

Prof. dr hab. Barbara Gawda

Lublin, 11.03.2024

**Recenzja dorobku naukowego w postępowaniu o nadanie stopnia doktora
habilitowanego w dyscyplinie nauki biologiczne dr Annie Beroun**

Informacje ogólne

Anna Beroun uzyskała w 2008 roku stopień magistra z zakresu biotechnologii, specjalność biochemia na Wydziale Biotechnologii, Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Tytuł pracy magisterskiej był następujący: Wpływ stresu i leków przeciwdepresyjnych na czynniki regulujące neurodegenerację. Praca była oceniona bardzo dobrze.

W 2012 roku Anna Beroun uzyskała stopień doktora w Göttingen Graduate School for Neurosciences and Molecular Biosciences (GGNB) na Uniwersytecie Georga Augusta w Getyndze (Niemcy). Tytuł pracy doktorskiej: Indukowana kokainą reorganizacja obwodów neuronalnych jako model śladów pamięciowych związanych z uzależnieniem. Praca została oceniona bardzo wysoko (Ocena: summa cum laude).

Zatrudnienie: W latach 2012 - 2013 Habilitantka zrealizowała staż podoktorski w Grupie Neurobiologii Molekularnej w Europejskim Instytucie Neurobiologii w Getyndze w Niemczech. Z kolei w latach 2013 - 2020 zrealizowała kolejny staż podoktorski w Laboratorium Neurobiologii w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN w Warszawie. Od 2020 roku jest Kierownikiem pracowni badawczej Laboratorium Plastyczności Neuronalnej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN w Warszawie.

Ocena osiągnięcia naukowego

Zgodnie z Ustawą (art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) dr Anna Beroun za swoje osiągnięcie naukowe wskazała cykl pięciu powiązanych tematycznie artykułów

opublikowanych w czasopismach naukowych. Cykl jest zatytułowany „Plastyczność synaptyczna w tworzeniu się pamięci oraz rozwoju uzależnień”.

Ogólnie odkrycia naukowe dr Anny Beroun dotyczą procesów plastyczności synaptycznej w procesach uczenia się i rozwoju uzależnień. Oparła się na zwierzęcych modelach uczenia się apetytywnego (zapamiętywania pozytywnych zdarzeń) i doszła do wniosku, że mają one wiele wspólnych cech, które pozwalają wyjaśniać rozwój uzależnień, jak i pamięć uzależnień. Tymi cechami wspólnymi są: wzrost siły synaps i pojawienie się milczących synaps pobudzających w różnych regionach mózgu. Dzięki swoim badaniom dr Anna Beroun opisuje wspólne mechanizmy molekularne leżące u podłoża powstawania uzależnień od kokainy i alkoholu. Badania Habilitantki dostarczają narzędzi do lepszego zrozumienia rozwoju uzależnień i wskazują na możliwości w zakresie przyszłych strategii terapeutycznych.

Opisane wyniki badań w artykule nr 1 podkreślają znaczenie dojrzewania cichych synaps w jądrze półzłym (NAc). Aktywność/dojrzewanie cichych synaps Habilitantka uznaje za niezbędne do utrwalenia wspomnień związanych z kokainą. Wyniki badań opisane w tym artykule pokazały fundamentalne różnice w funkcji paralogów białek z rodziny MAGUK i pozwoliły ustalić związek przyczynowy między pojawieniem się milczących synaps w NAc i ich późniejszym dojrzewaniem z zachowaniem wspomnień indukowanych kokainą. Habilitantka ustaliła, że nie wszystkie synapsy w NAc dojrzewają poprzez nagromadzenie receptorów CP-AMPA. Ponadto, wykazała że liczba receptorów CP-AMPA jest silnie skorelowana z nasileniem głodu narkotykowego, a ich usunięcie może zmniejszyć poszukiwanie narkotyków w badaniach wykorzystujących samopodawanie, jednak niekoniecznie wpływa na preferencję miejsca w modelu CPP. Zdaniem Habilitantki model CPP odzwierciedla pozytywne skojarzenie zwierzęcia z danym kontekstem i nie mierzy bezpośrednio wytrwałości w poszukiwaniu narkotyków. Wyniki zaprezentowane w tym materiale są owocem znakomicie zrealizowanych badań, są niezwykle nowatorskie i ważne dla rozumienia neurobiologicznych mechanizmów uzależnienia od kokainy.

