



Dr hab. Agnieszka Chocyk  
Zakład Farmakologii i Biostruktury Mózgu  
IF PAN

Kraków, 18.03.2025

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Karoliny Protokowicz**

### **pt. „Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym”**

wykonanej w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk  
pod kierunkiem prof. dr hab. Leszka Kaczmarka

W ostatnich dekadach dokonał się ogromny postęp w diagnostyce i leczeniu chorób neurorozwojowych (NDD). Coraz więcej wiemy też o mechanizmach leżących u podstaw ich rozwoju. Na pierwszy plan wysuwają się wczesnorozwojowe zaburzenia struktury i funkcji synaps prowadzące do nieprawidłowości w funkcjonowaniu całych obwodów neuronalnych, a w ich konsekwencji, do pojawienia się zaburzeń psychoruchowych, kognitywnych oraz zaburzeń w zachowaniach społecznych. Niemniej jednak dokładna etiologia NDD pozostaje nieznana. Zidentyfikowano wiele czynników genetycznych i środowiskowych przyczyniających się do rozwoju tych chorób. Wśród czynników środowiskowych szczególną rolę może odrywać stan zapalny w okresie prenatalnym i wczesnodziecięcym prowadzący do rozszerzenia bariery krew-mózg i neurozapalenia mogących z kolei interferować z neurorozwojem. Jednym z ważnych białek uczestniczących w powyższych procesach, a także w procesach plastyczności synaptycznej jest metaloproteaza macierzowa 9 (MMP-9). Co ciekawe, we krwi i mózgu pacjentów z NDD obserwuje się podwyższony poziom MMP-9, zaś podanie inhibitorów tej proteazy łagodzi deficyty behawioralne w zwierzęcych modelach NDD. Jednak rola MMP-9 w patomechanizmach tych chorób nie jest do końca poznana. Rozszerzeniem wiedzy w powyższej tematyce zajęła się Pani mgr Karolina Protokowicz w swojej pracy doktorskiej, wykorzystując zwierzęcy model zapalenia oraz genetycznego obniżenia poziomu MMP-9 (MMP-9 KO).

Rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Protokowicz stanowi tradycyjne opracowanie monograficzne liczące 157 ponumerowanych stron, podzielone na typowe części/rozdziały, takie jak: 1. Wstęp, 2. Cele pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Podsumowanie i Wnioski,

7. Bibliografia. Praca zawiera też streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz informacje o źródłach finansowania badań i publikacjach własnych Doktorantki. Układ monografii nie budzi zastrzeżeń. Bibliografia składa się z 292 pozycji. Są to w większości prace z ostatniej dekady, wśród nich wiele opublikowanych w ostatnich latach, co świadczy o nowoczesności i aktualności przeprowadzonych badań. Ogólnie, praca doktorska została napisana zwięzłym, ciekawym językiem, z edytorską starannością i stanowi bardzo spójne dzieło, co ułatwia czytelnikowi zrozumienia zawartego w nim materiału.

Rozdział pierwszy – Wstęp – bardzo rzeczowo i ciekawie wprowadza w tematykę badań. Krótko definiuje NDD, potencjalne czynniki etiologiczne; szerzej skupia się na odpowiedzi układu odpornościowego, neurozapaleniu, zwierzęcych modelach NDD oraz funkcjach MMP-9. Rozdział ten prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w obszarze zainteresowań badawczych. Niemniej jednak mam kilka drobnych uwag do tej części rozprawy. Po pierwsze, rozwinięcie skrótu ADHD powinno zawierać frazę „z deficytem uwagi”. Na stronie 18 brakuje informacji o produktach genów *shank3*, *cntnap2*, *syn1*, *fmr1*, *reln2*, która ułatwiłaby zrozumienie potencjalnego zaangażowania tych genów w rozwój NDD. Chciałam też zwrócić uwagę na sformułowanie „czynniki ryzyka diagnozy NDD” (strona 18 oraz 40). Postawienie/otrzymanie diagnozy związane jest z wieloma czynnikami zależnymi i niezależnymi od pacjenta. Można nie mieć oficjalnej diagnozy np., ADHD a wykazywać symptomy tego zaburzenia, więc raczej mówimy o czynnikach ryzyka rozwoju czy powstania NDD. Natomiast w rozdziale –Urazy psychiczne– (str. 20) Doktorantka w dość ogólnikowy i uproszczony sposób tłumaczy mechanizmy działania stresu we wczesnym okresie życia: „*Nadmierna i długotrwała aktywność osi HPA może prowadzić do obniżenia odporności, a także rozregulowania fizjologicznej odpowiedzi na bodźce*”. Przede wszystkim zwiększony poziom glikokortykoidów we wczesnym okresie życia (jako konsekwencja nadmiernej aktywacji osi HPA) jest potężnym czynnikiem programującym rozwój organizmu, w tym mózgu. Glikokortykoidy, działając przez receptory jądrowe, bezpośrednio regulują ekspresję genów i mogą indukować też zmiany epigenetyczne modulujące, np., tworzenie i funkcjonowanie szlaków neuronalnych, czy plastyczność synaptyczną. Ponadto glikokortykoidy (kortyzol, kortykosteron, stres) mają nie tylko działanie przeciwzapalne, obniżające odporność, jak to napisała Doktorantka na stronie 20 czy w rozdziale 1.2.1. (str. 26). Mogą one również potęgować działanie układu odpornościowego i uwrażliwiać go na kolejne czynniki. Stres może indukować, tzw., „sterylnie zapalenie”. Zatem zdecydowanie zbrakło precyzji w opisie tych kwestii, a sam fragment o wpływie hormonów stresu został dość niefortunnie i niespójnie włączony do rozdziału dotyczącego de facto różnic płciowych w odpowiedzi immunologicznej.

Cele pracy doktorskiej zostały jasno sprecyzowane w rozdziale 2. Było nimi scharakteryzowanie modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego, a w szczególności zbadanie: 1) Czy jednorazowe podanie czynnika bakteryjnego, tj. lipopolisacharydu (LPS), w siódmym dniu życia doprowadzi do zmian w zachowaniu dorosłych zwierząt, 2) Jaki jest przebieg stanu zapalnego u siedmiodniowych myszy, 3) Czy MMP-9 jest modulatorem zmian behawioralnych obserwowanych u dorosłych zwierząt poddanych wczesnej stymulacji układu odpornościowego. Cele pracy są w pełni uzasadnione i oryginalne, szczególnie jeśli chodzi o

rolę MMP-9 w patofizjologii NDD. Co ważne, podjęcie i rozszerzanie badań w tej tematyce może przyczynić się w przyszłości do wskazania nowych biomarkerów NDD, czy też do rozwoju nowych terapii łagodzących objawy tych chorób.

