

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Dunackiej pt. „Wpływ różnic w aktywności lokomotorycznej i reaktywności stresowej u szczurów na rozwój zaburzeń kognitywnych i depresyjnych oraz efektywność terapii z użyciem insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 w streptozotocynowym modelu choroby Alzheimera”**

Rozprawa doktorska mgr Joanny Dunackiej jest ciekawym opracowaniem z zakresu neurobiologii/neuroimmunologii i doskonale wpisuje się w tematykę badawczą od lat rozwijaną w zespole kierowanym przez dr hab. Danutę Lewandowską, prof. UG, promotorkę niniejszej rozprawy

Autorka postawiła sobie ambitny cel zbadania czy różnice we wrażliwości na stres wpłyną na podatności na rozwój wywołanej streptozotocyną sporadycznej postaci choroby Alzheimera (sAD) i związanych z nią deficytów pamięci oraz zaburzeń depresyjnych i lękowych oraz czy dokomorowe podanie insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) zapobiegnie deficytom pamięci i/lub zmniejszy poziom zaburzeń depresyjnych/lękowych towarzyszących progresji sAD. Równolegle badała także parametry immunologiczne/hemtaologiczne, w tym m.in. liczbę komórek CD68+ w różnych strukturach mózgu i zmiany składu leukocytów we krwi obwodowej.

Zasadniczą część rozprawy stanowią 3 oryginalne prace naukowo-badawcze. Prace ukazał się w latach 2024 i 2025, a ich łączny IF wynosi 14,9. Co nie dziwi, prace te są wielo-autorskie, jednak na końcu pracy znajdują się wszystkie wymagane oświadczenia współautorów.

Mając na względzie czaso- i pracochłonność badań, w tym przede wszystkim testów behawioralnych, należy docenić ogrom pracy wykonanej przez Doktorantkę.

Oprócz wymienionych artykułów badawczych na pracę składa się: i) bardzo obszerny wstęp, ii) opis metodyki eksperymentów, które nie znalazły się publikacjach, iii) wyniki tych eksperymentów, iv) ogólna dyskusja wszystkich uzyskanych wyników, v) bibliografia, na którą składa się 260 pozycji, z których ponad 36 % to pozycje z ostatnich 5 lat.

Taka konstrukcja pracy bardzo ułatwia pracę recenzenta bowiem wchodzące w skład rozprawy artykuły naukowe przeszły już przed przyjęciem do druku skrupulatną kontrolę ze strony niezależnych recenzentów. A zatem przy wykonywaniu recenzji moja uwaga w głównej mierze była skupiona na polskojęzycznej części pracy, będącej autorskim opracowaniem samej Doktorantki, ujawniającym jej zasób wiedzy, umiejętności posługiwania się piśmiennictwem naukowym, wyciągania wniosków i samodzielność.

## **Wstęp**

W obszernym wstępie pracy Autorka charakteryzuje chorobę Alzheimera, z uwzględnieniem jej potencjalnych przyczyn takich jak zaburzenia sygnalizacji insulinowej i rozwój neurozapalenia.

W dalszej części wstępu opisuje zwierzęce modele choroby Alzheimera i charakteryzuje dokładniej zastosowany w obecnej pracy model sporadycznej postaci choroby Alzheimera, w którym zaburzenia powodowane są domózgowym podaniem streptozotocyny.

Bardzo ważne, w kontekście obecnej pracy jest także porównanie szczurów HR i LR, różniących się wrażliwością na stres oraz opis roli insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz jego wpływu na behavior zwierząt. Wstęp kończą jasno sprecyzowane cele i hipotezy pracy.

Wstęp jest ciekawy i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Znalazłam jednak w nim kilka stwierdzeń, które budzą moje wątpliwości:

- 1) Na str. 29 znajdujemy stwierdzenie: „W przebiegu AD dowiedziono, że pro-zapalny, mało ruchliwy typ mikrogleju pojawia się w pobliżu blaszek starczych, a więc jest mało skuteczny w zwalczaniu tych patologicznych złogów”. Wydaje się, że rzeczywiście w warunkach *in vivo* mikroglej nie wykazuje lub wykazuje niską aktywność fagocytarną względem A $\beta$ , jednak na podstawie obecności w pobliżu blaszek starczych i aktywności pro-zapalnej raczej nie można wnioskować o jego małej skuteczności.
- 2) W tym samym podrozdziale znalazłam informację, że IL-8 tworzy środowisko chemoatrakcyjne przyciągające mikroglej. Podczas gdy IL-8 jest typową chemokiną zwołującą neutrofile, a mikroglej nie posiada wiążących IL-8 receptorów CXCR1 i CXCR2.

