

Warszawa, 8.12.2020 r.

**Recenzja** pracy doktorskiej mgr Anny Guguły pt. Wpływ stresu na morfologię neuronów kory ruchowej oraz strukturę i aktywację neuronów brzuszno-pole nakrywki szczura. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Hessa w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Autorka pracy doktorskiej podjęła się bardzo ambitnego tematu, tzn. powiązania zmian morfologicznych w mózgu na poziomie dendrytów komórkowych i neuronów z działaniem hormonalnych i psychicznych bodźców stresowych. Dodatkowo, projekt jest skomplikowany porównaniem badanych efektów ośrodkowych w obu płciach. Punktem wyjścia projektu jest neurotoksyczny wpływ stresu oraz zjawisko pobudzania neurogenezy i tworzenia połączeń synaptycznych, przez leki przeciwdepresyjne. Chodziło więc o stworzenie i badanie w modelach przedklinicznych, na poziomie subkomórkowym, zjawisk wywoływanych przez bodźce stresowe, będące prawdopodobną przyczyną zaburzeń i chorób psychicznych. Problematyka pracy doktorskiej jest jak najbardziej aktualna i dotyczy kluczowego problemu patomechanizmu zaburzeń i chorób zależnych od stresu.

Wstęp do pracy jest bardzo obszerny i liczy 50 stron przeglądu piśmiennictwa naukowego. Jest przejrzysty i zawiera wszystkie elementy uzasadniające podjęcie tematyki badawczej, w tym omówienie fizjologii reakcji stresowych, oddziaływanie stresu we wczesnych etapach rozwoju osobniczego (okres dojrzewania), wpływ stresu na morfologię neuronów i plastyczność dendrytów, modele zwierzęce reakcji stresowych, budowa i rola kory ruchowej i pola VTA (brzuszne pole nakrywki), receptory dopaminergiczne. Cele pracy są przedstawione klarownie. Pierwsza część badań ma na celu zbadanie wpływu wielokrotnych podań hormonu stresu, kortykosteronu, na morfologię neuronów piramidowych kory ruchowej M1, u samców szczurów. Druga część dotyczy zbadania wpływu separacji od matki na morfologię neuronów VTA i ich wrażliwość na stres immobilizacji u samic szczurów (samice szczurów zostały wybrane aby modelować częstsze występowanie zaburzeń zachowania związanych ze stresem, w tej populacji adolescentów).

Zastosowano dwa podstawowe modele bodźców stresowych: wielokrotne podania kortykosteronu oraz stres separacji od matek młodych szczurów. Dodatkowo, dla zintensyfikowania efektu, zastosowano stres unieruchomienia w grupie zwierząt izolowanych. Badano zmiany w budowie drzewek dendrytycznych komórek piramidowych M1 i neuronów VTA przy pomocy mikroskopii konfokalnej oraz rekonstrukcji 3D, wpływ na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych także, wpływ na ekspresję białka synaptycznego PSD-95, ekspresję białka c-FOS po stresie immobilizacji w grupie szczurów separowanych, wpływ separacji na poziom kortykosteronu i ACTH we krwi (testy Elisa), oraz poziom receptorów GR i MR w VTA (Western Blot). Zastosowana metodologia jest adekwatna do założonych celów, jest bardzo pracochłonna i wymaga wyjątkowej precyzji. Jest także metodologią nowoczesną, stosowaną w najlepszych laboratoriach.

Wyniki analiz są niejednoznaczne i trudne do analizy. Przyczyny są złożone. Przede wszystkim podstawowym problemem jest złożoność zjawiska, tzn. wielopiętrowe przechodzenie i transformacja informacji od bodźca psychicznego (stresowego) lub biochemicznego (hormonu stresu), na poziom morfologii neuronów. Po drugie, nie zweryfikowano efektu behawioralnego (czynnościowego) zastosowanych procedur stresowych, tzn. czy powodowały one istotne zmiany w funkcjonowaniu zwierząt (np. pod postacią zaburzeń w reakcjach socjalnych lub lękowych). Ten problem sprowadza się do pytania, czy zastosowano odpowiednio duże dawki kortykosteronu lub odpowiednio długi czas trwania stresu separacyjnego i unieruchomienia dla wywołania efektów behawioralnych? Zmiany morfologiczne powinny być bowiem wtórne dla funkcjonalnych, w modelach zaburzeń wywołanych przez stres, aby miały znaczenie biologiczne. Nie oznacza to, oczywiście, że otrzymane wyniki są niemożliwe do zinterpretowania. Obserwowane efekty morfologiczne wskazują bowiem na kierunek możliwych zmian w budowie subkomórkowej mózgu, zachodzących pod wpływem bodźców stresowych. Tak patrząc na wyniki, okazują się one w wielu aspektach bardzo interesujące. Do najważniejszych efektów należy zaliczyć: **(i)** zmiany w budowie drzewka dendrytycznego neuronów piramidowych warstwy 2/3 i 5 kory M1 po podaniu kortykosteronu; **(ii)** wzrost gęstości kolców dendrytycznych neuronów warstwy 2/3 kory M1, po podaniu kortykosteronu, **(iii)** stres separacyjny zmniejsza gęstość kolców dendrytycznych na komórkach części DL VTA samic szczurów, **(iv)** powoduje spadek gęstości synaps pobudzających (znakowanych białkiem PSD-95) w VTA, **(v)** w połączeniu ze stresem unieruchomienia zwiększa ekspresję białka c-Fos w neuronach VTA młodych dorosłych samic

szczurów, (vi) podnosi poziom kortykosteronu i ACTH we krwi samic szczurów, w okresie dojrzewania.

Dyskusja (26 stron) jest dojrzała i wnikliwa, bazuje na prawie 250 pozycjach aktualnego piśmiennictwa naukowego. Wnioski nie są ponumerowane ale ogólne, opisowe. Autorka proponuje oryginalną koncepcję zaburzeń ruchowych zachodzących pod wpływem stresu: podwyższony poziom kortykosteronu drogą poprzez rec. GR i MR oraz DA wywołuje zmiany w morfologii neuronów piramidowych kory M1, skutkujące rozwojem zaburzeń ruchowych obserwowanych klinicznie.

Biorąc pod uwagę ilość włożonej pracy i jej wysoką jakość z przyjemnością stwierdzam, że recenzowana dysertacja doktorska jest dojrzałym dziełem naukowym a jej autorka obiecującym pracownikiem naukowym. Praca doktorska zaświadcza o umiejętności stawiania oryginalnych pytań badawczych, planowania badań, ich właściwego wykonania i zinterpretowania. Praca doktorska mgr Anny Guguły jest także wyjątkowo starannie opracowana graficznie i edytorsko. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska mgr Anny Guguły spełnia wszystkie warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65, poz.595; z 2005r. Nr164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr182., poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455), stąd rekomenduję **Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego** dopuszczenie mgr Anny Guguły do dalszych etapów obrony dysertacji doktorskiej. Biorąc także pod uwagę ilość włożonej pracy i jej bardzo wysoką jakość metodologiczną oraz analityczną – a jest to główny cel pracy doktorskiej, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

**Prof. dr med. Adam Płaźnik**

Zakład Neurochemii

Instytut Psychiatrii i Neurologii

Warszawa

Instytut Psychiatrii i Neurologii  
**ZAKŁAD NEUROCHEMII**  
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9  
*Prof. dr hab. med. Adam Płaźnik*