych technik badawczych oraz sposób opracowania publikacji i wysoki współczynnik wpływu (IF) czasopism w których zostały opublikowane uzyskane wyniki zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej.

Prof. dr hab. Bogusława Budziszewska