UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Agnieszka Kloch
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
ul. I. Miecznikowa 1
02-096 Warszawa

Warszawa, 7.12.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Goncerzewicz pt. “Brain size and cognitive abilities of laboratory mice divergently selected for Basal or Peak Metabolic Rates”

Przedstawiona mi do oceny praca Pani mgr Anny Goncarzewicz została wykonana w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN pod kierunkiem dr hab. Eweliny Knapskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN oraz prof. dr hab. Marka Konarzewskiego Uniwersytetu w Białymstoku. Celem pracy było znalezienie związków między tempem metabolizmu, zdolnościami poznawczymi i wielkością mózgu, zweryfikowanie hipotezy o metabolicznym kompromisie ewolucyjnym między rozwojem mózgu a rozwojem innych narządów (brain-gut trade-off) oraz zidentyfikowanie anatomicznych różnic mogących wyjaśnić różnice między liniami myszy selekcjonowanych na niski i wysoki metabolizm.

Rozprawa składa się z dwóch części, połączonych wspólnym wstępem i przestawiających odpowiednio wyniki testów behawioralnych oraz wyniki pomiarów neurofizjologicznych mózgów myszy. Zgodnie z informacją na stronie 22 pierwsza część rozprawy została opublikowana w formie artykułu w prestiżowym czasopiśmie PNAS. Muszę jednak zauważyć, że w rozdziale 6 rozprawy pominięto część publikacji opisującą analizę LTP, którą zaprezentowano w rozdziale 7 uzupełniając niepublikowanymi danymi. Taki układ budzi pewną konfuzję, ponieważ trudno bez zaglądania do czasopisma ustalić, które elementy pracy zostały już opublikowane, niemniej rozumiem, że za prezentowanym podziałem stoją racje merytoryczne.

Jako biolog ewolucyjny, chciałabym się dowiedzieć, na ile uprawnione jest utożsamianie wielkości mózgu, nawet skorygowanej na wielkość ciała, z jego możliwościami funkcjonalnymi. Wydaje mi się, że kluczową rolę pełni liczba i złożoności połączeń, a nie sama wielkość tego narządu, co zresztą sama Autorka przyznaje na str 15 pisząc „The brain’s CA are determined not

only by the number and/or size of neurons but also by the phenomenon of neuroplasticity.”. Stronę wcześniej możemy natomiast przeczytać, że tempo metabolizmu mózgu jest związane z zagęszczeniem neuronów u dużych ssaków („In larger mammalian species, a specific brain metabolism rate […] parallels a decrease of neuronal density with increasing brain size”). Jak ta zależność kształtuje się u gryzoni, które do dużych ssaków nie należą? Czy większy mózg faktycznie zawsze przekłada się na wyższe zdolności poznawcze?

Mówiąc trendach ewolucyjnych należy ostrożnie podchodzić do porównań między taksonami, zwłaszcza wysokiego rzędu. Jak Autorka sama zauważa na stronie 18, dobór naturalny operuje na poziomie gatunków, a nie między nimi, jednak większość wstępu zajmują porównania na poziomie rzędów czy gromad. Trudno uznać, że np. wśród ptaków zdolności poznawcze kolibrów podlegają takim samym presjom selekcyjnym jak u długożyjących krukowatych, zwłaszcza że gromada ta podlega ścisłym metabolicznym ograniczeniom związanym z adaptacją do lotu. Jak więc należy rozumieć zdanie „birds […] evolved larger brains than other vertebrates”?

Żeby cecha mogła podlegać działaniu doboru, musi przekładać się na dostosowanie. Bez badań potwierdzających taki związek czyli pokazujących wyższy sukces reprodukcyjny u osobników danego gatunku o większych mózgach lub wyższych zdolnościach poznawczych trudno w ogóle mówić o ewolucji wielkości mózgu. Poza tym warto się zastanowić, czy wyższe zdolności poznawcze i większy mózg zawsze są korzystnymi cechami, niezależnie od kontekstu. Czy „inwestycja” w złożony i kosztowny mózg ma sens u gatunków, których przewidywana długość życia jest mała, jak u drobnych gryzoni? Czy korzyści z wysokich zdolności poznawczych zawsze przewyższają koszty utrzymania większego mózgu? Widzę w tym miejscu potencjalną rozbieżność między wnioskami płynącymi z badań eksperymentalnych a sytuacją w warunkach naturalnych, gdzie istotnym czynnikiem ograniczającym presję selekcyjną na wysokie tempo metabolizmu może być dostępność pokarmu czy warunki pogodowe. W tym kontekście trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że dobór początkowo faworyzował większy pobór energii, co pociągnęło za sobą wzrost masy narządów ciała oraz BMR. Taki scenariusz wydaje się mało prawdopodobny w warunkach naturalnych. Co ciekawe, dyskusja na stronach 42-43 poruszająca kwestię „biological relevance of the animal model used in this study” w ogóle tych kwestii nie porusza. Jak w tym świetle można interpretować Pani wyniki?

Jednym z celów pracy była weryfikacja hipotezy „brain-gut trade-off", jednak mierzono tylko masy trzech wybranych narządów (serce, nerki, wątroba). Nie ma jednak pomiarów masy jelit. Rozumiem, że nie są one tak wymagające metabolicznie jak ww. narządy, jednak ich wielkość jest związana z efektywnością przyswajania pokarmu. Czy pod tym względem coś wiadomo o różnicy między badanymi grupami? W opisie metod nie podano, ile karmy dostawały zwierzęta i czy były karmione *ad libitum.* Bez tej informacji trudno stwierdzić, czy myszy z linii H-BMR mają większy pobór energii („increased energy intake") oraz że przetestowano hipotezę o kompensacji kosztów „drogiego mózgu" większym poborem energii, jak możemy przeczytać w Dyskusji (str. 42). Czy badane grupy mogły się różnić efektywnością przyswajania pokarmu?

Drobne uwagi

W pracy znajduje się kilka uproszczeń czy skrótów myślowych, które wymagają wyjaśnienia, np.

- Skąd wniosek, że zdolności poznawcze nie są częste w przyrodzie (str 12, „However, since cognitive capabilities are commonly considered adaptive, why are they not ubiquitous?")
- Czy faktycznie wyższe zapotrzebowanie energetyczne organizmów stałocieplnych wynika z kosztów reprodukcji? (str 42„ An increase in energy intake is the hallmark of the evolution of endothermy, mainly linked with the need to fuel reproduction".)
- Struktura narzadów jest zazwyczaj związana ich z funkcją, nie wydaje mi się, żeby można mówic o kompromisie między tymi cechami (str 19, My experimental model allowed me to analyze not only trade-offs between anatomic and physiological traits)

Opis układów eksperymentalnych nie jest przejrzysty. Na przykład w części 7.1.1 podano, że barwienia i pomiary wykonywano „on separate groups of animals […] not qualified for further selection". Czy to znaczy, że nie spełniały one kryteriów selekcji dla linii H-BMR i R-BMR? Ponadto w części 7.1.2 znajduje się informacja, że LPT mierzono tylko u „naive animals". Pod jakim względem były one „naive"? Czy każdy pomiar wyszczególniony w Tab. 1 i Tab 6 odnosi się do innego zwierzęcia czy też pomiary powtarzano na materiale z tych samych zwierząt? Być może

zamieszczenie schematu (rysunku) doświadczenia lub podanie liczebności i pochodzenia zwierząt i ich pochodzenia względem linii selekcyjnych w każdej sekcji metod wyjaśniłoby te niejasności.

Muszę przyznać, że nie jestem zwolennikiem transformacji zmiennych. Czy sprawdzono, że po transformacji arc-sin dane z LTP miały rozkład normalny i homegniczną wariancję umożliwiające przeprowadzenie ANOVA? Informacja taka jest tylko w części 6 opisującej pomiary BMR, ale nie znalazłam jej w części 7.

Fig 6 różni się od Fig 3 z publikacji PNAS kształtem linii łączącej punkty. Dlaczego w rozprawie pokazano zależność liniową, której nie ma w publikacji?

Wnioski końcowe

Mimo powyższych uwag, moja ocena pracy jest pozytywna. Kompleksowe podejście do badanego zagadnienia, łączące testy behawioralne próbą ustalenia podłoża obserwowanych różnic za pomocą pomiarów neurofizjologicznych i neutroanatomicznych jest niewątpliwym atutem pracy. Doktorantka wykazała się opanowaniem szerokiego warsztatu doświadczalnego oraz bardzo różnorodnych technik badawczych, przeprowadziła poprawną analizę danych i krytyczną dyskusję uzyskanych wyników. Świadczy to o naukowej dojrzałości.

Uznaję, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej j Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o przyjęcie pracy i dopuszczenie pani Anny Goncarzewicz do dalszych etapów postępowania związanego z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora.

dr hab. Agnieszka Kloch

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. Michał S. Wojciechowski, prof. UMK
Katedra Zoologii i Ekologii Kręgowców
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 2022-12-10

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Goncerzewicz „Brain size and cognitive abilities of laboratory mice divergently selected for Basal or Peak Metabolic Rates"

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr Annę Goncerzewicz w Instytucie Biologii Eksperymentalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Ewy Knapskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN oraz prof. dr. hab..Marka Konarzewskiego z Uniwersytetu w Białymstoku. W jej skład wchodzi 81 stron maszynopisu podzielonych na 10 rozdziałów. Rozprawa została napisana w języku angielskim i została opatrzona streszczeniem w języku angielskim (rozdział 2) i polskim (rozdział 3). Rozdział 4 to obszerny wstęp do całości rozprawy, zaś w rozdziale 5 przedstawione zostały cele rozprawy. Rozdział 6 i 7 prezentują dwie części zawierające w swojej treści materiały i metody, wyniki oraz odrębne dyskusje zaprezentowanych w tych częściach rozprawy wyników. Rozdział 8 to konkluzje, rozdział 9 to spis literatury zawierający 124 pozycje, zaś w rozdziale 10 przedstawiony został kod programu SAS wykorzystany w analizie statystycznej podstawowego tempa metabolizmu, zachowania myszy oraz obrazów mikroskopowych w programie ImageJ. Rozdział 6 zgodnie z informacją zawartą w rozprawie prezentuje wyniki opublikowane w Proceedings of the Royal Society B w 2022 roku.

Opisane w rozprawie badania zostały przeprowadzone w oparciu o dwa eksperymenty selekcyjne, prowadzone na Uniwersytecie w Białymstoku, w których badane są mechanizmy leżące u podstaw ewolucji wysokiego tempa metabolizmu. Wykorzystano w nich myszy laboratoryjne z linii Swiss-Webster. Zgodnie z informacją zawartą w rozprawie, badania zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Zasadniczym celem rozprawy była analiza zależności pomiędzy wielkością mózgu, zdolnościami kognitywnymi a selekcją na różne poziomy tempa metabolizmu

oraz analiza zmienności na poziomie plastyczności układu nerwowego związana z selekcją na tempo metabolizmu. Tytuł rozprawy dobrze oddaje jej treść.

