



SEKRETARIAT RADY NAUKOWEJ
WPLYNĘŁO 17.03.2025

Kraków, 2025-03-10

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr **Wiktorii Mrozek**

„Badanie roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminianergicznej w ciele migdałowatym jako neuromodulatora emocji w uzależnieniu”

Wykonanej w Pracowni Pamięci Przestrzennej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR: dr hab. Adam Hamed

PROMOTOR POMOCNICZY: dr Miron Kursa

Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu badań

Uzależnienia lekowe – skutkujące między innymi katastrofą epidemii opioidowej w USA, wywołaną klinicznie dostępnymi, syntetycznymi opioidami – są wciąż w kręgu zainteresowań badaczy. Jakkolwiek rola transmisji serotoninowej i glutaminianergicznej w uzależnieniach wydaje się niepodważalna, nowoczesne techniki chemogenetyczne otwierają nowe możliwości w miarę selektywnego wpływania na funkcjonowanie mózgu. W tym sensie, tematykę rozprawy Pani mgr Wiktorii Mrozek oceniam jako na wskroś aktualną i niesłychanie istotną.

Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia

Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada tradycyjny układ monografii i napisana jest w języku polskim. Rozprawa jest niespotykane obszerna: 230 stron, 663 pozycje piśmiennictwa, 81 rycin i dodatkowe 44 ryciny w suplemencie. Tak obszerny materiał świadczy niewątpliwie o pracowitości Doktorantki, choć nie ułatwia percepcji całości.

We Wstępie Doktorantka omawia *zaburzenia związane z używaniem substancji*, w tym, klasyfikację kryteriów diagnostycznych zaburzeń związanych z używaniem substancji

opiodowych (OUD) wg DSM-5, sytuację rynku narkotykowego, nawet w Afganistanie i Afryce Zachodniej i Środkowej, behawioralne rozumienie fenomenu uzależnienia, rolę wzmocnienia pozytywnego, tolerancji, głodu narkotykowego oraz teoretyczne podstawy selektywnej manipulacji aktywnością neuroprzebieżników przy użyciu wektorów wirusowych DREADD. W tym podrozdziale, jak można sądzić, można by pominąć stwierdzenia typu *Podstawowymi jednostkami strukturalnymi i funkcjonalnymi układu nerwowego są neurony – elektrycznie pobudliwe komórki wyspecjalizowane w odbiorze, integracji i transmisji sygnałów elektrycznych i chemicznych*. Następnie, Doktorantka omawia wszystkie znane systemy neuroprzebieżnictwa, receptory jonotropowe i metabotropowe, aż wreszcie dociera do istoty chemogenetyki i omawia charakterystykę *różnych typów receptorów DREADD wykorzystywanych w badaniach neurobiologicznych*, w tym, wykorzystanych w obecnej pracy.

Dowiadujemy się również o układzie nagrody, jego podstawach anatomicznych, modelowaniu uzależnień, i tutaj przydałoby się nieco więcej informacji o użytym modelu. Jakkolwiek o samym modelu dowiadujemy się więcej w Dyskusji, wnikliwego czytelnika zastanowi, w jakim stopniu, dystans przebyty w klatce w której podawano morfinę odzwierciedla głód narkotykowy, i czy w istocie jest *zbieżny z doniesieniami literaturowymi, zgodnie z którymi ponowna ekspozycja na kontekst uprzednio skojarzony z podaniem substancji psychoaktywnej wywołuje wzrost aktywności lokomotorycznej u szczurów [574–577]*, ponieważ cytowane prace dotyczą podania dopamino-mimetycznych psychostymulantów, a nie opiodów. Stąd **pytania**, a) czy użyty model opiera się na warunkowaniu klasycznym, czy na instrumentalnym? b) dlaczego nie użyto klasycznego testu warunkowej preferencji miejsca?

Doktorantka omawia również wokalizacje ultradźwiękowe, szczególnie w kontekście badań nad uzależnieniami. Oceniam to niezwykle wysoko, ponieważ wokalizacje są obiektywną miarą emocji zwierząt, w tym, gryzoni. Wstęp kończy *Hipoteza dotycząca roli ko-transmisji serotonergiczo – glutaminianergiczej*.

Cel pracy jest przedstawiony jasno i poprawnie jako analizę roli ko-transmisji serotonergiczo i glutaminianergiczo w ciele migdałowatym w kontekście związanym z podaniem opiodowej substancji uzależniającej, choć zastanawia cel 4 czyli *Ocena ingerencji chemogenetycznych w kontekście potencjału terapeutycznego w leczeniu uzależnień*. **Pytanie**, czy Doktorantka w istocie postuluje stosowanie technik wirusowych w leczeniu zaburzeń psychicznych?

Recenzja metodyki

W podrozdziałach 1.3.3, Doktorantka omawia rozmaite wektory wirusowe, a także zalety, oraz rozmaite wady syntetycznych ligandów aktywujących receptory DREADD, co odnotowuję z uznaniem, ponieważ świadczy to o krytycznym spojrzeniu Doktorantki na metodykę. Ogólnie, rozdział dotyczący metod jest niezwykle obszerny i doskonale opisuje metody w najdrobniejszych szczegółach, co przyjmuję z uznaniem.

Pytanie, czy Doktorantka zgodziłaby się, że dobór grup doświadczalnych mógłby zostać uzupełniony o grupy, którym podawano by morfinę i sól fizjologiczną poza klatką kontekstową. W przedstawionym schemacie (rysunek 2) przez 10 dni podawano morfinę i umieszczano szczury w klatce kontekstowej – nie napisano na jak długo – w podgrupach (3.5.4). Gdyby zbadano efekty morfiny/soli podawanej *poza klatką*, czyli *poza kontekstem*, a następnie badano ruchliwość w klatce kontekstowej, wokalizację i neurochemię, wiedzielibyśmy czy uzyskane wyniki są specyficzne dla kontekstu, opioиду czy kontekstu związanego z działaniem narkotyku (o co chodziło w dysertacji).

Można również sądzić, że warunkowanie na efekt narkotyku w podgrupach, czyli w towarzystwie innych zwierząt i badanie osobników solo nieco „zmyłało” szczury. Spekulując, można sądzić, że atrakcyjność klatki kontekstowej wynikała z przebywania w grupie, a zwierzęta badane samotnie, nie doświadczały pozytywnych emocji. **Pytanie**, czy Doktorantka zgodziłaby się z taką hipotezą?

Ponieważ zwierzęta umieszczano w klatce kontekstowej po 13 dniach od ostatniej dawki narkotyku, powstaje pytanie, czy cały schemat doświadczenia nie dotyczył raczej badania wpływu odstawienia (zespołu abstynencyjnego), charakteryzującego się przykrymi odczuciami, aniżeli apetytywnego oddziaływania kontekstu. **Pytanie**, jak długo u człowieka i u szczura utrzymuje się opioidowy zespół abstynencyjny wywołany wielokrotnym podaniem wzrastających dawek morfiny?

Nie do końca rozumiem umieszczenia (pod)rozdziałów 3.9. *Barwienia immunohistochemiczne* i kolejnych, 3.9.2. i 3.9.3. ponieważ nie mogłem znaleźć wyników tego doświadczenia. Jeśli dobrze rozumiem, barwienia wykonano w celu wyznakowania konstruktów wirusowych oraz neuronów serotoninerгіcznych dla potwierdzenia obecności *neuronów serotoninowych w ciele migdałowatym*. **Pytanie** czy jedyny wynik doświadczeń z barwieniem przedstawiono na, dość skromnym, Rysunku 6?

Pytanie, czy oceniano trafność podań nośników wirusowych – nie znalazłem tej informacji.

Pojawia się również moja **prośba/pytanie** do Doktorantki o uzasadnienie wyboru płci zwierząt. Czy w dalszych badaniach planowane jest przeprowadzenie doświadczeń również na samicach? Jaka byłaby opinia Doktorantki na temat wyników uzyskanych u samic. Czy coś wiadomo o różnicach płciowych w kontekście reaktywności na łaskotki i behawioralne oraz neurochemiczne aspekty działania morfiny a także hamowania i pobudzania układu serotoninowego i glutaminianergicznego w amygdalach?

Recenzja wyników i dyskusji

Wyniki zaprezentowano na 125 rycinach, co jest z jednej strony niesłychanie imponujące, choć z drugiej, nie ułatwia interpretacji. Doktorantka zbadała wpływ pobudzenia oraz hamowania układu serotoninowego i glutaminianergicznego (razem i osobno) na behawioralną aktywność w klatce kontekstowej oraz na szereg parametrów neurochemicznych w kilku strukturach mózgu. Wykonała *analizę ilościową poziomu wybranych monoamin i aminokwasów z wykorzystaniem spektrometrii masowej*, wykonała barwienie *immunohistochemiczne*, oraz *barwienie neuronów serotonergicznym i hydroksylazy tryptofanowej*, a następnie korelowała rozmaite parametry i analizowała współwystępowanie za pomocą algorytmu „Boruta”.

Przykładowo, na rycinie 8, Doktorantka analizowała wpływ pobudzenia oraz hamowania układu serotoninowego i glutaminianergicznego (razem i osobno) na liczbę ultradźwięków emitowanych przez szczury po umieszczeniu w klatce skojarzonej z podawaniem narkotyku i tutaj, zwierzęta morfinowe niepoddane zabiegom chemogenetycznym emitowały więcej USV niż solne, hamowanie układu serotoninowego w jądrze migdałowatym obniżało USV, a pobudzanie układu serotoninowego i glutaminianergicznego podnosiło liczbę wokalizacji. Tego rodzaju analiz jest zbyt wiele, by je tutaj omówić, dlatego trudno się pokusić o jednoznaczne wnioski, co rzecz jasna, nie zależało wyłącznie od Doktorantki: dane są rzetelne, rzetelnie przeanalizowane i przedstawione.

Co ciekawe, Doktorantka nie stwierdziła korelacji pomiędzy liczbą wokalizacji emitowanych w wyniku łaskotania szczurów oraz emitowanych podczas testu odpowiedzi kontekstowej. Sugeruje to, że naturalna/bazowa zdolność do wyrażania pozytywnych emocji nie przekłada się na subiektywne, prawdopodobnie przyjemne odczucia wynikające

z umieszczenia w klatce, gdzie zwierzę doświadczało efektu narkotyku. To raczej nieoczekiwane odkrycie jest rzetelnie dyskutowane przez Doktorantkę w dalszych częściach dysertacji. Podobnie, nie znaleziono korelacji pomiędzy emisją USV a miarą głodu narkotykowego (rycina 11), co również jest zaskakujące i rzetelnie przedyskutowane.

Przedstawienie wszystkich rezultatów analiz neurochemicznych i tego, co z nich wynika przekracza objętość tej recenzji. Nawet izolowany wynik wskazujący na spadek stężenia noradrenaliny w korze retrosplenialnej zarówno u zwierząt, którym zahamowano jak i pobudzono migdałowatą serotoninę jest ciekawy i zaskakujący, podobnie jak i holistyczne spojrzenie na całość wyników. Reasumując i cytując Doktorantkę, z pewnością można stwierdzić, że *podłoże neurochemiczne ekspresji stanu afektywnego poprzez emisję wokalizacji ultradźwiękowych jest złożone i zróżnicowane, zaś aktywacja odrębnych sieci neurotransmisyjnych może indukować jednakowy efekt behawioralny.*

Podsumowanie pracy doktorskiej

Dysertacja mgr Wiktorii Mrozek to znakomity przykład interdyscyplinarnego podejścia do badania mechanizmów odpowiedzialnych za uzależnienie opioidowe. Autorka wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną w dyscyplinie albo dyscyplinach, umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, wysokimi kompetencjami badawczymi, oryginalnie łącząc zaawansowane metody behawioralne z nowoczesnymi technikami chemogenetycznymi i statystycznymi.

Praca cechuje się klarowną strukturą, a jej treść obfituje w szczegółowe analizy. Wyniki badań wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw uzależnienia opioidowego, co czyni rozprawę wartościowym źródłem wiedzy dla badaczy.

Przedstawiony w rozprawie opis aktualnego stanu wiedzy jak i badań własnych, dyskusja wyników jak i część eksperymentalna są dobrze zredagowane. Na pochwałę zasługuje również strona techniczna, edytorska i językowa pracy. Piśmiennictwo jest aktualne i zostało odpowiednio dobrane.

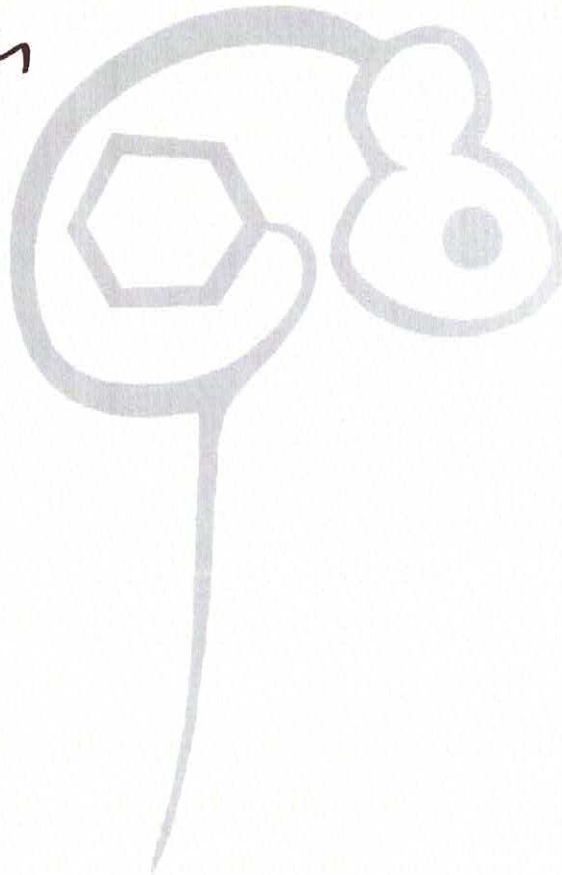
Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Mrozek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.).

Wnoszę wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Wiktorii Mrozek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Rozprawa w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem rekomenduję jej przyjęcie oraz nadanie stopnia doktora.

Piotr Popik

Piotr Popik





26.03.2025, Warszawa

Dr hab. n. med. Anna Skórzewska
Zakład Neuronauki Doświadczalnej i Klinicznej
Instytut Psychiatrii i Neurologii
ul. Sobieskiego 9
02-957 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Mrozek pt.: „Badanie roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym jako neuromodulatora emocji w uzależnieniu”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Pracowni Pamięci Przestrzennej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem Promotora dr hab. Adama Hameda oraz Promotora pomocniczego dr Mirona Kursy. Rozprawa doktorska obejmuje badania zrealizowane w ramach projektu badawczego OPUS 2018/29/B/NZ7/02021 finansowane przez Narodowe Centrum Nauki.

Ciało migdałowate jest strukturą mózgu kluczową dla przetwarzania emocji, zwłaszcza reakcji lękowych i stresowych, które odgrywają istotną rolę w procesie uzależnienia. Serotonina (5-HT) oraz glutaminian (Glu) współdziałają w regulacji plastyczności synaptycznej i wzmacnianiu emocjonalnych skojarzeń związanych z używaniem substancji psychoaktywnych. W warunkach uzależnienia zaburzona równowaga tych neuromodulatorów w ciele migdałowatym może zwiększać podatność na stres, utrwaląc skojarzenia związane z narkotykami oraz sprzyjać nawrotom. Ko-transmisja 5-HT i Glu w tej strukturze może modulować aktywność mezo limbicznego układu nagrody oraz wpływać na procesy uczenia się i pamięci związane z uzależnieniem. Zgadzam się z Doktorantką, że zrozumienie interakcji tych neuroprzekazników w kontekście regulacji emocji ma istotne znaczenie i może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na leczenie uzależnień.

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Mrozek ma standardowy układ typowy dla prac tego rodzaju. Liczy 230 stron i obejmuje wstęp, cele badawcze, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję, podsumowanie z wnioskami, spis piśmiennictwa, spis publikacji własnych oraz

suplement. Praca została napisana językiem naukowym i zawiera 81 starannie przygotowanych rycin w tekście głównym oraz 44 dodatkowe ryciny w suplemencie. Imponujące, liczące 663 pozycje piśmiennictwo świadczy o rzetelności analizy literaturowej. Całość uzupełniają załączniki, w tym powiększone ryciny 78 i S43, przedstawiające analizę korelacji neuroprzekazników w badanych strukturach.

We **Wstępie** omówiono problematykę zaburzeń związanych z używaniem substancji (SUD), ze szczególnym uwzględnieniem opioidów. Autorka odnosi się do klasyfikacji DSM-5, definiującej SUD jako zespół objawów prowadzących do trwałych zmian neuronalnych. Analizuje globalny kryzys opioidowy, zwłaszcza w USA, oraz czynniki wpływające na rozwój uzależnienia, takie jak wzmocnienie pozytywne i negatywne, tolerancja oraz głód narkotykowy. Przedstawia także neurobiologiczne aspekty SUD, rolę układu nagrody i zaangażowanych neuroprzekazników, a także techniki manipulacji ich aktywnością. Podkreśla znaczenie modelowania uzależnień oraz metod stosowanych do oceny efektów substancji psychoaktywnych, m.in. wokalizacji ultradźwiękowej.

Brakuje mi jednak krótkiej charakterystyki poszczególnych jąder ciała migdałowatego w kontekście regulacji procesów zaangażowanych w rozwój uzależnienia. Takie wprowadzenie pomogłoby lepiej uzasadnić wybór tej struktury jako obiektu badawczego, zwłaszcza że ciało migdałowe nie jest jedynym regionem mózgu zaangażowanym w proces uzależnienia. Cennym uzupełnieniem byłby również krótki opis nadużywania opioidów w Polsce, co pozwoliłoby osadzić problem w lokalnym kontekście.

Cele: ich przedstawienie nie budzi zastrzeżeń

Materiał i metody badań zostały szczegółowo opisane, a zastosowane techniki charakteryzują się wysoką pracochłonnością. Jestem pod ogromnym wrażeniem metodologii zastosowanej przez doktorantkę. Badania przeprowadzono na samcach szczurów Long-Evans, hodowanych w standardowych warunkach laboratoryjnych. Zwierzęta podzielono na grupy eksperymentalne i kontrolne, a ich zachowanie analizowano podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z morfiną, po okresie odstawienia. Odpowiedź na kontekst oceniano na podstawie wokalizacji ultradźwiękowych oraz dystansu, jaki pokonały zwierzęta. Manipulacje neurobiologiczne wykonano z wykorzystaniem techniki chemogenetycznej DREADD, umożliwiającej selektywną modulację aktywności neuronów serotonergicznym i glutaminianergicznym w ciele migdałowatym. Dodatkowo oznaczono poziom neuroprzekazników w strukturach mózgu związanych z mechanizmami uzależnienia. Analiza statystyczna została przeprowadzona rzetelnie, nie budząc zastrzeżeń. Zastosowanie algorytmu Boruta pozwoliło na identyfikację kluczowych zmiennych neurochemicznych powiązanych z odpowiedzią behawioralną zwierząt.

Doktorantka szczegółowo opisała przebieg eksperymentów, jednak pewne kwestie wymagają doprecyzowania. Ciało migdałowe składa się z kilku jąder o specyficznych funkcjach, m.in.: jądro podstawno-boczne (BLA) integrujące bodźce sensoryczne i uczestniczące w warunkowaniu strachu oraz uczeniu się emocjonalnym; jądro centralne (CeA) kontrolujące reakcje autonomiczne i hormonalne, odpowiadając za generowanie strachu i stresu; jądro przyśrodkowe (MeA) przetwarzające sygnały społeczne oraz regulujące zachowania seksualne i agresywne. Uważam, że konieczne jest doprecyzowanie do którego jądra wykonano iniekcje konstruktorów wirusowych. Ponadto, czy zwierzęta były losowo przydzielane do grup kontrolnych na początku eksperymentu, czy podział następował w trakcie? Jeśli tak, czy przebywały w tych samych klatkach domowych co zwierzęta z grup badanych, czy też były umieszczone oddzielnie, co mogło wpłynąć na ich poziom stresu? Warto również wyjaśnić, dlaczego zwierzęta kontrolne nie zostały poddane operacjom stereotaktycznym.

Wyniki zostały zaprezentowane w sposób przejrzysty i wzbogacone licznymi rycinami. Mam jednak kilka pytań dotyczących tej części rozprawy doktorskiej. Nie do końca jasne jest, czym doktorantka kierowała się przy wyborze neuroprzekaźników do szczegółowej analizy statystycznej w głównej części pracy. Zastosowanie algorytmu Boruta pozwoliło na identyfikację istotnych statystycznie zmiennych neurochemicznych oraz struktur mózgu wpływających na odpowiedź organizmu na kontekst związany z opioidami. Na przykład w ciele migdałowym algorytm wykazał zmiany w poziomach glutamianu, β -alaniny, DOPAC-u, GABA, glicyny, glutaminy, noradrenaliny, tauryny i serotoniny (niezależnie od modyfikacji chemogenetycznych). Natomiast dalsza analiza statystyczna koncentrowała się na serotoninie, 5-HIAA, glutaminianie, glicynie, sarkozynie, dopaminie, 3MT, GABA i noradrenalinie, podczas gdy pozostałe neuroprzekaźniki umieszczono w suplemencie. Podobna selekcja występuje w przypadku innych analizowanych struktur.

Analiza wyników została przeprowadzona za pomocą testu Kruskala-Wallisa, jednak w opisie wyników brakowało wartości funkcji testowej (chi-squared, df, p-value). Zwykle, przy prezentowaniu wyników, podaje się wartość funkcji testowej, a dla poziomu istotności statystycznej stosuje się przedziały (np. $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Choć podanie dokładnej wartości p nie stanowi błędu, stosowanie naprzemiennie obu podejść wydaje się nieuzasadnione.

Nie znalazłam także wyników dotyczących analizy immunocytochemicznej badanych skrawków.

Zaprezentowane badania dostarczyły ogromnej ilości danych. Ich podsumowanie, np. w formie tabeli, z podziałem na zmiany związane z wokalizacją oraz dystansem, które odzwierciedlają różne aspekty zmian wywoływanych przez substancje psychoaktywne

znacząco ułatwiłoby analizę i dyskusję wyników. Dodatkowo, czytelność danych uzyskanych przy użyciu algorytmu Boruta można by poprawić, umieszczając obok siebie wykres i opis wyników.

Dyskusja wyników została napisana w sposób przejrzysty. Doktorantka logicznie omawia uzyskane wyniki, potwierdzając hipotezę, że modulacja ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w jądrach ciała migdałowatego odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na kontekst związany z podaniem morfiny.

Odwołania do najnowszych publikacji świadczą o dobrej znajomości tematu oraz aktualnych trendów w badaniach nad mechanizmami głodu narkotykowego. Również obszerny wykaz literatury, obejmujący ponad 663 pozycje, potwierdza solidne przygotowanie merytoryczne autorki.

Poniżej przedstawiam kilka uwag i pytań dotyczących Dyskusji:

1. Na stronie 157 doktorantka napisała: „Badania neurochemiczne wykazały, że większość substancji psychoaktywnych o potencjale uzależniającym powoduje ostry (ang. acute) wzrost aktywności serotoniny w całym mózgu [498]. Rola 5-HT w rozwoju i utrzymaniu zachowań związanych z używaniem morfiny wydaje się jednak zróżnicowana i specyficzna dla danego obszaru mózgu [599–602].” Czy doktorantka mogłaby szerzej skomentować tę kwestię, odnosząc się również do wyników własnych badań?
2. Na stronie 163 czytamy: „W celu identyfikacji statystycznie istotnych różnic neurochemicznych pomiędzy grupami 'Glu+5-HT-' i 'Glu+5-HT+' przeprowadzono dodatkową analizę z wykorzystaniem algorytmu Boruta, której wyniki przedstawiono na rysunku 81. Wyniki analizy wskazały, że istotne znaczenie dla zróżnicowania grup miały: noradrenalina i kwas γ -aminomasłowy (GABA) w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC), glutaminian w hipokampie (Hipp), kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) w jądrze półleżącym (Nacc) oraz 5-hydroksyindoloctowy (5-HIAA) w ciele migdałowatym, polu brzusznej nakrywki oraz korze retrosplenialnej.” W obu grupach ('Glu+5-HT-' i 'Glu+5-HT+') poziom GABA w mPFC był obniżony, co nie stanowiło czynnika różnicującego. Dodatkowo, istotność 5-HIAA odnotowano w ciele migdałowatym, korze retrosplenialnej i polu brzusznej nakrywki. Czy Doktorantka mogłaby szerzej omówić znaczenie tych neuroprzekazników w kontekście różnic między grupami? W analizie statystycznej wszystkie wyniki odnoszono do grupy kontrolnej morfinowej. Dlaczego nie przeprowadzono porównania między grupami, co mogłoby ułatwić interpretację wyników?

3. Na stronie 155 Doktorantka nie dokończyła akapitu rozpoczynającego się od zdania:
„Analiza z wykorzystaniem algorytmu Boruta wykazała ...”.

Pod koniec rozprawy Doktorantka przedstawia swój dorobek naukowy, w tym współautorstwo dwóch publikacji – w jednej jako pierwsza autorka, w drugiej jako trzecia spośród dziesięciu autorów. Proszę o uzupełnienie danych tych publikacji.

Drobne uchybienia redakcyjne:

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

- powtarzające się wyjaśnianie skrótów np.: Neuroprzebieżniki (NT) str 24 i 25; w rozdziale 3.8. str 62 autorka wyjaśnia skrót monoamin i aminokwasów i powtarza rozwinięcia na str. 77, 79, 81, 83, 88, 89, itd., wielokrotnie wyjaśnia również skrót analizowanych struktur mózgu np.: rozdział 1.4 i str 158.

- strona 23, w zdaniu „Badania funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI) z udziałem ludzi potwierdziły potwierdziły kluczową rolę ciała migdałowego w generowaniu głodu opioidowego

wywołanego bodźcem (ang. cue-elicited) [127, 172–175].” – powtórzenie słów

- strona 53, rys 2 „(B) iniekcja konstruktów wirusowych do ciała migdałowego i rekonwalescencja pooperacyjnej (C) (z wyjątkiem osobników zakwalifikowanych do grup kontrolnych);” powinno być rekonwalescencja pooperacyjna.

- strona 57, rozdział 3.5.4, w zdaniach:

„ Po aklimatyzacji zwierząt w grupie rozpoczynano procedurę warunkowania miejsca (rys. 3 D).” powinno być rys 2 D;

„Przez 10 kolejnych dni szczur, raz dziennie, podawano roztwór morfiny (podanie podskórne w okolicę karku; ...” powinno być szczurom;

„Po iniekcji zwierzęta umieszczano do klatek testowych w podgrupach, ograniczonych do współdomowników z klatek domowych w celu ograniczenia stresu związanego ze zmianą miejsca oraz izolacją.” powinno być umieszczano w klatkach, aby uniknąć powtarzania ograniczonych lepiej użyć określenia w celu zredukowania stresu.

- strona 64, rozdział 3.9.2, w zdaniu ” Skrawki tkanek przeznaczone do barwienia znaczników mCherry wybierano skrawki tkanek przeniesiono do 12-dołkowej płytki testowej.” Powinno być mCherry przeniesiono do.

- strona 79, dwukrotnie zostały opisane zmiany w jądrze półleżącym

- strona 148, w zdaniu „Hipoteza dotycząca roli ... pozytywne korelacje między między poziomem serotoniny ...” powtórzone słowo między.

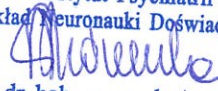
- strona 152, w zdaniu „Długotrwałe stosowanie morfiny może prowadzić do reorganizacji sieci neuronowej, co wpływa działanie obwodów neuronalnych i przetwarzanie sygnałów, w tym potencjalnie związanych z indukowaniem wokalizacji ultradźwiękowych [113, 405]”, powinno być co wpływa na działanie obwodów.

- strona 156, w zdaniu „Związki te są najprawdopodobniej zaangażowane są w odpowiedź kontekstową, niezależnie od formy jej ekspresji.” powtórzone słowo są.

- strona 158, w zdaniu „W grupie "5-HT-" zaobserwowano również spadek poziomów dopaminy (DA) w ciele migdałowatym (Amy) (rys. 20), jądrze półleżącym (Nacc) (rys. 29), prążkowiu (Cpu) (rys. 38) i polu brzusznej nakrywki (VTA) (rys. 47), czyli strukturach związanych min. In. Z mezolimbicznym szlakiem dopaminergicznym, w którym ten neuroprzebieżnik odgrywa kluczową rolę w przetwarzaniu informacji o nagrodzie (więcej informacji przedstawiono w punkcie 1.4).” powinno być m.in. z mezolimbicznym.

- strona 161-162, w zdaniu „Zgodnie z danymi literaturowymi glutaminian pełni rolę modulatora modulatora układu dopaminergicznego [648].” Powtórzone słowo modulatora.

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Mrozek potwierdza jej dogłębną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Autorka wykazała się znajomością nowoczesnych metod eksperymentalnych, takich jak technika DREADD i algorytm Boruta, co stanowi innowacyjne podejście do analizy mechanizmów uzależnienia. Praca jest starannie opracowana pod względem metodologicznym i wnosi istotny wkład w zrozumienie roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym. W mojej ocenie, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr. Wiktorii Mrozek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Adiunkt
Instytut Psychiatrii i Neurologii
Zakład Neuro nauki Doświadczalnej i Klinicznej

dr hab. n. med. Anna Skórzewska



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Centrum Badań Przedklinicznych CePT

Warszawa, 2025-04-01

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Wiktorii Mrozek pod tytułem: „*Badanie roli ko-transmisji serotoninergicznej i glutaminianergicznej w ciele migdałowatym jako neuromodulatora emocji w uzależnieniu*”

Rozprawa doktorska pt. „Badanie roli ko-transmisji serotoninergicznej i glutaminianergicznej w ciele migdałowatym jako neuromodulatora emocji w uzależnieniu” została przygotowana przez mgr Wiktorię Mrozek w Pracowni Pamięci Przestrzennej, w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Promotorem rozprawy jest dr hab. Adam Hamed, a funkcję promotora pomocniczego pełni dr Miron Kursa. Realizacja projektu została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego OPUS nr 2018/29/B/NZ7/02021.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 230 stron i ma klasyczny układ. Składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim (7 stron), wstępu (34 strony), celów (1 strona), opisu materiałów i metod (22 strony), wyników (77 stron), dyskusji (19 stron), wniosków (3 strony), bibliografii zawierającej 663 pozycji literaturowych oraz suplementu (23 strony). Procedury eksperymentalne uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej - uchwała numer: 539/2018.

Rozprawa doktorska Wiktorii Mrozek podejmuje ambitny i nowatorski temat z pogranicza neurobiologii emocji, uzależnień oraz neurotransmisji. Głównym celem pracy było

zbadanie roli współdziałania dwóch systemów neuroprzekaźnikowych – serotoninerpicznego i glutaminianergicznego w regulacji odpowiedzi emocjonalnych wywołanych ekspozycją na kontekst skojarzony z substancją uzależniającą (morfina). W badaniach wykorzystano zaawansowane techniki chemogenetyczne DREADD, modele behawioralne jak również przeprowadzono analizę neurochemiczną a uzyskane wyniki poddano zaawansowanej obróbce statystyczno-matematycznej.

Wstęp

We wstępie Doktorantka dokonała przeglądu literatury klinicznej, eksperymentalnej oraz neurobiologicznej dotyczącej uzależnień, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń związanych z używaniem opioidów (OUD). Autorka odwołała się do kryteriów diagnostycznych DSM-5 i omówiła klasyczne koncepcje uzależnienia, takie jak wzmocnienie pozytywne, tolerancja, rozwój objawów odstawiennych, mechanizmy głodu narkotykowego i jego inkubacji. Następnie przedstawiła neurobiologiczne podłoże tych zjawisk, akcentując rolę ciała migdałowatego, jądra półleżącego, hipokampa i kory przedczołowej. Autorka omówiła również technikę DREADD, znaczenie wokalizacji ultradźwiękowej (USV) w badaniach nad emocjami.

Wstęp został napisany sprawnie i przejrzyste i jako taki nie budzi poważnych zastrzeżeń. Niemniej pewne kwestie, moim zdaniem, można by zmodyfikować lub rozszerzyć. Opis sytuacji epidemiologicznej związanej z uzależnieniami od opioidów opiera się głównie na danych z USA, Kanady, Australii i krajów azjatyckich. Nie przedstawiono danych dotyczących tego problemu w Polsce czego mi wyraźnie brakuje.

Kolejną kwestią, którą można wziąć pod uwagę to odniesienie się również do mechanizmu wzmocnienia pozytywnego w przypadku stosowania substancji psychoaktywnych o innych mechanizmach działania jak LSD czy psylocybina, których wpływ na układ nagrody nie jest tak oczywisty jak opioidów. Podobnie kwestia pojawiania się uzależnienia u osób z ciężkimi dolegliwościami bólowymi stosującymi opioidy. Czy mechanizm jest identyczny jak w przypadku ich rekreacyjnego stosowania? Jak się wydaje kolejność klasycznych faz uzależnienia będzie inna, co więcej uważa się, że ryzyko rozwoju uzależnienia jest wyraźnie niższe. Ponadto wskazane jest rozszerzenie opisu „cichych synaps” pojawiających się w kontekście inkubacji głodu narkotykowego. Zjawisko to jest wyjątkowo ciekawe a z tekstu Doktorantki nie wynika jasno czy ich obecność i dojrzewanie są wskaźnikiem nasilenia głodu, czy też mechanizmem adaptacyjnym redukującym jego siłę. Na koniec warto zwrócić uwagę, że część definicyjna wstępu zawiera czasem zbyt proste elementy, jak np. wyjaśnienia co to jest neuron, synapsa czy potencjał czynnościowy. Moim zdaniem, chociaż ma to niewątpliwie walor popularyzatorski, to w pracy doktorskiej można by tego rodzaju informacje skrócić lub całkowicie pominąć.

Metody

Część metodologiczna pracy jest szczegółowa. Autorka omówiła zastosowany behawioralny model eksperymentalny z użyciem szczurów Long-Evans, u których po zastosowaniu wektorów wirusowych AAV do ekspresji receptorów DREADD (hM3Dq, hM4Di) specyficznych dla neuronów serotoninerpicznych i glutaminianergicznych

(hamujących lub pobudzających) podawano przewlekle morfinę w teście warunkowania miejsca a następnie po okresie odstawienia (inkubacji głodu narkotykowego) oceniano odpowiedź kontekstową.

Selektywne pobudzenie lub hamowanie aktywności tych neuronów w ciele migdałowatym wywoływane było podaniami liganda aktywującego - JHU37160, a następnie oceniano reakcję emocjonalną (USV) i motywacyjną (dystans). Po zakończeniu testów przeprowadzono analizę danych audio, wideo, analizę neurochemiczną (spektrometria masowa) oraz barwienia immunohistochemiczne oraz oceniono uzyskane dane przy użyciu algorytmu Boruta.

Zastosowane metody są zaawansowane i adekwatne do celu pracy. Niemniej niektóre elementy metodologii wymagają pewnego uszczegółowienia. Pierwsza wątpliwość dotyczy aktywności receptorów podanych przy użyciu wektora. W jaki sposób potwierdzono ich aktywność w badanej grupie? W badaniu potwierdzającym przeprowadzonym na dodatkowej grupie zwierząt zaprezentowano obecność receptorów jednak nie ma danych o ich aktywności. Czy zatem potwierdzenie lokalizacji należy traktować jako potwierdzenie ich aktywności? Ponadto Autorka podała, że w eksperymentach zastosowano ligand JHU37160, który aplikowano 30 minut przed testem, jednak nie uzasadniono wyboru czasu podania. Czy wynika on z farmakokinetyki związku tzn. czasu działania i szczytowego stężenia czy być może wynika z przeprowadzonej wcześniej optymalizacji tego parametru? Doprecyzowania wymaga także kwestia jakie bodźce kontekstowe, poza światłem w suficie zawierały klatki stosowane do warunkowania. Czy wcześniej klatki weryfikowano w innej procedurze warunkowania np. warunkowania strachu? Wskazane jest też określenie czy wszystkie osobniki, którym podano wektory, zostały uwzględnione w analizach końcowych, ani czy zdarzały się przypadki nieprawidłowej lokalizacji iniekcji, braku ekspresji, komplikacji pooperacyjnych lub innych problemów zmuszających do wykluczenia danego zwierzęcia z analiz.

Autorka wskazuje też, że bregma jest punktem w obszarze ciemniaczka, jest to chyba tylko punkt przecięcia szwów a definicyjnie ciemniaczko jest nieskostniałym obszarem na miejscu styku kości czaszki.

Wyniki

Rozdział poświęcony wynikom to najdłuższa i najbardziej szczegółowa część rozprawy, obejmująca blisko 80 stron. Autorka przejrzyście zaprezentowała dane z różnych poziomów eksperymentalnych: behawioralnego (wokalizacje i dystans), neurochemicznego (poziomy neuroprzebieżników i ich metabolitów w siedmiu strukturach mózgowych) oraz korelacyjnego (sieci zależności neuroprzebieżników, analiza Boruta). Podział jest logiczny i klarowny, a dane są dobrze zorganizowane i opatrzone licznymi rycinami, które znacząco ułatwiają orientację w materiale.

W części behawioralnej wykazano, że liczba wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie 50 kHz, różniła się istotnie pomiędzy grupami eksperymentalnymi. W grupie, w której chemogenetycznie hamowano transmisję serotonergiczną (grupa 5-HT-), liczba wokalizacji spadła w porównaniu do grupy kontrolnej. Jeszcze silniejszy spadek zaobserwowano w grupie Glu+5-HT-, w której jednocześnie aktywowano transmisję glutaminergiczną i hamowano

serotonergiczną. Co ciekawe, grupa Glu+5-HT+, czyli jednoczesna aktywacja obu systemów, wykazywała wzrost liczby wokalizacji względem kontroli.

W przypadku drugiej zmiennej behawioralnej – dystansu pokonywanego przez zwierzęta w klatce testowej – wyniki były mniej wyraziste. Kierunek zmian (zwiększenie przebywanego dystansu) była identyczna pomiędzy grupami z przeciwstawnymi manipulacjami np. 5-HT+ i 5-HT- oraz GLU+ i GLU-. Uzyskane dane w tym aspekcie są dosyć trudne do interpretacji.

Następnie Autorka zaprezentowała analizę części neurochemicznej. Wykorzystując spektrometrię masową, zmierzono poziomy kilkunastu substancji: serotoniny, glutaminianu, dopaminy, noradrenaliny, GABA, a także metabolitów (DOPAC, HVA, 5-HIAA) i aminokwasów (Gln, Gly, Asp). Pomiarów dokonano w siedmiu strukturach: ciele migdałowatym (Amy), jądrze półleżącym (NAcc), prążkowi (CPu), polu brzusznej nakrywki (VTA), przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC), hipokampie (Hipp) i korze retrosplenialnej (RSC). W ciele migdałowatym zaobserwowano, że hamowanie transmisji serotonergicznego (grupa 5-HT-) skutkowało istotnym obniżeniem poziomu 5-HT oraz jej metabolitu 5-HIAA. Jednoczesna aktywacja Glu i 5-HT (grupa Glu+5-HT+) prowadziła do wzrostu poziomów glutaminianu. Podobne tendencje obserwowano w pozostałych strukturach, przy czym ich siła i kierunek były zależne od struktury i rodzaju manipulacji. Przykładowo, w NAcc aktywacja systemu glutaminianergicznego skutkowała wzrostem Glu, ale nie wpływała istotnie na poziom 5-HT. W hipokampie zaś zauważono wyraźną redukcję noradrenaliny w grupie Glu+5-HT-, co może mieć znaczenie dla przetwarzania kontekstu przestrzennego.

Najbardziej złożoną część stanowi analiza korelacji między parametrami neurochemicznymi. Autorka wykorzystała algorytm Boruta, by wyodrębnić te czynniki, które najlepiej różnicują poszczególne grupy behawioralne. Analiza korelacji wykazała istnienie skomplikowanej sieci współzależności między neuroprzekaźnikami – zarówno w obrębie jednej struktury, jak i między strukturami. Przykładowo, liczba USV była dodatnio skorelowana z poziomem 5-HT w ciele migdałowatym i ujemnie z GABA w NAcc. W innej analizie stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy Glu w ciałach migdałowatych a 5-HT w mPFC – co może sugerować trans-strukturalną synchronizację aktywności tych układów.

Całość wyników wskazuje na bardzo istotną rolę współdziałania układów serotonergicznego i glutaminianergicznego w warunkowaniu odpowiedzi emocjonalnej na kontekst nagradzający. Jednak nie wszystkie zależności są jednoznaczne. W niektórych przypadkach zmiany neurochemiczne nie miały odpowiednika w zmianach zachowania, nie jest łatwo ustalić także kierunek zależności – czy to poziom neuroprzekaźników determinuje zachowanie, czy też zmiany zachowania wpływają wtórnie na układ neurotransmisyjny. Czy wobec uzyskanych danych Autorka uważa, że zmiany neurochemiczne są pierwotne czy wtórne wobec zmian behawioralnych?

Dyskusja

Rozprawę kończy dyskusja, w której Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z danymi pochodzącymi z aktualnego piśmiennictwa. Dyskusja wyników została opracowana bardzo rzetelnie i obejmuje interpretację danych z każdego poziomu: zachowania, neurochemii,

oraz interakcji między strukturami. Autorka omawia każde z zaobserwowanych zjawisk, odnosząc się do literatury, oraz wskazując możliwe mechanizmy leżące u ich podstaw.

Redukcja liczby USV po hamowaniu systemu serotonergicznego (grupa 5-HT-) została zinterpretowana jako dowód na to, że serotonina w ciele migdałowatym odgrywa istotną rolę w ekspresji pozytywnego afektu w odpowiedzi na kontekst uzależniający. Analogicznie, wzrost liczby USV w grupie Glu+5-HT+ potraktowano jako potwierdzenie synergii pomiędzy układami glutaminianergicznym i serotonergicznym. Interpretacja ta jest spójna z obserwowanymi wzrostami poziomów neuroprzekaźników w tych grupach oraz ze znanym udziałem ciała migdałowatego w przetwarzaniu emocji, jednakże niemal identyczny wynik USV w obu grupach, moim zdaniem świadczy raczej o dominującym wpływie układu serotoninowego.

W ciekawy sposób autorka omawia brak korelacji między dystansem a liczbą wokalizacji. Sugeruje, że te dwa parametry odpowiadają różnym komponentom odpowiedzi kontekstowej – afektywnemu (USV) i motywacyjnemu (dystans). Jest to interpretacja logiczna, jednak wymagałaby dalszego wsparcia eksperymentalnego, np. przez zastosowanie dodatkowych miar motywacji w innych eksperymentach behawioralnych. Interesująca jest także analiza korelacyjna, gdzie autorka wykazuje, że podobne poziomy zachowania mogą wynikać z różnych wzorców neurochemicznych. Oznacza to, że zbliżone zachowania mogą być generowane przez różne „konfiguracje” aktywności układów neurotransmisyjnych – co ma duże znaczenie translacyjne i stanowi sugestię dla personalizacji terapii uzależnień. Autorka sugeruje, że skuteczne leczenie może wymagać dostosowania do „profilu neurochemicznego” danego pacjenta, a nie tylko do objawów behawioralnych.

Mimo wysokiego poziomu dyskusji, niektóre interpretacje wydają mi się zbyt spekulatywne. Na przykład, wpływ aktywacji układu glutaminianergicznego na poziom emocji jest trudny do jednoznacznej oceny, ponieważ glutaminian pełni rolę pobudzającą w wielu szlakach, zarówno nagradzających, jak i awersyjnych. Nieco brakuje również bardziej szczegółowego odniesienia do zmian w poziomach badanych aminokwasów (np. alaniny). Ostatnią kwestią jest płeć badanych zwierząt. Biorąc pod uwagę płciowe różnice neurochemiczne i behawioralne wskazane byłoby odniesienie się na ile uzyskane dane można traktować uniwersalnie a na ile są płciowo specyficzne.

Pracę kończą podsumowanie i wnioski. Wnioski zaprezentowane przez Doktorantkę odnoszą się wprost do danych eksperymentalnych. W moim przekonaniu zabrakło wniosku odnoszącego się wprost do celu czyli mechanizmu inkubacji głodu, chociaż zdaję sobie sprawę, że wobec bardzo licznych danych, w wielu miejscach trudnych do jednoznacznej interpretacji nie byłoby to łatwe.

Należy stwierdzić, że pewne niedoskonałości zidentyfikowane w pracy nie umniejszają jej wartości. Rozprawa doktorska Wiktorii Mrozek to praca nowatorska i kompleksowa i stanowi oryginalny wkład w badaniach dotyczących regulacji stanów emocjonalnych związanych z nawrotem uzależnienia. Zdefiniowanie problemu, osadzenie go w realiach społecznych wskazuje na rozległą wiedzę teoretyczną adekwatną dla osoby ubiegającej się o stopień doktora. W pracy zastosowano zróżnicowaną metodologię, uwzględniono szeroki zakres pomiarów – obejmujący zarówno zachowanie, jak również poziomy neuroprzekaźników oraz ich wzajemne relacje, a także nowoczesne metody analityczne – m.in. wykorzystanie

algorytmu Boruta. Zastosowane metody są adekwatne to podjętego problemu, co jednoznacznie świadczy o odpowiednim przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że autorka w toku dyskusji wykazuje dużą świadomość ograniczeń swoich danych i wielokrotnie zaznacza, że zależności korelacyjne nie są tożsame z przyczynowymi. To podejście krytyczne i dojrzałe. Wskazuje to na wysoką jakość przygotowania naukowego doktorantki i zdolność do samodzielnej oceny wartości oraz ograniczeń własnych badań.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz.742 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Wiktorii Mrozek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Dr hab. n. med. Janusz Szyndler

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa