



**Instytut Medycyny Doświadczalnej i
Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii
Nauk**

A.Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, Tel: (48 22) 608 6493,

Warszawa, 20 listopada 2022 roku

Prof. dr hab. Elżbieta Salińska
Zakład Neurochemii
IMDiK PAN

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Nowickiej

**Pt. „Rozkład białka c-FOS w całym mózgu podczas uczenia
apetytywnego”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Leszka Kaczmarka oraz Promotora pomocniczego dr Marzeny Stefaniuk.

W przedstawionej pracy podstawę przeprowadzonych badań stanowił uznana rola białka c-Fos jako markera aktywacji neuronów prowadzących do zmian plastyczności komórek. Zmiany takie są nieodłączną częścią procesów uczenia się i zapamiętywania, które stanowią niezbędny element przystosowania do zmieniających się warunków środowiska gwarantujący przeżycie organizmu.

W przedstawionych badaniach wykorzystano myszy model uczenia awersyjnego, a w kluczowej części badań uczenia apetytywnego, którego molekularne mechanizmy są poznane w mniejszym stopniu niż te, związane z uczeniem awersyjnym. Bodźce apetytywne warunkują nie tylko wybór np. odpowiedniego pożywienia, stanowią

również element procesu uzależnień, gdzie pogoń za pozytywnymi odczuciami przybiera postać patologiczną, stając się uzależnieniem. Szeroka gama uzależnień jest współcześnie obecna w prawie każdym społeczeństwie i dlatego zgadzam się z tezą autorki tej pracy, że poznanie neuronalnych mechanizmów uczenia apetytywnego ma duże znaczenie, gdyż mogą one wskazać drogę do skutecznego wyprowadzania z nałogów.

Rozprawa doktorska mgr Nowickiej ma typowy układ dla prac tego typu, mieści się na ponad stu stronach zawierających Wstęp, Cele pracy, opis Materiałów i Metod użytych w badaniach, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wraz z Wnioskami oraz Spis Piśmiennictwa. Całość uzupełniają dodatki w postaci załączników, spisu rycin oraz publikacji własnych, wśród których, chyba przez pomyłkę znalazła się praca autorstwa Lenart i wsp. z 2017, w której mgr Nowicka nie miała udziału.

We Wstępie znajdziemy dosyć zwięzły opis mechanizmów kształtowania się reakcji zwierząt na bodźce zewnętrzne oraz komórkowych mechanizmów prowadzących do utrwalenia i zapamiętania przyczyn i okoliczności powstałych reakcji, czyli uczenia się i zapamiętywania. Ta część tekstu skupia się na podaniu informacji wskazujących na kluczowy udział białka c-Fos w tych procesach. We Wstępie znajdziemy również informacje dotyczące użytej w prezentowanej pracy techniki mapowania ekspresji białka c-Fos w mózgu za pomocą mikroskopii opartej na arkuszu światła. Jest to bardzo ciekawa metoda i słowa uznania dla konstruktorki mikroskopu, jednak woląłabym znaleźć te informacje w rozdziale poświęconym metodom, albo jeszcze lepiej w Dyskusji, jako dyskusję przydatności użytych metod.

Natomiast to, czego mi brakuje we Wstępie, to bardziej szczegółowego opisu przyjętego obecnie modelu inicjacji sygnałów wewnątrzkomórkowych prowadzących do aktywacji ekspresji genów wczesnej odpowiedzi w procesach związanych z formowaniem pamięci. Na miejscu była by również krótka charakterystyka i opis budowy ciała migdałowatego, a zwłaszcza typów neuronów tworzących tę strukturę mózgu. Pomogło by to zrozumieć wybór badacza właśnie tej struktury i określonych typów neuronów w przedstawionych badaniach, gdyż ciało migdałowe nie jest jedynym obszarem mózgu zaangażowanym w procesy uczenia.

W rozdziale Materiały i Metody znajdujemy dokładny opis przeprowadzonych badań behawioralnych oraz metod użytych do kompleksowego pomiaru ekspresji białka c-Fos w mózgu myszy poddanych treningowi. Woląłabym jednak aby w opisie

umiejscowienia butelek z napojami używano określenia narożnik zamiast róg, ale jest to tylko sugestia na przyszłość.

Szczególnie pracowitą wydaje się metoda przygotowania mózgów do obrazowania obecności c-Fos przy użyciu mikroskopu opartego na arkuszu światła raz analiza uzyskanych wyników i konstrukcja trójwymiarowych map aktywacji c-Fos. Nie jest jednak jasne czy doktorantka analizowała ekspresję tego białka w półkulach mózgowych osobno czy razem. Uważa się bowiem, że ciała migdałowe prawej i lewej półkuli, choć współpracują ze sobą, jednak odpowiadają intensywniej na inne bodźce, a odpowiedź na bodźce apetytywne wiązana jest najczęściej z ciałem migdałowym lewej półkuli. Ciekawe by było pokazanie, czy w prowadzonych przez doktorantkę badaniach taka różnica faktycznie występuje.

W opisie apetytywnego treningu zwierząt, których skrawki mózgu posłużyły do badań elektrofizjologicznych nie jest jasne czy zwierzęta mogły wybierać między butelkami zawierającą wodę lub roztwór sacharozy, a jest to informacja istotna.

Na końcu rozdziału Materiały i Metody powinna się znajdować informacja jakich testów statystycznych używała doktorantka w analizie danych.

Wyniki przedstawione w pracy są interesujące i wyraźnie wskazują na udział ciała migdałowego, a zwłaszcza bocznej części jądra środkowego zawierającej neurony somatostatynowe (SST+) w reakcji na pozytywne bodźce smakowe i ich poszukiwanie. Jednak w tym rozdziale autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów. W legendzie do Ryc. 13 wymieniony jest wykres D, którego tam nie ma. Podobnie w legendzie do Ryc. 25 – wymienione są tam wykresy D i E nie będące częścią tej figury. Z kolei Ryc. 27 przedstawiająca wyznakowanie neuronów VIP, PV i SST w CeL i CeM nie jest przekonująca. Być może to kwestia złego doboru zdjęcia, bo na tych umieszczonych w pracy ilość wszystkich badanych neuronów w strukturze CeM wydaje się znikoma, podczas gdy komórek zawierających c-Fos jest całkiem dużo. Ten obraz rzutuje na odbiór wyników przedstawionych na Ryc. 28A, zwłaszcza odnośnie neuronów SST+ - trudno dopatrzeć się tak dużego procentu komórek c-Fos pozytywnych zidentyfikowanych jako SST+.

Szczególnie skrupulatna wydaje się być analiza regionów anatomicznych mózgu, w których zaobserwowano największe zmiany w poziomie ekspresji c-Fos. Zdziwiłam się jednak nie znajdując wśród nich hipokampa, który uważany jest za rejon mózgu szczególnie aktywny w procesach uczenia. Nie znalazłam go na żadnej z przedstawionych figur ani w Załączniku. Wyniki badania ekspresji c-Fos w różnych

strukturach mózgu przedstawione na Ryc. 19 pokazują, że wzrost ekspresji tego białka obserwowano w ponad 50 strukturach. Na wykresach pokazana jest różnica w ilości c-Fos pozytywnych komórek w mózgach myszy pijących tylko wodę lub tylko 10% sacharozę. Ten sposób przedstawienia wyników nie oddaje faktycznych różnic. Takie różnice najlepiej ocenić przy prezentacji procentowych zmian (woda vs. sacharoza) lub krotności wzrostu jak na Ryc. 18.

Wspominając Załącznik 1 – drobny błąd w określeniu istotności, w tabeli wskazana jest jako $p < 0.005$, podczas gdy wszystko, łącznie z legendą, wskazuje, że jest ona $p < 0.05$.

Dużo błędów znajduje się w tekście na str. 72 – wymieniona jest Ryc. 23, a powinna być Ryc. 28, w legendzie do Ryc. 28 również są błędy, Ryc. 28A przedstawia wyniki z obszaru CeM a nie CeL, opis Ryc. 28B, zresztą też błędny, oznaczony jest jako C, a co za tym idzie, Ryc. 28C jest oznaczona w legendzie jako D. Na str. 83 autorka prawdopodobnie pomyliła się, pisząc o Ryc. 27A zamiast Ryc. 34

Poza tym w rozdziale Wyniki dużą część tekstu zajmują opisy metodyczne, które są albo powtórzeniem albo rozszerzeniem tych znajdujących się w rozdziale Materiały i Metody. Uważam, że większość z nich powinna jednak znaleźć się w opisie Metod.

Prezentowane w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej badania pozwoliły na wyjaśnienie udziału ciała migdałowatego w awersyjnym i uczeniu apetytywnym i reakcji na pozytywne bodźce, w tym wypadku bodźce smakowe. Stworzenie mapy oddziaływań różnych struktur i projekcji sygnałów na podstawie ekspresji białka c-Fos po treningu apetytywnym jest przedsięwzięciem interesującym, mogącym być furtką do nowych badań.

Interesujące są również wyniki wskazujące na różny udział dwóch struktur tworzących ciało migdałowate oraz zidentyfikowanie neuronów SST+, znajdujących się w CeA, jako potencjalnie zaangażowanych w uczenie apetytywne.

Dyskusja wyników jest napisana w sposób przejrzysty i w pełni uzasadnia końcowe wnioski. Uważam, że cele pracy wymienione na końcu Wstępu zostały w pełni osiągnięte i udokumentowane zaprezentowanymi wynikami.

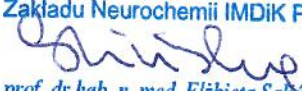
Powoływanie się w dyskusji na najnowsze publikacje wskazuje na znajomość doktorantki tematu i najnowszych trendów w badaniach nad mechanizmami formowania pamięci. Wskazuje też na to lista prac cytowanych w przedstawionej pracy doktorskiej obejmująca ponad 260 pozycji.

Dojrzała argumentacja wyciąganych wniosków i polemika z wynikami innych autorów wskazuje na dobre przygotowanie doktorantki do prezentowania wyników własnych badań.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Klaudii Nowickiej stanowi oryginalne i bardzo szczegółowe badanie rozkładu ekspresji białka c-Fos w uczeniu apetytywnym i szczegółową analizę zaangażowania ciała migdałowatego w ten proces. Niewątpliwie zastosowanie niekonwencjonalnych metod oraz osiągnięcie postawionych celów, jak również obszerna, wnikliwa dyskusja wyników są mocnymi stronami tej pracy. Pragnę podkreślić, że zawarte w tej recenzji komentarze, uwagi krytyczne czy sugestie nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Nowickiej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Klaudii Nowickiej zatytułowana „Rozkład białka c-Fos w całym mózgu podczas uczenia apetytywnego” 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)”.

Wnoszę zatem do Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Klaudii Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Neurochemii IMDiK PAN

prof. dr hab. n. med. Elżbieta Salmńska

Prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska
Pracownia Neurobiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71 C
60-625 Poznań

Poznań, 4.12.2022

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Klaudii Nowickiej
pt. „Rozkład białka c-Fos w całym mózgu podczas uczenia apetytywnego”
wykonanej w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
pod kierunkiem prof. dr hab. Leszka Kaczmarka i dr Marzeny Stefaniuk**

1. Zasadność podjęcia tematu pracy doktorskiej

Praca doktorska dotyczy uczenia się rozumianego jako zdolność organizmu do zmiany swojego zachowania pod wpływem przebytych doświadczeń. Założenia do podjęcia tematyki badawczej wynikają z faktu, że o ile dość dobrze poznano zmiany neuronalne leżące u podstaw zachowań awersyjnych, to te związane z zachowaniem apetytywnym są mniej zrozumiane. Stąd też głównym celem doktoratu było zmapowanie aktywności neuronalnej prowadzącej do powstania zmian plastycznych w mózgu podczas uczenia apetytywnego. Tematyka doktoratu obejmuje bardzo istotne zagadnienia nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale również tych o potencjalnym aspekcie aplikacyjnym.

Eksperymenty wykonano na modelu mysim, w którym uczenie apetytywne z wykorzystaniem systemu klatek Intelii Cage było oparte na wykształceniu preferencji miejsca do 10% roztworu sacharozy. Natomiast aktywację neuronalną oceniano przy użyciu markera - białka c-Fos i obrazowano w mikroskopie opartym na arkuszu światła. Dokonano również charakterystyki fenotypowej neuronów wykazujących ekspresję c-fos oraz przeprowadzono badania elektrofizjologiczne. Metody są nowoczesne, właściwie dobrane do realizacji celu badawczego i pozwoliły na:

1. Stworzenie mapy mózgu ukazującej wzrost ekspresji c-Fos w około 170 strukturach.
2. Udowodnienie, że najwięcej połączeń neuronalnych z innymi aktywowanymi strukturami wykazuje jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA).
3. Wykazanie, że podczas uczenia się zdarzeń apetytywnych c-Fos ulega ekspresji głównie w neuronach wykazujących ekspresję somatostatyny (SST+) i w niewielkim stopniu wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP+) i parwalbuminy (PV+).
4. Stwierdzenie, że w obrębie SST+ w CeA występują dwie podgrupy charakteryzujących się innymi wzorami potencjałów czynnościowych. Natomiast uczenie apetytywne zwiększa wewnętrzną pobudliwość neuronów SST+, zlokalizowanych w CeA.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktoraka trafnie wnioskuje, że uczenie apetytywne powoduje przebudowę funkcjonalnej architektury mózgu. Wyniki wskazują także na wpływ uczenia apetytywnego na globalną aktywację wielu struktur mózgu. Wykazano również, że CeA jest kluczowe dla uczenia się zdarzeń pozytywnych, poprzez aktywację neuronów SST+.

Badania są nowatorskie i przyczyniają się do zrozumienia mechanizmów dotyczących zmian neuronalnych leżących u podstaw zachowań apetytywnych. Podkreślić należy, że rezultaty uzyskane w zwierzęcym modelu o globalnej aktywności mózgu pod wpływem uczenia apetytywnego znacznie przekraczają rozdzielczość strukturalną w badaniach prowadzonych z udziałem ludzi z użyciem fMRI.

2. Ocena formalna pracy doktorskiej

Opracowanie liczy 134 strony i posiada układ typowy dla pracy doktorskiej, tj. składa się z następujących rozdziałów: wstęp (str 12-24), cele pracy (3/4 strony), materiały i metody (str 26-43), wyniki (str 44-83), dyskusja (str 84-103), podsumowanie i wnioski (1/2 strony), spisu rycin, spisu piśmiennictwa, spisu publikacji własnych, źródła finansowania i załączniki. Praca napisana jest językiem naukowym z dużą dokładnością, zawiera 34 starannie przygotowane ryciny i obejmuje bogate, liczące 261 pozycji piśmiennictwo. Badania zostały sfinansowane ze środków Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - TEAM6-2016 (POIR.04.04.00-00-1ACA/16-00) „Pursuing addiction: appetitive learning and synaptic plasticity in the amygdala”, a kierownikiem projektu jest promotor rozprawy doktorskiej prof. dr hab. Leszek Kaczmarek.

3. Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

We wstępie Autorka przedstawia procesy uczenia się powołując się na eksperymenty opisujące warunkowanie klasyczne i instumnetalne. Z kolei Doktorantka płynnie przechodzi do zagadnień plastyczności synaptycznej konkludując, że zakłócenie mechanizmów leżących u podstaw adaptacji do pozytywnych lub negatywnych bodźców środowiskowych może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób psychicznych. Pani mgr Klaudia Nowicka podaje również przykład rozwoju uzależnień, w którym sygnały środowiskowe nie zawsze wywołują zachowania adaptacyjne. Ze względu rosnący problem występowania zaburzeń psychicznych oraz uzależnień tematyka badawcza poruszana w doktoracie jest bardzo ważna. Zrozumienie mechanizmów neuronalnych uczestniczących w przetwarzaniu emocji apetytywnych może przyczynić do opracowania nowych metod terapii leczenia tych zaburzeń. Z kolei Doktorantka przechodzi do omówienia molekularnego podłoża procesu uczenia się podkreślając znacznie badań z wykorzystaniem aktywacji tzw. genów odpowiedzi wczesnej (ang. immediate early genes, IEGs) będących markerami plastyczności synaptycznej skupiając się głównie na c-fos. Wybór ten podyktowany jest wcześniejszymi doniesieniami grupy badawczej pod kierunkiem prof. Kaczmarka, która wykazała, że aktywacja c-fos zachodzi w odpowiedzi na działanie zarówno bodźców apetytywnych, jak i awersyjnych. Doktorantka przytacza dobrze dobrane przykłady badań wskazujących na związek między ekspresją c-Fos, a plastycznością synaptyczną wywołaną działaniem różnorodnych bodźców oraz procesami uczenia się. W ostatniej części wstępu Autorka przedstawia metody stosowane do mapowania aktywności mózgu. Podkreślony został problem ograniczonej rozdzielczości obrazu w badaniach funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI), który nie pozwala na pomiar aktywności neuronalnej na poziomie komórkowym. Stąd też Doktorantka skupia się na mikroskopii świetlnej, konfokalnej i dwufotonowej oraz omawia potęgę w metodach zautomatyzowanego obrazowania całych mózgów, połączonych z optycznym oczyszczaniem tkanek. To wprowadzenie pozwala Autorce przejść do techniki używanej w doktoracie a mianowicie metody umożliwiającej obrazowanie całych struktur anatomicznych w wymiarze 3D i 4D. przy zachowaniu wysokiej rozdzielczości obrazu tj. mikroskopii opartej na arkuszu światła (LSFM, ang. light sheet fluorescence microscopy).

Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że wstęp napisany jest w zwięzły i ciekawy sposób. Autorka przedstawia zagadnienia będące tematyką doktoratu powołując się na obszerną literaturę. Dodatkowo zamieszczone ryciny ułatwiają czytanie tekstu.

Cele pracy (3/4 strony) są jasno przedstawione. Głównym celem doktoratu było zmapowanie za pomocą znakowania c-Fos obszarów mózgu, w których dochodzi do zainicjowania procesu plastyczności synaptycznej wywołanej uczeniem apetytywnym. Dodatkowo wyznaczono 4 szczegółowe cele:

1. Stworzenie globalnej mapy struktur mózgowych wykazujących ekspresję białka c-Fos podczas treningu apetytywnego.
2. Wytypowanie kluczowych struktur zaangażowanych w proces uczenia apetytywnego.
3. Identyfikacja poszczególnych typów neuronów wykazujących ekspresję białka c-Fos w odpowiedzi na uczenie apetytywne.
4. Charakterystyka fizjologicznych cech wyselekcjonowanych typów neuronów oraz zachodzących w nich zmian pobudliwości podczas uczenia apetytywnego.

Materiały i metody Ten rozdział został przygotowany szczegółowo i zawiera opis poszczególnych metod stosowanych w pracy, który zaopatrzony jest w szereg figur umożliwiających zrozumienie przebiegu doświadczeń. Lektura tej części pracy skłania do zadania pytania w kontekście informacji zawartych w materiałach i metodach - str. 26 „Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były z wykorzystaniem myszy w wieku od 8 do 12 tygodni”. Czy badania przeprowadzone zostały na samcach ?

Wyniki zostały przedstawione w jasny sposób i są bogato ilustrowane rycinami. Do tej części rozprawy doktorskiej mam kilku pytań:

1. W jaki sposób dokonywano oceny wielkości „n” w poszczególnych eksperymentach, np. z opisu treningu apetytywnego (str 45) w klatce IntelliCage wynika, że n=6, natomiast w eksperymencie mapowania ekspresji c-Fos w mózgu po treningu apetytywnym - grupa kontrolna n=4, a doświadczalna n=6.
2. Str 60, ryc 21 D - w opisie ryciny brak wyjaśnienia co oznaczają poszczególne kolory (oprócz różowego – tj. projekcji wysyłanej do CeA.)
3. Str 65 „Jądra komórkowe, które wykazywały ekspresję białka c-Fos zaznaczano i zliczano w programie ImageJ.” Czy Doktorantka mogłaby przedstawić szczegóły dokonania tej analizy, gdyż liczba komórek wykazujących ekspresję c-Fos w niektórych przypadkach była bardzo duża. Czy brano pod uwagę w analizie tzw. „tło” (ang. background) i z jakiego obszaru mózgu?

Dyskusja rozpoczyna się podsumowaniem wyników i wnioskami. Pierwsza część dyskusji (str 85) jest powtórzeniem wcześniej przedstawionych treści w rozdziale materiały i metody i mogłaby zostać

pominięta. W dalszej części Doktorantka podaje przykłady badań z zastosowaniem mapowania przy użyciu c-fos potwierdzające zasadność zastosowania tego markera, połączonego z obrazowaniem w mikroskopie LSM do mapowania plastyczności mózgu w celu wyjaśnienia wielu paradygmatów behawioralnych.

Poniżej zamieszczam kilka uwag i pytań do Dyskusji:

1. Str 86. Szczególnie zainteresowało mnie doniesie literaturowe „Wykazano, że odstawienie środków psychostymulujących powoduje zmiany w strukturze sieci neuronalnej, w tym wzrost łączności funkcjonalnej między regionami mózgu (Kimbrough i in., 2021).” Czy Doktorantka mogłaby szerzej je skomentować w odniesieniu również do wyników badań własnych prezentowanych w doktoracie.
2. Autorka na str 89 napisała: „Wysoco prawdopodobne jest, że nawet odległe struktury, w odpowiedzi na trening uczenia apetytywnego tworzą nowe sieci funkcjonalne niezbędne do powstania śladów pamięciowych.” Czy Doktorantka mogłaby rozwinąć tę myśl o jakie konkretnie struktury chodzi ?
3. Na str 89-90 Doktorantka napisała „Biorąc pod uwagę podobieństwo procesu uczenia apetytywnego do procesu powstawania uzależnień, zidentyfikowanie określonych obszarów neuronalnych może być potencjalnie wykorzystane do leczenia za pomocą technik stymulacji mózgu.” Czy mogę prosić o rozwinięcie tego stwierdzenia i podanie konkretnych przykładów.
4. Str. 91 „CeA posiada także bogate połączenia wychodzące do regionów pnia mózgu oraz podwzgórza, które także pośredniczą w określonych oznakach strachu i niepokoju. Warto wspomnieć, że regiony te odpowiedzialne są za występowanie reakcji motorycznych związanych ze stresem, m.in. reakcja zamierania (ang. freezing)”. Proszę o komentarz odnośnie znaczenia reakcji zamierania w sytuacji stresowej ?

Podsumowanie i wnioski Ta część zawiera 3 jasno sformułowane wnioski wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych i opisanych w pracy badań, które brzmią następująco:

1. Uczenie apetytywne wywołuje globalny wzrost plastyczności synaptycznej w całym mózgu oraz przebudowę architektoniczną sieci funkcjonalnych o czym świadczy wzrost ekspresji białka c-Fos w wielu, często znacznie od siebie oddalonych strukturach mózgowych.

2. Jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA) może pełnić istotną rolę w przetwarzaniu zdarzeń apetytywnych poprzez liczne połączenia neuronalne z innymi aktywowanymi uczeniem apetytywnym strukturami.
3. Populacją neuronów CeA potencjalnie zaangażowanych w uczenie apetytywne są neurony SST+, które w wyniku treningu wykazują zwiększoną ekspresję c-Fos. Ponadto, wykazano, że pod wpływem uczenia się zdarzeń pozytywnych zwiększa się pobudliwość neuronów SST+ zlokalizowanych w CeA.

4. Uwagi edycyjne, językowe i inne

Tekst rozprawy doktorskiej napisany jest z dużą starannością. Poniżej przedstawiłam tylko drobne uchybienia, które nie obniżają jakości pracy:

- W streszczeniu należało wprowadzić pełne nazwy dla skrótów: VIP+, PV+ i SST+.
- Str. 24 – niepotrzebna „.” po (Renier i in., 2014).
- Str. 46 w opisie ryc. 13 „***p<0,001” natomiast na rycenie nie ma tego symbolu
- Str. 53 W zadaniu zacynającym się od: „ Na Rycinie 19C widoczne jest 19 struktur.....” powinien być odstęp pomiędzy 19 i C
- Str. 53 „Rycina 19 G przedstawia 1 strukturę, która jest częścią gałki bladej. Przedstawiona analiza pokazuje, że zastosowanie techniki obrazowania całego mózgu umożliwia jednocześnie zaobserwowanie zmian aktywności neuronalnej w wielu obszarach mózgu, wywołanych treningiem apetytywnym.” W dwóch kolejnych zdaniach umieszczono słowo „przedstawia” i „przedstawiona”. Można jedno z nich zastąpić sformułowaniem pokazuje lub obrazuje.
- Str. 53 „W kolejnej grupie znajdowały się struktury należące do grupy jąder wzgórza związanych z polimodalną korą asocjacyjną: jądro śródbłonkowe wzgórza grzbietowego (ILM), jądro przyśrodkowo- grzbietowe (MD), Perireunensis nucleus (PR), Jądro podprzyśrodkowe...” brak jednoznaczności – jądro napisano z małej a w innym przypadku z dużej litery.
- Str. 64, opis ryciny 23 W legendzie jest wartość *p<0,05 a nie ma jej na rycinie. To samo dotyczy ryc. 25, ryc. 26, ryc. 28.
- Str. 65 Po „zgodnie z atlasem mózgu Allen Brain Atlas,” Niepotrzebny jest „ , ”
- Str. 85 W zadaniu „Za pomocą profilowania molekularnego wykazano, że deprywacja pokarmowa powoduje aktywację ekspresji c-Fos w wielu regionach mózgu, takich jak: śródmózgowie, wzgórze oraz niektóre podregiony podwzgórza.” Może lepszej w tym przypadku zastosować określenie jądra podwzgórza a nie podregiony.

- Str. 99 Niepotrzebna spacja po CeA a przed „ , ” w zdaniu „Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na to, że neurony SST+ zlokalizowane w CeA , mogą pełnić istotną rolę w uczeniu się zdarzeń apetytywnych”.
- Str. 101 W zadaniu: „Pobudliwość wewnętrzna jest formą plastyczności neuronalnej, która może ulegać zmianom podczas procesu uczenia się” powinno być może (a nie może).

5. Dorobek naukowy Doktorantki

W pracy doktorskiej przedstawiono spis publikacji własnych obejmujący 3 oryginalne prace twórcze, które tworzą dorobek publikacyjny Doktorantki:

1. Puścian A., Winiarski M., Borowska J., Łęski S., Górkiewicz T., Chaturvedi M., **Nowicka K.**, Wołyniak M., Chmielewska JJ., Nikolaev T., Meyza K., Dziembowska M., Kaczmarek L., Knapska E. (2022). Targeted therapy of cognitive deficits in fragile X syndrome. *Molecular Psychiatry*. 27(6):2766-2776.
2. Salamian A., Legutko D., **Nowicka K.**, Badyra B., Kaźmierska-Grębowska P., Caban B., Kowalczyk T., Kaczmarek L., Beroun A. (2021). Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 Activity Promotes Synaptogenesis in the Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 31:6.
3. Lenart J., **Kogut K.**, Salinska E., (2017). Lateralization of housekeeping genes in the brain of one-day old chicks. *Gene Expression Patterns*. 25-26:85-91.