We wstępie rozprawy Doktorantka wyczerpująco przedstawiła współczesne poglądy na ewolucję wielkości mózgu oraz na temat jej związku z tempem metabolizmu. W swoich eksperymentach mgr Goncerzewicz przeprowadziła test dwóch hipotez tłumaczących ewolucje dużego mózgu – hipotezy kosztownych tkanek oraz hipotezy kosztownego mózgu. Pierwsza z nich zakłada ujemną korelację pomiędzy wielkością mózgu a wielkością kosztowych energetycznie organów ciała, druga zaś postuluje dodatnią korelację pomiędzy wielkością organów służących pozyskaniu energii a wielkością mózgu. W pierwszej części pracy Doktorantka analizowała związek pomiędzy wielkością organów, w tym mózgu, a zachowaniem myszy selekcjonowanych na wysokie, niskie i szczytowe tempo metabolizmu oraz myszy z linii kojarzonych losowo. Pomiary respirometryczne potwierdziły, że myszy z poszczególnych linii selekcyjnych różniły się BMR zgodnie z kierunkami selekcji. Mimo różnic w wielkości organów wewnętrznych (myszy selekcjonowane na wysoki MR miały je większe), nie stwierdzono różnic w wielkości mózgu pomiędzy poszczególnymi liniami selekcyjnymi. Jednakże, myszy selekcjonowane na wysokie tempo metabolizmu lepiej radziły sobie w testach apetytywnych i awersyjnych dotyczących wyboru pokarmu. Myszy selekcjonowane na niskie tempo metabolizmu gorzej uczyły się w teście warunkowania strachu.

Wyniki drugiej części rozprawy dostarczyły informacji na temat plastyczności układu nerwowego. Test długotrwałego wzmocnienia synaptycznego wykazał najwyższą plastyczność synaptyczną u myszy selekcjonowanych w kierunku wysokiego tempa metabolizmu. Również u tych myszy zaobserwowano większą liczne neuronów i kolców dendrytycznych, a także zwiększoną aktywność oksydazy cytochromowej, wskazująca na wyższą aktywność mitochondriów niż u myszy z linii selekcjonowanych w kierunku niskiego podstawowego tempa metabolizmu oraz myszy kojarzonych losowo.

Wyniki rozprawy dostarczają istotnych informacji na temat możliwych funkcjonalnych konsekwencji selekcji w kierunku wysokiego tempa metabolizmu. Wskazują, że wzrost zdolności kognitywnych w ewolucji możliwy był bez jednoczesnego wzrostu masy mózgu, a raczej poprzez zwiększenie plastyczności synaptycznej. Selekcja w kierunku wysokiego metabolizmu mogła również doprowadzić do podniesienia tempa metabolizmu na poziomie poszczególnych neuronów.

Podczas gdy pierwsza część pracy jest napisana wyczerpująco, nie generując żadnych dodatkowych pytań, tak druga część pracy, dotycząca aspektów neurobiologicznych była trudna do oceny. Nie jestem neurobiologiem, stąd też większość

stosowanych w pracy technik była dla mnie trudna do oceny. Niestety, wydaje mi się, że jest to również efektem sposobu przedstawienia tej części pracy. Wszystkie eksperymenty behawioralne oraz pomiary wykonane w pierwszej części pracy wynikają logicznie ze wstępu oraz zostały klarownie wytłumaczone w opisie metod. Niestety, opis metod drugiej części pracy był dla mnie niejasny. Wprawdzie rozdział 4.3 „Energetic costs of neurophysiological processes" opisuje znaczenie plastyczności układu nerwowego dla zdolności kognitywnych i możliwy związek tego procesu z tempem metabolizmu, jednak jak wspomniałem, możliwe hipotezy i przewidywania z nich wynikające nie były dla mnie jednoznaczne. Nie znając poszczególnych metod analizy materiału nerwowego, ich opis w części metodycznej drugiej części rozprawy był enigmatyczny. Dlaczego przeprowadzono określone pomiary, co miały wnieść do pracy, jakich wyników oczekiwano? Na dobrą sprawę, większość z tych analiz oraz powód ich przeprowadzenia stały się dla mnie jasne dopiero podczas lektury dyskusji tej części rozprawy.

Z metodologicznego punktu widzenia nie mam wielu uwag. Metody analizy zachowania myszy oraz tempa metabolizmu zostały dobrane i opisane właściwie. Trudno mi ocenić adekwatność metod neurobiologicznych, gdyż jak wspomniałem, nie jestem neurobiologiem. Analizy statystyczne są właściwe. Jednakże w pracy brakowało mi szczegółowych przewidywań dotyczących wyników eksperymentów behawioralnych oraz badań neurobiologicznych. Podczas gdy znaczenie testów apetytywnych i awersyjnych oraz interpretacja ich wyników wydają się jasne, szczególnie w kontekście opisanych hipotez. Miałem jednak problem ze zrozumieniem znaczenia testu warunkowania strachu oraz z interpretacją jego wyników. Podobnie z wynikami pomiarów na poziomie neurobiologicznym. Jakie wyniki wskazywałyby na większą plastyczność układu nerwowego, jakich wyników należało oczekiwać w badaniach na poziomie komórkowym? Jakich korelacji oczekiwała Autorka? Podczas lektury rozprawy brakowało mi szczegółowych przewidywań, które pozwalałyby na przetestowanie hipotez, a które w znaczny sposób ułatwiłyby analizę wyników przeprowadzonych analiz.

W pracy nie stwierdzono zróżnicowania wielkości mózgu myszy selekcjonowanych na wysokie BMR, choć jak rozumiem, takiego wyniku się spodziewano. Zastanawiam się jednak, czy model, jaki dobrano pozwalał na przetestowanie hipotez dotyczących ewolucji dużego mózgu? Odnoszę wrażenie, że dobrany model pozwala na badanie, czy selekcja w kierunku BMR może prowadzić do skorelowanego efektu w postaci dużego mózgu. Taki jest wprawdzie oryginalny wydźwięk hipotez kosztownych tkanek i kosztownego mózgu. Zastanawiam się jednak, czy właściwym podejściem do przetestowania tych hipotez nie byłaby selekcja w

kierunku zdolności poznawczych i wielkości mózgu, a następnie przetestowanie ich korelacji z tempem metabolizmu i wielkością organów. Czyli niejako w odwrotnym kierunku niż zaproponowano w niniejszej rozprawie. Proszę Doktorantkę o odniesienie się do tej uwagi.

Obie części rozprawy kończą się krótką, ale treściwą dyskusją uzyskanych wyników. W mojej ocenie niezmiernie wartościową byłaby jednak choć krótka, wspólna dyskusja całości wyników uzyskanych w rozprawie. Szczególnie zaś wyników dotyczących zdolności kognitywnych i różnic na poziomie organizacji i plastyczności synaptycznej.

