



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału
Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk
Kierownik

tel.: 48 22 60 86 572
e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl

Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN
Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału
tel.: 48 22 60 86 572
e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl

Warszawa, 10.12.2023

RECENZJA 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

Stres we wczesnym okresie życia (ang. *early-life stress*, ELS) znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia chorób neuropsychiatrycznych, w tym neurorozwojowych takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, ADHD, czy schizofrenia oraz neurodegeneracyjnych, np. choroby Alzheimera czy Parkinsona, które są ważnym i narastającym problemem zdrowotnym na całym świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia WHO, ELS nie tylko zwiększa ryzyko wystąpienia choroby psychicznej, ale również przyczynia się do wcześniejszego wystąpienia jej objawów. ELS zaburza procesy rozwoju i dojrzewania mózgu, nie są jednak wyjaśnione molekularne mechanizmy odpowiedzialne za te zaburzenia. Konieczne są dokładnie kontrolowane badania prospektywne, aby określić możliwe procesy przyczynowe i mechanizmy leżące u podstaw związku pomiędzy ELS i występowaniem chorób neuropsychiatrycznych. Badania ostatnich lat wskazują na znaczenie stresu zależnego od siateczki śródplazmatycznej w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych. Kiedy w komórce gromadzą się uszkodzone białka, dochodzi do stanu nazywanego właśnie stresem siateczki śródplazmatycznej charakteryzującego się aktywacją układów enzymatycznych i czynników transkrypcyjnych mających przywrócić komórkom homeostazę. W komórkach poddanych stresowi dochodzi do zahamowania translacji oraz do degradacji w proteasomach nagromadzonych, dysfunkcyjnych białek (ER-associated degradation; ERAD). Jest to odpowiedź komórek na nieprawidłowo sfałdowane białka (Unfolded Protein Response; UPR). Wpływ ELS na

główne ścieżki stresu ER (zależna od PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 (Inositol-Requiring-Enzyme 1) oraz ATF6 (Activating Transcription Factor 6) i UPR nie był dotąd badany. Dlatego badania, które są przedmiotem przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej są nowatorskie i niezwykle ważne, wpisują się w nurt najnowszych działań badaczy zmierzających do zrozumienia i wyjaśnienia molekularnych mechanizmów prowadzących do zaburzeń psychiatrycznych zależnych od ELS. W przyszłości mogą doprowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu zaburzeń psychiatrycznych. Przedmiotem badań Doktorantki jest mało dotąd poznany udział bariery krew mózg (ang. Blood Brain Barrier – BBB) i procesów zapalnych w biologii ELS oraz modulacja tych procesów przez czynniki związane z płcią. Kandydatka podjęła również próbę wyjaśnienia udziału stresu siateczki śródplazmatycznej (ER) i UPR w molekularnych mechanizmach odpowiedzi na ELS. Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej stanowi zatem oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego.

Rozprawa ma charakter spójnego tematycznie zbioru utworzonego przez cztery prace doświadczalne opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy Filadelfijskiej: *Developmental Neurobiology*, *Brain, Behavior, and Immunity*, *Neuroscience* i *Pharmacological reports* o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 26,3 uzyskując 520 pkt. MEiN. We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Anna Solarz-Andrzejewska jest pierwszym autorem. Ze względu na to, że wszystkie cztery prace są wieloautorskie, załączono stosowne oświadczenia współautorów oraz samej Autorki, wskazujące na wiodącą rolę Doktorantki zarówno w planowaniu jak i wykonaniu doświadczeń jak i opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Dowodzi to, iż Kandydatka nabyła umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i jest dojrzałym badaczem. Cykl prac dopełniają badania uzupełniające jeszcze nie opublikowane. Konstrukcja rozprawy jest zgodna z zaleceniami Komisji Rady d.s. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, zawiera bowiem: 1) stronę tytułową, 2) spis artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy, 3) spis skrótów, 4) streszczenie w języku polskim i angielskim, 5) wprowadzenie, 6) główne i szczegółowe cele badań, 7) dyskusję, 8) Wnioski końcowe, 9) bibliografię wykorzystaną we wprowadzeniu oraz w dyskusji, 9) oświadczenia współautorów oraz 10) artykuły naukowe w wersji oryginalnej. Dołączono również suplementy artykułów. Integralną częścią rozprawy są badania uzupełniające, które opisano skrupulatnie i wyczerpująco dzieląc na podrozdziały, Metodyka, Wyniki i Podsumowanie.