Rozdział trzeci pracy –Materiały i Metody– ze szczegółami wprowadza w warsztat badawczy Doktorantki, wykazując również jej ogólną wiedzę teoretyczną. Zamieszczone w tej części pracy ryciny i zdjęcia bardzo ułatwiają zrozumienie zastosowanych technik eksperymentalnych. Do realizacji zaplanowanych celów mgr Karolina Protokowicz wybrała zwierzęcy model wczesnej stymulacji układu odpornościowego lipopolisacharydem (LPS) i genetycznego obniżenia poziomu MMP-9 (MMP-9 KO), a także klasyczne testy behawioralne badające lęk (podniesiony labirynt krzyżowy, EPM) i zachowania społeczne (test trójkomorowy, aparat Eco-HAB™) oraz techniki molekularne, takie jak, test immunoenzymatyczny Luminex®, zymografię żelową i RT-qPCR. Zastosowana metodyka jest nowoczesna i adekwatna do badania wyznaczonych celów. Na szczególne uznanie zasługują obserwacje zwierząt w aparacie Eco-HAB™ umożliwiające śledzenie aktywności dobowej i zachowań społecznych zwierząt w grupie do 16 osobników. Choć same metody zostały opisane szczegółowo i wyczerpująco, to w mojej ocenie w rozdziale 3.1. –Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach– brakuje kilku ważnych informacji. Na przykład, warto byłoby podać dokładniej akty prawne regulujące wykorzystanie zwierząt oraz przepisy określające wymagania w zakresie opieki nad zwierzętami, tym bardziej że w doświadczeniach brały udział zwierzęta modyfikowane genetycznie. Ponadto, skoro zwierzęta genotypowano w czternastym dniu po urodzeniu, a podanie LPS nastąpiło w siódmym, to wszystkie zwierzęta w miocie, w tym heterozygoty, otrzymywały LPS, zatem, jaki był dalszy los heterozygot. Kolejne pytania to, ile miotów wykorzystano w badaniach do stworzenia ostatecznych grup eksperymentalnych i jak te grupy tworzone, czyli, w jaki sposób rozwiązywano kwestię efektu miotu. Czy wszystkie zwierzęta przechodziły wszystkie testy behawioralne, czy też osobne kohorty zwierząt były dedykowane konkretnym testom.

Czwarty rozdział rozprawy przedstawia wyniki badań. Rozdział ten został napisany bardzo klarownie, zawiera wszystkie niezbędne dane statystyczne umożliwiające prześledzenie toku analizy oraz 30 starannie wykonanych rycin i dwie tabele. Doktorantka wykazała, że podanie LPS w siódmym dniu życia myszy wpływa na zachowanie zwierząt w późniejszym okresie życia, a w szczególności, obniża aktywność tych zwierząt i w sposób zależny od genotypu wpływa na ich lękliwość. Ponadto LPS w sposób zależny od płci modulował zachowania społeczne. Co ciekawe, efekt ten (w reakcji na nieznaną bodziec społeczny) nie występował u zwierząt linii MMP-9 KO, co może świadczyć o zaangażowaniu białka MMP-9 w powstawanie zaburzeń społecznym w badanym modelu. Natomiast badania biochemiczne potwierdziły, że stosowany model wczesnej stymulacji układu odpornościowego wywołuje stan zapalny na obwodzie i w mózgu oraz zwiększa ekspresję mRNA MMP-9 i jej aktywność żelatynolityczną w mózgu. Bez wątpliwa uzyskane wyniki stanowią podwaliny nowego modelu NDD do badań nad patomechanizmami tych chorób. Wskazują także białko MMP-9 jako potencjalnego kandydata na obwodowego i mózgowego biomarkera NDD.

Doktorantka zdecydowała się analizować uzyskane w doświadczeniu dane za pomocą analiz wieloczynnikowych, w tym wieloczynnikowej ANOVA. Najłatwiej interpretować wyniki takich analiz, jeśli uzyskuje się znamienne statystycznie interakcje między czynnikami. W przypadku uzyskiwania istotnych statystycznie tylko głównych czynników analizy, należy zachować ostrożność, gdyż szczegółowe analizy post hoc nie są wtedy zwykle uprawnione. W mojej ocenie Doktorantka w kilku przypadkach nie zachowała takiej ostrożności, co wpłynęło na interpretację części wyników pokazujących zmiany zależne od płci i genotypu. Na przykład dane dotyczące aktywności dobowej myszy B6 (str. 65) – analiza wykazała znamienne wpływy podanej substancji i płci, ale nie interakcji między nimi, a Doktorantka stosuje w następnym kroku analizę post hoc badając wpływ LPS osobno u samców i samic, czy też porównuje samce z samicami po podaniach NaCl. Podobna sytuacja, ale dotycząca trójczynnikowej ANOVA, występuje w przypadku wyników aktywności zwierząt w modelu MMP-9 KO (str. 91, EPM). ANOVA wykazała wpływ wszystkich głównych czynników (substancja, płeć, genotyp), ale żadnej interakcji, więc szczegółowe porównania wpływu LPS u danej płci i określonego genotypu nie są w mojej ocenie uprawnione. Kolejny przykład to analiza aktywności dobowej myszy linii MMP-9 KO (str. 94), gdzie nie uzyskano znamienego wpływu płci i interakcji płci z innymi czynnikami, natomiast Doktorantka napisała, że dalsza „*Analiza post- hoc między grupami wykazała istotne różnice wyłącznie w grupie samców*”. Podobne wątpliwości budzi we mnie analiza testami Manna-Whitneya w obrębie czynników, które nie okazały się znamienne w globalnej analizie Kruskala-Wallisa. Dotyczy to głównie wyników biochemicznych. Wiele analiz nie wykazało np., znamienności czynnika płci, a i tak prowadzono dalszą analizę osobno dla samców i samic. Może lepszym rozwiązaniem dla wykazania różnic płciowych byłoby zredukowanie liczby czynników (np. po wstępnych analizach globalnych) i przeprowadzanie analiz, np. w konkretnych punktach czasowych (poziom białek w surowicy) lub strukturach mózgu (poziom mRNA). Pomimo tych rozbieżności w interpretacji niektórych danych pragnę podkreślić, że ogólny przekaz uzyskanych wyników i ostateczne wnioski z doświadczenia pozostają takie same. Do tej części rozprawy mam jeszcze jedno pytanie, czy indukowana LPS zmniejszona ogólna aktywność zwierząt w modelu MMP-9 KO mogła wpłynąć na pomiar i interpretację ich zachowania w teście EPM (badanie lęklivosti i podejmowania zachowania ryzykownego).

W piątym rozdziale swojej rozprawy doktorskiej Pani mgr Karolina Protokowicz wnikliwie dyskutuje uzyskane w doświadczeniu wyniki na tle dostępnych danych literaturowych, wykazując ogólną wiedzę teoretyczną w temacie oraz zdolność zarówno do analizy, jak i syntezy badań. Jednak moim zdaniem fragment Dyskusji opisujący potencjalną genezę różnic płciowych w odpowiedzi układu odpornościowego wymagałby uzupełnienia. Doktorantka stymulowała układ immunologiczny we wczesnym okresie postnatalnym, kiedy to hormony płciowe niekoniecznie mogą mieć kluczowe znaczenie w ekspresji różnic płciowych. Warto było wspomnieć o płci genetycznej, obecności genów regulujących układ immunologiczny na chromosomie X i o tym, że część genów „ucieka” inaktywacji chromosomu X, co może leżeć u podstaw odmiennej odpowiedzi odpornościowej u samic i samców od samego początku. Tym bardziej, że ta kwestia nie została dokładnie opisana we Wstępie. W mojej ocenie brakuje też w Dyskusji (bądź we Wstępie) szerszego wyjaśnienia wyboru do badań nad wczesną stymulacją układu odpornościowego akurat siódmego dnia po

urodzeniu zwierząt. Doktorantka wspomina, że chodziło o badania w okresie intensywnej synaptogenezy i w okresie postnatalnym jako uzupełnienie badań w okresie prenatalnym. Niemniej jednak przyjmuje się, że pod względem rozwoju, mózg gryzonia w 1-10 dniu postnatalnym odpowiada mózgowi człowieka w trzecim tryestrze ciąży. W tym kontekście wybór siódmego dnia postnatalnego do badań jest jak najbardziej sensowny, bo większość NDD rozwija się prawdopodobnie w okresie prenatalnym i okołourodzeniowym. Na koniec zwracam uwagę na niefortunny błąd, który wkradł się w trzecim podrozdziale Dyskusji (str. 118), ACTH nie jest uwalniany z jądra przykomorowego podwzgórza, a CRH nie jest produkowany przez przysadkę, tylko na odwrót.

Rozprawę doktorską kończy rozdział –Podsumowanie i Wnioski–, w którym Doktorantka poprawnie formułuje następujące konkluzje: 1) Jednorazowa stymulacja układu odpornościowego w okresie intensywnej synaptogenezy może stanowić nowy myślny model zaburzeń neurorozwojowych, 2) Ze względu na różnice między samcami i samicami, niezbędne jest prowadzenie badań na obu płciach, 3) MMP-9 jest niezbędna do zajścia zmian w zachowaniu społecznym obserwowanych po wczesnej stymulacji układu odpornościowego, 4) białko MMP-9 może być potencjalnym celem terapeutycznym i/lub wskaźnikiem molekularnym wykorzystywanym w terapii NDD.

Podsumowując, przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Protokowicz oceniam pozytywnie. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, o czym świadczą wszystkie rozdziały rozprawy. Jest ona niewątpliwie cennym źródłem wyników uzupełniających wiedzę o patomechanizmach zaburzeń neurorozwojowych. Zamieszczone przeze mnie uwagi krytyczne nie wpływają na moją ogólnie pozytywną ocenę pracy. Zdecydowanie rozprawa ta prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w wybranej przez nią dziedzinie nauki oraz wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, w tym ich zaplanowania, analizy i przedstawienia uzyskanych wyników oraz ich dyskusji.

Stwierdzam, wobec tego, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Protokowicz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Protokowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Agnieszka Chocyk



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, 25.03.2025

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Karoliny Protokowicz**

**pt: „Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym” wykonanej w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem Prof. dr hab. Leszka Kaczmarka**

Zaburzenia neurorozwojowe (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDD) stanowią heterogenną grupę schorzeń, obejmującą m.in. zaburzenia ze spektrum autyzmu (*autism spectrum disorder*, ASD) oraz zespół nadpobudliwości psychoruchowej (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD). Charakteryzują się one trudnościami w interakcjach społecznych, zaburzeniami komunikacji werbalnej i niewerbalnej oraz występowaniem sztywnych, stereotypowych wzorców zachowań i zainteresowań, które istotnie wpływają na funkcjonowanie jednostki we wszystkich aspektach życia. Aktualne dane epidemiologiczne wskazują na stały wzrost liczby diagnoz NDD, co czyni te zaburzenia istotnym wyzwaniem zarówno dla naukowców, jak i klinicystów. Pomimo intensywnych badań prowadzonych w wielu ośrodkach na świecie, etiologia oraz molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych schorzeń pozostają w dużej mierze nieznane. W związku z tym każda próba pogłębienia wiedzy w tym obszarze jest niezwykle cenna i może przyczynić się do opracowania nowych strategii diagnostycznych oraz terapeutycznych.

Tematyka przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej wpisuje się zatem w aktualne kierunki badań nad NDD, podejmując ważne i aktualne zagadnienia związane z rolą układu odpornościowego w patogenezie tych zaburzeń. Praca ta nie tylko wzbogaca naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych leżących u podstaw NDD, lecz także może stanowić inspirację do dalszych badań nad nowymi, potencjalnie skutecznymi metodami leczenia.

Opracowanie cechuje się sprawdzoną i tradycyjną strukturą. Liczy 157 stron i zostało zgodnie z przyjętymi standardami podzielone na główne rozdziały: *Wstęp*, *Cele Pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie i Wnioski* oraz *Bibliografia*. Każdy z rozdziałów zawiera konsekwentnie ponumerowane

podrozdziały, co znacząco ułatwia orientację w treści. W pracy umieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim. Doktorantka dołączyła także spis publikacji własnych, co świadczy o jej dużej aktywności naukowej.

**Wstęp** pracy stanowi bardzo dobre wprowadzenie w zagadnienie objęte tematem badań. Doktorantka umiejętnie prowadzi narrację, przechodząc od ujęcia ogólnego do szczegółowego – rozpoczyna rozdział od przedstawienia istoty zaburzeń neurorozwojowych, a następnie przechodzi do omówienia roli czynników genetycznych oraz środowiskowych w etiologii NDD. W kolejnych fragmentach wstępu Doktorantka rzetelnie i w oparciu o kluczową literaturę naukową omawia coraz częściej podkreślane różnice w odpowiedzi odpornościowej między płciami, które mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju i przebiegu zaburzeń neurorozwojowych. Jest to szczególnie wartościowy element rozprawy, świadczący o jej aktualności oraz wnikliwej analizie zagadnienia. Rozważania te prowadzą do rozdziału poświęconego roli stanu zapalnego w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), ze szczególnym uwzględnieniem funkcji bariery krew-mózg (BBB) w mechanizmach patologicznych związanych z aktywacją układu odpornościowego. Analiza ta została wzbogacona o starannie opracowany schemat BBB, który znacząco podnosi wartość dydaktyczną pracy, ułatwiając zrozumienie przedstawionych treści. Kolejna część wstępu poświęcona jest modelom zwierzęcym NDD. Doktorantka w sposób przemyślany uzasadnia wybór zastosowanego w pracy modelu aktywacji układu odpornościowego we wczesnym okresie postnatalnym, co stanowi kluczowy aspekt metodologiczny dysertacji. W tej części pracy znalazła się także syntetyczna, lecz wyczerpująca charakterystyka metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9), enzymu o istotnym znaczeniu w mechanizmach plastyczności neuronalnej oraz procesach zapalnych. Całość została oparta na starannie dobranej literaturze. Choć wstęp pracy jest merytorycznie bogaty i dobrze skonstruowany, nie udało się całkowicie uniknąć drobnych błędów edytorskich. Nie wpływają one jednak na ogólną wartość rozprawy.

Na stronie 40 Doktorantka określa główny **cel pracy**, którym była charakterystyka modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego. Model ten został oparty na podaniu siedmiodniowym mysim oseskom lipopolisacharydu (LPS) w dawce 0,05 mg/kg masy ciała. W ramach badań postawiono trzy zasadnicze pytania:

1. Czy jednorazowe podanie LPS w siódmym dniu życia doprowadzi do zmian w zachowaniu dorosłych zwierząt?
2. Jaki jest przebieg stanu zapalnego u siedmiodniowych myszy?
3. Czy MMP-9 jest modulatorem zmian behawioralnych obserwowanych u dorosłych zwierząt poddanych wczesnej stymulacji układu odpornościowego?

Analiza sformułowanego celu badawczego w kontekście tytułu dysertacji „Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym” sugeruje pewną niepełną kompatybilność między nimi. Choć główny kierunek badań jest jasny, wskazane byłoby doprecyzowanie celu tak, aby w pełni korespondował z tytułem rozprawy.

W pracy zastosowano szeroki wachlarz starannie dobranych **metod badawczych**, obejmujących zarówno techniki biologii molekularnej, jak i testy behawioralne. Każda z zastosowanych metod została szczegółowo

scharakteryzowana, z uwzględnieniem jej istoty oraz znaczenia dla prowadzonych badań. Dodatkowym atutem jest przejrzysta prezentacja metodologii w postaci czytelnych schematów ilustrujących przebieg eksperymentów, co nie tylko ułatwia zrozumienie zastosowanych procedur, ale także świadczy o wysokim poziomie kompetencji Doktorantki w zakresie samodzielnego planowania i realizacji badań naukowych. W opisie metodologicznym nie podano jednak, czy podjęto działania mające na celu eliminację efektu miotu (*litter effect*), który może istotnie wpłynąć na wiarygodność wyników. Efekt ten wynika z faktu, że zwierzęta pochodzące z jednego miotu mają bardziej zbliżony profil genetyczny oraz podlegają podobnym wpływom prenatalnym i postnatalnym. W konsekwencji zmienność między miotami może zostać błędnie przypisana do efektu badanej zmiennej, co zwiększa ryzyko błędnej interpretacji wyników i może prowadzić do fałszywych wniosków, zwłaszcza jeśli nie uwzględniono go w analizie statystycznej.

W sekcji 3.2. (s. 40) Doktorantka stwierdza, że „cały miot otrzymywał tę samą substancję”. Nie jest jednak jasne, czy oznacza to, że wszystkim oseskom z jednego miotu podawano LPS, a oseskom z innego miotu NaCl, czy też z każdego miotu losowo wybierano określoną liczbę zwierząt do różnych grup eksperymentalnych. Ponadto nie wiadomo, czy w analizie statystycznej za  $n$  przyjęto średnią ze zwierząt z jednego miotu, czy też liczba  $n$  odpowiadała liczbie zwierząt, które pochodziły z danego miotu lub z kilku różnych miotów. Informacje te nie zostały zawarte ani w sekcji dotyczącej metodologii, ani w legendach pod wykresami w sekcji wyniki, co utrudnia ocenę sposobu przeprowadzenia eksperymentu. Dlatego poproszę o wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony pracy.

Aby potwierdzić, że model stymulacji układu odpornościowego we wczesnym okresie postnatalnym wpływa na powstawanie długotrwałych zmian w zachowaniu, przeprowadzono kompleksową analizę aktywności, emocjonalności oraz socjalności dorosłych zwierząt po jednorazowym podaniu LPS 7-dniowym oseskom. Szczególnie istotnym aspektem badań jest uwzględnienie wpływu płci, co stanowi ważny wkład w dalsze prace nad mechanizmami leżącymi u podstaw chorób neurorozwojowych. Może to przyczynić się do lepszego zrozumienia, dlaczego zaburzenia takie jak np. autyzm częściej diagnozuje się u chłopców – czy wynika to z rzeczywistych różnic biologicznych, czy też z niedoszacowania przypadków u dziewcząt ze względu na tzw. kobiety fenotyp autyzmu. Dalsze badania w tym obszarze mogą pomóc w opracowaniu bardziej precyzyjnych narzędzi diagnostycznych oraz strategii terapeutycznych uwzględniających specyfikę płci.

W kontekście przedstawionych wyników warto jednak doprecyzować, czy samce i samice pochodziły z tego samego, czy też z różnych miotów, np. w przypadku analizy czasu spędzanego na czyszczeniu futra (*grooming*) (Ryc. 4.6.), gdzie zaobserwowano istotny wpływ płci, czy w ocenie lęklivosti (Ryc. 4.7.). Ponadto warto wyjaśnić, czy przy określaniu liczby zwierząt w grupach eksperymentalnych, oprócz uwzględnienia zasady 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), przeprowadzono analizę mocy testu w celu optymalizacji wielkości próby. W badaniach behawioralnych odpowiednia liczba zwierząt jest kluczowa dla uzyskania wiarygodnych wyników, dlatego zastosowanie metod statystycznych, takich jak analiza mocy testu (np. za pomocą oprogramowania *G\*Power*) zwiększa precyzję i rzetelność uzyskanych danych. Zależny od płci wzrost stężeń kluczowych cytokin prozapalnych oraz MMP-9 w surowicy osesków, a także zwiększona aktywność oraz ekspresja



MMP-9 w wybranych strukturach mózgu, świadczą o inicjacji procesów prozapalnych oraz rozwoju neurozapalenia. Obserwowane zmiany mogą wskazywać na długofalowe konsekwencje dla funkcjonowania układu nerwowego, potencjalnie wpływając na plastyczność synaptyczną, barierę krew-mózg oraz podatność na rozwój neurozapalenia w późniejszym życiu. W dalszej części pracy Doktorantka konsekwentnie koncentruje się na wyjaśnieniu roli MMP-9 w kształtowaniu zachowań dorosłych myszy narażonych na LPS we wczesnym okresie postnatalnym.

Doktorantka dostrzega rozbieżności w zachowaniach osesków myszy C57BL/6J (B6) i MMP-9 KO (WT) w odpowiedzi na LPS. Na rycinie 4.2 (s. 63) pokazano, że LPS nie wpływa na aktywność samców i samic B6, podczas gdy na rycinie 4.20 (s. 91) wykazano, że u samców myszy WT powoduje jej obniżenie, co kontrastuje z wynikami dla B6. Podobne różnice zaobserwowano w analizie self-groomingu – rycina 4.6 (s. 68) wskazuje, że LPS nie wpływa na czyszczenie futerka u B6, natomiast na rycinie 4.24 (s. 97) widać, że samce i samice WT po wczesniej aktywacji układu odpornościowego LPS-em poświęcają na tę czynność więcej czasu.