W pierwszej z nich Doktorantka jest 7 spośród 14 autorów, w drugiej 3 spośród 9 autorów i w trzeciej 2 spośród 3 autorów. Powyższe artykuły nie dotyczą bezpośrednio tematyki doktoratu. Przedstawiony dorobek oceniam jako dobry. Jako że w żadnej z powyższych publikacji Doktorantka nie jest pierwszą autorką, nie można wnioskować o wiodącym wkładzie w powstanie tych artykułów. Stąd moje pytanie o konkretny wkład Doktorantki w powstanie tych publikacji. Czy Doktorantka zamierza opublikować wyniki doktoratu ? Jeśli tak to w jakich czasopismach i jaka będzie Jej pozycja w liście autorów ? Ponadto prosiłabym o informacje o wkładzie Doktorantki w przeprowadzeniu prezentowanych w pracy doktorskiej badań. Proszę również o udzielenie odpowiedzi na pytanie jaki był wkład intelektualny, jeśli chodzi o sformułowanie celów zadań doktoratu. Czy Doktorantka brała udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych i prezentowała wyniki badań? Czy Pani mgr Nowicka podjęła działania w celu aplikowania o granty naukowe ?

6.Podsumowanie

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr mgr Klaudii Nowickiej pt. „Rozkład białka c-Fos w całym mózgu podczas uczenia apetytywnego” spełnia wymagania 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). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc po uwagę wysoki poziom przedłożonej mi do recenzji pracy, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Nowickiej.



prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska

INSTITUTE OF PSYCHIATRY AND NEUROLOGY.
Dept. Neurochemistry. 9 Sobieskiego str., 02-957
WARSAW, POLAND. Tel.+48 (22) 4582509. Fax +48
(22) 4582771 E-mail: taracha@ipin.edu.pl



INSTYTUT PSYCHIATRII I NEUROLOGII
Zakład Neurochemii. Ul. Sobieskiego 9, 02-957
WARSZAWA, POLSKA. Tel. +48 (22) 4582509. Fax
+48 (22) 4582771 E-mail: taracha@ipin.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Klaudii Nowickiej

**pt.: Rozkład białka c-Fos w całym mózgu podczas uczenia
apetytywnego**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Pracowni Neurobiologii Instytutu
Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR: Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek

PROMOTOR pomocniczy: Dr Marzena Stefaniuk

Praca dotyczy badania procesów zaangażowanych w uczenie apetytywne. Uczenie pozwala na przystosowanie się do warunków środowiska. Nabycie odpowiedniej reakcji na bodźce apetytywne (np.: pokarm) czy awersyjne (np.: drapieżnik), prowadzące do poszukiwania lub unikania zdarzeń korzystnych i niekorzystnych, zwiększa szanse na przeżycie. Zaburzenia w tym zakresie mogą prowadzić do takich chorób jak depresja czy zachowania kompulsywne. W badaniach podstawowych dość dobrze poznaliśmy efekty uczenia się na poziomie behawioralnym, znacznie mniej wiemy o tym procesie na poziomie neurobiologicznym. Dlatego należy uznać, że niniejsza rozprawa podejmująca próbę określenia obszarów mózgu, w których uczenie wywołane bodźcem apetytywnym inicjuje zmiany neuroplastyczne jest uzasadniona.

Doktorantka jest współautorką 3 publikacji nie opartych na wynikach przedstawionej pracy doktorskiej. Praca liczy 134 strony, 11 rozdziałów, 2 załączniki. Zacytowano 261 pozycji literatury.

We **wstępie** omówiono wpływ bodźców awersyjnych i apetytywnych na zachowanie zwierząt oraz rolę genów szybkiej odpowiedzi komórkowej (w szczególności genu *c-fos*) w indukcji plastyczności synaptycznej leżącej u podstaw uczenia się. Dużo miejsca poświęcono zagadnieniom technicznym, takim jak metody obrazowania aktywacji mózgu, porównano stosowanie mapowania za pomocą mikroskopii opartej na arkuszu światła z fMRI, bardzo szczegółowo omówionym proces oczyszczania tkanki. Brakuje natomiast jakiejkolwiek wzmianki na temat elektrofizjologii. Przydałoby się nieco wiadomości na temat, co wnoszą badania elektrofizjologiczne w rozwiązywanie zagadnień związanych z tematyką niniejszej rozprawy, jakich informacji dostarczają wykorzystywane w tej pracy pomiary poszczególnych parametrów czy też zastosowania pomiarów pobudliwości wewnętrznej jako innej formy oceny plastyczności neuronalnej. Wydaje się, że doktorantka mylnie utożsamia pojęcia asocjacyjny i apetytywny (str 12 i str 14). „*W zależności od charakteru bodźca ludzie i zwierzęta mogą przejawiać wobec niego zachowania asocjacyjne (apetytywne) lub awersyjne*”

Cele: ich przedstawienie nie budzi zastrzeżeń

Materiały i metody: Robi wrażenie poziom użytych technik. W części behawioralnej zastosowano system klatek IntelliCage pozwalający na automatyczne i precyzyjne śledzenie zachowania poszczególnych myszy podczas uczenia apetytywnego i awersyjnego. Do detekcji białka c-Fos użyto zaawansowanych technik obrazowania mózgów w mikroskopie opartym na arkuszu światła oraz w mikroskopie konfokalnym. Pozytywnie należy również ocenić nawiązanie współpracy z Laboratorium Neuroinformatyki co pozwoliło na pełniejsze wykorzystanie otrzymanych wyników. Także współpraca z Pracownią Elektrofizjologii, wniosła istotny wkład w prezentowane badania. Obszerne opisy metod ilustrowane zdjęciami i schematami pozwalają na ich zrozumienie, co jest istotne, ponieważ jak wspomniałam przynajmniej niektóre z nich nie należą do powszechnie dostępnych. Ilustracja poszczególnych etapów np.: obróbki obrazów w celu uzyskania trójwymiarowych map aktywacji c-Fos w mózgu pozwala na śledzenie przebiegu prowadzonego procesu.

W rozdziale tym brakuje zwyczajowo zamieszczanych w publikacjach podrozdziałów o stosowanych metodach statystycznych i użytych odczynnikach (np. nie udało mi się znaleźć informacji jakie i w jakim rozcieńczeniu p-ciała II-rzędowe stosowano). Przy opisie zwierząt korzystne byłoby podanie jakie myszy były używane w poszczególnych doświadczeniach. Schemat z zestawieniem wszystkich wykonanych doświadczeń ułatwiłby śledzenie powiązań między kolejnymi etapami badań. Wybór metod jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń

Str 36 i 37 dwa rozdziały mają nr 3.3.6

Wyniki: W tym rozdziale zamieszczono zarówno wykresy przedstawiające otrzymane wyniki, jak również zdjęcia pozwalające ocenić wysoką jakość otrzymanych preparatów. Jednak część umieszczonych tu opisów np.: te ilustrowane na ryc. 12, 14 powinna być w metodach. Rozdział ten zawiera sporo powtórzeń, niepotrzebne jest np.: wielokrotne powtarzanie opisu doświadczenia szczegółowo omówionego poprzednio w Materiałach i metodach.

Proszę o wyjaśnienie/poprawienie:

- Wielokrotnie doktorantka stwierdza, że dane miały rozkład normalny. Jak sprawdzano normalność rozkładu?

- Co autorka przedstawiła na ryc. 13: w tekście (powtórzone również w podpisach pod rysunkami) podano, że wizyty i puknięcia nosem przedstawiono jako % po udostępnieniu sacharozy w stosunku do wartości przed. Co w takim razie przedstawiają dane w słupku przed treningiem? % czego? A jeżeli to ilości przed treningiem, to gdzie grupa kontrolna? Napisano, że są to % a nie uwzględniono tego w podpisie osi. Autorka podaje statystykę dla różnic między grupami a na ryc. 13 zaznaczono różnice przed i po treningu.

-Prezentacja wyników: zwyczajowo podajemy wartość funkcji testowej a dla p na ogół nie podajemy konkretnych wartości tylko określamy przedział, (tzn. $p < 0,05$; $p < 0,01$ lub $p < 0,001$). Nie jest błędem podanie wartości p ale autorka stosuje naprzemiennie te dwie metody. Proponuję to ujednolicić w całej pracy. W wielu przypadkach brakuje wartości funkcji testowej dla testów t-Studenta, Manna-Whitney'a, Kolmogorova-Smirnova. W załączniku 1 również wskazane byłoby podanie wartości funkcji testowej.

-Pominięto 4.2 w numeracji rozdziałów.

-W legendzie do ryc. 17 nie podano co oznaczają 2 gwiazdki, a w legendzie do ryc. 16 podano opis dla 1, 2 i 3 gwiazdek, mimo, że na wykresie występują tylko 1 i 2 gwiazdki.

-Str 51/52 i powtórnie na str 57 podano : $(-\log_{10}(0.05) = 1.3)$ oraz bez podania podstawy ($\log(2) = 0.7$). W podpisie osi x na ryc. 18, gdzie przedstawiono te dane, podano, że jest to log o podstawie 2, ale $\text{Log}_2(2)=1$ a nie 0,7. Proszę o wyjaśnienie nieścisłości. Jakie jest uzasadnienie stosowania na jednym wykresie na osi y $\log_{10}$ a na osi x $\log_2$? W polskim tekście jako separator dziesiętny powinien być używany przecinek a nie kropka.

-Wskazane byłoby podanie, czy liczba jąder Fos+ odnosi się do jednostki powierzchni czy do całej struktury.

-Str 66 (dwa razy), str 72 (dwa razy) i w podpisie pod ryc. 28 doktorantka napisała, że stosowała ANOVA dla powtarzanych pomiarów. Proszę o podanie co było czynnikiem powtarzanych pomiarów.

Rozdział 4.6: Opis wyników w tym rozdziale jest dla mnie niezrozumiały : Doktorantka pisze:

”Dane dotyczące aktywności zwierząt przedstawiono jako liczba zarejestrowanych wizyt oraz *nosepoke* w rogu warunkowanym awersyjnie, w stosunku do sumy wizyt i puknięć nosem we wszystkich rogach”. Co ma to obrazować? Gdzie są te wyniki? Dalej podano, że zastosowano 2 grupy kontrolne, tymczasem dla behawioru podano wyniki tylko dla grupy badanej (ryc. 23). Jak się zachowywały myszy z grupy kontrolnej i te które miały dostęp do sacharozy? Tak samo? W podpisie do ryc. 23, podobnie jak poprzednio do ryc. 13 podano, że wyniki przedstawiono jako „procent wizyt do najczęściej uczęszczanego rogu, przed i po otrzymaniu w nim dmuchnięcia sprężonym powietrzem”. Co w takim razie przedstawiają dane w słupku przed treningiem? % czego? A statystyka jest podana dla liczby wizyt przed i po treningu.... Dlaczego w takim razie nie zastosowano testu dla prób zależnych....Wartość funkcji statystycznej dla testu t-Studenta na ogół oznacza się literą t. Doktorantka również w innych miejscach (np. rozdz. 4.1, 4.7), o ile podaje wartość funkcji testowej dla testu t-Studenta, podaje ją jako $F(x,y)$. Co to oznacza? Co oznaczają indeksy? W rozdziale 4.6 dla wizyt doktorantka podaje: $(F(7,7)=6,8, p=0,0001, n=8)$ a dla puknięć nosem: $(F(7,7)=20,75, p=0,0024, n=8)$. Jak to możliwe, że dla trzykrotnie większej wartości funkcji testowej, przy tej samej liczbie prób jest znacznie większe p?

-Str 72 reprezentatywne zamiast reprezentacyjne pomiary byłoby lepiej

-Str 73 ryc. 28 błędy w podpisie: na ryc. jest A, B i C w podpisie A, C i D

-białko c-Fos wchodzi w skład czynnika transkrypcyjnego ale samo nie jest czynnikiem transkrypcyjnym jak napisano na str 85.

Dyskusja: Dyskusja liczy 20 stron, zawiera liczne cytowania. Początkowa część dyskusji (5.1-5.3) jest opisowa, omówiono w niej chyba zbyt szczegółowo badania wykorzystujące podobne techniki, zmiany ekspresji białka c-Fos wywołane bardzo różnorodnymi, często odległymi od stosowanych w tej pracy, procedurami doświadczalnymi. Niektóre fragmenty są niepotrzebne lub powinny być umieszczone w innym rozdziale lub były już opisane, np. warunkowanie Pawłowa (tu niepotrzebne i już przednio opisane). Wymieniane są uzyskane wyniki, omówione szczegółowo dane literaturowe dotyczące znaczenia funkcjonalnego najsilniej aktywowanych struktur niekoniecznie w kontekście tej pracy. W powodzi czasami zbędnych lub podanych już wcześniej informacji gubi się główny wątek. W prezentowanych badaniach otrzymano ogromną ilość danych. Mam świadomość, że uwzględnienie ich wszystkich w analizie nie jest łatwe, tym bardziej należy pozytywnie ocenić skutki współpracy z Pracownią Neuroinformatyki. Jak pisze doktorantka, „globalne podejście do profilowania aktywności c-Fos w mózgu dostarcza informacji o poszczególnych strukturach jak i obwodach neuronalnych, które mogą brać udział w procesowaniu zdarzeń apetytywnych”. Czy zostało to w pełni wykorzystane? Czy z otrzymanych wyników można uzyskać więcej informacji? Doktorantka wymieniła najsilniej aktywowane struktury, np.: wykazano, że 6 struktur otrzymuje projekcje z CeA, 19 wysyła projekcje do CeA a 11 zarówno otrzymuje jak i wysyła projekcje do tej struktury. Jest ponad 3 krotnie więcej struktur wysyłających projekcje z CeA niż otrzymujących. Czy to ma znaczenie w kontekście badanej roli CeA w procesie uczenia apetytywnego? Czy istnieją jakieś powiązania z jądrem półleżącym uważanym za strukturę istotną dla odczuwania przyjemności? Doktorantka powołuje się na piśmiennictwo, w którym wykazano, że „pamięć jest rozłożona na wiele, często oddalonych od siebie obszarów mózgu, które są ze sobą połączone funkcjonalnie i określane jako kompleks engramów”. Jakie są zależności funkcjonalne między obszarami, które wykazywały największą aktywację a w szczególności czy są jakieś związki funkcjonalne w obrębie struktur wysyłających, otrzymujących bądź otrzymujących i wysyłających projekcje? Wydaje się, że podczas przygotowywania publikacji korzystne byłoby uwzględnienie zależności funkcjonalnych i szlaków neurotransmisyjnych łączących te najsilniej aktywowane

struktury.

Dużo lepiej poprowadzona jest druga część dyskusji dotycząca charakterystyki neuronów CeA, struktury będącej w centrum uwagi w prezentowanych badaniach (5.4-5.6). Wywód w sposób logiczny prowadzi poprzez wyniki kolejnych doświadczeń mających na celu zidentyfikowanie typu neuronów zaangażowanych w proces uczenia apetytywnego, ich lokalizację w obrębie CeA, charakterystykę elektrofizjologiczną podtypów neuronów oraz zmiany wywołane treningiem.

Praca zawiera sporo błędów ale doktorantka zastosowała nowoczesne, zaawansowane techniki, uzyskała wyśmienitą jakość preparatów i interesujące wyniki. Globalne podejście do profilowania aktywności c-Fos dało unikalną możliwość zidentyfikowania obszarów istotnych dla uczenia apetytywnego w całym mózgu, wytypowanie CeA jako struktury kluczowej dla przetwarzania odpowiedzi neuronalnej indukowanej tym typem uczenia a badania elektrofizjologiczne dostarczyły dodatkowo charakterystyki neuronów CeA. Uważam, że w przedstawionej rozprawie założone cele zostały zrealizowane.

W związku z tym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska pani mgr Klaudii Nowickiej 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 powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Ewa Taracha

Warszawa, 12.12.2022

Instytut Psychiatrii i Neurologii
ZAKŁAD NEUROCHEMII
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9

Dr hab. n. med. Ewa Taracha
adiunkt