Dr hab. Łukasz Chrobok

Lecturer in Neuroscience
sir Henry Wellcome Postdoctoral Fellow
School of Physiology, Pharmacology, and Neuroscience
Faculty of Life Sciences
University of Bristol
Biomedical Sciences Building,
Tankard's Cl, University Walk, Bristol BS8 1TD
email: lukasz.chrobok@bristol.ac.uk
tel: +44 07915 735 825

Bristol, 09/11/2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Łukasza Bijocha

pt.: Przetwarzanie informacji o nagrodach naturalnych i famakologicznych w mózgu myszy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Pracowni Plastyczności Neuronalnej oraz Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, pod kierunkiem promotora – pana prof. Leszka Kaczmarka, oraz promotora pomocniczego – pani dr Anny Beroun. Praca doktorska wpisuje się w tematykę badawczą obu Pracowni, a przedstawione w niej wyniki stanowią oryginalny wkład w poznanie mechanizmów przetwarzania informacji o nagrodach, z istotnym rozróżnieniem na nagrody naturalne (cukier) oraz farmakologiczne (na przykładzie kokainy). Wyniki przedstawione w rozprawie rozstały wcześniej opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach naukowych, na łamach prestiżowych czasopism *Translational Psychiatry* oraz *Cell Reports*; w obu tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Badania finansowane były z trzech różnych źródeł, w tym grantu Preludium 19, w którym Doktorant był kierownikiem. Warto podkreślić, że umiejętność zdobycia własnego finansowania na tak wczesnym etapie kariery, a także prowadzenia i w końcu rozliczenia własnego projektu badawczego, które Łukasz zdecydowanie opanował, są bardzo cenionymi cechami młodego naukowca.

Rozprawa zapisana na 178 stronach została sporządzona w języku polskim i składa się z ośmiu logicznie rozplanowanych części: dogłębnego wprowadzenia, określenia celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania, bibliografii, oraz opisu dorobku naukowego Doktoranta. Główne części pracy zostały poprzedzone usystematyzowanym i przejrzystym spisem treści, streszczeniem w języku polskim i angielskim, oraz bardzo przydatnym w lekturze pracy wykazem stosowanych skrótów. Praca została opatrzona pięcioma tabelami, 51 wysokiej jakości rycinami, oraz 237 pozycjami literaturowymi, w doskonałej większości z ostatnich 5 lat. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na

wyróżniający się dorobek naukowy Doktoranta świadczący o jego dojrzałości naukowej. Łukasz jest pierwszym autorem 2 publikacji wchodzących w skład rozprawy, a ponadto pierwszym autorem 4 i współautorem 6 kolejnych prac z różnych ośrodków naukowych w Polsce i w Stanach Zjednoczonych. Pokazuje to, że Łukasz jest dynamicznym i mobilnym młodym naukowcem o wysokich perspektywach dalszego rozwoju naukowego.

Wartość merytoryczną pracy oceniam bardzo wysoko. We wstępie Autor rozprawy przedstawił wyczerpujący opis rodzaju nagród i znanych mechanizmów ich działania na aktywność ośrodkowego układu nerwowego, oraz przegląd literatury na temat układu nagrody. Doktorant trafnie rozpoznaje dwa odrębne mechanizmy nagradzającej wartości pożywienia (cukru): poprzez receptory na języku (smak) oraz chemoreceptory w jelicie (produkty trawienia). W tym miejscu zabrakło może krótkiego omówienia prac dotyczących neuronalnego obwodu przekazującego nagradzające właściwości cukru z jelita do układu nagrody w mózgu. Byłoby to ciekawe w dalszej anatomicznej interpretacji wyników zaprezentowanych w rozprawie. W kolejnej części Łukasz skupił się na dokładnym omówieniu anatomii i roli ciała migdałowatego – struktury mózgu, na której szczególnie skupiły się badania przedstawione w pracy. Niewielką nieścisłością wydaje się jednak uproszczenie, jakoby receptory D1 zawsze zwiększały pobudliwość neuronów (str. 25), gdy dalej Autor nadmienia, że w jądrach wtrąconych aktywacja D1DR powoduje hyperpolaryzację błony komórkowej (str. 30). Dalej, Doktorant wprowadza metody objętościowe obrazowania mózgu, co uważam za bardzo przydatne do zrozumienia potrzeby zastosowanych dalej metod. Wprowadzenie kończy rozdział dedykowany plastyczności synaptycznej z bardzo ciekawym omówieniem pojęcia milczących synaps. Warto tu podkreślić, iż mimo moich komentarzy, wprowadzenie stanowi ciekawy, logicznie poprowadzony i spójny przegląd danych literaturowych, który bez wątpienia **prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie nauk biologicznych**.