Mam jedną uwagę redakcyjną, która nie wpływa w żadnym stopniu na moją ocenę całości pracy. Nie rozumiem dlaczego Autorka w takiej obfitości stosuje w pracy skróty. Jest ich 39. Wykorzystywanie skrótów w artykułach publikowanych w czasopismach wydaje się być uzasadnione (choć coraz mniej w dobie publikacji wyłącznie w formie elektronicznej). Jednak w rozprawie utrudnia to w znacznym stopniu lekturę i zmusza do częstego wracania do listy skrótów znajdującej się na początku rozprawy.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska wnosi wiele nowych informacji dla zrozumienia związku pomiędzy ewolucją wysokiego tempa metabolizmu a funkcjonowaniem układu merwowego. Wyniki przedstawionych eksperymentów nie wsparły hipotezy kosztownych tkanek, zaś na podstawie funkcjonalnych korelacji dają wsparcie hipotezie kosztownego mózgu. Co najciekawsze, wyniki wskazują, że wzrost plastyczności synaptycznej, a nie wielkość mózgu może leżeć u podstaw wyższych zdolności kognitywnych związanych z ewolucją wysokiego tempa metabolizmu.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Anny Goncerzewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab.Michał Wojciechowski, prof. UMK

Warszawa, 3 stycznia 2023 r.

dr hab. Robert Filipkowski
rfilipkowski@imdik.pan.pl

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN
Pracownia Behawioralno-Metaboliczna
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Goncerzewicz
pt. „Brain size and cognitive abilities of laboratory mice divergently selected for Basal or Peak Metabolic Rates"
wykonanej w Pracowni Neurobiologii Emocji Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
pod opieką dr hab. Eweliny Knapskiej i prof. dr. hab. Marka Konarzewskiego

Doktorantka badała rozmiary narządów wewnętrznych i zachowanie myszy szeregu linii wyselekcjonowanych pod względem wysokiego i niskiego podstawowego poziomu metabolizmu oraz maksymalnego tempa metabolizmu wysiłkowego – próbując odpowiedzieć na pytanie, jak przebiegała ewolucja wielkości mózgu i zdolności kognitywnych u ssaków. Część wyników uzyskanych w czasie realizacji projektu doktorskiego stała się podstawą publikacji, która ukazała się w *Proceedings of the Royal Society B* (2022) o wysokim współczynniku wpływu (5,531/2021). Doktorantka jest pierwszą autorką tej publikacji, w ramach której przedstawiono udział poszczególnych autorów w powstaniu pracy, który potwierdza wiodący wkład mgr Goncerzewicz.

Przy zastrzeżeniach dotyczących badań nad wyselekcjonowanymi liniami myszy – ważne i wnoszące nowe informacje są obserwacje dotyczące zwiększonych zdolności kognitywnych u myszy z wysokim tempem metabolizmu podstawowego (H-BMR), a także zmniejszonych zdolności kognitywnych u myszy z obniżonym tempem metabolizmu podstawowego (L-BMR). Docenić należy różnorodność zastosowanych metod i, dzięki temu, szeroki wachlarz różnicujących elementów fenotypu badanych myszy.

Niestety, w toku lektury pracy doktorskiej narzuciły mi się zastrzeżenia dotyczące przedstawionej rozprawy – trudno jest mi się zgodzić z jej głównymi założeniami teoretycznymi, podejściem metodycznym i interpretacją wyników.

Główne pytanie badawcze i próba odpowiedzi na to pytanie

Pytanie, które postawiła sobie doktorantka, brzmiało (str. 20): W jaki sposób rozwiązany został (w czasie ewolucji) problem kosztów energetycznych powiększenia mózgu ssaków? („How were the energetic costs of enlarged mammalian brains overcome?"), czy inaczej „Jak koszty związane z mózgiem dużych rozmiarów zostały przezwyciężone w toku ewolucji?" (str. 9). W celu odpowiedzi na to pytanie doktorantka twierdzi, że sfalsyfikowała dwie kluczowe hipotezy:
ET – „expensive tissue hypothesis" (hipoteza kosztowych tkanek),
EB – „expensive brain hypothesis" (hipoteza kosztownego mózgu);
hipoteza kosztownych tkanek – wg której koszt utrzymania zwiększonego mózgu kompensowany jest redukcją narządów wewnętrznych i przyjmowaniem pokarmu wyższej jakości (relokacja energii);
hipoteza kosztownego mózgu – wg której koszt utrzymania zwiększonego mózgu kompensowany jest przyjmowaniem bardziej kalorycznego pokarmu (zwiększenie energii w środowisku).

Rozgraniczenie założeń obu hipotez nie jest precyzyjne. Pewne ich elementy nakładają się, jednocześnie mamy wierzyć, że hipotezy te są sprzeczne, „podważają się" (str. 9), podczas gdy zupełnie prawdopodobne mogło być wykorzystanie „przez" zwiększający się ewolucyjnie mózg obu tych strategii – i to w różnym stopniu na różnych etapach ewolucji.

Doktorantka w celu odpowiedzi na ww. pytania badawcze, dotyczące zwiększenia rozmiarów mózgu w toku ewolucji, zbadała linie myszy pochodzące z eksperymentu selekcyjnego. Nie była to jednak selekcja dotycząca rozmiarów mózgu, a selekcja dotycząca tempa metabolizmu podstawowego i maksymalnego tempa metabolizmu wysiłkowego. Zbadano więc myszy o zwiększonym poziomie metabolizmu i okazało się, że ich mózg (wg przedstawionej interpretacji) „nie rośnie", „rosną" natomiast ich narządy wewnętrzne (raczej niż „organy", str. 9) i zdolności kognitywne; co (wg przedstawionej interpretacji) oznacza, że zwiększenie zdolności kognitywnych w toku ewolucji nie nastąpiło poprzez zwiększenie wielkości mózgu. **Problem kosztów ewolucyjnie zwiększającego się mózgu został więc rozwiązany stwierdzeniem, że mózg nie zwiększył swojej masy. Postawiono pytanie, na jakich warunkach mózg urósł i zaproponowano odpowiedź – że nie urósł.**