- 3) Dane literaturowe wskazują, że A $\beta$  aktywuje sygnalizację poprzez kompleks receptorowy obejmujący TLR2/4/6. Jednak kontekst w jaki Autorka opisała rolę TLR4 w tym procesie, pisząc, że rozpoznaje LPS, nie jest dla mnie do końca jasny.
- 4) Nie zgadzam się też, że stwierdzeniem, że aktywacja szlaku PPAR- $\gamma$  promuje syntezę cytokin prozapalnych.

## **Metodyka**

W tym podrozdziale Autorka opisuje metody wykorzystywane w badaniach, które nie weszły w skład publikacji.

Mam do tej części kilka uwag/pytań. Mając na względzie dużą liczbę skrótów zawartych w opisie eksperymentu na stronie 51 właściwsze wydaje mi się umieszczenie tego opisu jak i ryciny 2, po szczegółowych opisach testów behawioralnych (podrozdziały 2.2-2.5).

Czy w przypadku badań ICC/IHC wykonano próby z pominięciem przeciwciał I-rzędowych. W przypadku tego typu barwień warto w metodyce podać także temperatury, w których dokonuje się inkubacji skrawków.

Dlaczego jako marker aktywacji mikrogleju wybrano CD68+? Jest to marker głównie związany z fagocytozą i charakterystyczny nie tylko dla mikrogleju ale też m.in. monocytów/makrofagów. Czy Doktorantka wyklucza zatem możliwość napływu do mózgu aktywowanych makrofagów z obwodu? Z literatury wiemy, że to one wykazują wyższą aktywność fagocytarną względem złożeń amyloidu niż rezydentny mikroglej. W przypadku oznaczenia stężenia interleukin w osoczu techniką ELISA dobrze byłoby podać czułość testu.

## **Oryginalne prace naukowo-badawcze**

Tak jak już wspomniano zasadniczą część rozprawy stanowią 3 oryginalne prace naukowo-badawcze. Każda z nich została w rozprawie poprzedzona polskim streszczeniem.

Pierwsza z prac (Dunacka et al., 2024, IJMS) porównuje tempo progresji sAD u szczurów HR i LR. Autorzy udowodnili w niej, że szczury z wysoką aktywnością ruchową (HR) wykazują większą progresję sAD, mierzoną większymi deficytami pamięci referencyjnej i zaburzeniami lękowymi oraz, że tym zaburzeniom behawioralnym towarzyszy zwiększenie w określonych obszarach mózgu liczby

komórek CD68+ (co w pracy interpretowane jest jako aktywacja mikrogleju) i odkładanie złogów  $\beta$ -amyloidu.

W polskim streszczeniu tego artykułu znajdujemy stwierdzenie, że liczba aktywowanych komórek mikrogleju (CD68+), jak również liczba złogów  $\beta$ -amyloidu ( $\beta$ A) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) były markerami neurozapalenia. Wydaje mi się, że jest to stwierdzenie nieco na wyrost i że lepiej byłoby wskazać, że podniesiona ekspresja CD68 była wskaźnikiem wzrostu aktywności fagocytarnej mikrogleju (makrofagów?), a liczba złogów amyloidu wskazywała na stopień rozwoju sAD.

Ponadto w pracy zanalizowano ogólny poziom aktywacji układu odpornościowego, mierzono: liczbę limfocytów T – całkowitą i z podziałem na limfocyty Th i Tc, limfocytów B i komórek NK w PBML oraz poziom IL-6 i IL-10 osoczu krwi. Podczas obrony chciałabym prosić Doktorantkę o doprecyzowanie czemu te dwie cytokiny zostały wybrane do badań. Chciałabym się także dowiedzieć czemu do oznaczania liczby limfocytów B użyto jako markera CD45RA? Wydaje mi się, że bardziej specyficzny byłby w tym kontekście antygen B220 (CD45R). W rozdziale materiały i metody tej publikacji znalazłam także informację, że analiz procentowego udziału różnych populacji limfocytów dokonywano także w zawieszynie komórek pozyskanych ze śledziony. W pracy nie udało mi się jednak odszukać wyników tych analiz.

W osoczu mierzono także poziom kortykosteronu.

Wyniki pokazały pewien stopień immunosupresji, co może być, jak sugerują Autorzy pracy w dyskusji, związane z poziomem/aktywnością kortykosteronu.

Stwierdzono także, że wywołanie u szczurów sAD powoduje zmiany obwodowych wskaźników hematologicznych i że zmiany te są zależne od wrażliwości zwierząt na stres. I tak, u zwierząt z grupy STZ HR stwierdzono we krwi niższą liczbę erytrocytów, niższą zawartość hemoglobiny, niższy hematokryt oraz niższe stężenie hemoglobiny na wczesnym etapie sAD w porównaniu do zwierząt z grupy STZ LR.

