

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Jaszczyk

pt.: „*Effects of prolonged treatment with corticosterone on brain transcriptome in laboratory mice*”, w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Rozprawa doktorska mgr Anety Jaszczyk powstała w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Tadeusza Jezierskiego oraz promotora pomocniczego dr Grzegorza Juszcza. Rozprawę stanowi cykl trzech publikacji przedstawiony w formie zalecanej dla prac promocyjnych i obejmuje łącznie z oświadczeniami 124 strony. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy:

- 1) **Jaszczyk A**, Juszcza GR. *Glucocorticoids, metabolism and brain activity*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021 Jul;126:113-145. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.03.007. Epub 2021 Mar 13. 200 punktów ministerialnych, IF 9,052, liczba cytowań 14 (*Web of Science*, 21.08.2023);
- 2) **Jaszczyk A**, Stankiewicz AM, Juszcza GR. *Dissection of Mouse Hippocampus with Its Dorsal, Intermediate and Ventral Subdivisions Combined with Molecular Validation*. *Brain Sci*. 2022 Jun 18;12(6):799. doi: 10.3390/brainsci12060799. 100 punktów ministerialnych, IF 3,333, liczba cytowań 7 (*Web of Science*, 21.08.2023);
- 3) **Jaszczyk A**, Stankiewicz AM, Goscik J, Majewska A, Jezierski T, Juszcza GR. *Overnight Corticosterone and Gene Expression in Mouse Hippocampus: Time Course during Resting Period*. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3):2828. doi: 10.3390/ijms24032828. 140 punktów ministerialnych, IF 6,208.

Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich prac, całkowita liczba punktów ministerialnych wynosi 440, a współczynnik oddziaływania IF 18,593, co jest bardzo dużym osiągnięciem. Recenzent uznaje niniejszą rozprawę jako bardzo dobrą, stanowiącą kontynuację tematyki realizowanej przez Autorkę w Zakładzie Behawioru i Dobrostanu Zwierząt, który od wielu lat zajmuje się badaniami genotypu w dobrostanie i zachowaniu zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem zmian transkryptomycznych w ośrodkowym układzie nerwowym związanych z zakłóceniem dobrostanu. Rozprawa została przygotowana w ramach realizacji projektu OPUS „Wpływ długotrwałego działania kortykosteronu na transkryptom mózgu myszy laboratoryjnej”, nr 2017/27/B/NZ2/02796, którego kierownikiem był promotor pomocniczy dr Grzegorz Juszcza. Również zainteresowania badawcze promotora rozprawy - prof. dr hab.

Tadeusza Jezierskiego dotyczące genetyki i epigenetyki zachowania się i dobrostanu zwierząt w pełni odpowiadają zakresowi prezentowanej do oceny rozprawy.

Pierwszy artykuł włączony do rozprawy doktorskiej stanowi praca przeglądowa podsumowująca dostępne informacje dotyczące glikokortykoidów, ich metabolizmu i aktywności mózgu. Doktorantka przedstawia różnorodne podejścia badawcze umożliwiające ocenę wpływu podwyższonego poziomu glikokortykoidów na aktywność i metabolizm mózgu. Glikokortykoidy zmieniają dynamikę aktywności neuronalnej, prowadzą również do dywersyfikacji dostępnych źródeł energii ze względu na podwyższony poziom glukozy, mleczanu, pirogronianu, mannozy i hydroksymaślanu (ciał ketonowych), które mogą być wykorzystywane do zasilania mózgu oraz ułatwiają przechowywanie i wykorzystanie rezerw węglowodanów w mózgu utworzonych przez glikogen. Odnosi się również do warunków stresu metabolicznego związanego z podwyższonym poziomem glukozy w mózgu. Wskazuje ponadto na wpływ nadmiernej podaży glikokortykoidów na produkcję energii (ATP) i utlenianie mitochondrialne. Doktorantka zwraca ponadto uwagę na czas wykonywanych badań, które stosunkowo rzadko skupiają się na efektach powyżej czterech godzin. Część ta stanowi bardzo dobre wprowadzenie i umożliwi recenzentowi zapoznanie się z tematyką rozprawy. O wartości pracy przeglądowej z pewnością bardzo dobrze świadczą liczne cytowania.