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Doświadczenia zostały starannie zaplanowane co pozwoliło na zrealizowanie zamierzeń badawczych. Niewątpliwie, dużą rolę odegrał tu dobór szerokiego wachlarza metod. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że opanowanie przez Doktoranta metod behawioralnych, inżynierii chemogenetycznej, metod elektrofizjologicznych, immunohistochemicznych, a przede wszystkim skomplikowanych metod oczyszczania całych mózgów i ich obrazowania jest bardzo imponujące. Świadczy to o tym, że osoba ubiegająca się o nadanie stopnia doktora **wykazuje umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej.** W mojej opinii w rozdziale 3.2. *Mysie modele badawcze* zabrakło informacji o wieku i płci badanych myszy. Jako chronobiolog muszę nadmienić, że ważną dla interpretacji wyników informacją byłoby tu również określenie, czy eksperymenty były przeprowadzone w fazie jasnej (nieaktywnej), czy ciemnej (kiedy to myszy C57BL/6 wykazują aktywność behawioralną). Podobnie, w jaki sposób i kiedy była prezentowana nagroda: czy prezentacje były losowe w czasie dobowym, czy może

przeprowadzane codziennie o tej samej godzinie. Nawet u zwierząt bez restrykcji pokarmowej, rytmiczny dostęp do nagradzającego pokarmu powoduje aktywację sieci struktur mózgowych, zwanych oscylatorem regulowanym pokarmem (ang. Food-Entrainable Oscillator, FEO), co skutkuje w nich ekspresją genu *c-fos* już w antycypacji nagradzającego bodźca pokarmowego.

Ocena recenzencka wyników przedstawionych w rozprawie była bardzo prosta, gdyż zostały one już opublikowane w dwóch artykułach na łamach prestiżowych czasopism o wysokim współczynniku wpływu. W skrócie, w doświadczeniach przedstawionych w rozprawie doktorskiej Doktorant stosuje dwa mysie modele ekspozycji na nagrody, aby sprawdzić, czy nagrody naturalne i farmakologiczne są kodowane przez te same części mózgu. Badania zostały przeprowadzone na trzech poziomach organizacji: na poziomie całego mózgu, pojedynczej struktury (ciała migdałowatego), oraz pojedynczych populacji neuronalnych wyróżnionych na podstawie ekspresji receptorów dopaminowych DRD1 i DRD2. Po pierwsze, Autor wskazuje, że zarówno cukier, jak i kokaina powoduje aktywacje rozległych obszarów mózgu i wysnuwa prawidłowy wniosek, że świadczy to o rozproszonym charakterze przetwarzania informacji przez układ nerwowy. Dodatkowo, Doktorant obserwuje ciekawe różnice pomiędzy ekspozycją na nagrodę naturalną i farmakologiczną, szczególnie w przebiegu odpowiedzi (istotna zmiana modułowości mózgu po jednokrotnej ekspozycji na cukier vs zwiększenie siły odpowiedzi w przypadku wielokrotnej ekspozycji na kokainę). W tym miejscu pojawia się pytanie, czy gęstość komórek c-Fos+ jest najlepszym parametrem w przypadku normalizacji liczby aktywowanych neuronów – np. aktywacja nieznacznej liczby komórek bardzo komórkowo-gęstych struktur mózgowych jakich jak jądra nadskrzyżowaniowe w tej metodzie dobrze korelowałoby z aktywacją wszystkich komórek relatywnie komórkowo-rzadkiej kory. Ponadto, w swojej pracy Autor pokazuje, że zarówno kokaina jak i cukier angażują w swojej odpowiedzi jądro środkowe ciała migdałowatego. Bardzo silnym dowodem na to twierdzenie jest kolejny eksperyment przedstawiony w pracy, który wskazuje, że chemogenetyczna manipulacja aktywnością tej struktury zaburza nagradzającą wartość cukru oraz opóźnia efekty behawioralne wywołane kokainą. Wyniki te zostały następnie wzmocnione przez eksperymenty elektrofizjologiczne *ex vivo*. Podsumowując, ten logiczny i dobrze zaprojektowany ciąg trudnych technicznie doświadczeń, poparty wartościowymi wynikami, pozwala bez wątpienia na ocenę pracy jako **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**.

