



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Prof. dr hab. Zuzanna Setkowicz-Janeczko
Pracownia Neuropatologii Doświadczalnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Kraków, 13.09.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Iwony Majcher-Maślanki pod tytułem

„Wpływ wczesnego stresu postnatalnego (separacja od matki) na procesy plastyczności i funkcje kory przedczołowej w okresie adolescencji”

(The impact of early postnatal stress (maternal separation) on the plasticity and function of the prefrontal cortex during adolescence)

przygotowanej po opieką naukową dr hab. Agnieszki Chocyk, adiunkta w Pracowni Farmakologii i Biostruktury Mózgu, Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z tematycznie spójnego cyklu trzech prac naukowych, opublikowanych w latach 2018-2019, oraz dodatkowych badań behawioralnych, dotychczas nieopublikowanych. Zostały one opatrzone spisem treści, streszczeniem (w języku polskim i angielskim), wstępem, zwięzłym opisem celów badań, a także wynikami niepublikowanych badań oraz dyskusją. Układ ten jest zgodny z wytycznymi Rady Naukowej IF PAN. Wszystkie trzy artykuły, opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, są pracami wieloautorskimi, których łączny współczynnik oddziaływania jest bliski dziesięciu. Pomimo krótkiego czasu od publikacji, zostały one zacytowane przez innych autorów już 23 razy, co świadczy o zainteresowaniu środowiska naukowego prezentowanymi wynikami. Do rozprawy zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów prac będących podstawą doktoratu. Wynika z nich, że Pani Majcher-Maślanka uczestniczyła aktywnie w planowaniu badań, uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej na

wykonanie badań, przeprowadziła procedurę separacji od matki, wykonywała doświadczenia behawioralne, podawała wymagane substancje, wykonała szereg oznaczeń i barwień, oraz przeprowadziła analizy statystyczne. W każdej z tych publikacji Doktorantka zajmuje pozycję pierwszego autora. Co istotne, Doktorantka pozyskała fundusze na przeprowadzenie części badań, jako Kierownik projektu badawczego Prehodium 9, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Wszystkie materiały zebrane w omawianej rozprawie dotyczą problemu stresu u osobników młodocianych. Dane opublikowane przez UNICEF pozwalają stwierdzić, że stres na wczesnym etapie rozwoju postnatalnego dotyka większości dzieci na świecie i wiąże się z trwałymi konsekwencjami w dorosłości. Separacja od matki (ang. maternal separation; MS) jest powszechnie stosowanym zwierzęcym modelem takiego stresu i polega na oddzielaniu samicy od młodych w pierwszych tygodniach życia, na kilka godzin dziennie. Zarówno dla młodych, jak i dla samicy separacja jest silną sytuacją stresową. Opieka matczyna zapewnia prawidłowe działanie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) w reakcji na stres u potomstwa, a jej zniesienie może prowadzić do długotrwałych zmian, objawiających się, między innymi, wzrostem niepokoju, zachowaniami depresyjnymi, zaburzeniami pamięci oraz dysfunkcjami emocjonalnymi. Autorka, poprzez przeprowadzone badania wykazała, że stres przeżywany we wczesnym okresie życia wpływa na funkcjonowanie przyśrodkowej kory przedczołowej u zwierząt dorosłych. Ponadto, poprzez jednokrotne podanie kortykosteronu, sprawdziła jak stres wywołany we wczesnych okresach rozwoju modyfikuje reakcję na stres przeżywany po osiągnięciu dojrzałości, zarówno na poziomie komórkowym, jak i behawioralnym.

Omawiana praca stanowi cenne uzupełnienie badań przeprowadzanych dotychczas przez zespół dr hab. Agnieszki Chocyk oraz innych badaczy.

Praca 1. Majcher-Maślanka, I., Solarz, A. & Chocyk, A. (2019). Maternal separation disturbs postnatal development and the maturation of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Neuroscience*, 423, 131-147.

Celem tego opracowania była ocena wpływu MS na część prelimbiczną mPFC u zwierząt dojrzałych i dorosłych. Aby ją zrealizować, Doktorantka użyła procedury separacji młodych od matki (począwszy od pierwszego do czternastego dnia życia), zgodnie z metodyką jaka stosowana jest w zespole, w którym pracuje. Po osiągnięciu przez zwierzęta wieku 35 lub 70 dni, przeprowadziła testy behawioralne (test jasnego/ciemnego pola, test aktywności lokomotorycznej oraz preferencji glukozy). Następnie, po odpowiednim przygotowaniu tkanki, wykonała analizy biochemiczne oraz histologiczne i, używając klasycznych markerów komórek nerwowych czy glejowych, takich jak fiolet krezylu, GFAP, NG2, Iba1, wykazała wzrost liczby atrocytów oraz komórek NG2-

pozytywnych w części prelimbiczej mPFC u zwierząt poddanych MS. Co ciekawe, w tej samej grupie zwierząt zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek mikrogleju. Z wynikami tymi skorelowane były wyniki badań ekspresji genów regulujących proces apoptozy. Ekspresja genów proapoptotycznych była obniżona u zwierząt, które we wczesnych etapach rozwoju były narażone na MS, natomiast ekspresja genów promujących przeżycie komórek była podwyższona. Test eksploracji jasnego/ciemnego wykazał zwiększoną lękliwość u zwierząt po MS, natomiast w teście aktywności lokomotorycznej w nowym środowisku oraz teście preferencji glukozy brak było znaczących różnic. Wynikom tym towarzyszą odpowiednie ryciny, w przejrzysty sposób ilustrujące istotności statystyczne różnic międzygrupowych oraz mikrofotografie uwidoczniające wybarwioną tkankę. Przedstawione wyniki jasno dowodzą, że skutki wczesnego stresu postnatalnego wywierają wpływ zarówno na komponentę komórkową badanego obszaru, jak i na zdolności proliferacyjne komórek. Wzmagają także zachowania lękowe zwierząt.

Zgodnie z opisem metody, po urodzeniu, mioty ograniczano do 8 sztuk, po cztery samce i samice. Następnie zwierzęta przydzielano do grupy poddawanej MS lub hodowanej w warunkach standardowych. Dopiero w 22 dniu życia zwierzęta różnych płci były rozdzielane, by w dalszych częściach eksperymentu używać tylko samców. Bardzo proszę o wyjaśnienie dlaczego samce oddzielano dopiero po zakończeniu procedury MS ? Czy samice zostały użyte w innym eksperymencie? Czy przeprowadzano na nich podobne analizy?

Praca 2. Majcher-Maślanka, I., Solarz, A., Wędzony, K. & Chocyk, A. (2018). Previous early-life stress modifies acute corticosterone-induced synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex of adolescent rats. *Neuroscience*, 379, 316-333.

Celem tych badań było ustalenie jak MS moduluje odpowiedź na ostry stres u zwierząt dorosłych. Odpowiedź na to pytanie jest bardzo istotna w kontekście doniesień informujących o różnych przejawach stresu na jaki obecnie narażone są dzieci i młodzież.

W doświadczeniu tym, podobnie jak w poprzednio przytoczonej pracy, posłużono się modelem MS, by sprawdzić jak stres wywołany we wczesnych etapach rozwoju wpływa na plastyczność synaptyczną w obszarze mPFC po narażeniu na stres zwierząt dorosłych. By naśladować warunki ostrego stresu, u osobników dorosłych, zastosowano jednokrotne podanie kortykosteronu (CORT). Eksperyment przeprowadzono w dwóch punktach czasowych - 30 minut i dwie godziny po podaniu CORT. Skutki przeprowadzonych procedur sprawdzano, badając długotrwałe wzmocnienie synaptyczne w mPFC, ekspresję genów i białek zaangażowanych w plastyczność synaptyczną oraz poziom CORT we krwi. Jak się okazało, poziom ten był prawidłowo podwyższony w obydwu

punktach pomiarowych u zwierząt hodowanych w warunkach standardowych, natomiast narażenie na MS spowodowało iż jego poziom był istotnie niższy. Podobnie, iniekcja CORT wzmocniła LTP w badanym obszarze u zwierząt kontrolnych, natomiast u zwierząt po MS jego natężenie było mniejsze. Także poziom białek związanych z genami wczesnej odpowiedzi był podwyższony u zwierząt hodowanych przez cały czas z samicą. Przedstawione wyniki, tak jak w poprzedniej pracy, są zilustrowane odpowiednimi rycinami oraz kolorowymi mikrofotografiami. Doświadczenia te bez wątpienia dowodzą, że narażenie na stres w okresie neonatalnym prowadzi do wytworzenia swoistej plastyczności adaptacyjnej w odpowiedzi na stres wywołany w życiu dorosłym. W połączeniu z osobniczymi uwarunkowaniami genetycznymi może ona prowadzić do wzmocnienia lub osłabienia odporności psychicznej osobnika.

Praca 3. Majcher-Maślanka, I., Solarz, A. & Chocyk, A. (2019). The impact of early-life stress on corticosteroid carrier protein levels and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in adolescent rats. *Pharmacological Reports*, 71, 347–350.