W syntetycznym i bardzo interesującym Wstępie zajmującym 16 stron Doktorantka wprowadza czytelnika w istotę problemu badawczego podjętego w pracy. Kolejne podrozdziały Wprowadzenia napisane bardzo dojrzałym językiem naukowym (Stres we wczesnym okresie życia – wpływ na zdrowie psychiczne i fizyczne, Komórkowa odpowiedź stresowa: stres siateczki śródplazmatycznej i odpowiedź na niepoprawnie zwinięte białka, Bariera krew-mózg a stres, Procesy neurozapalne a stres, Modulacja procesów zapalnych, stresu ER i funkcji BBB przez chroniczny stres) wskazują na ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki i doskonałą znajomość najnowszej literatury z badanej dziedziny. Bardzo starannie przygotowany schemat przedstawiający aktywację ścieżek odpowiedzi na nieprawidłowo zwinięte białka (UPR) związanych z aktywacją trzech głównych

receptorów PERK, IRE1 oraz ATF6, a także Schemat budowy bariery krew-mózg (BBB) ułatwiają analizę opisywanych procesów. Podsumowując ocenę tej części pracy stwierdzam, że Doktorantka doskonale porusza się w zagadnieniach związanych z biologią stresu, w bardzo interesujący i wyczerpujący sposób przedstawia komórkowe i molekularne podłoże stresu. Rozdział napisany jest klarownie i bardzo precyzyjnie, dobrze koresponduje z założeniami pracy i uzasadnia cele podjętych badań, które zostały jasno sformułowane w kolejnym rozdziale pracy i opatrzone schematami obrazującymi przebieg eksperymentów. Sformułowano cztery główne cele pracy, które obejmowały:

1. Zbadanie wpływu separacji od matki (MS) na dojrzewanie i integralność bariery krew-mózg (BBB) u szczurów obu płci na różnym etapie rozwoju;
2. Zbadanie, czy doświadczenie MS wpływa na przebieg reakcji zapalnej w późniejszym okresie życia modelowanej podaniem lipopolisacharydu (LPS) zwierzętom obu płci w 21 i 70 dniu po urodzeniu;
3. Sprawdzenie, czy MS moduluje ekspresję białek rodziny HSP70 na różnych etapach rozwoju – poszukiwanie mózgowego i obwodowego biomarkera ELS;
4. Zbadanie roli stresu ER i UPR w mechanizmach podatności bądź oporności na ELS u samców;

Odpowiedzią na postawione cele jest cykl czterech publikacji Doktorantki oraz nie opublikowane jeszcze wyniki badań, które stanowią uzupełnienie pierwszej z cyklu prac.