Analiza statystyczna wyników jest ogólnie przeprowadzona prawidłowo, jednak chciałbym prosić o komentarz Doktoranta w następujących kwestiach. Zgadzam się, że Doktorant prawidłowo dokonał wyboru podstawowej jednostki eksperymentalnej ('n' jako zwierzę, raczej niż skrawek, czy pojedyncza komórka). Jednakże, w przypadku wielokrotnych eksperymentalnych powtórzeń w obrębie jednego zwierzęcia, Autor postanowił przeprowadzić testy statystyczne na wynikach uśrednionych. Jak wspominam powyżej, nie

jest to błąd statystyczny, jednak metoda ta gubi informację o zróżnicowaniu czy też odchyleniu standardowym w obrębie każdego zwierzęcia. Jestem ciekaw, czy Doktorant mógłby zaproponować lepszą metodę na rozwiązanie tego problemu, a tym samym inny model statystyczny, jeśli miałby przeprowadzać podobne 'zagnieżdżone' eksperymenty w przyszłości. Chciałem też podkreślić, że w przypadku raportowania wyników dwuczynnikowego testu ANOVA bardzo informatywne jest podawanie wartości interakcji między czynnikami głównymi, oraz wyników testów post-hoc (szczególnie interesujące byłoby poznać wyniki takich testów dla grupy 'cukier 1d', np. na rycinie 20, czy interakcji na rycinie 40). Na rycinach 22, 44, i 46 Autor przedstawia dane w formie wykresów kołowych czy udziałów procentowych. Wartościowych informacji dostarczyłyby wyniki testów statystycznych porównujących te rozkłady. Te drobne niedociągnięcia statystyczne, czy uwagi do rozważenia przy planowaniu przyszłych eksperymentów, w żaden sposób **nie obniżają mojej wysokiej oceny wartości naukowej wyników przedstawionych w rozprawie**.

Dyskusja wyników została przeprowadzona logicznie, przejrzyście, zrozumiale i wskazuje na naukową dojrzałość Doktoranta. Na szczególną uwagę zasługują jasno postawione wnioski i świetna rycina podsumowująca najważniejsze wyniki pracy.

Z obowiązku recenzenta muszę przytoczyć niedociągnięcia edytorskie zawarte w pracy. Jednak warto pamiętać, że przy takiej objętości (178 stron) naprawdę nie da się ich uniknąć. We wstępie na str. 19 pochodzenie kokainy powinno być przypisane do Ameryki Południowej, a nie Północnej; słowa takie jak 'figury' (str. 25) czy 'sekcja koronalna' (str. 28), powinny być raczej dla spójności z resztą pracy zastąpione przez 'rycina' czy 'przekrój czołowy'. W metodach wyrażenie '12-godzinny cykl dobowy' powinno być zastąpione przez '24-godzinny cykl dobowy, z 12:12h stosunkiem światła do ciemności (str. 51); zabrakło w tabeli lub tekście szczegółów dotyczących gatunku przeciwciał; spektra zbierania sygnału dla UV nie powinny być niższe niż wzbudzenia (str. 68); warto by przypomnieć czytelnikowi jakie skrawki były używane do barwienia kolców dendrytycznych (str. 70); błąd w opisie ryciny 29 i 31, który można by uniknąć trzymając się jednego sposobu kolejności przedstawiania danych dla wszystkich rycin; trudna do podążania kolejność paneli na rycinie 38 (A, B, D, C, E, F). W całej rozprawie Autor prawie konsekwentnie stosuje termin 'nagrania' odnosząc się do 'rejestracji' na przykład elektrofizjologicznych. Termin ten wydaje się dość niezgrabny, ale może to wynikać z różnic w terminologii środowiska krakowskiego i warszawskiego.

Nieliczne błędy topograficzne i niezręczne sformułowania nie są warte wspomnienia. Dla przeciwwagi chciałbym również nadmienić, że w wielu miejscach język rozprawy jest bardzo precyzyjny i zasługuje to na podkreślenie, np. 'dopamina reguluje prawdopodobieństwo otwarcia kanałów' zamiast często spotykanego skrótu myślowego 'otwiera kanały'.

Podsumowując, te drobne uchybienia edytorskie nie umniejszają mojej **bardzo wysokiej oceny merytorycznej** rozprawy. Ogrom pracy włożonej w staranne zaplanowanie i

wykonanie doświadczeń, szczególnie tak trudnymi metodami, skomplikowana analiza danych i dogłębne opanowanie literatury, budzi podziw. Tym samym, ja, niżej podpisany, stwierdzam, że rozprawa doktorska przedłożona mi do recenzji 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, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej **o dopuszczenie pana magistra Łukasza Bijocha do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora**. Ponadto, mając na uwadze bardzo wysoko ocenianą przeze mnie wartość merytoryczną i naukową rozprawy, ponad przeciętny zakres stosowanych metod i materiałów, oryginalny charakter wyników, oraz przede wszystkim ogromny wkład pracy Doktoranta, **wnoszę o wyróżnienie rozprawy**.