Celem badań opisanych w tej pracy było ustalenie czy MS modyfikuje działanie glikokortykoidów (GC) na drodze niezależnej od aktywacji osi HPA. Ponownie zastosowano procedurę MS, a krew, tkanka mózgu oraz wątroby zwierząt, które ją przeszły została pobrana do dalszych badań w 35 dniu życia. Autorka wybrała ten okres rozwoju szczura ponieważ w tym czasie dochodzi do szeregu zmian strukturalnych w mPFC, co powoduje większą wrażliwość na zmiany sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zależnej od glikokortykoidów, czego późniejszą konsekwencją może być nawet rozwój chorób o podłożu psychicznym. Analizując surowice tych zwierząt zauważono, że separacja zmniejszyła stężenie białek nośnikowych GC, nie wykazano zmian zawartości samego kortykosteronu. W wątrobie nie wykryto zmian ekspresji globuliny wiążącej kortykosteroidy ani albuminy, natomiast w mPFC zaobserwowano zwiększoną ekspresję dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowa typu 1. Można więc uznać, że stres wywołany przez MS zwiększa dostępność GC u dorastających szczurów, to zaś w przyszłości może modyfikować podatność lub odporność na inne czynniki stresogenne.

Praca zawiera odpowiednie tabele przedstawiające poziomy omawianych związków w poszczególnych strukturach oraz przykładowe fotografie immunoblotów.

Badania behawioralne (niepublikowane). Aby uzupełnić badania zachowania przedstawione w pracy 1, Doktorantka wykonała szereg doświadczeń, które miały ocenić jak MS wpływa na zachowanie zwierząt dorosłych. Jako najodpowiedniejsze do tego typu badań Autorka wybrała testy

wymuszonego pływania, test eksploracji jasnego/ciemnego pola oraz test aktywności lokomotorycznej w nowym środowisku. Dwa ostatnie testy wykonano dodatkowo u zwierząt poddanych ostremu stresowi wywołanemu przez podanie CORT. Wszystkie testy przeprowadzono u zwierząt dojrzałych. Sposób wykonania oraz interpretacja poszczególnych testów została opisana szczegółowo. Pomimo tego nie udało mi się znaleźć informacji o płci zwierząt użytych w badaniach. Domyślam się, że podobnie jak w opublikowanych badaniach, były to samce. Również bardzo przejrzysto przedstawiono użyte metody statystyczne, konieczne obliczenia zostały zgrupowane w tabeli, a wyniki na dobrze opisanych pięciu rycinach.

Jak wykazał test eksploracji jasnego/ciemnego pola oraz test aktywności lokomotorycznej w nowym środowisku, zwierzęta poddane MS były bardziej lękliwe. Natomiast podanie CORT na 30 minut przed testem aktywności lokomotorycznej zmniejszało ich lękliwość. W teście wymuszonego pływania nie zaobserwowano różnic pomiędzy zwierzętami po MS a grupą hodowaną w warunkach normalnych. Biorąc pod uwagę podobny brak różnic w teście preferencji glukozy, opisanym w opublikowanej pracy 1, można przypuszczać, że stres separacji od matki na jaki były narażone zwierzęta nie ma wpływu na zachowania depresyjne badane u zwierząt dorosłych. Również wyniki testów aktywności lokomotorycznej pozwalają sądzić, że MS nie nasila odpowiedzi na ostry stres wywołany w wieku dorosłym. Stanowi to ważne uzupełnienie poprzednich badań Doktorantki i mam nadzieję, że w najbliższym czasie zostanie przygotowane do druku.

Rozprawa doktorska mgr Iwony Majcher-Maślanki została przygotowana bardzo starannie, nie znalazłam w niej poważniejszych uchybień natury redakcyjnej. Z pewnością dlatego, iż recenzowany cykl prac został wielokrotnie poddany rzeczowej i wnikliwej ocenie przez kompetentnych recenzentów wydawniczych. Polskojęzyczna część pracy jest napisana w sposób zwięzły, poprawną polszczyzną, z rozległą znajomością przedstawianego tematu. Również użyta w pracy literatura jest obszerna i zacytowana w sposób poprawny. Opis metodyki jest precyzyjny, co świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego. Analiza i omówienie wyników są także opisane bez zarzutu, co potwierdza szerokie umiejętności analityczne Autorki. Wszystkie wyniki są spójne i odpowiadają celom sformułowanym przez Doktorantkę. Dyskusja obejmująca zarówno wnioski z prac opublikowanych, jak i nowe badania, jest napisana w sposób zajmujący.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa jest dowodem, iż Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie praktyczne i teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Spełnia więc kryteria art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.

U. Nr 65/2003, poz. 595, z późn. zm.). Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i duże znaczenie praktyczne dociekań naukowych przedstawionych w pracy, z prawdziwą przyjemnością przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie Pani mgr Iwony Majcher-Maślanka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo aktualną tematykę badań opracowanych przez Doktorantkę oraz ciekawe i nowatorskie koncepcje badawcze, które pozwoliły na publikację wyników w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

2. Setkowicz
prof. dr hab. Zuzanna Setkowicz-Janeczko