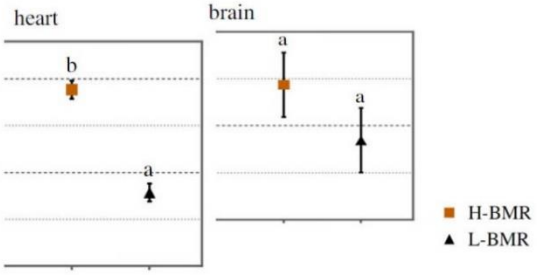
Wydaje się więc, że użyto niewłaściwych narzędzi do odpowiedzi na postawione pytania. Można było np. użyć myszy selekcjonowanych na większy i mniejszy rozmiar mózgu (np. Perepelkina i wsp., 2013, Mice selected for large and small brain weight: The preservation of trait differences after the selection was discontinued, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4:1-8), jak również wielu linii transgenicznych, z opisanymi zmianami molekularnymi, które wykazują mózgi większe lub mniejsze od wartości średnich (np. myszy typu nokaut *Aspm*, cykliny D2, *Kv1.1*) – i zweryfikować ewentualne zmiany dotyczące masy ich trzewi. Jeżeli zaś chodzi o przedstawione wyniki, wydaje się, że można było ograniczyć się do interpretacji faktu korelacji zdolności kognitywnych, badanych cech anatomicznych i fizjologicznych oraz podstawowego poziomu metabolizmu.

Doktorantka, na podstawie swoich wyników, twierdzi, że ewolucyjne zwiększenie zdolności kognitywnych było rezultatem przede wszystkim zwiększenia metabolizmu podstawowego. Problem tkwi w tym, że twierdzenie to opiera na swoim jednostkowym eksperymencie i stwierdzeniu, że mózgi badanych myszy nie różniły się masą. Zaproponowana interpretacja wydaje się więc zbyt prosta wobec złożoności problemu i niejednoznaczności uzyskanych wyników.

Nie pokazano także, czy występują korelacje pomiędzy metabolizmem podstawowym, wielkością mózgu i zdolnościami kognitywnymi – co jest o tyle zaskakujące, że doktorantka posiadała wszystkie dane, by takie korelacje policzyć.

Czy można stwierdzić, że nie ma różnicy *pomiędzy dwiema średnimi*, np. w masie mózgów myszy H-BMR i L-BMR? Nadinterpretacja nieznamiennego wyniku

„U testowanych szczepów myszy nie zmienia się […] wielkość mózgu" (str. 9) – doktorantka twierdzi, że pokazała różnice w wielkości narządów wewnętrznych (wątroby, nerek, serca) pomiędzy myszami o wysokim (H-BMR) i niskim (L-BMR) tempem metabolizmu podstawowego, podczas gdy różnicy takiej nie ma w przypadku mózgu. Co więcej – dla przedstawionych wniosków **kluczowe** jest stwierdzenie, że różnica pomiędzy myszami H-BMR i L-BMR występuje w przypadku narządów wewnętrznych (np. „heart", poniżej), a nie występuje w przypadku mózgu („brain", poniżej; fragmenty ryciny 1B, str. 35).



Przedstawiono interpretację, w ramach której brak istotności (dokładnej wartości p w rozprawie nie podano) przedstawia się jako brak różnicy pomiędzy grupami – chodzi o różnicę masy mózgów myszy H-BMR i L-BMR (np. rycina powyżej). Niestety, jak stwierdzają autorzy pracy „Ten common statistical mistakes to watch out for when writing or reviewing a manuscript" – Tamar R. Makin i Jean-Jacques Orban de Xivry (eLife, 2019; 8:e48175): „błędna interpretacja wyników testu statystycznego, w sytuacji gdy wynik nie jest istotny, jest również wysoko problematyczna, ale także niezwykle powszechna" / "misinterpreting the results of a statistical test when the outcome is not significant is also highly

problematic but extremely common" (page 1). Brak znamienności wyniku porównania statystycznego ($p < 0,05$) nie upoważnia do twierdzenia, że, np. w omawianym przykładzie, nie ma różnicy w wielkości mózgu dwóch linii myszy. Nie wiadomo, czy ww. brak nie wynika np. z błędu metodologicznego, nieodpowiednio przeprowadzonych pomiarów (np. niedbałości[1]), ich czułości, zbyt małej siły statystycznej testu etc.

Co więcej – ww. różnicę „widać gołym okiem", wynosi 6,1–6,5% (obliczone na podst. Tab. 2, str. 29), przebiega w spodziewanym kierunku (mózg myszy H-BMR jest większy niż L-BMR). Jest więc (duża) szansa, że jest to różnica prawdziwa. Nie ma natomiast próby krytycznego namysłu, skąd może pochodzić brak znamienności. A może wynikać na przykład z zastosowania jedynie samic w badanych grupach – co mogło prowadzić do zwiększenia wariancji wyników. Pokazano, że u samic szczura cykl rujowy wiąże się z ok. 2-3%-owymi zmianami w objętości formacji hipokampa (Qiu i wsp., 2013, NeuroImage, 83:593-8); podobnie pokazano zmiany u kobiet, np. zwiększenie objętości istoty szarej kory mózgowej o 1,81% w czasie owulacji (Hagemann i wsp., 2011, PLos ONE, e14655). Doktorantka nie sprawdzała, w jakiej fazie cyklu znajdowały się badane samice.

Czy można stwierdzić, że jest różnica pomiędzy dwiema sytuacjami doświadczalnymi, jeśli się ich bezpośrednio nie porównuje, np. „zwiększenie masy wątroby" *vs* „zwiększenie masy mózgu"?

W wynikach nie ma pokazanej znamienności w różnicy pomiędzy dwiema grupami czy parami grup (różnice w masie np. serca *vs* różnice w masie mózgu – patrz rycina powyżej), podczas gdy na takiej różnicy różnic mowa jest w ramach interpretowania wyników. Innymi słowy, doktorantka nie pokazuje statystycznie, że wątroba u myszy H-BMR „urosła" bardziej niż mózg, ale tak opisuje swoje wyniki.

Ten błąd Tamar R. Makin i Jean-Jacques Orban de Xivry (eLife 2019) określają jako „interpretowanie porównań pomiędzy dwoma efektami mimo braku bezpośredniego ich porównania" („interpreting comparisons between two effects without directly comparing them"). Bezpośrednie porównanie „wzrostu" np. wątroby ze „wzrostem" mózgu jest konieczne, by twierdzić, że narządy te w innym/różnym stopniu uległy „zwiększeniu" w grupie myszy H-BMR. Nie ma podstaw do mówienia o różnicach, jeśli się tych różnic nie pokaże. Nie można bowiem „porównywać oddzielnie", porównywanie z definicji polega na zestawianiu cech porównywanych elementów.

W ramach weryfikowania hipotez nie można skupiać się na wybranych wynikach

Brak różnic w masie mózgu myszy H-BMR i L-BMR – skoro jest wynikiem kluczowym – powinien zostać powtórzony, sprawdzony i potwierdzony. Zrobiono to popełniając jednak kolejne błędy, a uzyskane rezultaty nie zostały właściwie pokazane i krytycznie omówione. Doktorantka przeprowadziła barwienie fioletem krezylu (barwienie Nissla), nie stwierdziła różnic w powierzchni „hipokampa" ($p = 0,98$) pomiędzy badanymi liniami, okazało się jednak, że wielkość hipokampalnego obszaru piramidowego jest różna u badanych grup myszy ($p = 0,04$) i że różnica ta wynika z tego, że ww. obszar jest u myszy H-BMR większy o ok. 35% (obliczone na podst. Fig. 9, str. 55). Nie wiadomo, jakie były rozmiary całych formacji hipokampa, nie przedstawiono ich wyników, nie wiadomo więc, czy ponownie elementy mózgu myszy H-BMR nie były jednak większe niż u myszy L-BMR.

Popełniono tu kolejny błąd, o którym piszą Tamar R. Makin i Jean-Jacques Orban de Xivry (eLife 2019) – „badanie zbyt małych prób" („Use of small samples"), które może prowadzić do przeoczenia istniejącego efektu (błąd II typu). W omawianych badaniach, które mogły wykluczyć brak różnic w wielkości części mózgu myszy H-BMR i L-BMR użyto jedynie 3 myszy na grupę ($n = 3$); ponownie – były to samice, u których nie sprawdzano etapu cyklu. Problem zbyt małej liczby n dotyczy także badań dot. barwień DAPI i GFAP (Tab. 6, str. 45).

Nie wiadomo więc, na ile stwierdzenie większego hipokampalnego obszaru piramidowego u myszy H-BMR nie było przypadkowe, niemniej ponownie, i tym razem znamiennie, element mózgu tych myszy był większy niż myszy L-BMR. Jednak wynik ten, podważający „wynik główny" nie został omówiony krytycznie, „zauważony" pod tym względem w ramach dyskusji wyników. Co więcej, wyniki

[1] akceptowanie „braku różnicy" jako „wyniku naukowego" prowadzić może do wymiernych korzyści z niedbale i błędnie wykonywanych doświadczeń – tak, by po porównaniu wyników >1 grup wyszło $p > 0,05$.

dotyczące rozmiarów (części) formacji hipokampa zostały przeniesione do innej części pracy; sztucznie i niepotrzebnie podzielono wyniki na porównanie wielkości narządów (np. nerek i mózgu; część pierwsza wyników) i na porównanie cech formacji hipokampa. Można odnieść wrażenie, że zrobiono to, by móc w części pierwszej stwierdzić, że mózg myszy H-BMR nie różni się wielkością od mózgu myszy L-BMR, a następnie, w części drugiej nie musieć krytycznie zestawić tego stwierdzenia ze znamiennymi różnicami wielkości części formacji hipokampa – które temu stwierdzeniu przeczą.

Wydaje się, że chodziło o możliwość utrzymania jednoznacznego stwierdzenia „braku różnicy wielkości mózgów" – koniecznego do przyjętej interpretacji przebiegu ewolucji i do „wysyłania sygnałów ostrzegawczych do społeczności neuronaukowej" (str. 64), podczas gdy obraz faktyczny jest, w dużym stopniu prawdopodobieństwa, co najmniej bardziej złożony.

Rozdzielenie wyników, o którym piszę powyżej, nastąpiło częściowo wtórnie, już po wspólnym ich opublikowaniu w pracy w *Proceedings of the Royal Society B*, w której np. liczba n myszy użytych w doświadczeniach LTP, doświadczeniach behawioralnych i dot. rozmiarów narządów znajdują się w tej samej tabeli (Table S1, *Supplementary Materials*). W ramach rozprawy z tabeli tej wyniki dot. LTP zostały wycięte i przeniesione, w podpisie zaś zostało niepotrzebne „N.M. – not measured" poprzednio powiązane z wynikami LTP (Table 1, str. 24).

Brak stwierdzenia, że masa wątroby, nerek i serca myszy H/L-BMR została wcześniej pokazana

Doktorantka opisuje uzyskane wyniki dotyczące różnic w masie wątroby, nerek i serca jak własne odkrycia oryginalne. W *Streszczeniu* czytamy: „W swoich badaniach wykazałam, że myszy wyselekcjonowane na wysokie tempo metabolizmu podstawowego (H-BMR) mają, w przeciwieństwie do innych badanych linii, większe organy wewnętrzne." Tymczasem wyniki opisujące masę wątroby, nerek i serca, w znacznej mierze przypominające te uzyskane przez doktorantkę, znajdują się w pracach: Brzęk i wsp., *Effect of dietary restriction on metabolic, anatomic and molecular traits in mice depends on the initial level of basal metabolic rate*, J. Exp. Biol., 215 (2012) 3191-3199, **Fig. 3a–f**, Sadowska i wsp., Basal metabolic rate is positively correlated with parental investment in laboratory mice, Proc. R. Soc. B, 280 (2013) 20122576, **Tab. 1** oraz Maciak i wsp., *Mice divergently selected for high and low basal metabolic rates evolved different cell size and organ mass*, J. Evol. Biol., 27 (2014) 478–487, **Fig. 1cd**.