Dr hab. Łukasz Chrobok

Data sporządzenia recenzji: 09/11/2023, Bristol

Recenzent: Prof. dr hab. Jan Konopacki
Miejsce wykonania recenzji: Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego,
Łódź 90-236, Pomorska 141/143
Recenzja sporządzona dnia: 14. 11. 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Bijocha pt.:

„Przetwarzanie informacji o nagrodach naturalnych i farmakologicznych w mózgu myszy”

wykonanej w Pracowni Plastyczności Neuronalnej oraz Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem

prof. dr hab. Leszka Kaczmarka

Wstęp.

Prawdopodobieństwo powstawania nałogów zależy od subiektywnego odczucia przyjemności. Istotną rolę w ich powstawaniu odgrywają również cechy charakteru, stan zdrowia psychicznego oraz predyspozycje genetyczne. Dotychczasowe badania nie pozwalają stwierdzić, które osoby są bardziej podatne na uzależnienia. Wiadomo jednak, że osoby uzależnione od jednej substancji psychoaktywnej łatwiej ulegają kolejnym nałogom.

Powstawanie uzależnienia związane jest ze zjawiskiem plastyczności mózgu. Wprowadzony przez Jerzego Konorskiego termin odnosi się do sumy wszystkich procesów zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym, które dotyczą tworzenia się nowych połączeń międzyneuronalnych oraz zmian lub zaniku istniejących. Prawdopodobnie z tego powodu wychodzenie z uzależnień to długotrwały proces, wymagający ponownej reorganizacji sieci neuronalnej.

Powstawanie uzależnień związane jest również z pojęciem nagrody oraz funkcją ośrodkowego układu nagrody - zespołu struktur mózgowych biorących udział w ocenie bodźców apetytywnych pod kątem ich biologicznego znaczenia, odczuwaniu stanów przyjemności oraz generowaniu ukierunkowanego napędu i motywacji w celu uzyskania przyjemności.

Zarówno sacharoza jak i kokaina posiadają silne cechy motywujące. Określane są nagrodami ponieważ ukierunkowują określone wzorce zachowania w celu ich pozyskania. Problemem otwartym pozostaje jednak zagadnienie czy substrat oraz mechanizm neuronalny leżący u podstaw uzależnienia od w/w substancji jest taki sam czy odmienny.

Powyższa tematyka stanowi podstawowy problem naukowy adresowany w recenzowanej rozprawie doktorskiej mgr Łukasza Bijocha. Uzyskane wyniki zostały w znacznej części opublikowane w 2023 r. w *Translational Psychiatry* i *Cell Report*. Oba pisma mają wysoki IF wynoszący odpowiednio 7.979 oraz 9. 995. Fakt ten stawia wartość wyników uzyskanych przez zespół prof. dr hab. Leszka Kaczmarka, w którym doktorant pracuje, na najwyższym poziomie światowym.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Część metodyczna. Podstawowym celem rozprawy doktorskiej była odpowiedź na pytanie w jaki sposób mózg myszy przetwarza informacje o nagrodach. Podczas eksperymentów zastosowano dwa mysie modele ekspozycji na nagrody: nagrodę farmakologiczną - kokainę oraz nagrodę naturalną - sacharozę.

W rozprawie zastosowano imponującą liczbę najnowocześniejszych technik i metod badawczych, których opanowanie było zapewne dużym wyzywaniem dla mgr Łukasza Bijacha zważywszy ograniczony reżim czasowy szkoły doktorskiej.

Badania przeprowadzono na dwóch liniach myszy na tle genetycznym, posiadających fluorescencyjnie wybarwione różne typy komórek: jedna linia charakteryzowała się fluorescencyjnym wyznakowaniem głównie neuronów hamujących a druga linia charakteryzowała się fluorescencyjnym wyznakowaniem komórek z dwoma receptorami dla dopaminy (D1 i D2). Barwniki fluorescencyjne obecne w neuronach myszy obu linii pozwalały na wyróżnienie poszczególnych komórek.

W rozprawie wykorzystano m.in. technikę obrazowania arkuszem światła, pozwalającej na jednoczesną obserwację wielu struktur mózgu. W celu jak najgłębszej penetracji a zarazem zachowania struktury mózgu i wszystkich połączeń, poddano mysie mózgi procedurze tzw. oczyszczania optycznego co pozwoliło na usunięcie z tkanki mózgowej związków lipidowych. Dzięki zastosowaniu technik elektrofizjologicznych badano zmiany plastyczne zachodzące na poziomie pojedynczych neuronów wywołane nagrodami. Stosując techniki inżynierii chemogenetycznej modyfikowano motywację zwierząt do picia roztworu sacharozy oraz następstw behawioralnych wywołanych przez kokainę.