Wyniki pracy są ciekawe i spójne, chociaż w moim przekonaniu byłoby wygodniejsze dla czytelników, gdyby w porównaniu wyników pozyskanych od szczurów HR i LR na wykresach (a nie tylko w tabeli) uwzględniać nie tylko zwierzęta, którym podano STZ, ale również te potraktowane nośnikiem (z rozdziałem na HR i LR). Dałoby to możliwość szybkiego porównania kierunku i nasilenia zmian wywołanych STZ w tych dwóch grupach.

Druga z prac (Dunacka et al., 2025, Pharmaceuticals) skupia się na wpływie IGF-1 na wywołane STZ zaburzenia pamięci przestrzennej i neurozapalenie. Stwierdzono w niej, że dokomorowe podanie IGF-1 w modelu sAD redukuje zaburzenia referencyjnej pamięci przestrzennej. Zauważono również, że szczury potraktowane IGF-1 mają niższą liczbę złogów  $\beta$ A w rejonie CA1 hipokampa i niższą liczbę komórek CD68+ w obszarze CA2 hipokampa, w porównaniu ze zwierzętami, którym nie podano tej neurotrofiny. Na podkreślenie zasługuje wnikliwa dyskusja tej pracy, wskazująca również na ograniczenia modelu.

Charakterystykę wpływu dokomorowego podania IGF-1 w modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera Doktorantka kontynuowała w trzeciej zamieszczonej w rozprawie publikacji (Dunacka et al., 2025, Cells). W tym przypadku skupiono się na wpływie IGF-1 na poziom anhedonii i zaburzeń lękowych obserwowanych w sAD. Dodatkowo badano nasilenie zapalenia obwodowego. Stwierdzono, że w późnej fazie sAD dokomorowe podanie szczurom IGF-1 zredukowało poziom zaburzeń depresyjnych i lękowych (mierzonych odpowiednio w testach preferencji sacharozy i uniesionego labiryntu krzyżowego). Pokazano także, że IGF-1 obniża we krwi liczbę leukocytów, w tym limfocytów (B i Th), komórek NK, monocytów jak i granulocytów, a także stężenie IL-6 i kortykosteronu w osoczu.

Podczas obrony chętnie przedyskutuję z Doktorantką potencjalny mechanizm, za pomocą którego podany dokomorowo IGF-1 wpływa na liczbę poszczególnych subpopulacji leukocytów i IL-6 w krążeniu.

### **Wyniki nieopublikowane**

Wartościowym uzupełnieniem rozprawy jest rozdział zawierający dane nieopublikowane. Zapewne wygodniej dla czytelnika byłoby, gdyby metodyka (teraz umieszczona po wstępie w rozdziale 2) znajdowała się bezpośrednio przed wynikami, a rozdział ten zamykał rodzaj krótkiego podsumowania. Rozdział 3 jest bardzo bogaty w wyniki, a najważniejszym celem badań w tym przypadku było sprawdzenie czy ograniczenie zaburzeń behawioralnych wywołanych STZ, w wyniku działania IGF-1, zależne jest od osobniczej wrażliwości na czynniki stresowe, mierzone zróżnicowaną aktywnością lokomotoryczną (HR vs LR). Badano zarówno zmiany behawioralne, jak i liczbę komórek CD68+ i liczbę złogów amyloidu w różnych strukturach mózgu, parametry hematologiczne, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w składzie leukocytów krwi, a także ogólne parametry takie jak masa narządów limfatycznych.

Stwierdzono, że IGF-1 redukuje poziom zmian histopatologicznych w mózgu szczurów z sAD, a zjawisko to jest lepiej widoczne u zwierząt HR niż LR. Wywołane IGF-1 zmiany wpływają pozytywnie na pamięć przestrzenną, a redukcja deficytów pamięci jest skuteczniejsza w przypadku zwierząt o większej wrażliwości na stres.

Rozdział jest bogato ilustrowany 15 rycinami (w tym 7 rycin złożonych) i 17 tabelami.