Autorka podejmuje próbę wyjaśnienia tych rozbieżności w Dyskusji, odwołując się m.in. do badań sugerujących, że wpływ LPS na emocjonalność zwierząt może być niejednorodny. Jednak w kontekście przedstawionych wyników pojawia się pytanie o jednorodność stosowanego preparatu LPS. Jego toksyczność zależy od składu lipidowej części (lipidu A) oraz długości łańcucha polisacharydowego, co wpływa na rozpoznawanie przez receptory TLR4 i siłę odpowiedzi immunologicznej. Różnice między partiami preparatu mogą zatem wpływać na powtarzalność wyników i ich interpretację. Warto więc doprecyzować, czy w badaniach kontrolowano skład i toksyczność LPS oraz czy mogło to mieć wpływ na zaobserwowane różnice między B6 a WT.

**Dyskusja** pracy została przeprowadzona w sposób spójny i klarowny, co świadczy o wysokiej kulturze naukowej Autorki. Doktorantka rozpoczyna ten rozdział od syntetycznego i przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników badań, po czym konfrontuje je z najnowszą, starannie dobraną literaturą. Wykazuje się przy tym nie tylko szeroką znajomością aktualnego stanu badań, ale także umiejętnością krytycznej analizy dostępnych źródeł. Na podstawie światowego dorobku naukowego prowadzi wnikliwą dyskusję nad uzyskanymi rezultatami, wskazując zarówno ich znaczenie, jak i ograniczenia. Świadomie podkreśla, że formułowanie jednoznacznych wniosków na tym etapie badań byłoby przedwczesne, co dowodzi jej naukowej dojrzałości i rzetelności badawczej. Wykazuje przy tym umiejętność refleksyjnego i obiektywnego podejścia do własnych wyników, a także otwartość na dalsze eksploracje tematu. Warto docenić również jej umiejętność formułowania perspektyw badawczych oraz identyfikowania obszarów wymagających kontynuowania badań, co dodatkowo podkreśla jej kompetencje naukowe. Szczególnie interesujące i wartościowe są dwa ostatnie rozdziały dyskusji, w których Doktorantka wnikliwie analizuje rolę MMP-9 w kształtowaniu zachowań społecznych po wczesniej stymulacji układu odpornościowego. Przedstawia również potencjalne mechanizmy leżące u podstaw zmian behawioralnych obserwowanych u zwierząt poddanych takiej stymulacji. W oparciu zarówno o wyniki własnych badań, jak i dane z najnowszej literatury, dochodzi do wniosku, że MMP-9 odgrywa istotną rolę w regulacji interakcji społecznych. Jednocześnie z dużą świadomością naukową zaznacza, że „pełne zrozumienie molekularnego mechanizmu wymaga dalszych badań”, podkreślając tym samym potrzebę kontynuacji prac w

tym obszarze. Co istotne, Doktorantka formułuje pytania badawcze, które mogą stanowić inspirację do dalszych poszukiwań skutecznych związków protekcyjnych w terapii zaburzeń neurorozwojowych indukowanych wczesną aktywacją układu odpornościowego. Wysuwa również hipotezę dotyczącą zwiększonej przepuszczalności BBB pod wpływem aktywacji cytokin i innych mediatorów stanu zapalnego. Proponuje, że wynikający z tego naciek komórek odpornościowych z obwodu do OUN może być kluczowym czynnikiem inicjującym nieodwracalne zmiany w organizacji sieci neuronalnych, prowadzące do zaburzeń neurorozwojowych. Hipoteza ta jest spójna z aktualnym stanem wiedzy i znajduje potwierdzenie w najnowszych doniesieniach naukowych, które wskazują na związek między przewlekłym neurozapaleniem, uszkodzeniem BBB a patogenezą zaburzeń ze spektrum autyzmu. W kontekście tych ustaleń, praca Doktorantki wnosi istotny wkład w zrozumienie roli czynników zapalnych w etiologii zaburzeń neurorozwojowych oraz otwiera nowe perspektywy badawcze nad potencjalnymi strategiami terapeutycznymi.

Rozdział **Podsumowanie i Wnioski** stanowi klarowne i syntetyczne zestawienie najważniejszych wyników przeprowadzonych badań. Autorka w sposób przejrzysty i logiczny podsumowuje kluczowe ustalenia. Wnioski zostały sformułowane w sposób rzetelny i dobrze uzasadniony, co świadczy o dogłębnym zrozumieniu tematu oraz umiejętności krytycznej analizy wyników.

Podsumowując, pomimo przedstawionych uwag i sugestii, należy podkreślić, że tematyka rozprawy jest niezwykle istotna nie tylko z perspektywy naukowej, lecz także praktycznej. Może stanowić inspirację do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu zaburzeń neurorozwojowych, w tym ASD, wynikających z nadmiernej aktywacji układu odpornościowego.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska świadczy o solidnym przygotowaniu merytorycznym Autorki w dziedzinie nauk biologicznych. Kandydatka wykazała się zdolnością do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, umiejętnością formułowania i weryfikacji hipotez, a także projektowania oraz realizacji eksperymentów i wyciągania wniosków. Zastosowanie mysiego modelu opartego na postnatalnej aktywacji układu odpornościowego oraz dążenie do identyfikacji molekularnych mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń neurorozwojowych stanowi oryginalne i nowatorskie podejście badawcze. Co więcej, wyniki i wnioski płynące z pracy mają istotne znaczenie nie tylko dla lepszego zrozumienia mechanizmów patogenezы zaburzeń neurorozwojowych, ale również dla przyszłych badań nad potencjalnymi strategiami terapeutycznymi. W obliczu rosnącej liczby diagnoz tych schorzeń zarówno w Polsce, jak i na świecie, podjęta problematyka ma nie tylko wymiar naukowy, lecz także ważny kontekst kliniczny i społeczny.

Stwierdzam, wobec tego, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie mgr Karoliny Protokowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Katowice / 21.03.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Karoliny Protokowicz:**

**„Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym”.**

Katedra i Zakład Fizjologii  
Wydział Nauk Medycznych  
w Katowicach

40-752, Katowice  
ul. Medyków 18

prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 208 8476



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska powstała w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, pod kierunkiem promotora, pana prof. Leszka Kaczmarka.

Dysertacja została zredagowana w typowym układzie monografii i obejmuje 157 stron składających się na osiem rozdziałów podzielonych na dalsze podrozdziały.

Treść pracy rozpoczynają streszczenia w języku w języku polskim i angielskim, przybliżające czytającemu kwintesencję rozprawy. Na stronie 10, w streszczeniu polskim znajduje się określenie „zawieszony labirynt krzyżowy”. Właściwa nazwa to „uniesiony labirynt krzyżowy” co odpowiada nazwie angielskiej „elevated plus maze”.

Po streszczeniach autorka zamieściła „Alfabetyczny wykaz najczęściej stosowanych skrótów”, który wyjaśnia skróty zastosowane w tekście rozprawy, lecz wbrew tytułowi nie jest on jednak alfabetyczny.