Wyniki. Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują, że ekspozycja zarówno na cukier, jak i na kokainę powoduje wzrost poziomu białka c-Fos w różnych częściach mózgu co sugeruje, że informacje o cukrze i kokainie są przetwarzane w sposób rozproszony. Aktywacja rozległej sieci struktur po ekspozycjach na badane związki została odzwierciedlona jako zmieniona modułowość mózgu myszy. Była ona przejściowa jedynie w przypadku ekspozycji na słodką wodę. Jak słusznie sugeruje autor, farmakologiczne własności kokainy wpływają na to, że jest ona nagrodą „lepszą od oczekiwanej", która wymaga czasu adaptacji mózgu.

W dalszych badaniach doktorant wykazał m. in., że zarówno cukier jak i kokaina wywoływały podobne zmiany plastyczne w przyśrodkowej części środkowego jądra ciała migdałowatego polegające na wzmocnieniu połączeń glutaminianergicznych. Kokaina, w przeciwieństwie do cukru, wywoływała wzrost poziomu genu wczesnej odpowiedzi Arc. Co więcej, angażuje również część boczną środkowego jądra ciała migdałowatego, gdzie obserwowano osłabienie pobudzających prądów postsynaptycznych. Doktorant odkrył obecność neuronów zawierających dwa typy receptorów wrażliwych na dopaminę (D1 lub D2) w jądrze środkowym ciała migdałowatego i stwierdził, że jego boczna część niemal w połowie składa się z neuronów z receptorami dla dopaminy D2. Neurony te ulegały odmiennym zmianom plastycznym po ekspozycji myszy na sacharozę oraz kokainę. Kokaina zwiększała spontaniczną aktywność neuronów posiadających receptory D1, a zmniejszała aktywność komórek posiadających receptor D2. Roztwór sacharozy z kolei zwiększał spontaniczną aktywność neuronów zawierających receptory D2, a zmniejszał aktywność neuronów z receptorami D1.

Uwagi

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka drobnych uwag:

1. W przeprowadzonych badaniach zastosowano dwa modele ekspozycji myszy na nagrody (Ryc. 12): nagrodę naturalną - model częściowo wolincjonalny - 7.5% roztwór sacharozy oraz nagrodę farmakologiczną – model niewolincjonalny, kokainę (20 mg/kg m. c.). Ze względu na konieczność podawania określonej dawki kokainy, związek ten podawano w postaci iniekcji. Tak więc wpływ nagrody farmakologicznej (kokainy) poprzedzony był zawsze efektem stresowym. Efekt ten nie występował w modelu z ekspozycją na nagrodę naturalną. Gdyby jednak w grupie z nagrodą naturalną wprowadzić identyczny czynnik stresowy (iniekcja pozorna) oba modele byłyby bardziej do siebie

podobne. Chociaż efekt stresowy iniekcji kontrolowany był w grupie, w której stosowano iniekcję fizjologicznego roztworu soli, ciekawy jestem opinii doktoranta w poruszonej sprawie.

2. Ryc. 28 przedstawia średnie wyniki gęstości komórek c-Fos w analizowanych strukturach mózgu. W proponowanej formie rycina ta zawiera tak gigantyczną ilość informacji, że jest po prostu nieczytelna. Uważam, że zachowując informacje w linku w/w ryciny dla potrzeb rozprawy doktorskiej rycinę tę można by przedstawić w sposób bardziej syntetyczny, podając np. dane dotyczące wybranych struktur.

3. Na str. 62 doktorant wspomina, że (cyt.)"*Stymulację projekcji dochodzących do komórki wykonywano z częstotliwością 0,2 Hz prądem o napięciu wystarczającym do każdorazowego wywołania odpowiedzi komórki'.* Zapewne chodziło autorowi o natężenie prądu w pA oraz o wyznaczenie progu pobudliwości.

4. Przy wszystkich wykresach pokazujących potencjały polowe zamiast wyrażenia „pozioma skala" i „pionowa skala" wystarczyło wprowadzić termin „kalibracja" (np. kalibracja 20 ms, 30 pA).

5. W rozprawie autor stosuje termin "sól fizjologiczna". Prawidłowy termin to fizjologiczny roztwór soli.

4. Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dowodzi, że mgr Łukasz Bijoch jest doskonale przygotowany pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik laboratoryjnych do dalszej samodzielnej pracy naukowej. Duża erudycja autora sprawiła, że cała praca, w tym wstęp i wielowątkowa dyskusja, zostały napisane w sposób bardzo dobrze przemyślany i dobrym językiem. Praca ilustrowana jest bogato znakomitymi, w części kolorowymi, czytelnymi rycinami. Recenzowana rozprawa doktorska stanowi przemyślane koncepcyjnie, dobrze wykonane i opisane rozwiązanie istotnego problemu naukowego, posiadające istotne znaczenie aplikacyjne. Całość składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autor wykazał się doskonałą znajomością literatury o czym świadczy ponad 220 starannie wyselekcjonowanych pozycji piśmiennictwa.

