



**Katedra i Zakład Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin

Telefon sekr.(81) 448 64 50

Lublin, 05.11.2020

Dr hab. n. med. Zofia Danilczuk

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Katarzyny Anny Chamery

pt.” Evaluation of the role of the selected neuronal and microglial proteins in the pathogenesis of schizophrenia – studies in an animal model”

„Ocena roli wybranych białek neuronalnych i mikroglejowych w patogenezie schizofrenii – badania w modelu zwierzęcym”

wykonana w Pracowni Immunoendokrynologii

Zakładu Neuroendokrynologii Doświadczalnej

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Basta-Kaim

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Anny Chamery ma formę spójnego tematycznie opracowania dwóch artykułów prac doświadczalnych i jednego *review*, opublikowanych w znakomitych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, tj. *Journal of Neuroinflammation*, *Cells* i *Current Neuropharmacology* o wspólnym wskaźniku oddziaływania *impact factor* 16,908. Wszystkie prace powstały w tym samym Zespole badawczym o uznanej pozycji w badaniach nad mechanizmami patogenezy chorób psychiatrycznych. Należy podkreślić, że we wszystkich trzech artykułach, opublikowanych w roku 2020, Doktorantka jest pierwszym autorem, co niewątpliwie świadczy o Jej dużym wkładzie w powstawaniu prac, potwierdzonym oświadczeniami współautorów. Konstrukcja rozprawy doktorskiej została przygotowana z wielką starannością i zgodnie z zaleceniami Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Tematyka rozprawy doktorskiej, dotycząca schizofrenii, zaburzenia rozwoju neurologicznego, jest szczególnie ważną w aspekcie złożoności mechanizmu patogenezy. Oznacza to, że zmiany strukturalne i funkcjonalne w mózgu są obecne u niektórych nawet w rozwoju płodowym bądź powstają w okresie dzieciństwa lub dorastania, bądź w obu

okresach. Dane dotyczące bliźniaków, adopcji i wywiadów rodzinnych dowodzą, że schizofrenia jest chorobą genetyczną o dużej heterogenności. Według współczesnych teorii szereg mutacji i tych powszechnie występujących, i tych rzadszych, jak duże delecje i insercje (zmiany liczby kopii), łącznie powoduje bardzo różnorodny obraz kliniczny i przebieg choroby. Co więcej, za rozwój tego schorzenia odpowiedzialne są nie tylko czynniki genetyczne ale również czynniki środowiskowe, jak: jak stres matki w okresie ciąży, traumatyczne przeżycia, infekcje bakteryjne i wirusowe a nawet niedożywienie w okresie prenatalnym. Badanie mechanizmów leżących u podstaw rozwoju schizofrenii jest niezwykle aktualne i ważne w świetle poszukiwania nowych, skutecznych terapii tej choroby a zarazem wielce aplikacyjne.

Liczne obserwacje dotyczące homeostazy i prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego wskazują na ważną komunikację między neuronami i mikroglejem. Znaczenie tej komunikacji dla homeostazy ośrodkowego układu nerwowego, rola mikrogleju we wzajemnej interakcji z neuronami, w tym układów białek takich jak: CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 oraz wpływ na patogenezę schizofrenii, jeszcze nadal jest słabo rozpoznana.

W przedłożonej rozprawie doktorskiej, zawierającej oprócz wymaganej, w kolejności, strony tytułowej, źródeł finansowania, podziękowań, spisu artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, spisu treści, wykazu skrótów oraz streszczeń w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, celu pracy, dyskusji, podsumowania i wniosków, bogatej bibliografii, oświadczeń współautorów, zostały dołączone w całości oryginalne prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej.

We Wprowadzeniu, Mgr Katarzyna Anna Chamera, w oparciu o licznie dobrane piśmiennictwo, przybliży Czytelnikowi tematykę rozprawy doktorskiej. Doktorantka opisała, w przystępny sposób, komunikację neuronalno-mikroglejową, jej charakterystykę wzajemnego oddziaływania a także rolę wydzielanych substancji a wśród nich par ligand-receptor CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1.

CD200 (wcześniej OX-2 lub MRC OX-2) jest glikoproteiną błonową typu I jak również jej jedyny receptor dla CD200 znany jako CD200R (lub OX-2R). W ludzkim mózgu CD200 jest silnie wydzielany w mózdzku, korze mózgowej, hipokampie, prążkowie i rdzeniu kręgowym. Układ ten zaangażowany w kontrolę aktywacji mikrogleju czy aktywację zapalną może również brać udział w neurytogenezie.

Natomiast, CX3CL1 (fraktalkina u ludzi i szczurów lub neurotaktyna u myszy) jest jedynym przedstawicielem podrodziny chemokin, obecnym przede wszystkim w ciele migdałowatym,

korze mózgowej, hipokampie, prążkowi, wzgórzu i opuszkach węchowych, a w bardzo niewielkim stopniu także w mózdzku. CX3CL1 jest jedynym ligandem dla CX3CR1 który jest receptorem sprzężonym z białkiem G_i. Wykazano, że CX3CR1 znajduje się na powierzchni monocytów/makrofagów, neutrofilii, limfocytów T i komórek NK (ang. *natural killer*), komórek tucznych, komórek dendrytycznych oraz mikrogleju. Główna funkcja CX3CL1 polega na indukcji chemotaksji i adhezji komórek. Oś CX3CL1-CX3CR1 związana jest również z promowaniem neurogenezy. Jedną z najważniejszych ról układu CX3CL1-CX3CR1 jest kontrola aktywacji i prawidłowego funkcjonowania mikrogleju. We wstępie, Autorka uwzględniła również aktualne teorie patogenezy schizofrenii: neurorozwojową, immunologiczną i teorię „dwóch uderzeń”. Kolejną częścią pracy jest cel rozprawy, przedstawiony jasno i logicznie, w sposób uporządkowany, poparty rysunkami obrazującymi kolejne etapy wykonywanych badań, odwołując się w szczegółach do opublikowanych prac.

Mgr Katarzyna Anna Chamera, wykorzystując dwa neurorozwojowe modele zwierzęce schizofrenii, w tym jeden opracowany wcześniej przez Zespół prof. dr hab. Agnieszki Basta-Kaim, postanowiła zbadać rolę układów białek takich jak: CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 w regulacji komunikacji neuronalno-mikroglejowej, a także udział tych potencjalnych zaburzeń neurorozwojowych w etiologii schizofrenii wywołanych prenatalnym narażeniem układu immunologicznego matki (MIA), który może prowadzić do zmian w systemach białkowych w korze czołowej i hipokampie potomstwa a w konsekwencji do deficytów behawioralnych, przypominających schizofrenię w dorosłości.

Wykorzystany w badaniach, prezentowanych w niniejszej rozprawie, układ doświadczalny pozwolił na określenie wpływu MIA na osie CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 z uwzględnieniem różnych czynników immunostymulujących (LPS, Poly I:C), wieku potomstwa (młode, dorosłe), a także podłoża genetycznego zwierząt doświadczalnych (Wistar, Sprague-Dawley).

W tym celu w 1. modelu podawano samicom szczurzym od 7. dnia ciąży do dnia wykotu substancję immunostymulującą – lipopolisacharyd („model LPS”) natomiast w 2. modelu stosowano jednorazową iniekcję dożylną kwasu poliinozylo-policytydylowego („model Poly I:C) samicom w 15. dniu ciąży.

Bogaty, nowoczesny warsztat metodyczny obejmował następujące badania:

1. obrazowanie białek CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 na specyficznych typach komórek OUN w korze czołowej, a także regionach CA1, CA3 oraz DG hipokampa młodego potomstwa szczurów szczepu Wistar;

2. ocenę wpływu MIA na ekspresję i poziom układów CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 oraz reaktywność mikrogleju w homogenatach kory czołowej i hipokampa młodego (7-dniowego) potomstwa szczurów szczepu Wistar;
3. określenie wpływu MIA na behavior (bramkowanie sensoryczne, zachowanie lękowe i interakcje socjalne) dorosłego potomstwa szczurów szczepu Wistar, jak również poziomy białkowe CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1 w homogenatach kory czołowej i hipokampa tych zwierząt.
4. określenie wpływu MIA na behavior (bramkowanie sensomotoryczne, aktywność eksploracyjna, zachowania lękowe i depresyjne oraz interakcje socjalne) dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley;
5. zbadanie wpływu MIA skojarzonego z ostrym jednorazowym podaniem dootrzewnowym LPS w dorosłości, zgodnie z teorią „dwóch uderzeń”, na bramkowanie sensomotoryczne dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley, a także ekspresję i poziom układów CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 oraz reaktywność mikrogleju w homogenatach hipokampa i kory czołowej tych zwierząt.

Należy podkreślić, że zgromadzono imponującą ilość wyników a badania przeprowadzone przez Autorkę są nowatorskie i bardzo cenne poznawczo.

Zaobserwowano, że MIA zmienia ekspresję genów i poziomy białek neuronalno-mikroglejowych CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 w korze czołowej i hipokampie młodego potomstwa szczurów szczepu Wistar. Jednocześnie wykazano nieprawidłową reaktywność mikrogleju, indukowaną MIA, w mózgach tych zwierząt. Wskazują na to zaburzenia ekspresji genów markerów mikrogleju (w tym *Cd40*, *Arg1* i *iNos*) oraz cytokin pro- (*Il-1 β* , *Tnf- α* , *Il-6*) i przeciwzapalnych (*Tgf- β* , *Il-10*), ale także białkowych poziomów tych czynników (np. IL-6, IL-4). Niejednorodny profil zmian, dotyczący zarówno układów CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1, jak i reaktywności mikrogleju sugeruje istotny wpływ rodzaju użytej substancji immunostymulującej w powstawaniu nieprawidłowości u młodego potomstwa.