Tymczasem w dysertacji czytamy: „The H-BMR mice are characterized by increased energy intake and reproductive allocation (Sadowska et al., 2013) and increased gut mass (Table 1)." – taki zapis sugeruje, że odkrycie cięższych narządów wewnętrznych u myszy H-BMR jest zasługą doktorantki (Table 1). Prace Pawła Brzęka i wsp. (2012) oraz Sebastiana Maciaka i wsp. (2014) nie są w rozprawie cytowane.

Błędy metodyczne i brak informacji

1. Na rycinie 2a (Fig. 1a w publikacji) pokazano BMR 4 badanych linii myszy. Linie RB i PMR mają wartości prawie takie same, niemniej oznaczono tę parę jako różniącą się statystycznie pod względem BMR. ANCOVA może tu generować słupki błędów, które utrudniają ocenę obserwowanych różnic. Wartości p tych różnic nie są podawane, w tym – kluczowa tzn. dotycząca masy mózgu myszy H-BMR *vs* L-BMR. Nie wiadomo, jak poszczególne pary grup były porównywane, tzn. jaka (i czy) była zastosowana analiza *post-hoc*. (Podobnie na rycinie 12 pokazano, prawdopodobnie błędnie, różnicę pomiędzy myszami H-BMR i L-BMR dla rejonu CA2, która nie jest widoczna na wykresie i nie jest opisana w tekście.)

2. Najważniejsze wyniki nie są odpowiednio opisane, np. w Tabeli 4. (str. 34; jest to Tab. 1 publikacji) jest jedynie stwierdzenie, że chodzi o wyniki ANCOVY dotyczące BMR i masy narządów. Nie wiadomo, co kryje się w kolumnie „Line type", a co w kolumnie „Body mass", co z czym i jak zostało porównane; podobna sytuacja jest z Tabelą 5. (str. 40), nie wiadomo, co opisują statystyki dotyczące kolumny „Line Type" i innych kolumn; w tekście czytamy, że aktywność nie różniła się pomiędzy liniami, a różnice wystąpiły w przypadku konsumpcji wody z chininą – tymczasem podsumowania statystyczne tych wielkości (aktywność *vs* błędne-wsadzenia-nosa-chinina) są bardzo podobne; brakuje surowych wyników.

3. Zastosowano testy parametryczne. Nie ma informacji, czy i jak sprawdzono, czy dane spełniają warunki zastosowania tych testów.
4. Czasami doktorantka przedstawia „body mass adjusted means"; czasami „arithmetic means", co utrudnia porównania; nie wiadomo, jak powstały „body mass adjusted means".
5. Nie sprawdzono podstawowych parametrów behawioralnych badanych myszy; np. ruchliwości w otwartym polu. Jest to ważne, jeśli następnie bada się zamieranie w warunkowaniu strachu.
6. W doświadczeniu, w którym badano „energy relocation from energy-costly organs" nie zastosowano ograniczenia podawanego pokarmu. Takie ograniczenie mogłoby pokazać, czy w warunkach podwyższonego poziomu metabolizmu, przy ograniczonej podaży energii, ewentualny ubytek masy dotyczy narządów wewnętrznych czy też mózgu. Tymczasem na temat ilości podawanego pokarmu jest jedynie informacja, że „animals were fed a standard diet" (str. 23). Nie wiadomo nawet, czy pokarm dostępny był *ad libitum*. Nie wiadomo, czy są różnice w ilości spożywanego pokarmu.
7. W rozdziale Metody nie podano kluczowych informacji na temat użytych myszy:
- jest jedynie informacja, że pochodzą z dwóch równoległych eksperymentów selekcyjnych prowadzonych na Uniwersytecie Białostockim; ta informacja nie ma odniesienia literaturowego; nie wiadomo, kto i jak długo prowadzi ww. eksperymenty; czytelnik może odnieść wrażenie, że doświadczenia te i hodowle prowadziła doktorantka;
- nie wiadomo także, jakie tło genetyczne mają badane myszy (tę informację znalazłem we Wstępie);
- nie wiadomo, kiedy rozpoczęły się te doświadczenia, które pokolenie myszy było poddane selekcji i zostało zbadane;
- dotychczasowe liczne wyniki uzyskane z doświadczeń prowadzonych z myszami badanych linii nie zostały omówione we *Wstępie*.
8. Nie ma informacji, czy doświadczenia były prowadzone przez osobę bez znajomości przynależności myszy do poszczególnych grup.

Brak (pogłębionej) dyskusji wyników
Wspomniane powyżej rozdzielenie wyników spowodowało nie tylko błędy w ich opisie, wymusiło niepotrzebne zduplikowanie wielu informacji – np. dwa razy, w dwóch analogicznych rozdziałach „Animals" (6.1.1 i 7.1.1) jest informacja o tym, że myszy pochodziły w Białegostoku, rozdzieliło również *Dyskusję* na dwa lakoniczne fragmenty, które w sumie stanowią jedynie 7 stron i zawierają głównie, ponownie (sic!), powtórzenia i przedstawienia i podsumowania wyników. Powtórzona jest ich główna interpretacja (która w mojej ocenie nie jest uprawniona). W *Dyskusji* zabrakło wielu podstawowych elementów:
a) porównania uzyskanych wyników z poprzednimi wynikami badań dot. linii myszy H-BMR i L-BMR, np. dot. masy narządów wewnętrznych (patrz wyżej) lub większej aktywności myszy H-BMR (Gębczyński i Konarzewski, 2009, J. Evol. Biol., 22: 1212-1220, **Fig. 1c**; praca nie jest cytowana);
b) omówienia innych przypadków zmian BMR, wielkości mózgu lub jego struktur i zdolności poznawczych u zwierząt, np. transgenicznych, badanych przez inne zespoły;
c) omówienia aspektów fizjologiczno-histologicznych badanych narządów dotyczących np. możliwości rozrostu wątroby *vs* nerek *vs* serca, otłuszczenia tych narządów, efektów hipermetabolizmu (stłuszczenie i zwłóknienie wątroby u ludzi), przerostu hepatocytów (por. Maciak i wsp., 2014); a także tego, czy mózg w ogóle mógłby – podobnie do wątroby – „urosnąć" w zbliżonym nawet stopniu (61% u H-BMR *vs* L-BMR) bez jednoczesnych zmian w budowie czaszki; namysłu, jakiego wzrostu mózgu się spodziewano (por. **b**);
d) spojrzenia krytycznego na zastosowane podejście merytoryczne i uzyskane wyniki! – które mogłoby objąć problemy związane z zastosowaniem eksperymentami selekcyjnych np. brak informacji i kontroli nad zachodzącymi zmianami w genotypie, problem efektu linii i tego, czy dana linia nie jest jedynie „jednym n", tzn. obserwujemy w niej np. efekty podwyższenia tempa metabolizmu, ale powinniśmy je zestawić w grupie wielu linii H-BMR, by mieć w tej grupie kilka niezależnie uzyskanych elementów).

Zabrakło więc namysłu nad ewentualnymi ograniczeniami przyjętych założeń i podejścia metodologicznego – związanego np. z użyciem linii wyselekcjonowanych i jedynie samic myszy.

Autorka twierdzi, że bada przebieg ewolucji. Ewolucja nie polegała jednak na sztucznym doborze myszy o zwiększonym BMR, którym zapewniony jest pokarm *ad libitum*. Tymczasem odniosłem wrażenie, że doktorantka jest przekonana, że odtwarza ewolucję i że wyniki ma jednoznaczne. W pracy przedstawione zostały jednak nieuprawnione wnioski na podstawie niewłaściwie zinterpretowanych rezultatów – przy popełnieniu co najmniej trzech poważnych błędów związanych z ich analizą i pominięciu wyników, które tym wnioskom przeczyły. Mam nadzieję, że publiczna obrona doktoratu będzie okazją do dyskusji błędów powyżej przedstawionych – mogę się w części lub całości swoich ocen mylić.

Zauważone błędy edytorskie

Pracę otwiera *Spis skrótów* (*Abbreviations*), który nie został uporządkowany alfabetycznie; przy okazji niefortunnie wybrano CA jako skrót dla „cognitive abilities", podczas gdy często również wspominano o częściach formacji hipokampa, tzn. CA1, CA2 i CA3 – częściowe pokrywanie się tych skrótów sprawia trudności w zrozumieniu tekstu. Niektórych skrótów, które wprowadzono w tekście, np. CCO (oksydaza cytochromowa c; skrót jest rozwinięty/wyjaśniony na str. 4, 7, 21, 48, 49, 59 – dwa razy, 63, 64 – dwa razy), nie ma w *Spisie*.

Streszczenia zawierają skróty wprowadzane bez ich wyjaśnienia, np. „ET" i „EB" (3 ostatnie linijki *Summary*). Niektóre pozycje literatury są cytowane w sposób niewłaściwy, np. w 4. linijce *Summary* czytamy o „hypothesis postulated by (Aiello and Wheeler 1995)". Nawias jest tu niepotrzebny. Taki sam błąd występuje w *Streszczeniu*. Ponadto w *Streszczeniach*:

- „random bread lines" (linie przypadkowego chleba?, str. 7);
- „poprzez przyjmowanego […] pokarmu" (str. 9);
- „charakteryzowały się […] większą liczbę" (str. 10);
- „oraz plastycznością neuronalnej" (str. 10);
- „powiększenie organów wewnętrznych [/ *enlarged gut*] nie było ewolucyjnym kompromisem przy rozwoju większego mózgu" (chodziło raczej o „zmniejszenie") (str. 7/10).

Inne zauważone błędy:

- skrót „BMR" pojawia się na str. 11, na str. 12 jest podane jego rozwinięcie;
- podobne, do przypadku w *Streszczeniu*, błędy dotyczące cytowań występują np. na str. 12 („e.g. (Bennett &…)"); 13 „(Chappel et al. 2007)"; 23 (w różny sposób cytowane te same prace: Gębczyński i Konarzewski, 2009 oraz Sadowska i wsp., 2017); 32 „Konarzewski et al. (Konarzewski 2005)";
- „25 °C *vs* 23°C (str. 23), „20.5 cm" *vs* „2.2mm" (str. 25), „24h" (str. 26) *vs* „24 h" (str. 27), „2 hours" *vs* „6-8 h" (str. 48), „15 minutes" *vs* „5 min" (str. 48);
- brak kropek na końcu zdania, np. str. 13;
- wielkości „105" i „106" zamiast „10^5" i „10^6", str. 14;
- „birds are […] interested" zamiast „interesting", str. 16;
- brak rozdzielenia akapitów, np. str. 30;
- cytowania właściwe dla suplementu publikacji w *Proceedings of the Royal Society B* (2022) wraz z niewłaściwym użyciem łączników: „*The d values for organ masses were located according to published values of h2 (heart- [8]; liver-[8, 9]; kidneys-[10]; brain mass- [7])"*, Fig. 4., str. 37;
- „line lines", str. 49; - kolaterale Schaffera nie zostały pokazane na rycinie 7 (str. 52).

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Goncerzewicz pt. „Brain size and cognitive abilities of laboratory mice divergently selected for Basal or Peak Metabolic Rate" spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Mimo szeregu wątpliwości wnioskuję o dopuszczenie mgr Anny Goncerzewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Robert Filipkowski