Należy odnotować, że cykl badań przedstawiony w rozprawie doktorskiej został sfinansowany w ramach środków Narodowego Centrum Nauki (Preludium), Fundację na rzecz Nauki Polskiej (Homing) oraz Międzynarodową Agendę Badawczą (Braincity).

5. Wniosek końcowy

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określane 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 przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o dopuszczenie mgr Łukasza Bijocha do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wysoki poziom naukowy przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz fakt, że część przedstawionych wyników została wcześniej opublikowana w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym upoważnia mnie do wystąpienia dodatkowo z wnioskiem o stosowne jej wyróżnienie.

Łódź, dnia 15. 11. 2023 r.

Prof. dr hab. Jan Konopacki

Prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz
Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Bijocha

„Przetwarzanie informacji o nagrodach naturalnych i farmakologicznych w mózgu myszy"

Celem pracy było poznanie podobieństw, a przede wszystkim różnic w zmianach na poziomie komórkowym i molekularnym indukowanych w mózgu myszy przez bodźce apetytywne o zupełnie odmiennym charakterze, nagrodę naturalną i farmakologiczną, co może w dalszej perspektywie ułatwić zrozumienie mechanizmów prowadzących do uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Uważam, że podjęta tematyka badań jest ciekawa i aktualna, ze względu na narastający problem uzależnień m.in. od psychostymulantów. Zastosowanie zaawansowanych nowoczesnych metod badawczych umożliwiło zrealizowanie założeń projektu na bardzo dobrym poziomie, a uzyskane wyniki wskazały na bardzo złożony charakter zmian wywołanych przez substancje nagradzające, co skłania do konieczności innego spojrzenia na układ nagrody. Wyniki doświadczeń Doktoranta zwracają uwagę na jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA), w którym wykazał istotne, ale różne zmiany po stosowaniu badanych substancji nagradzających.

Badania zostały przeprowadzone w Pracowni Plastyczności Neuronalnej oraz Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem znanego naukowca prof. dr hab. Leszka Kaczmarka i dr Anny Beroun. Realizację projektu sfinansowano z grantów: NCN (konkurs PRELUDIUM); Fundacji na Recz Nauki Polskiej (program HOMING) oraz Międzynarodowych Agend Badawczych (projekt BRAINCITY).

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie pracy monograficznej zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami. Liczy wraz z piśmiennictwem 177 stron, podzielona jest na 7 typowych rozdziałów; zawiera streszczenie w j. polskim i angielskim oraz wykaz skrótów z ich dwujęzycznym wyjaśnieniem. Bibliografia liczy aż 237 pozycji – Autor cytuje zarówno

prace sprzed kilkudziesięciu lat, które miały przełomowe znaczenie dla badań z zakresu neurobiologii OUN, jak i aktualne piśmiennictwo, do 2023 r. włącznie. Warto podkreślić, że prezentowane doktoracie wyniki zostały już częściowo opublikowane w 2023 r. w 2 pracach oryginalnych, w których Doktorant jest pierwszym autorem: w czasopiśmie *Cell Reports* (IF=8.8, pkt MEiN=200) i *Transational Psychiatry* (IF=6.8). Opublikowanie badań w takich czasopismach potwierdza ich interesującą tematykę, prawidłowe zaplanowanie i przeprowadzenie, jak również właściwą interpretację uzyskanych wyników.
Pracę zamyka wykaz kolejnych 10 prac opublikowanych w latach 2015 – 2023, których Kandydat jest współautorem (niestety, nie zostały podane parametry naukometryczne). W czterech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, co zapewne świadczy o Jego zaangażowaniu w prowadzone badania i zainteresowaniu neurobiologią OUN.

Przedmiotem badań przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej były dwie substancje nagradzające, wywołujące przyjemne doznania: kokaina (nagroda farmakologiczna) i sacharoza (nagroda naturalna). Kokaina to substancja uzależniająca, która wywołuje istotne zmiany w aktywności i plastyczności sieci neuronalnych w mózgowiu, a sacharoza poprzez doznania smakowe i pośrednio, przez stymulację receptorów w przewodzie pokarmowym, ma pozytywny wpływ na emocje.