Pokazano również, że w korze czołowej i hipokampie dorosłego potomstwa szczurów dochodzi do zaburzeń w systemach CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1. Zmiany w tych układach zależą zarówno od czynnika immunostymulującego, jak i szczepu szczurów. Jednocześnie MIA wywiera niekorzystny wpływ na reaktywność mikrogleju w mózgach dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley (w modelu z użyciem LPS), o czym

świadczą nieprawidłowości w ekspresji markerów mikrogleju oraz cytokin pro- i przeciwzapalnych.

U dorosłego potomstwa obu badanych szczepów, które w okresie prenatalnym narażone było na MIA, zaobserwowano pojawienie się zaburzeń behawioralnych, przypominających schizofrenię. Zmiany te dotyczyły zachowań lękowych, interakcji socjalnych, aktywności eksploracyjnej oraz bramkowania sensomotorycznego. Szczególnie interesujące są dane pokazujące, że deficyty w bramkowaniu sensomotorycznym są zależne od wieku, a dodatkowo u dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley (w modelu LPS) pozwalają na wyodrębnienie dwóch fenotypów („odpowiadającego” i „nieodpowiadającego”), różnicujących zachowanie tych zwierząt. W oparciu o te wyniki dokonano weryfikacji teorii „dwóch uderzeń” poprzez zastosowanie dodatkowego bodźca u dorosłego potomstwa szczurów szczepu Sprague-Dawley w modelu LPS. Wykazano, że stymulacja w dorosłości prowadzi do zmian na poziomie behawioralnym i biochemicznym, głównie u zwierząt „nieodpowiadających”. Szczególnie istotny okazał się jej wpływ na układ CD200-CD200R oraz mechanizmy go regulujące, co pozwala sądzić, że chociaż MIA nie zawsze bezpośrednio prowadzi do deficytów behawioralnych, to uwrażliwia potomstwo na działanie niekorzystnych czynników w życiu dorosłym. Uzyskane i przedstawione w rozprawie wyniki sugerują, że brak prawidłowego funkcjonowania układów neuronalno-mikroglejowych CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1, a także towarzyszące im zmiany w reaktywności mikrogleju, obserwowane w istotnych dla patomechanizmów schizofrenii strukturach mózgu, wywołane działaniem MIA w okresie prenatalnym, mogą stanowić ważny element złożonego obrazu tego schorzenia.

Dyskusja została poprowadzona logicznie i wnikliwie, Autorka zgromadziła imponującą ilość wyników, odpowiednio je zinterpretowała i skonfrontowała z danymi bibliograficznymi. Zawiera również osobiste spostrzeżenia i uwagi dotyczące badań własnych i innych badaczy, co świadczy o dużej wiedzy i rozwadze Autora w wyprowadzaniu prawidłowych wniosków. Wyniki badań czynią pracę wysoce aplikacyjną. Badania behawioralne uzupełnione procedurami molekularnymi są niezwykle pożądane i wnoszą ogromną wiedzę w patomechanizm badanego zaburzenia.

Moim obowiązkiem jako recenzenta była ocena wszystkich aspektów merytorycznych i interpretacyjnych dysertacji mgr Katarzyny Anny Chamery. Uwagi dotyczą raczej pytań aniżeli krytycznych uwag, gdyż wyniki tej rozprawy były już wcześniej przedmiotem wnikliwych recenzji w publikacjach renomowanych czasopism. W świetle tych osiągnięć,

bardzo ciekawym jest aspekt korzyści dla pacjenta. Czy możemy zaproponować łatwo dostępny marker w diagnostyce laboratoryjnej schizofrenii? Czy na podstawie przeprowadzonych badań w tych pracach możemy wnioskować o kierunku badań nowych leków zwłaszcza w przypadku schizofrenii odpornej na dotychczasową terapię? Czy znany jest wpływ leków stosowanych w terapii schizofrenii na osie CD200-CD200R oraz CX3CL1-CX3CR1? Czy dostępne są badania funkcjonalne, które potwierdziłyby udział badanych przez Doktorantkę układów białkowych w powstawaniu zaburzeń przypominających schizofrenie u zwierząt?

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Anny Chamery pt. "Ocena roli wybranych białek neuronalnych i mikroglejowych w patogenezie schizofrenii – badania w modelu zwierzęcym" spełnia wszystkie kryteria ustawowe stawiane dysertacjom naukowym zgodnie z art.13 ust.1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Anny Chamery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na fakt, iż przedstawione w pracy badania są nowatorskie i wnoszą ogromny wkład w poznanie podłoża powstawania zaburzeń schizofrenicznych oraz zostały już opublikowane w bardzo dobrych czasopiśmie o wysokiej renomie wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