W kolejnej pracy Doktorantka przedstawia zagadnienia praktyczne związane z uzyskaniem prawidłowych preparatów wybranych fragmentów mózgu myszy - hipokampa, wskazując również na konieczność prawidłowego przygotowania próbek do analiz. Wskazuje na ograniczenie zanieczyszczenia preparatu splotem naczyniówkowym, który może maskować dane dla hipokampa na poziomie transkryptomu. Do walidacji poprawności prowadzonej sekcji wybrano analizę ekspresji genu transtyretyny *Ttr* jako markera splotu naczyniówkowego oraz ekspresji genów *Trhr* i *Lct* jako markerów molekularnych poddziałów anatomicznych hipokampa.

Przedstawiona w drugim artykule metodyka została wykorzystana do uzyskania wyników opisanych w trzeciej publikacji, dotyczącej podania kortykosteronu myszom i ekspresji genów w hipokampie myszy ze szczególnym uwzględnieniem przebiegu czasowego w okresie spoczynku. Kortykosteron podawano myszom przez 12 godzin podczas aktywnej fazy cyklu okołodobowego. Doktorantka określiła okołodobowe zmiany w ekspresji genów i czas zaniku odpowiedzi transkryptomycznej na kortykosteron z wykorzystaniem mikromacierzy. Wykazała, że odpowiedzi na poziomie transkryptomu na glikokortykoidy różnią się pod względem czasu zaniku, a niektóre geny wykazują trwałe zmiany w ekspresji podczas 9-godzinnego odpoczynku. Doktorantka zaobserwowała, że wiele genów

regulowanych przez kortykosteron bierze udział w odpowiedzi na stres, co sugeruje możliwość wykorzystania w badaniach mechanizmów odpowiedzi na ten czynnik. Geny zaangażowane w odpowiedź na kortykosteron związane z odpowiedzią na stres to *Acer2*, *Agt*, *Apod*, *Aqp4*, *Etnppl*, *Fabp7*, *Fam107a*, *Fjx1*, *Fmo2*, *Galnt15*, *Gjc2*, *Heph*, *Hes5*, *Htra1*, *Jdp2*, *Kif5a*, *Lfng*, *Lrg1*, *Mgp*, *Mt1*, *Pglyrp1*, *Pla2g3*, *Plin4*, *Pllp*, *Ptgds*, *Ptn*, *Slc2a1*, *Slco1c1*, *Sult1a1*, *Thbd* i *Txnip*. Artykuł ten nie posiada jeszcze cytowań, ale z pewnością wykazuje dużą wartość poznawczą.

Rozprawa doktorska została przygotowana jak wcześniej wspomniano w języku angielskim i zawiera główne elementy wchodzące w skład typowej pracy promocyjnej i obejmuje: spis treści, zestawienie publikacji wchodzących w skład rozprawy, streszczenie w języku angielskim i polskim, wprowadzenie, hipotezy, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, oświadczenia współautorów publikacji oraz publikacje będące podstawą rozprawy. Jest to układ wystarczający do przygotowania recenzji rozprawy.

Doktorantka założyła trzy hipotezy badawcze sugerujące występowanie innych zmian na poziomie transkryptomu po 12-godzinnym podawaniu kortykosteronu, wpływ długości okresu spoczynku na ekspresję genów oraz możliwość obserwacji opóźnionych reakcji po powrocie poziomu hormonu we krwi do wartości wyjściowych. Sprawdzenie prawidłowości hipotez uważam za zadanie bardzo ambitne i wymagające dużo pracy ze względu na wykorzystanie modelu *in vivo*. Cel rozprawy doktorskiej został przedstawiony w formie bardzo zwartej i dotyczy wyjaśnienia procesów zachodzących w mózgu w odpowiedzi na przedłużony (12 godz.) podwyższony poziom kortykosteronu, na szczęście hipotezy wskazują odpowiednie zadania.

Ciekawą część rozprawy stanowi Dyskusja, którą Doktorantka podzieliła na dwie części odnoszące się do prac eksperymentalnych związanych z opracowaniem i walidacją metody izolacji hipokampa oraz oceny zmian na poziomie transkryptomu po podaniu kortykosteronu.