Do modelowania ELS w warunkach laboratoryjnych Kandydatka zastosowała procedurę separacji osesków szczurzych od matki (z ang. maternal separation, MS), którą przeprowadzała codziennie w dwóch pierwszych tygodniach życia. W tym okresie u gryzoni, niektóre struktury mózgu (np. przyśrodkowa kora przedczołowa - medial prefrontal cortex (mPFC)) nie są jeszcze w pełni wykształcone, dlatego są szczególnie narażone na zmiany wywołane działaniem czynników środowiskowych. Wyselekcjonowanie do badań mPFC oraz prążkowiec i hipokampa, które są szczególnie istotne w patologii zarówno chorób neurodegeneracyjnych jak i neurodegeneracyjnych oraz w innych zaburzeniach neuropsychicznych jest zatem w pełni uzasadnione. Eksperymenty zostały bardzo starannie zaplanowane i logicznie poprowadzone. Opublikowanie wyników w dobrych pismach wskazuje na bardzo dobre opanowanie metod badawczych przez Autorkę oraz umiejętność zaplanowania, przeprowadzenia eksperymentów oraz logicznego wnioskowania i dyskusji. Badania rozpoczęto (publikacja 1) od oceny wpływu ELS na przepuszczalność i integralność bariery krew-mózg u młodych i dorosłych szczurów z uwzględnieniem zmian zależnych od płci. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu BBB mogą prowadzić do aktywacji procesów prozapalnych w mózgu, a w konsekwencji predysponować do rozwoju zaburzeń neuropsychicznych i neurodegeneracyjnych w późniejszym życiu. Głównym celem tej pracy było sprawdzenie integralności i funkcjonowania BBB w kontekście ELS. Chociaż badania nie wykazały znaczącego wpływu wczesnego stresu na integralność BBB, to dowiedziono, że proces uszczelniania BBB przebiegał odmiennie u samic i u samców szczurów. Samce wykazywały stopniowe uszczelnianie BBB w trakcie rozwoju, natomiast w przypadku samic, poziom przepuszczalności BBB w przyśrodkowej korze przedczołowej i w hipokampie w PND 22 osiągał już poziom typowy dla dorosłych samic. W PND 22 samice charakteryzowały się znacznie mniejszą przepuszczalnością BBB niż samce. Taka tendencja występowała również u zwierząt MS. Są

to nowatorskie i bardzo ważne badania, które mogą przyczynić się do zrozumienia molekularnych mechanizmów prowadzących do nieprawidłowości synaptycznych np. w zaburzeniach ze spektrum autyzmu, Związek pomiędzy płcią a występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu wciąż stanowi przedmiot rozważań i badań naukowych, chciałabym wobec tego poprosić Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas obrony do uzyskanych wyników badań i wyrażenie opinii, czy zależne od płci różnice w dojrzewaniu BBB mogą mieć znaczenie w rozwoju zaburzeń ze spektrum autyzmu i wpływać na znacznie częstsze diagnozowanie autyzmu u chłopców niż u dziewcząt. Doktorantka sugeruje, że samice mogą uruchamiać pewne mechanizmy kompensacji/adaptacji na poziomie BBB, które mogą potencjalnie determinować jej odpowiedź funkcjonalną na działanie różnych czynników środowiskowych w późniejszym okresie życia. Hipotezę tę weryfikowano wykonując badania, które złożyły się na drugą publikację z cyklu (Solarz i wsp. (2023).).

Do chwili obecnej nie badano zależności pomiędzy ELS, a rozwojem neurozapalenia w kontekście funkcjonowania BBB. Autorka rozprawy podjęła się sprawdzenia, czy doświadczenie ELS uwrażliwia bądź uodparnia na działanie czynników środowiskowych w późniejszym okresie życia uwzględniając funkcjonowanie BBB. W celu naśladowania ostrej infekcji bakteryjnej i modelowania ogólnoustrojowego zapalenia z towarzyszącym zaburzeniem BBB zastosowano iniekcję endotoksyny (lipopolisacharyd, LPS) bakterii Gram-ujemnych, która stymuluje komórki układu odpornościowego do produkcji mediatorów zapalnych. W tym wypadku badania prowadzono już tylko z wykorzystaniem przyśrodkowej kory przedczołowej (mPFC) i hipokampa, dlaczego nie kontynuowano badań w prążkowie? Nie zauważyłam w dysertacji wyjaśnienia dlaczego w pierwszej z cyklu prac wybrano do badań trzy kluczowe struktury mózgu, a w dalszych badaniach pominięto prążkowie, które pełni istotną rolę w kontroli funkcji motywacyjnych, motorycznych i behawioralnych. Zaskakujące jest również, że w świetle zaobserwowanych zmian w ekspresji genów (*Ocln*, *Cldn5*) kodujących kluczowe białka zaangażowane w utrzymanie prawidłowej struktury BBB (okludyna i kładyna-5) Autorka nie pokusiła się o zbadanie poziomu tych białek. Kładyna-5 jest najistotniejszym białkiem z rodziny kładyn odgrywającym rolę w utrzymaniu szczelności BBB, co zresztą podkreśla Autorka w Dyskusji, okludyna natomiast pełni funkcje regulatorowe. Mając na uwadze, że zmiany ekspresji genów nie zawsze korelują ze zmianą poziomu białka, analiza Western blot (lub inna) mogłaby wpłynąć na interpretację wyników dotyczących stanu połączeń ścisłych (tight junctions – TJs) i integralności BBB w badanym modelu.

Najważniejszym osiągnięciem spośród opublikowanych w drugiej pracy z cyklu jest dowiedzenie, że ELS moduluje odpowiedź neurozapalną na prowokację LPS-em w sposób zależny od płci. U samców poddanych MS odpowiedź na późniejsze narażenie na LPS była znacznie większa w stosunku do kontroli, natomiast samice wykazywały obniżone neurozapalenie po iniekcji endotoksyny. Badania wpisują się zatem w nurt poszukiwań zależności pomiędzy płcią, a zapadalnością na choroby neuropsychiczne i neurodegeneracyjne. Potwierdzono, że rola płci ma duże znaczenie dla patogenezy i przebiegu tych zaburzeń. Bardzo słusznie Doktoranta podkreśla w Dyskusji, że „różnice płciowe w funkcjonowaniu BBB mogą leżeć u podstaw obserwowanych w klinice różnic płciowych w podatności na niektóre choroby psychiczne i neurodegeneracyjne, a także wpływać na sposoby ich leczenia” Należy jednak podchodzić z dużą ostrożnością do uzyskanych wyników badań, co zresztą czyni

Autorka prac. W związku z sugestią, iż u samic narażonych na ELS dochodzi do uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych lub oporności na stres w późniejszym życiu, chciałabym usłyszeć podczas obrony opinię Doktorantki w sprawie znacznie większej zapadalności na chorobę Alzheimera (chA) wśród kobiet w stosunku do mężczyzn (ok. 47 milionów osób na całym świecie cierpi na chorobę Alzheimera, 2/3 tej grupy stanowią kobiety) oraz znaczenia dysfunkcji BBB w patologii chA i toksyczności peptydów A β i białka Tau. Czy w tym przypadku kobiecy mózg jest bardziej podatny na rozwój zaburzenia ?

W kolejnej, trzeciej pracy z cyklu Autorka konsekwentnie przechodzi do analizy ekspresji genów i poziomu białek z rodziny HSP70 związanych z komórkową odpowiedzią stresową. Wnioskuje, że w związku z zaobserwowaną większą wrażliwością samców na ELS badania prowadzono wyłącznie na samcach. Czy tak? Zbadano również procesy długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w mPFC i HP (PND 70) oraz przeprowadzono testy behawioralne oceniające lęk, anhedonię i strategię radzenia sobie ze stresem.

Wykazano, że ELS powoduje wzrost poziomu mRNA HSPA1B we krwi i w mPFC zwierząt na wczesnym etapie życia (PND 15 i 26). Zmianom w ekspresji HSP70 u zwierząt stresowanych towarzyszyły zaburzenia procesów LTP w mPFC (osłabienie) i HP (nasilenie) oraz zmniejszona lęklivość w teście jasnego/ciemnego pudełka sugerująca zwiększoną impulsywność zwierząt. Są to badania nowatorskie, po raz pierwszy wykazano bowiem istotny udział białek HSP70 w molekularnych mechanizmach odpowiedzi na ELS. Autorka słusznie konkluduje, że białka z rodziny HSP70 mogą być potencjalnymi kandydatami na biomarkery zaburzeń związanych z ELS, niemniej potwierdzenie tej hipotezy wciąż wymaga szerszych badań.

Kontynuując badania, w czwartej pracy z cyklu, Kandydatka podjęła próbę zbadania udziału stresu ER i UPR w molekularnych mechanizmach odpowiedzi na ELS, ale tylko u samców i tylko w mPFC. Aktywację i programowanie procesów stresu ER i UPR oceniano na podstawie analizy ekspresji genów i poziomu kluczowych białek PERK, IRE1 oraz eIF2 α związanych z tymi procesami. Zbadano wpływ MS oraz inhibitora stresu ER, salubralinu (SAL), na ekspresję markerów UPR i apoptozy (brak analizy poziomu białek). Nie wykazano jednak jednoznacznego wpływu ELS na procesy stresu ER, UPR i apoptozy w badanych okresach rozwojowych (PND 15, 26 i 70). Modulujący wpływ salubralinu i jego rozpuszczalnika (DMSO) na ekspresję markerów UPR i apoptozy oraz zachowanie zwierząt MS jest dyskusyjny i zaskakujący, a działanie salubralinu jest w zasadzie niemożliwe do oceny i wyjaśnienia. Autorka jest tego w pełni świadoma i podejmuje długą, rzeczową i wyczerpującą dyskusję na ten temat zarówno w publikacji jak i w Dyskusji rozprawy.

Niezależnie od tego podjęte badania znacząco poszerzają wiedzę o molekularnych mechanizmach zaburzeń zależnych od ELS i tym samym przyczyniają się do zrozumienia podłoża zaburzeń neuropsychiatrycznych wywołanych stresem we wczesnym okresie życia, które są ogromnym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym na całym świecie.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Solarz-Andrzejewskiej porusza bardzo ważny i aktualny problem naukowy. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę wnoszą nową wiedzę do literatury przedmiotu i wskazują na nowe punkty uchwytu w terapii chorób neuropsychiatrycznych indukowanych stresem we wczesnym okresie życia. Badania zostały przemyślane, bardzo dobrze zaplanowane, wykonane i

zinterpretowane, odzwierciedleniem tego są cztery publikacje w dobrych czasopismach. Doktorantka jest Autorem wiodącym we wszystkich tych pracach, co świadczy o Jej dużej dojrzałości naukowej. Dowodem tego jest również Dyskusja w rozprawie, w której Doktorantka odnosi się do uzyskanych wyników badań z dużym krytycyzmem i konfrontuje je z najnowszą literaturą. Pod względem edytorskim, praca została napisana z dużą starannością, chciałabym jedynie zwrócić uwagę Autorki na sformułowanie w Dyskusji (Str. 54), gdzie pisze o ekspresji białka, podczas gdy ekspresji ulegają geny, a nie białka, które są produktami ekspresji genów. Należałoby zatem dyskutować o poziomie badanego białka lub efektywności ekspresji genu, a nie o „ekspresji białka”, choć takie sformułowanie jest dość często spotykane w polskojęzycznej literaturze naukowej.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca jest dojrzałą rozprawą doktorską, w której jasno sformułowane cele osiągnięto przy pomocy szerokiego wachlarza różnorodnych technik badawczych i dobrze opracowanego modelu zwierzęcego, a uzyskane wyniki są przedstawione i przedyskutowane w sposób interesujący i kompetentny. Pani mgr inż. Anna Solarz-Andrzejewska przedstawiła się jako doświadczona badaczka, która doskonale potrafi zaprojektować i przeprowadzić eksperymenty oraz wyciągnąć prawidłowe wnioski, a przede wszystkim opublikować badania w dobrych czasopismach.

Stwierdzam, wobec tego, że przedłożona mi do recenzji praca 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 Wysokiej 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.

**Wniosek o wyróżnienie 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**

Ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, nowatorstwo i znaczenie poznawcze uzyskanych wyników badań oraz bardzo dobry sposób przygotowania rozprawy, a przede wszystkim opublikowanie wyników w renomowanych pismach o zasięgu międzynarodowym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie niniejszej rozprawy.