## **Dyskusja**

Pomimo, że w każdej z opublikowanych prac znajdujemy dyskusje wyników, Doktorantka pokusiła się o napisanie ogólnej dyskusji, zbierającej wszystkie opublikowane i nieopublikowane wyniki. Bardzo to doceniam, a ta część pracy podoba mi się najbardziej. Dyskusja jest napisana w sposób jasny i kompetentny i wskazuje na bardzo dobrą orientację w temacie i dojrzałość naukową Doktorantki. Wyniki dyskutowane są na tle dotychczasowej wiedzy, ale ta część pracy wskazuje też jasno ograniczenia i dalsze kierunki badań. Zgadzam się z Autorką pracy, że bardzo wartościowym uzupełnieniem pracy byłoby pokazanie ewentualnych różnic pomiędzy szczurami HR i LR z sAD w indukowanej IGF-1 neurogenezie. Wydaje się, że ważne byłoby również wykonanie u tych zwierząt pomiarów nasilenia neurodegeneracji. Dyskusję kończy 5 wniosków. Są one w większości jasno sformułowane i znajdują potwierdzenie w wynikach. Chociaż wniosek, w którym znajdujemy stwierdzenie „Przywrócenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej we wczesnym stadium sporadycznej postaci choroby Alzheimera, poprzez ośrodkowe podanie neurotrofiny IGF-1 przywracającej prawidłową sygnalizację insulinową we wczesnym etapie AD...” wydaje mi się zbyt „zapętlony”.

W tym miejscu warto zauważyć, że wyniki pokazujące, że przywrócenie zaburzonej sygnalizacji insulinowej poprzez ośrodkowe podanie IGF-1, we wczesnym stadium sAD, zmniejsza deficyty pamięci przestrzennej, zaburzenia depresyjne/lękowe, a także redukuje liczbę złogów  $\beta$ A, obniża liczbę komórek CD68+ w rejonie CA2 hipokampa oraz wywołuje obwodowy efekt przeciwzapalny, wydaje się mieć potencjalne znaczenie aplikacyjne.

Uzyskane wyniki zostały w sposób ciekawy podsumowane na rycinie 19, chociaż pewnie liczba umieszczonych na niej wyników szczegółowych, bardziej niż schemat podsumowujący, czyni z niej graficzny abstrakt pracy.

Trzeba również wspomnieć, że jakkolwiek stwierdzenia na temat różnic w poziomie białek pro- i anty-apoptotycznych i szczelności bariery krew-mózg pomiędzy szczurami

HR i LR są ciekawe, na tym etapie mają jednak charakter raczej spekulatywny i wymagałyby weryfikacji eksperymentalnej.

Na stronie 233 znajdujemy stwierdzenie: Glikokortykoidy indukują apoptozę białych krwinek. W tym kontekście należy jednak pamiętać, że są też takie leukocyty, których apoptoza jest hamowana przez glikokortykoidy.

Moje dodatkowe uwagi co do tej części pracy są następujące:

- 1) Na stronie 230 komentując różnice hematologiczne Autorka pisze „Być może efekt ten był spowodowany zmniejszoną migracją mediatorów zapalenia z ośrodka na obwód.” Podczas obrony poprosiłabym o bardziej szczegółowe wyjaśnienie tego zagadnienia.
- 2) Zarówno w opisie wyników jak i w dyskusji Doktorantka wspomina, o obniżeniu albo podwyższeniu jakiś parametrów zastrzega jednak, że „zmiana nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej”. W moim przekonaniu nie można zatem mówić o zmianie, a jedynie o tendencji i to pod warunkiem, że w tym wypadku p mieściło się w zakresie pomiędzy 0.05 a 0.1.

### **Pozostałe uwagi**

Zapewne z uwagi na duży rozmiar pracy wkradły się do niej błędy literowe, stylistyczne i interpunkcyjne a także niezręczności językowe. Dobrym przykładem częstego wykorzystywania przez Doktorantkę składni angielskiej jest zamieszczone we wstępie (strona 29) zdanie: Gdy w OUN rozwinie się patologiczny proces, mikroglej uruchamia silną fagocytarną odpowiedź, prezentuje antygeny, jak również syntetyzuje prozapalne związki. Zgodnie z polskimi zasadami gramatyki powinno ono brzmieć: Gdy w OUN rozwinie się proces patologiczny, mikroglej uruchamia silną odpowiedź fagocytarną, prezentuje antygeny, jak również syntetyzuje związki prozapalne. Pewne, ale powtarzające się problemy, miała Autorka także z zapisem nie z imiesłowami.

### **Wnioski końcowe**

Rozprawę doktorską Pani magister Joanny Dunackiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem i oceniam wysoko, a moje nieliczne i raczej drobne krytyczne uwagi w niczym nie obniżają jej bardzo dobrej oceny. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa ta spełnia warunki określone w artyku 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Zwracam się zatem z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu

Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani magister Joanny Dunackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, mając na względzie oryginalność uzyskanych wyników, fakt, że zostały one w większości już opublikowane oraz biorąc uwagę bardzo duży nakład pracy i różnorodność użytych technik badawczych, wnioskuję o **wyróżnienie pracy**.

Z poważaniem,