Mgr Aneta Jaszczyk przedstawiła trzy wnioski, w pełni potwierdzające zakładane hipotezy. Recenzent odczuwa jednak pewien niedosyt, ze względu na ich formę przedstawienia i brak wskazania konkretnych obserwacji.

Uprzejmie proszę aby Doktorantka podczas publicznej obrony ustosunkowała się do poniższych pytań:

- 1) Czy podobne badania mogą być przeprowadzone w układach *in vitro*? Czy można rozważyć dalsze niż 9 godzin punkty czasowe analiz?
- 2) Czy zastosowanie hydroksypropylo- β -cyklodekstryny podawanej zarówno myszom kontrolnym jak i myszom badanym umożliwiając rozpuszczenie kortykosteronu, nie

zmienia ekspresji genów? Czy porównywano poziomy ekspresji w odniesieniu do czystej wody, ponieważ hydroksypropylo- β -cyklodekstryna może sama stanowić czynnik stresogenny, potencjalnie zmieniający układ badawczy?

- 3) Czy otrzymane wyniki można ekstrapolować na szczury? Jak wygląda możliwość odniesienia modelu myszy do człowieka, zakładając udział odmiennych glikokortykoidów?
- 4) Poproszę o wyjaśnienie ewentualnych różnic między pojęciami glikokortykoidy a glukokortykoidy, zastosowanymi przez Doktorantkę w Streszczeniu rozprawy.

Jako recenzent muszę zwrócić uwagę również na drobne niedociągnięcia, np. przyleganie jednostek do wartości liczbowych, nie umniejsza to jednej ogólnej wysokiej oceny merytorycznej rozprawy.

Ze względu na specyficzną formę przygotowania rozprawy w oparciu o trzy artykuły, które podlegały recenzjom na etapie przyjęcia do druku, pozwałam sobie wskazać na istotne znaczenie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Bardzo ważne jest podjęcie analiz wpływu dłuższego podawania – 12 godz., zamiast standardowo 3-4 godzin – glikokortykoidów, w przypadku myszy kortykosteronu oraz ocena zmian na poziomie transkryptomu także po dłuższym czasie oddziaływania jak i po powrocie naturalnego poziomu kortykosteronu we krwi. Są to z pewnością wartości dodane.

Wniosek końcowy. Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr Anecie Jaszczyk. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, 1088, 1234).

Ze względu na opracowanie bardzo szerokiej problematyki związanej z analizą wpływu długiego podawania kortykosteronu na ekspresję genów w hipokampie myszy łącznie z metodyką przygotowania preparatów wybranych fragmentów mózgu myszy, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Rozprawa oparta jest o wyniki opublikowane w czasopismach o szerokim międzynarodowym zasięgu: 1) **Jaszczyk A**, Juszcak GR. *Glucocorticoids, metabolism and brain activity*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021 Jul;126:113-145. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.03.007. Epub 2021 Mar 13. 200 punktów ministerialnych, IF 9,052, liczba cytowań 14 (*Web of Science*, 21.08.2023); 2) **Jaszczyk A**, Stankiewicz AM, Juszcak GR. *Dissection of Mouse Hippocampus with Its Dorsal, Intermediate and Ventral Subdivisions Combined with Molecular Validation*. *Brain Sci*. 2022 Jun 18;12(6):799. doi: 10.3390/brainsci12060799. 100 punktów ministerialnych, IF 3,333, liczba cytowań 7 (*Web of*

Science, 21.08.2023); 3) **Jaszczyk A**, Stankiewicz AM, Goscik J, Majewska A, Jezierski T, Juszczyk GR. *Overnight Corticosterone and Gene Expression in Mouse Hippocampus: Time Course during Resting Period*. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3):2828. doi: 10.3390/ijms24032828. 140 punktów ministerialnych, IF 6,208. Pani mgr Aneta Jaszczyk jest pierwszą autorką wszystkich prac, całkowita liczba punktów ministerialnych wynosi 440, a współczynnik oddziaływania IF 18,593, wartości te są bardzo wysokie i są porównywalne z osiągnięciami habilitacyjnymi.



Dr hab. Marlena Szalata, prof. UPP

Poznań, 21.08.2023 r.