Rozdział numer 1 to „Wstęp” podzielony na 4 podrozdziały, które na podstawie danych literaturowych, wchodzących w skład bogatej bibliografii przybliży wiedzę na temat zagadnień, będących meritum przygotowanej dysertacji. W podrozdziale 1.1. doktorantka przybliży czytającemu definicję zaburzeń neurorozwojowych oraz jej zakres obejmujący 6 schorzeń zgodnie z klasyfikacją zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego - DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

Zamieszczony diagram 1.1. w jasny sposób informuje na temat powiązanych ze sobą uwarunkowań fizjologiczno-morfologicznych leżących u podstaw schorzeń neurorozwojowych. W mojej opinii określenie „objawy w OUN” należałoby zastąpić mniej klinicznym określeniem „zmiany w OUN”. Zdając sobie sprawę z ograniczeń objętościowych rozprawy doktorskiej, w zaburzeniach neurorozwojowych, a tym samym wśród czynników genetycznych (podrozdział 1.1.1.) należałoby też koniecznie wymienić stwardnienie guzowate (tuberous sclerosis complex). Mam też wątpliwość czy stan zapalny wymieniony w podrozdziale 1.1.2. „Czynniki środowiskowe”, nie jest raczej zaburzeniem metabolicznym, a może cały rozdział czynniki środowiskowe należałoby nazwać „Czynniki epigenetyczne”?

W powyższym rozdziale można by też wspomnieć o niektórych często zażywanych lekach jak np.  $\beta$ -adrenolityki, a w części mówiącej o diecie można by wymienić rośliny krzyżowe (obecnie kapustowate, *Brassicaceae*), które mają wpływ na gospodarkę hormonami tarczycy.

Podrozdział 1.2 koncentruje się na odpowiedzi immunologicznej i jej roli w etiologii zaburzeń neurorozwojowych. W tym aspekcie autorka pracy wskazuje na rolę, jaką pełni bariera krew-mózg, której funkcja może być modyfikowana aktywnością metaloproteaz macierzowych. Jedno z tych białek, *matrix metalloproteinase-9* - MMP-9, jego rola w kształtowaniu odpowiedzi układu odpornościowego oraz modyfikowaniu zachowania, jest przewodnim tematem ocenianej pracy doktorskiej. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące MMP-9, oparte na danych literaturowych oraz badaniach własnych zespołu promotora tej pracy znajdują się w podrozdziale 1.4.

Przedostatnim podrozdziałem części wstępnej jest podrozdział 1.3, w którym doktorantka skupiła się na przedstawieniu wybranych, zwierzęcych modeli zaburzeń neurorozwojowych oraz wybranych aspektach metodycznych badań tych modeli. Doktorantka wskazuje też na bardzo istotną rolę genetycznych modeli zwierzęcych, w szczególności zwierząt transgenicznych. Chciałbym tutaj podkreślić, iż poprawnym terminem, opisującym nokaut genetyczny jest wyłączenie lub zablokowanie ekspresji genu, a nie jego uszkodzenie, jak napisano na stronie 30.

Na stronie 31 doktorantka wskazuje na zjawisko eliminacji komórek jako elementu dojrzewania układu nerwowego oraz kształtowania jego docelowych połączeń synaptycznych. Zjawisko tzw. naturalnej śmierci komórkowej, czyli apoptoza różni się w swoim przebiegu od degeneracji neuronów i wskazany byłby krótki opis charakterystycznych cech apoptozy.

W dalszej części podrozdziału 1.3. znajdujemy opis podstaw metodycznych, wybranych do części eksperymentalnej testów behawioralnych, uniesionego labiryntu krzyżowego oraz testów badających zachowania socjalne – testu trójkomorowego i testu w systemie Eco-HAB.

Rozdział 2 to „Cele pracy”, gdzie znajdziemy wyjaśnienie podstawowych założeń eksperymentu oraz trzy jasno sprecyzowane cele/pytania, na które ma odpowiedzieć część doświadczalna rozprawy i wyniki będące jej rezultatem.

„Materiał i metody” to trzeci rozdział pracy doktorskiej. Podrozdział 3.1 zawiera informacje na temat zwierząt wykorzystanych do zaplanowanych badań. Cennym uzupełnieniem były by numery szczepów zgodne z katalogiem Jackson Laboratory oraz linki do stron katalogu. Pozwoliłoby to na uzyskanie bardziej precyzyjnych informacji, dotyczących szczególnie linii z wyłączoną ekspresją MMP-9 (np. jak stworzono linię, jak inaktywowano ekspresję, jakie jest tło genetyczne linii).

Podrozdział 3.1.3 to „Identyfikacja genotypu (genotypowanie)”. W tym miejscu ma zastrzeżenia odnośnie sposobu pobierania biopsji do izolacji DNA. Po pierwsze obcinanie paliczków dopiero w czternastym dniu wydaje się być nieuzasadnione, można to było robić wcześniej, co jest mniej

dotkliwe, po drugie, jeżeli już pobieramy paliczki to można było z nich izolować DNA, bez konieczności dodatkowego pobierania „fragmentu ogona”. Po trzecie w publikacji “Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation” w czasopiśmie *Laboratory animals*, 44/2, 2009, znajduje się następujące zalecenie, popierające powyższą opinię: *„Toe clipping has been widely used in the past, but is currently not recommended due to welfare and ethical grounds.1,8,9 Recommendations and guidelines indicate toe clipping as a method only acceptable for altricial neonates ( $\leq 7$  postnatal day [pnd]), when no other methods are feasible and several Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) only allow toe clipping when strong scientific justification is presented. Toe clipping can be applied to newborn mice as early as one day after birth, but it is easier to perform between pnd 5 and 7, when the toes are larger but ossification is not yet complete. An advantage of toe clipping is that the tissue removed can be used for DNA extraction and genotyping, particularly useful when studying transgenes and/or mutations requiring analysis in the early postnatal period.”*

Podrozdział 3.3 poświęcony jest opisowi metod behawioralnych wykorzystanych podczas części eksperymentalnej rozprawy.

W związku z faktem, iż zachowania socjalne stoją w centrum zainteresowania tej pracy, chciałbym zapytać, czy doktorantka rozważała przeprowadzenie testu izolacji i rejestracji USV celem sprawdzenia interakcji pomiędzy matką i potomstwem, co można badać również po 7 dniu po urodzeniu?

Doktorantka przeprowadziła dwa testy behawioralne, test w uniesionym labiryncie krzyżowy oraz test trójkomorowy, a także dwie obserwacje behawioralne bez wymuszania zachowania, obserwację w klatce oraz długoterminową obserwację w systemie EcoHAB. Jeżeli chodzi o test trójkomorowy, to chciałbym zapytać, dlaczego jako bodziec, zamiast żywej myszy zastosowano ściótkę i czy podczas habituacji w metalowym koszyczku znajdowała się czysta ściółka? Moim zdaniem w części opisującej metodykę, szczególnie testy behawioralne powinna znaleźć się informacja o liczbie zwierząt wykorzystanych w tych badaniach.

Podrozdział 3.4. zawiera informacje dotyczące badań molekularnych przeprowadzonych w części eksperymentalnej, w tym oznaczeń wskazujących na istniejący stan zapalny. Ponieważ w pierwszym zdaniu tego rozdziału znajduje się informacja, iż badania molekularne wykonano na tkankach pobranych do 24 godzin po stymulacji LPS, chciałbym zapytać, czy poziom stanu zapalnego był również badany przed testami behawioralnymi? Ostatni podrozdział części „Materiały i metody” opisuje metody statystyczne zastosowane do analizy danych utrzymanych w części eksperymentalnej dysertacji.

Wyniki uzyskane podczas wykonywania rozprawy doktorskiej pani mgr Karoliny Protokowicz zostały zebrane w rozdziale czwartym. Wyniki opisano po podzieleniu ich na trzy części. Część pierwsza to podrozdział 4.1 skupiający się na analizie zachowania niezmienionych genetycznie myszy szczepu C57Bl/6J – grupa eksperymentalna B6, których system odpornościowy był stymulowany w 7 dniu po urodzeniu przy pomocy LPS. Aktywność opisana w podrozdziale 4.1.1 była analizowana w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) oraz analizy zachowania w systemie Eco-HAB. Myszy z grupy B6, podzielone na samce i samice oraz zwierzęta stymulowane i niestymulowane LPS obserwowano przez 5 minut podczas eksploracji labiryntu. Uzyskane wyniki i ich analiza nie wykazały różnic pomiędzy grupami. Jak wynika z wykresu na rycinie 4.2 jedynym analizowanym parametrem w tym teście był czas spędzony w ruchu. Chciałby zapytać, dlaczego nie analizowano aktywności w teście otwartego pola (OF), który pozwoliłby na rejestrację i analizę większej liczby parametrów istotnych dla spontanicznej eksploracji, w tym przede wszystkim dystansu, co pokazałoby też motorykę badanych zwierząt. Drugim rodzajem aktywności, analizowanym w systemie Eco-HAB, była aktywność eksploracyjna, mierzona podczas 6 godzin przebywania w systemie, mierzona jako liczba wizyt w klatkach. Konfiguracja grup eksperymentalnych była taka sama jak w przypadku testu w EPM. Tu chciałbym zapytać, czy jest przełożenie wizyt w klatkach na przebyty dystans? Eksperyment ten pokazał wyższą aktywność eksploracyjną samców, przy czym podanie LPS miało wpływ (hamujący) jedynie na samice. Kolejnym, trzecim parametrem badanym w systemie Eco-HAB była aktywność dobową, mierzona pomiędzy 36 a 96 godziną. Na stronie 65 pojawia się określenie „tryb dobowy”, które chyba odnosi się do tego samego parametru. W mojej opinii zamiast określenia „aktywność dobową” można użyć określenia „aktywność okołodobowa” mimo, iż parametr ten nie był mierzony w „klasyczny” sposób w kołach biegowych. Konfiguracja grup eksperymentalnych była taka sama jak w przypadku testu w EPM. Wyniki uzyskane podczas tej obserwacji wykazały, iż podanie LPS, w przypadku tego parametru, również mierzonego ilością wizyt w klatkach, hamuje aktywność samców. Podrozdział 4.1.2 opisuje zachowania zwierząt zdefiniowane przez doktorantkę jako „emocjonalność”, obejmujące obserwacje niewymuszonego zachowania w klatce bytowej. Doktorantka skupiła się na poszukiwaniu zachowań typu kompulsywnego czy stereotypii ruchowych. Analiza uzyskanych wyników nie wykazała różnic pomiędzy grupami. Tu chciałbym zapytać, w jaki sposób rejestrowane/zliczane były badane zachowania, „ręcznie” przez obserwatora czy w sposób zautomatyzowany? W ramach analizy emocjonalności zwierząt doktorantka wykorzystwała zachowanie zwierząt prezentowane podczas w EPM i przyjrzała się lęklivości myszy przez pryzmat czasu spędzonego w ramionach otwartych i zamkniętych. Efektem tej analizy było określenie stosunku pomiędzy tymi dwoma wartościami. Na tej podstawie można było stwierdzić, iż podanie LPS w grupie samców obniżało poziom lęklivości w teście EPM, natomiast pozostawało bez wpływu na

ten parametr u samic. Kolejnym analizowanym parametrem włączonym przez doktorantkę do kategorii „emocjonalność” była „chęć podejmowania ryzyka” mierzona jako liczba wychyleń z otwartych ramion labiryntu EPM. W przypadku tego parametru eksperyment nie wykazał żadnych różnic pomiędzy grupami. Chciałbym zapytać, czy doktorantka rozważała zastosowanie testu konkurencji ryzyko/pokarm lub dyskryminacji jasno/ciemno, który w bardziej bezpośredni sposób mierzy chęć podejmowania ryzyka?

Trzecim z przebadanych aspektów behawioralnych była „socjalność” opisana w podrozdziale 4.1.3. W ramach tej grupy testów wykorzystano popularny test trójkomorowy oraz test w aparacie Eco-HAB. Test ten wykazał spadek zainteresowania nowym bodźcem socjalnym w efekcie podania LPS, w grupie samców, zachowanie samic w tym teście pozostało bez zmian. Należy jednak zwrócić uwagę, iż w teście tym zamiast nieznanej myszy zastosowano ściółkę pochodzącą z nieznanej klatki. Czy zdaniem doktorantki taki rodzaj bodźca mógł mieć wpływ na wyniki testu? Stosując ściółkę jako bodziec wykluczono potencjalną rolę bodźców wzrokowych i akustycznych (USV). Podobne zachowania doktorantka badała w grupach myszy tej samej płci obserwowanych w systemie Eco-HAB, z wykorzystaniem bodźca tego samego rodzaju jak w przypadku testu trójkomorowego. Wyniki wskazują, iż w warunkach systemu Eco-HAB, podaniu LPS bodziec budzący zainteresowanie stawał się bodźcem awersyjnym. W przypadku samic zaobserwowano odwrotną sytuację, gdzie awersyjny efekt nieznanej ściółki ulegał odwróceniu po podaniu LPS. Na rycinie 4.12 doktorantka przedstawiła wyniki badań nad ostatnim parametrem związanym z socjalnością, którym była skłonność do spędzania czasu z innymi osobnikami. Eksperyment ten został przeprowadzony z wykorzystaniem systemu Eco-HAB, który pozwala na śledzenie pojedynczych zwierząt w grupie. Analiza statystyczna wykazała, iż podanie LPS samcom podwyższyło ich socjalność w tym badaniu, natomiast u samic zaobserwowano efekt odwrotny.

W podrozdziale 4.2 doktorantka przeanalizowała wyniki dotyczące odpowiedzi na podanie LPS na poziomie molekularnym, u zwierząt w wieku P7. Analizę wykonano w oparciu o białka izolowane z surowicy lub mózgowia. Analiza ekspresji genów została przeprowadzona w oparciu o RNA wyizolowane z różnych struktur mózgowia: kory mózgu, prążkowiec, podwzgórze, wzgórze, hipokampa i mózdzku. W pobranych próbkach osocza oznaczano stężenie białek MMP-9, MMP-2, TIMP-1, CCL5, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 i IFN- $\gamma$ . Wyniki w postaci wykresów zostały zebrane na rycinie 4.14. Najważniejszym wnioskiem wynikającym z tej ryciny jest wzrost stężenia MMP-9 w wyniku podania LPS u samców i samic oraz wzrost czynników prozapalnych. Przeprowadzona analiza aktywności żelatynolitycznej enzymów MMP-9 i MMP-2 wykazała wzrost aktywności MMP-9 po podaniu LPS zarówno u samców jak i u samic. Doktorantka zbadała też poziom ekspresji genów powiązanych z odpowiedzią

immunologiczną po podaniu LPS i wykazała wzrost poziomu ekspresji większości z nich we wszystkich przebadanych strukturach OUN.

Trzecia część eksperymentalna dysertacji opisana w rozdziale 4.3 skupia się na roli białka MMP-9 w kształtowaniu zachowania dorosłych myszy po podaniu LPS. Eksperymenty te przeprowadzono z wykorzystaniem tych samych metod behawioralnych, które zastosowano w pierwszej części rozdziału wyniki. Schemat stymulacji przy pomocy LPS również był identyczny jak w przypadku badań z wykorzystaniem zwierząt C57Bl/6J. Do badań wykorzystano zwierzęta z wyłączoną ekspresją genu kodującego MMP-9 dobierając do tego odpowiednią grupę kontrolną z niezaburzoną ekspresją tego białka. Zachowanie było analizowane oddzielnie dla samic i samców. W przypadku badania aktywności w teście EPM uzyskano inne wyniki niż w przypadku zwierząt z grupy B6. Samce z grupy WT były mniej aktywne po podaniu LPS podobnie jak samice, choć w tym drugim przypadku różnica ta nie była znamieną statystycznie. W przypadku zwierząt z grupy KO podanie LPS powodowało znamieny spadek aktywności dla obu płci. Proszę o komentarz na temat różnic pomiędzy wynikami dla grupy B6 z pierwszego eksperymentu i grupy WT z trzeciego eksperymentu opisanego w podrozdziale 4.3. Te same grupy badawcze i kontrolne były również testowane pod względem spontanicznej aktywności eksploracyjnej w systemie Eco-HAB. Podobnie jak poprzednio analizowano dwa parametry, aktywność w ciągu pierwszych 6 godzin eksperymentu oraz aktywność dobową/okołodobową po habituacji do sytemu, od 36 do 96 godziny eksperymentu. Oba parametry były analizowane na podstawie liczby wizyt w klatkach.

Nie zagłębiając się w interesujące i ważne wyniki jakie doktorantka uzyskała w trzeciej części eksperymentalnej nasuwa się jeden istotny wniosek:

- Zwierzęta z szczepu wsobnego C57Bl/6J reagowały inaczej na procedury eksperymentalne wykonane podczas realizacji rozprawy. Widać tu wyraźnie, iż różnice w tle genetycznym mogą diametralnie zmieniać wyniki eksperymentu. Dlatego też eksperyment przeprowadzony na zwierzętach C57Bl/6J należy potraktować jako odrębny eksperyment, pozwalający wprawdzie na wyciąganie bardzo interesujących wniosków, jednak wyników tych nie można porównywać z wynikami uzyskanymi podczas analizy szczepu zwierząt, u których wyłączono ekspresję genu kodującego białko MMP-9.

Dyskusja jest piątym rozdziałem przygotowanej rozprawy doktorskiej. Doktorantka komentuje wyniki otrzymane w części eksperymentalnej, porównując je do wyników innych eksperymentów opisanych w bogatej bibliografii, zawierającej aż 292 pozycje literaturowe. Na stronie 108 znajduje się zdanie, które w mojej opinii wprowadza nieco zamieszania w opisie grup eksperymentalnych, a co za tym idzie w interpretacji wyników. Doktorantka pisze: „Podanie LPS oseskom linii MMP-9 KO prowadziło do spadku aktywności, ale odwrotnie niż w przypadku zwierząt o genotypie dzikim (B6), wzrostu



łękliwości.” Zwierzęta opisane jako B6, nie są zwierzętami o genotypie dzikim, ale zwierzętami o genotypie C57Bl/6J. Zwierzętami o genotypie dzikim można umownie (choć dość niezręcznie) określić zwierzęta z grupy WT (wild-type) należące do szczepu z wyłączoną ekspresją MMP-9. Zresztą, jak wspomniałem powyżej porównywanie tych dwóch grup nie może przynieść żadnych kluczowych wniosków, ze względu na różne tło genetyczne. W dalszej części tego rozdziału doktorantka omawia wyniki eksperymentów analizujących zachowanie, odnosząc się też do kwestii roli tła genetycznego i jego wpływie na wyniki. Widać więc, iż doktorantka jest świadoma jak ważny jest właściwy dobór grup kontrolnych w eksperymentach wykorzystujących zwierzęta modyfikowane genetycznie. Po dyskusji następuje rozdział numer 6 „Podsumowanie i wnioski”, podsumowujący otrzymane wyniki oraz płynące z nich wnioski, będące też odpowiedziami na hipotezy badawcze postawione w rozdziale „Cele pracy”. Doktorantka bardzo słusznie wskazuje tu na konieczność oddzielnej analizy samców i samic. Z dysertacji tej płyną więc też cenne wnioski dla badaczy planujących podobne eksperymenty. Po przeczytaniu tego rozdziału nasuwa mi się pytanie: czy zmiany na poziomie translacyjnym i transkrypcyjnym związane z odpowiedzią na podanie LPS zwierzętom szczepu C57Bl/6J są tożsame ze zmianami zachodzącymi u zwierząt pochodzących ze szczepu z zablokowaną ekspresją MMP-9?

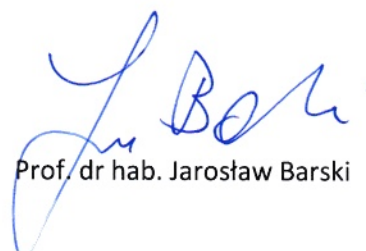
Bogata bibliografia została spisana w rozdziale 7, a rozprawę kończy rozdział 8 zawierający bibliografię własną doktorantki.

#### **Podsumowanie:**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską pani mgr Karoliny Protokowicz oceniam ją wysoko, a opierając się na uzasadnieniu zawartemu w sporządzonej przeze mnie recenzji stwierdzam, iż

1. Treść rozprawy doktorskiej potwierdza ogólną wiedzę jaką prezentuje doktorantka w dyscyplinie nauki biologiczne
2. Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej
3. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

Na tej podstawie stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie pani mgr Karoliny Protokowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Mając na uwadze nowatorski charakter ocenianej przeze mnie dysertacji wnioskuję do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Jarosław Barski