Drugi artykuł prezentuje wyniki badań odnośnie znaczenia milczących synaps w plastyczności synaptycznej w uzależnieniu od alkoholu. W opublikowanym manuskrypcie opisano eksperymenty z wykorzystaniem systemu IntelliCage, który jest zautomatyzowaną



klatką pozwalającą na monitorowanie zachowania zwierząt bez ingerencji eksperymentatora. Przeprowadzona przez Habilitantkę analiza elektrofizjologiczna plastyczności synaptycznej w zakręcie zębatym (DG) wywołana spożyciem alkoholu pokazała, że zarówno swobodny dostęp do alkoholu, jak i nawrót nałogu indukuje milczące synapsy w komórkach ziarnistych w zakręcie zębatym (DG). Liczba milczących synaps była znacznie wyższa podczas nawrotu u uzależnionych myszy, w porównaniu z myszami nieuzależnionymi i kontrolnymi (pijącymi jedynie wodę). Na podstawie analizy plastyczności strukturalnej - pomiaru liczby i kształtu kolców dendrytycznych, na których znajdują się synapsy pobudzające, Habilitantka sformułowała konkluzję, że możliwą funkcją cichych synaps w nawrocie do picia alkoholu jest osłabienie pobudzającego neuroprzekaznictwa z kory mózgowej do hipokampa oraz że hamowanie w zakręcie zębatym (DG) może prowadzić do wzmocnienia poszukiwania alkoholu. Zaprezentowany materiał dostarcza niezwykle ważnych informacji na temat neurobiologicznych mechanizmów uzależnienia od alkoholu.

Trzeci artykuł prezentuje kolejne badania łączące indukcję cichych synaps z nawrotem picia alkoholu. Dotyczył on roli metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) w uzależnieniu od alkoholu. Aktywność MMP-9 była monitorowana w jądrze środkowym ciała migdałowatego, ponieważ uznano, że jest niezbędna w procesie apetytywnego uczenia się (zapamiętywanie przyjemnych zdarzeń), ale nie jest konieczna do warunkowania awersyjnego. Ustalono, że aktywność MMP-9 wywołuje zmiany plastyczne, wymagające tworzenia milczących synaps i zmian liczby receptorów AMPA. Obserwacje Habilitantki na temat niezbędności aktywności MMP-9 w plastyczności wywołanej alkoholem, zostały wzmocnione przez wyniki badań na ludziach. Habilitantka konkluduje, że taki efekt jest obserwowany u klinicznie zdiagnozowanych alkoholików z polimorfizmem genu, który prowadzi do wyższej aktywności MMP-9. Osoby takie częściej spożywają alkohol pomimo jego szkodliwych skutków fizycznych i psychologicznych. Badania pokazały związki pomiędzy plastycznością synaptyczną w jądrze środkowym ciała migdałowatego a rozwojem zachowań związanych z poszukiwaniem alkoholu. Wykazano, że spożywanie alkoholu, odstawienie i nawrót wyzwala procesy, które wymagają aktywności MMP-9 oraz, że w tych procesach pośredniczy tworzenie i dojrzewanie milczących synaps. Znaczenie uzyskanych wyników należy uznać za bezsprzecznie przełomowe.



Kolejny artykuł opisuje obrazowanie w całym mózgu markerów plastyczności związanych ze spożyciem słodkiej wody i zastrzykami kokainy oraz z oceną poziomu cichych synaps w jądrze półleżącym u myszy. Habilitantka wykazała, że duża liczba struktur mózgu jest zaangażowana (ekspresja białka c-Fos) w procesowanie ekspozycji zarówno na cukier jak i kokainę. To ilustruje złożoność i rozległość obwodów mózgowych, które odbierają i integrują wszystkie aspekty przetwarzania nagród. Co ważne, wykazano, że istnieją odmienności pomiędzy markerami uzależnienia i naturalnych nagród. Odmienności dotyczą modułowości, która jest funkcjonalną reprezentacją złożonych sieci organizujących się w mniejsze moduły, aby przetwarzać określone informacje. Zaobserwowano trwały wzrost modułowości mózgu po ekspozycji na kokainę, co zinterpretowano następująco: długotrwałe stosowanie kokainy stale aktualizuje sieć połączeń mózgowych i koduje subiektywną „wartość” narkotyku. Dla odmiany, spożycie cukru wywołuje jedynie przejściowy wzrost modułowości tylko po pierwszej ekspozycji. Wykazano, że chociaż te same struktury mózgu są zaangażowane w przetwarzanie różnych nagród, to sposób zapisu bodźca w obwodach mózgowych odpowiada za określoną reakcję behawioralną. Hipotezę tę poparto doświadczeniami na poziomie komórkowym. Wykazano, że mechanizm indukcji milczących synaps oraz ich późniejszy los (dojrzewanie lub zanikanie) mogą się różnić w zależności od rodzaju bodźca. Jednak przejściowe pojawienie się milczących synaps stwarza możliwość modulacji sposobu, w jaki te synapsy zostaną zintegrowane w przebudowującej się sieci neuronów. Habilitantka wskazuje na takie możliwości odwołując się do badań innego zespołu, który zarejestrował, że ponowne wyciszenie specyficznych dla kokainy synaps projekcji BLA-NAc zmniejsza poszukiwanie kokainy u szczurów. Z kolei w eksperymentach Habilitantki i zespołu wykorzystano podawanie myszom akamprozatu podczas spożywania alkoholu. Stwierdzono, że akamprozat zapobiega tworzeniu się cichych synaps i zapobiega zachowaniom związanym z poszukiwaniem alkoholu.

Konkludując dr A. Beroun stwierdza, że możliwe jest, że indukcja bądź usuwanie milczących synaps, w połączeniu z pozytywnymi sygnałami środowiskowymi, może wpłynąć na intensywność nawrotu lub/i zachowań związanych z poszukiwaniem narkotyków, co stwarza pole dla przyszłych nowych strategii terapeutycznych. Opisane badania i dane, jakich badania dostarczają mają charakter przełomowy i bezsprzecznie bardzo wartościowy dla nauki.



Kolejny etap badań i kolejna publikacja Habilitantki opisują wnikliwiej plastyczność wywołaną spożyciem cukru i ekspozycją na kokainę w strukturach ciała migdałowego, a dokładnie w części przyśrodkowej (CeM) i bocznej jądra środkowego (CeL). Przeanalizowano wzór ekspresji dwóch markerów plastyczności tj. c-Fos i Arc u myszy, które piły słodką wodę lub otrzymywały zastrzyki dootrzewnowe kokainy (raz lub przez 7 kolejnych dni). Wykazano, że obie nagrody wywołały ekspresję c-Fos w CeM, ale tylko kokaina wywołała plastyczność w CeL. Ważne odkrycia to także wykazanie, że tylko zastrzyki kokainy zwiększały ekspresję markera Arc w CeM i CeL. Kolejno zbadano elektrofizjologiczne właściwości komórek w jądrze środkowym ciała migdałowego. Tutaj celem było scharakteryzowanie plastyczności synaptycznej indukowanej przez cukier i kokainę. Odkryto, że wielokrotne ekspozycje na cukier i kokainę zwiększyły liczbę milczących synaps w CeM. Synapsy te powstawały *de novo*, co potwierdziła zwiększona gęstość kolców dendrytycznych i wzrost częstotliwości spontanicznych prądów pobudzających. Natomiast w CeL tylko kokaina powodowała nagromadzenie się cichych synaps. Synapsy w CeL, w przeciwieństwie do CeM, powstały poprzez wyciszenie istniejących, dojrzałych synaps. Spowodowało to zmniejszenie liczby funkcjonalnych synaps i częściową okluzję procesu LTD. Sformułowano konkluzję, że jądra CeL i CeM ciała migdałowego integrują informacje o nagrodach poprzez przeciwstawne procesy. Neurony CeM zwiększają liczbę i siłę pobudzających projekcji wejściowych w wyniku ekspozycji na cukier i kokainę. Z kolei neurony CeL osłabiają swoje wejścia glutaminergiczne po wstrzyknięciu kokainy, podczas gdy konsumpcja słodkiej wody nie ma na nie wpływu.

Wyniki tych badań potwierdzają, że różne bodźce wykorzystują ciche synapsy do pośredniczenia w odpowiednich adaptacjach obwodów. Jądro CeM jest przykładem, w którym zarówno naturalna nagroda (cukier), jak i uzależniająca (kokaina) indukują milczące synapsy w celu wzmocnienia wejść pobudzających. Opisane badanie pokazało również, że dojrzewanie i/lub usuwanie cichych synaps, czyli funkcjonowanie cichych synaps określa, w jaki sposób dana populacja komórkowa przyczyni się do wywołania odpowiedniego zachowania.



Podsumowanie osiągnięcia

Opisane powyżej wyniki badań Habilitantki charakteryzują plastyczność synaptyczną leżącą u podstaw przetwarzania nagród w mózgu. Dr Anna Beroun analizuje w jaki sposób substancje uzależniające (kokaina, alkohol) poprzez posiadanie specyficznych właściwości farmakologicznych oddziałują na obwody mózgowo zaangażowane w naturalne procesy przetwarzania informacji o nagrodach. Habilitantka ustaliła, że takie działanie przyczynia się do tworzenia praktycznie nieodwracalnych form pamięci, które mają ścisły związek z rolą milczących synaps. W badaniach Habilitantka skupiła się zarówno na naturalnych, jak i uzależniających nagrodach, aby pokazać podobieństwa i różnice w procesach uczenia się i rozwoju uzależnienia. Skoncentrowała się na określonych obszarach mózgu stanowiącym obszar nagrody: jądrze półkolumnowym i ciele migdałowatym. Opisała, w jaki sposób zażywanie kokainy intensyfikuje transmisję pobudzającą w NAc, tworząc nowe milczące połączenia synaptyczne, które po dojrzeniu ułatwiają przechowywanie wspomnień związanych z kokainą. Ponadto pokazała, jakie jest znaczenie przejściowego gromadzenia się milczących synaps na różnych etapach rozwoju uzależnienia od alkoholu, abstynencji i nawrotu. W kolejnych badaniach wykazała podobieństwa i odmienności w zakresie plastyczności synaptycznej wywołanej podaniem kokainy i cukru, zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego mózgu. Bardzo istotna wiedza, którą przynoszą badania Habilitantki to także pokazanie, iż obie nagrody indukują milczące synapsy, jednakże w różnych strukturach mózgowych, synapsy te przyczyniają się to wzmocnienia lub osłabienia przekazywania glutaminianergicznego. Wartość odkryć Habilitantki to wnikliwość opisu mechanizmów molekularnych leżących u podłoża uzależnień od kokainy i alkoholu. Dr Anna Beroun pokazuje w jaki sposób różne bodźce są integrowane na poziomie struktur i obwodów w mózgu.

Znaczenie opisanych powyżej odkryć zostało wielokrotnie docenione w środowisku naukowym, m.in. w komentarzu autorstwa E. Koya i Y. Donga zatytułowanym "Sound of silent synapses from the addicted hippocampus" w sekcji "Research Highlights" w numerze 43 *Neuropsychopharmacology* (strony 1981-1982). Kolejno w 2019 roku, publikacja otrzymała Nagrodę im. Jerzego Konorskiego przyznaną przez Komitet Neurobiologii Polskiej Akademii Nauk i Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego za najlepszą pracę z dziedziny neurobiologii wykonaną w Polsce.



Następnie inny artykuł Habilitantki (Stefaniuk, Beroun et al., 2017) został doceniony w komentarzu ACW Smitha zatytułowanym "A Glitch in the Matrix: Aberrant Extracellular Matrix Proteolysis Contributes to Alcohol Seeking", opublikowanym w *Biological Psychiatry* (81: strony 900-902). Zaś w 2018 roku, ta publikacja otrzymała Nagrodę im. Jerzego Konorskiego przyznaną przez Komitet Neurobiologii Polskiej Akademii Nauk i Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego za najlepszą pracę z dziedziny neurobiologii wykonaną w Polsce.

Sam fakt, iż publikacje Habilitantki zostały tak wysoko nagrodzone i docenione przesądza o ich niezwykłym i niekwestionowanym znaczeniu dla nauki. Jest to niewątpliwie bardzo cenny, oryginalny i przełomowy wkład w wyjaśnianie molekularnych, i ogólnie, neurobiologicznych mechanizmów uzależnień od substancji psychoaktywnych. Nie ulega zatem żadnej wątpliwości, że Habilitantka spełnia kryterium ustawowe nr 2, tj. posiada w dorobku osiągnięcia naukowe albo artystyczne, stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.

Pozostałe osiągnięcia naukowe

Dr Anna Beroun jest bardzo aktywna naukowo. Oprócz kluczowego stanowiącego osiągnięcie cyklu artykułów opublikowanych w prestiżowych czasopismach, opublikowała 15 naukowych manuskryptów po uzyskaniu stopnia doktora oraz 3 przed uzyskaniem stopnia doktora. Dorobek ten jest niewątpliwie oryginalny i wyróżniający się.

Dr A. Beroun także uczestniczyła czynnie w 14 konferencjach naukowych prezentując bądź wykłady bądź referaty lub postery. Ponadto dwukrotnie była członkiem komitetów organizacyjnych konferencji naukowych. Co ważne i bardzo cenne, 6-krotnie uczestniczyła w grantach naukowych finansowanych przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, NCN lub Siódmy Program Ramowego (7PR) UE Initial Training Network EXTRABRAIN (w tym cztery razy jako kierownik projektu, dwa razy jako wykonawca grantu). Jest także członkinią towarzystw naukowych: Society for Neuroscience (członkini zwyczajna - 2012) i Polskiego Towarzystwo Badań Układu Nerwowego (2014-2015). Odbyla również cztery staże naukowe. Była dwukrotnie członkinią zespołów redakcyjnych czasopism naukowych. Była także ekspertką oceniającą wnioski o Stypendium START.



Wykazuje się ponadto istotną działalnością/współpracą z otoczeniem społecznym i gospodarczym.

Jej sumaryczny IF wynosi 196,7, liczba cytowani 1060, zaś liczba punktów 3650.

Istotna aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

Dr Anna Beroun spełnia również ustawowe kryterium nr 3 nadania stopnia dr habilitowanego tzn. wykazuje się istotną aktywnością naukową w więcej niż jednej instytucji naukowej. W latach 2008 – 2012 realizowała doktorat w Molecular Neurobiology Group, European Neuroscience Institute w Getyndze w Niemczech. Ponadto, w roku 2011 odbyła naukowy EMBO short-term Fellowship (realizowała trzymiesięczny projekt badawczy) w Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology w Washington State University w Pullman w USA.

Kolejno, dr Anna Beroun współpracowała w latach 2012 – 2013 (Staż podoktorski) z Molecular Neurobiology Group at the European Neuroscience Institute w Getyndze w Niemczech.

Inna aktywność

Dr Anna Beroun wykazuje się także innego rodzaju aktywnością, tzn. działaniami dydaktycznymi, organizacyjnymi i popularyzatorskimi.

Aktywność dydaktyczna: dwukrotnie promotor pomocniczy, wielokrotnie promotor prac magisterskich, oraz realizacja warsztatów.

Aktywność organizacyjna: Organizacja sympozjów naukowych: symposium na FENS Regional Meeting w Krakowie i konferencji Neurons in Action.

Aktywność popularyzatorska: Wywiad dla Polskiej Agencji Prasowej na temat najnowszych odkryć zespołu, z którym pracuje, dotyczących aktywacji mózgu wywołanej cukrem i kokainą oraz wywiad dla czasopisma Epoch Times w artykule „How sugar changes your brain”.



Habilitationka była też nagradzana za swoje osiągnięcia: lata 2018 i 2019 - Nagrody im. Jerzego Konorskiego za najlepszą publikację z dziedziny neurobiologii.

Inne nagrody: 2015 - Stypendium START dla wybitnych, młodych naukowców, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, 2013 - Stypendium Mentorskie dla Kobiet w Nauce (staż na Uniwersytecie Rosalind Franklin, Chicago Medical School, USA).

Konkluzja

Podsumowując stwierdzam, że osiągnięcie naukowe, aktywność naukowa, cały dorobek naukowy, dydaktyczny, organizacyjny i popularyzatorski dr Anny Beroun z wyróżnieniem spełniają kryteria określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art.219. W pełni popieram wniosek o nadanie dr Annie Beroun stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