W interesująco napisanym **WPROWADZENIU** (30 stron) Autor w kompetentny sposób omawia ważne zagadnienia związane z tematem badań. Przedstawia ogólną charakterystykę naturalnych i farmakologicznych bodźców apetytywnych odnosząc się do parametrów warunkujących działanie nagradzające kokainy, jak i testów behawioralnych weryfikujących takie działanie. Omawia kwestię uzależnienia od kokainy, molekularny mechanizm jej działania, a następnie układ nagrody i istotną rolę dopaminy (DA) w uzależnieniach od substancji psychoaktywnych. Przytaczając wyniki metod obrazowania przedstawia zmiany aktywności neuronów dopaminergicznych reprezentujących różne receptory dla DA indukowane stosowaniem kokainy. Dalej charakteryzuje budowę i funkcje jąder kompleksu ciała migdałowatego, w tym jądra środkowego, które było przedmiotem Jego badań. W kolejnym podrozdziale przechodzi do zagadnień metodycznych – kwestii systemowego spojrzenia na mózg, które jest możliwe dzięki zastosowaniu nowych technik o wysokiej rozdzielczości przestrzennej, co pozwala na obrazowanie całego mózgu i poznanie interakcji funkcjonalnych nawet między odległymi strukturami. M.in. opisuje zalety stosowanej w Jego badaniach techniki optycznego oczyszczania tkanek, która w połączeniu z immunohistochemią (iDisco+) przygotowuje materiał do badania na obecność wybranych

białek. Metoda ta została wykorzystana do wykrycia komórek c-Fos + jako markera modułowości mózgu. Ponieważ, jak wiadomo, uzależnienie jest związane ze zmianami plastyczności synaptycznej, Doktorant dokładnie omawia różne aspekty procesów długotrwałego wzmocnienia (LTP) lub osłabienia (LTD) postsynaptycznego, którym towarzyszą zmiany strukturalne, elektrofizjologiczne oraz ekspresji genów m.in. *c-fos* i *arc*. Ta część rozprawy świadczy niewątpliwie o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autora, zotała dobrze napisana i zilustrowana 11 rycinami, które są bardzo ładnie graficznie opracowane.

CELEM pracy było porównanie działania kokainy i sacharozy w aspekcie aktywacji sieci struktur mózgowych oraz ocena, jakie jest znaczenie jądra środkowego ciała migdałowatego w mechanizmie działania badanych substancji nagradzających i jakie zmiany na poziomie molekularnym substancje te wywołują w częściach jądra środkowego.

W rozdziale **MATERIAŁ I METODY** (31 stron) Autor przedstawił bardzo dokładnie metodologię badań. W trakcie realizacji projektu zmiany funkcjonalne i strukturalne sieci neuronów zostały ocenione przy zastosowaniu kliku zaawansowanych nowoczesnych metod badawczych. Doświadczenia, na które wyraziła zgodę I Lokalna Komisja Etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie, zostały wykonane na myszach linii TgN(GAD65-TdTomato) lub DRD1-TdTomato/DRD2-GFP. Dobór wspomnianych linii, które posiadają fluorescencyjnie wybarwione różne typy komórek umożliwił realizację projektu. Eksperymenty zostały przeprowadzone w dwóch modelach doświadczalnych – po 2 dniach adaptacji kokaina była wstrzykiwana ip. (20 mg/kg) przez 7 dni lub jednorazowo w 7 dniu albo po 2 dniach adaptacji mysz otrzymywała do picia 7,5% roztwór sacharozy przez 2 godz. dziennie bądź tylko w 7 dniu przez 2 godz. Materiał do badań pobierano po 2 godz. od ostatniego podania substancji nagradzającej (uwaga: w pracy nie podano referencji odnośnie dawki kokainy i stężenia sacharozy). Do badań włączono właściwe grupy kontrolne.
Doświadczenia obejmowały: 1). ocenę aktywności lokomotorycznej myszy po podaniu kokainy lub pomiar czasu picia przez mysz na samodzielnie przez Autora skonstruowanym urządzeniu; 2). określenie wpływu chemogenetycznej manipulacji aktywnością neuronów CeA na efekty behawioralne badanych substancji; 3). badania elektrofizjologiczne w części przyśrodkowej (CeM) i bocznej (CeL) jądra CeA w tym pomiar poziomu milczących synaps, kinetyki prądów zależnych od rec. dla kwasu N-metylo-D-asparaginianowego (NMDA), pomiary spontanicznej aktywności neuronalnej, długotrwałego osłabienia postsynaptycznego i pobudliwości komórek; 4). analizę mikroskopową w CeA: wybarwionych komórek

wrażliwych na DA oraz komórek c-Fos +, lokalizacji białka Arc, obecności podjednostki GluN2B rec. NMDA i kolców dendrytycznych; 5). obrazowanie przy zastosowaniu mikroskopu arkusza światła preparatów z mózgów poddanych optycznemu oczyszczaniu metodą iDISCO+ celem określenia liczby komórek c-Fos + w strukturach mózgu. Pewne aspekty metodologiczne zostały zilustrowane na 7 rycinach i 2 zdjęciach.
(uwaga: str. 64 – w ujęciu histologicznym nie ma pojęcia „tkanka mózgowa")

Wyniki uzyskane przy użyciu specjalistycznych programów zostały zanalizowane przy pomocy właściwych testów statystycznych.

Rozdział **WYNIKI** (66 stron) jest najobszerniejszą częścią rozprawy, gdyż ze względu na zastosowanie wielu metod badania przyniosły znaczną liczbę danych, które mają znaczenie poznawcze. Badania na poziomie molekularnym i komórkowym poprzedziła weryfikacja behawioralna działania obu substancji. Wyniki doświadczeń zostały dobrze opisane i przedstawione na 31 rycinach. Do ważnych wyników, które dają nowe spojrzenie na neurobiologię mózgu lub potwierdzają doytchczasowe pojedyncze obserwacje można zapewne zaliczyć stwierdzenie, że:

1. w wyniku stosowania substancji nagradzających zwiększa się poziom c-Fos w różnych częściach niemal całego mózgu, co świadczy o szeroko zakrojonej zmianie aktywności neuronalnej w odpowiedzi na badane substancje. Kinetyka wzrostu poziomu c-Fos, któremu towarzyszył wzrost liczby komórek c-Fos + zależy od badanej substancji, jak i analizowanych rejonów mózgu klasyfikowanych na podstawie Allen'owskiego Atlasu Mysiego Mózgu.
2. są różnice w działaniu kokainy i sacharozy na neurony CeA (w części przyśrodkowej CeM i bocznej CeL) dotyczące: ekspresji białek wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos i Arc (wzrost poziomu Arc i liczby kom. Arc + tylko po kokainie), zmian plastycznych (obecność milczących synaps w CeA po kokainie, a tylko w CeM po sacharozie; przeciwstawne zmiany w częstotliwości postsynaptycznych prądów pobudzajacych w neuronach DRD1+ i DRD2+)
3. aktywność neuronów CeM ma istotne znaczenie dla działania nagradzającego sacharozy, a nie dla efektu lokomotorycznego kokainy
4. w CeM kokaina i sacharoza aktywują również inne niezidentyfikowane typy neuronów, które nie mają ekspresji rec. dopaminergicznych (DRD1 i DRD2)

W rozdziałach **DYSKUSJA** (15 str.) oraz **PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI** Autor omawia efekty stosowania kokainy i sacharozy, począwszy od zwiększonej modułowości mózgu myszy, poprzez zmiany plastyczne określone na poziomie jądra środkowego ciała migdałowatego, po zmiany w aktywacji neuronów DRD1 i DRD2 w wymienionej strukturze. Wskazuje na różnice w działaniu badanych substancji. Dyskusja jest bardzo dojrzała. Przy interpretacji wyników Autor umiejętnie nawiązuje do opublikowanych prac. Odnosi się do wyników, które mogą wydawać się kontrowersyjne, a także do ograniczeń metodologicznych przeprowadzonych badań. Uzyskane dane potwierdzają, że stosowanie nowoczesnych metod, które dają możliwość równoczesnej oceny zmiany aktywności różnych struktur, wskazuje na bardziej złożoną odpowiedź mózgu na bodźce nagradzające, aniżeli dotychczas zakładano. Doktorant przedstawia propozycje dalszych badań z zastosowaniem innych metod, by zweryfikować obserwacje poczynione w trakcie realizacji projektu, co wskazuje na Jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Prosiłabym o wyjaśnienie dlaczego: 1).oceniał Pan u myszy aktywność lokomotoryczną po stosowaniu kokainy, a nie właściwości nagradzające kokainy np. w teście preferencji miejsca; 2). mierzył Pan czas picia 7,5% roztworu sacharozy, a nie był wykonywany klasyczny test preferencji sacharozy ?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pana mgr Łukasza Bijocha oceniam bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje doskonały warsztat badawczy, ciekawy pomysł projektu. Uzyskane wyniki mają istotną wartość merytoryczną, a część z nich ma charakter nowatorski. Praca jest interesująco napisana i dobrze zredagowana. Uważam zatem, że oceniana 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 powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Bijocha do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ze względu na istotną wartość merytoryczną rozprawy, która wnosi nowe elementy poznawcze do wiedzy na temat mechanizmu działania substancji nagradzających oraz zasługujący na wysokę ocenę warsztat badawczy i bardzo staranną formę pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Katowice, 7 grudnia 2023 r.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz