

Warszawa, 26 marca 2022 r.

Prof. dr hab. Alina Gajewska

Zakład Fizjologii Zwierząt

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

Jabłonna k. Warszawy

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kobrzyckiej zatytułowanej **”Ośrodkowe mechanizmy kompensacji długotrwałego upośledzenia immunosensorycznej i immunosupresorowej funkcji nerwu błędnego”**, wykonanej w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej w Katedrze Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Marka Wieczorka oraz promotora pomocniczego Pana dr Adriana Mateusza Stankiewicza.

## **I. Ocena formalna pracy**

Pierwszą częścią przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej są cztery prace, w których Pani mgr Anna Kobrzycka jest pierwszym autorem.

1. Praca przeglądowa, zawierająca też wyniki badań własnych, opublikowana w języku polskim w czasopiśmie recenzowanym:

**Kobrzycka A.**, Rudnicki K., Jabłoński G., Wieczorek M. Immunosensoryczne funkcje nerwu błędnego. Kosmos. 2017; 66:651-663. Liczba punktów MEiN: 20.

2. Praca oryginalna opublikowana w czasopiśmie z listy JCR:

**Kobrzycka A.**, Nopora P., Pearson B. L., Pierzchała-Koziec K., Szewczyk R., Wieczorek M. Peripheral and central compensatory mechanisms for impaired vagus nerve function during peripheral immune activation. Journal of Neuroinflammation. 2019;16:150. IF= 8,322. Liczba punktów MEiN:100.

3. Praca oryginalna w formie manuskryptu: **Kobrzycka A.**, Stankiewicz A. M., Gościk J., Góra M., Burzyńska B., Iwanicka-Nowicka R., Pierzchała-Koziec K., Wieczorek M. "Hypothalamic neurochemical changes in long-term recovered bilateral subdiaphragmatic vagotomized rats" przesłanego do redakcji czasopisma Brain Research.

4. Praca oryginalna w formie manuskryptu: **Kobrzycka A.**, Stankiewicz A. M., Nopora P., Pierzchała-Koziec K., Wieczorek M. "Bilateral subdiaphragmatic vagotomy modulates the

peripheral met-enkephalin and striatal monoamine responses to peripheral inflammation in rat” przesłanego do redakcji czasopisma Brain Research.

Do każdej publikacji oraz do każdego manuskryptu Doktorantka załączyła pisemne oświadczenia wszystkich współautorów, którzy wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac jako części Jej rozprawy doktorskiej i szczegółowo określili zakres swego indywidualnego zaangażowania w wykonywaniu badań i przygotowaniu tekstów naukowych. Z treści oświadczeń jednoznacznie wynika wiodący udział mgr Anny Kobrzyckiej we wszystkich etapach powstawania włączonych do rozprawy prac:

W pracy 1 (*Kosmos, 2017*) udział ten wynosił 80% i obejmował: przygotowanie preparatów histologicznych wraz wykonaniem ich zdjęć, opracowanie koncepcji i napisanie kolejnych wersji tekstu, pracę nad przygotowaniem diagramów i ostateczną edycją tekstu.

W pracy 2 (*Journal of neuroinflammation, 2019*) na indywidualny, wynoszący 55%, wkład Doktorantki złożyła się praca eksperymentalna związana z izolacją i przygotowaniem dyskretnych struktur mózgu pobranych do oznaczenia stężenia amin biogennych oraz wykonaniem analiz metodą chromatografii wysokociśnieniowej wraz z interpretacją otrzymanych danych, a także kompleksowa analiza wyników uzyskanych w testach behawioralnych, przeprowadzenie analizy statystycznej wszystkich danych eksperymentalnych, jak również praca nad przygotowaniem manuskryptu obejmująca opracowanie koncepcji tekstu, napisanie kolejnych wersji i opracowanie edytorskie manuskryptu.

W pracy 3 (*Hypothalamic neurochemical changes in long-term recovered bilateral subdiaphragmatic vagotomized rats*) indywidualny wkład Doktorantki wynosił 50% i polegał na udziale w części eksperymentalnej (operacje na zwierzętach, kolekcja próbek i ich adaptacja do analiz HPLC i mikromacierzowych), wykonaniu analiz HPLC oraz analiz RT- qPCR wraz z interpretacją otrzymanych wyników, analizie statystycznej otrzymanych danych, a także na pracy koncepcyjnej i edytorskiej związanej z napisaniem kolejnych wersji manuskryptu i przygotowaniem go do druku.

W pracy 4 (*Bilateral subdiaphragmatic vagotomy modulates the peripheral me-enkephalin ans straitea responses to peripheral inflammaton in rat* ) indywidualny wkład Doktorantki wynosił 60% i obejmował pracę eksperymentalną związaną z przygotowaniem próbek krwi i struktur mózgowia do analiz i wykonanie oznaczeń metodą HPLC wraz z interpretacją otrzymanych danych, wykonanie analizy statystycznej otrzymanych wyników, a także pracę koncepcyjną i edytorską związaną z napisaniem kolejnych wersji manuskryptu i przygotowaniem go do druku.

Drugą, integralną częścią ocenianej rozprawy jest przygotowane w języku polskim opracowanie, które zawiera syntetyczne wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej, wyodrębniony cel badań wraz przyjętymi założeniami, opis zastosowanej metodyki z uwzględnieniem charakterystyki zastosowanych procedur doświadczalnych i wykorzystanych technik analitycznych, zwarte omówienie uzyskanych wyników badań zaprezentowanych na tle wybranych danych literaturowych, wnioski wypływające z badań własnych, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bibliografię.

Układ ocenianej rozprawy spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim powstałym na podstawie własnych badań eksperymentalnych. Niebudzące wątpliwości, wszechstronne zaangażowanie Pani mgr Anny Kobrzyckiej zarówno w wykonywanie pracy badawczej, jak też w przygotowanie każdej z powyższych publikacji/manuskryptów, w mojej ocenie w pełni uzasadnia ich łączne przedstawienie jako części Jej rozprawy doktorskiej.

## **II. Ocena merytoryczna rozprawy**

Wzajemne oddziaływania układów immunologicznego i ośrodkowego są od lat przedmiotem badań, w wyniku których zaproponowano kilka dróg, jakimi układ odpornościowy komunikuje się z centralnym układem nerwowym. Kluczowym elementem w tym procesie są cytokiny, które mogą przenikać przez narządy okołokomorowe, być transportowane przez białkowe transportery błonowe lub być syntetyzowane w mikrogleju. Ponadto, interakcja obu układów może odbywać się drogą pośrednią dzięki aktywacji cyklooksygenaz i w konsekwencji syntezy prostaglandyn w śródbłonku naczyń włosowatych, a także poprzez obwodowe, czuciowe zakończenia nerwu błędnego. Podstawą podjęcia ocenianych badań było założenie, że upośledzenie immunosensorycznej i immunosupresorowej funkcji nerwu błędnego nie przerywa komunikacji między układem odpornościowym i ośrodkowym układem nerwowym, lecz indukuje powstanie mechanizmu kompensacyjnego, który zapewnia utrzymanie ich funkcjonalnego związku. Doktorantka skoncentrowała się nie tylko na poszukiwaniu zmian, jakie stan zapalny wywołuje w wybranych strukturach ośrodkowego układu, lecz także zmian w zachowaniu zwierząt w warunkach długotrwałej neuropatii nerwu błędnego.

Przemyślane i wszechstronne badania Doktorantka wykonała na modelu *in vivo*, w którym wykorzystywała trzymiesięczne samce szczura Wistar poddane obustronnej wagotomii podprzeponowej lub operacji pozorowanej bez przecięcia gałązek nerwu (*ang. sham operated*). Po 30 dniach rekonwalescencji, u zwierząt był indukowany stan zapalny przez jednorazową iniekcję lipopolisacharydu (LPS) aplikowanego dootrzewnowo. Po 120 minutach od iniekcji, część zwierząt poddawano testowi uniesionego labiryntu krzyżowego (*ang. elevated plus maze*

*test*), w którym określano trzy aspekty zachowań: aktywność lokomotoryczną, podejmowanie zachowań ryzykownych oraz lęk; natomiast część poddano eutanazji w celu pobrania tkanek wybranych do dalszych badań. Wybrany model doświadczalny wynikał z ugruntowanego doświadczenia promotora rozprawy, Pana dr hab. Marka Wieczorka, który jest uznanym, o międzynarodowej renomie, specjalistą w dziedzinie badań nad udziałem nerwu błędnego w procesie integracji funkcjonalnej układu odpornościowego i ośrodkowego układu nerwowego. Na część analityczną badań przeprowadzonych przez Doktorantkę złożyły się oznaczenia stężenia osocznego cytokin prozapalnych ( IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) oraz kortykosteronu i prostaglandyny PGE<sub>2</sub>, oznaczenia stężenia monoamin (noradrenaliny, serotoniny, dopaminy) i ich metabolitów w ciele migdałowatym, pniu mózgu, hipokampie, podwzgórzu, korze ruchowej, przyśrodkowej korze przedczołowej i istocie szarej okołowodociągowej, oznaczenia podwzgórzowego stężenia asparagianu, glutaminianu, glicyny, kwasu gamma masłowego, tyrozyny i tryptofanu, analiza ekspresji genów na mikromacierzy, analiza ekspresji wybranych mRNA metodą amplifikacji w czasie rzeczywistym, oznaczenia stężenia met-enkefaliny w osoczu i w prążkowie lewym i prawym oraz stężenia neurotransmiterów monoaminergicznych i ich metabolitów w prążkowie lewym i prawym. Wszystkie wyniki uzyskano przy zastosowaniu prawidłowo dobranych metod analitycznych z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury badawczej.

## II.1. Część publikacyjna rozprawy

**Praca 1.** W publikacji tej Doktorantka skupiła się na charakterystyce anatomicznej i funkcjonalnej nerwu błędnego. Uwzględniając fakt, że nerw błędny był następnie kluczowym czynnikiem doświadczalnym w pracach eksperymentalnych, włączenie syntetycznego opracowania dotyczącego jego aktywności do zestawu prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest całkowicie zrozumiałe. Część wstępna artykułu dotyczy interakcji układów odpornościowego i centralnego nerwowego oraz charakterystyki mechanizmów uczestniczących w procesie wzajemnej komunikacji. Następnie Autorka wskazuje na udział nerwu błędnego w alternatywnym mechanizmie przekazywania informacji o pobudzonym układzie immunologicznym do mózgu. W kolejnej części omawia aspekt anatomiczny kładąc szczególny nacisk na opis przebiegu i połączeń nerwu błędnego, a następnie charakteryzuje indukowane przez antygeny mechanizmy pobudzające ten nerw wskazując na zaangażowanie komórek dendrytycznych, komórek Kupffera i komórek M. Tekst zawiera też szczegółowe przedstawienie roli nerwu błędnego w mechanizmie komunikacji między obydwoma układami. W końcowym fragmencie Autorka zamieściła podsumowanie wraz z oryginalnym schematem ilustrującym drogi pobudzenia zakończeń nerwu błędnego prowadzące do aktywacji osi podwzgórze - przysadka - nadnercze.

**Praca 2.** Intensywność śródtrzewnowego stanu zapalnego wywołanego podaniem LPS-u była zależna od funkcjonalnej aktywności nerwu błędnego. Po wagotomii, w stosunku do zwierząt *sham-operated*, wzrost stężenia IL-6 w osoczu był zmniejszony, podczas gdy wzrost stężenia PGE<sub>2</sub> był nasilony. Wagotomia nie wpłynęła natomiast na zmiany w dynamice aktywności osi HPA mierzonej stężeniem kortykosteronu w osoczu. Wagotomia modulowała transmisję monoaminergiczną w sposób zależny od stanu infekcyjnego organizmu. U zwierząt bez zapalenia zmniejszyło się stężenie noradrenaliny i dopaminy w pniu mózgu oraz serotoniny w korze przedczołowej. Jednocześnie, zwiększony poziom serotoniny pojawił się w korze ruchowej. W warunkach zapalnych u zwierząt po wagotomii, stężenie dopaminy w pniu oraz serotoniny w korze ruchowej nie uległo takim zmianom, lecz utrzymało się na poziomie występującym u zwierząt pozornie operowanych. W pniu mózgu, korze ruchowej, przyśrodkowej korze przedczołowej, ciele migdałowatym oraz w podwzgórzu indeks użycia dopaminy (mierzony stosunkiem kwasu homowanilinowego do dopaminy HVA/DA) u zwierząt po wagotomii i bez stanu zapalnego był zwiększony, co świadczy o nasileniu transmisji dopaminergicznej. Stan zapalny neutralizował te zmiany w ciele migdałowatym i podwzgórzu. Jednocześnie, w pniu mózgu, ciele migdałowatym, podwzgórzu i korze ruchowej indeks użycia serotoniny (mierzony stosunkiem kwasu 5 hydroksy indolooctowego do 5 hydroksytryptaminy 5HAA/5HT) u zwierząt po wagotomii i bez stanu zapalnego był zmniejszony, co wiązało się z obniżoną transmisją serotoninergiczną. W obszarze kory ruchowej stan zapalny neutralizował te zmiany. Podsumowując, po 30 dniach od wagotomii funkcjonalny związek między układem immunologicznym a centralnym układem nerwowym został utrzymany, a brak immunosensorycznej funkcji nerwu błędnego był zastępowany przez wzmożoną syntezę prostaglandyny E<sub>2</sub> na obwodzie. W teście behawioralnym zwierzęta pozornie operowane nie wykazywały oznak lęku, natomiast w fazie rozwiniętego stanu zapalnego wystąpiła u nich charakterystyczna reakcja na stan chorobowy: niższa aktywność lokomotoryczna oraz zmniejszona liczba zachowań ryzykownych. U zwierząt po wagotomii te zachowania indukowane stanem zapalnym nie ulegały modyfikacjom, jakkolwiek na początku testu obserwowano u nich objawy lęku. Analiza graficznej mapy lokalizacji zwierząt na arenie testu (*ang. heat map*) zasugerowała jednak wpływ wagotomii na charakterystyczne cechy zachowania zwierzęcia w chorobie: unikanie kontaktów społecznych i samoizolację.

**Praca 3.** Podanie LPS-u zwierzętom pozornie operowanym spowodowało śródtrzewnową reakcję zapalną, której przejawem był gwałtowny wzrost stężenia TNF $\alpha$  w osoczu. Skutkiem wagotomii była silnie zmniejszona odpowiedź zapalna, lecz stężenie TNF $\alpha$  nadal pozostało

istotnie wyższe w porównaniu do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych. W podwzgórzu ujawniły się, zależne od funkcjonalnej aktywności nerwu błędnego, różnice w stężeniu aminokwasów (pobudzających i hamujących) oraz aminokwasowych prekursorów dla katecholamin. Wagotomia spowodowała wzrost stężenia asparagianinu i glutaminianu, a wywołany u tych zwierząt stan zapalny zwiększył stężenie jedynie asparagianinu. Zmiany nastąpiły też w układzie aminokwasów hamujących, a największe różnice dotyczyły neurotransmisji GABA-ergicznej. Stężenie GABA wzrosło po podaniu LPS-u zwierzętom po operacji pozorowanej i po wagotomii, a najwyższy pułap osiągnęło u zwierząt w stanie zapalnym i po wagotomii. Wzrost stężenia tyrozyny i tryptofanu w podwzgórzu nastąpił po wagotomii zarówno w stanie niezapalnym jak i zapalnym. W fazie zapalnej stężenie tryptofanu wzrosło u zwierząt pozornie operowanych oraz u zwierząt po wagotomii. Nie pojawiły się natomiast różnice w ekspresji mRNA żadnego z badanych genów.

**Praca 4.** Odpowiedzią zapalną na LPS podany zwierzętom pozornie operowanym lub poddanych wagotomii był wzrost stężenia interleukiny IL-1 $\beta$  w osoczu. Wagotomia nie wpłynęła na zmianę stężenia met-enkefalin w osoczu w warunkach niezapalnych, jednak znacząco obniżyła jej poziom w fazie zapalnej w stosunku do poziomu w fazie niezapalnej. Zmiany stężenia met-enkefaliny, jakie zaobserwowano w prążkowie, były związane z lateralizacją tej struktury, gdyż pojawiły się jedynie w jej lewej części. W obszarze tym stężenie met-enkefaliny u zwierząt po wagotomii i w stanie zapalnym było wyższe w porównaniu do poziomu stwierdzonego po wagotomii i w stanie niezapalnym. Związek z lateralizacją dotyczył też neurotransmisji monoaminergicznej. Wagotomia spowodowała zmiany w transmisji serotoninerdycznej, która w tym przypadku zachodziła tylko w prawym prążkowie. Obserwowano jej zwiększenie (wzrost indeksu 5HAA/5HT) w warunkach zapalnych. Nie wystąpiły zmiany w transmisji dopaminergicznej, jednak zwiększona rezerwa dopaminy w obszarze presynaptycznym (wzrost indeksu utylizacji DOPAC/DA) stwierdzona po wagotomii w warunkach niezapalnych i zapalnych, wskazywała na potencjał tej ścieżki do aktywacji.

Lektura prac nasunęła mi następujące pytania:

1. Badania ujawniły, że w stanie neuropatii spowodowanej obustronną wagotomią przedprzeponową funkcjonalny związek między układem immunologicznym a centralnym układem nerwowym nie zostaje przerwany, a brak immunosensorycznego oddziaływania nerwu błędnego jest kompensowany aktywacją syntezy prostaglandyny E<sub>2</sub> na obwodzie. W konsekwencji komunikacja między tymi układami jest utrzymana. Czy istnieją dane, które wskazują również na udział leukotrienów w generacji takiej ścieżki kompensacyjnej?

2. U samców poziom testosteronu we krwi nie podlega cyklicznym oscylacjom, podczas gdy u samic, zmiany stężenia estradiolu zależne od fazy cyklu są cechą fizjologiczną. Czy i jak zmienny poziom estrogenu w osoczu może modulować aktywność cyklooksygenazy w warunkach stanu zapalnego?
3. W badaniach opublikowanych w pracy 2, indeks utylizacji dopaminy mierzony stosunkiem kwasu homowanilinowego do dopaminy (HVA/DA) w kilku badanych strukturach mózgu był zwiększony. Natomiast, gdy mierzony był stosunkiem kwasu dihydroksyfenylooctowego do dopaminy (DOPAC/DA) zasadniczo nie wykazywał zmian. Co oznacza ta różnica?
4. Jednym z parametrów analizowanych w pracy 3 była ekspresja mRNA ośmiu genów. Jakie funkcje one pełnią?
5. Jak, w świetle modelu zaproponowanego w pracy 4, wskazującego na bezpośredni związek transmisji serotonergiczej z syntezą met-enkefalin w prążkowie można skomentować fakt, że zmiany w transmisji enkefalinergiczej pojawiły się w lewej części prążkowie, natomiast w transmisji serotoninoergicznej w prawej części?

## II.2. Opracowanie w języku polskim

**Wprowadzenie.** Na siedmiu stronach tekstu Doktorantka w interesujący i logiczny sposób przedstawiła najważniejsze czynniki i procesy stanowiące koncepcyjne podłoże podjętych badań. Zaczynając od rozważań nad reakcją układu odpornościowego na czynniki prozapalne i pirogenne, wiąże ich chemotaktyczny wpływ na komórki odpornościowe z indukcją bólu, jako istotnego elementu odpowiedzi zapalnej organizmu. Następnie wskazuje na zmiany, jakie w wyniku nieefektywnej neutralizacji procesu zapalnego pojawiają się w zachowaniu zwierząt (ang. *sickness behavior*). W dalszej części charakteryzuje stan zapalny jako proces naturalny i przechodzi do omówienia szczególnej roli nerwu błędnego w funkcjonalnej integracji układów odpornościowego i ośrodkowego. Autorka wyjaśnia przebieg i połączenia nerwu błędnego oraz wskazuje na jego toniczną aktywność jako jedną z dróg wspierających organizm w walce z infekcjami. Przedstawia też wyniki prac dokumentujące dotychczas poznane skutki zaburzeń aktywności nerwu błędnego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu tych zaburzeń na aktywność centralnego układu nerwowego.

Wstęp przekonująco uzasadnia wybór podjętej tematyki badawczej i dowodzi dobrej orientacji Doktorantki w bieżącym piśmiennictwie specjalistycznym.

**Cel i założenia badań.** Rozdział rozpoczyna się jednostronicowym wprowadzeniem, w którym Doktorantka, powołując się na dane literaturowe, omawia mechanizm działania nerwu błędnego w procesie integracji sygnałów nerwowych i sygnałów immunologicznych w stanie zapalnym (funkcja neuro-immuno-komunikacyjna), a następnie wskazuje na jego fizjologiczne znaczenie jako głównego elementu układu przywspółczulnego w organizmie. Dalsza część tekstu zawiera wyszczególnione cele badań, które zostały pogrupowane w postaci: celu głównego, celów szczegółowych oraz celów dodatkowych. Rozdział kończy się omówieniem celów i zadań badawczych w kontekście ich realizacji w poszczególnych pracach zgłoszonych jako część rozprawy doktorskiej.

Uwagi.

1. Rozdział jest najmniej klarowną częścią opracowania. Opis funkcji nerwu błędnego, jaki znalazł się w części początkowej, nie mieści się w konwencji formułowania hipotez i celów badawczych. Przynieszone w tym fragmencie informacje i dane literaturowe mogłyby być natomiast wykorzystane w tekście Wstępu.

2. Mankamentem jest brak sformułowanych hipotez badawczych, które są kluczowym elementem koncepcyjnym w badaniach. Dopiero następnym krokiem powinno być określenie celów badawczych służących weryfikacji testowanych hipotez. Wobec braku jasno określonych hipotez, wprowadzony przez Doktorantkę podział celów badawczych na cel główny, cele szczegółowe i cele dodatkowe jest niezrozumiały. Nieklarowny i chaotyczny charakter rozdziału jest dodatkowo spotęgowany przez zamieszczony na jego końcu fragment, który ponownie przywołuje cele i założenia badawcze jakie, według określenia Doktorantki, zostały zrealizowane i opisane w poszczególnych pracach.

**Metody badawcze.** W rozdziale tym Doktorantka zwięźle przedstawia wykorzystane procedury doświadczalne i analityczne. Ich bardziej szczegółowy opis zawierają trzy prace z wynikami oryginalnymi. Zamieszczony tekst dostarcza jednak najważniejszych informacji o wykorzystanych zwierzętach, wybranym schemacie badawczym opartym o dwie główne grupy eksperymentalne: poddanej operacji kontrolnej oraz poddanej pełnej wagotomii przedprzeponowej, jak też o zastosowanych metodach analitycznych, do których należały: chromatografia wysokociśnieniowa (HPLC) użyta do oznaczenia stężeń amin katecholowych, ich metabolitów oraz wybranych aminokwasów w dyskretnych strukturach mózgu, a wraz ze spektrometrią masową, również do oznaczenia stężenia prostaglandyny E<sub>2</sub> w osoczu, metoda ELISA wykorzystana do oznaczeń osoczowego stężenia cytokin (IL-1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) oraz radioimmunologiczna do oznaczenia stężenia kortyzolu w osoczu oraz met-enkefalin w osoczu



i w prążkowie, metoda izolacji RNA wraz z jego spektrofotometryczną i elektroforetyczną identyfikacją ilościową i jakościową. Rozdział zawiera także informacje o analizie ekspresji mRNA na macierzach Rat Gene 2.1.ST Array Strip, o amplifikacji specyficznych mRNA w czasie rzeczywistym oraz informację o behawioralnym teście uniesionego labiryntu krzyżowego. Taki szeroki i kompetentnie dobrany zestaw nowoczesnych metod analitycznych jakie zastosowano w badaniach stanowi niewątpliwy atut recenzowanej rozprawy. Ostatni podrozdział dotyczy zastosowanej analizy statystycznej. Na szczególne podkreślenie zasługuje tu precyzyjny opis i wyjaśnienie użytych procedur.

Uwagi i pytania:

1. Ze względu na zamieszczone informacje dotyczące zwierząt użytych w badaniach, tytuł rozdziału powinien brzmieć: Materiał i metody badawcze.
2. W podrozdziale „Zwierzęta doświadczalne” Autorka podaje, że całkowita liczba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach wynosiła 192. Jednakże, w publikacji w Journal of Inflammation (2019) mowa jest o 123 użytych zwierzętach, natomiast w tekstach prac 3 i 4 odpowiednio o 75 i 60 samcach szczura. Po zsumowaniu daje to liczbę 278 zwierząt. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności.
- 3.. Jaka była czułość metody ELISA w oznaczeniach stężenia poszczególnych cytokin oraz czułość metod RIA zastosowanych do oznaczeń stężeń kortykosteronu i met-enkefaliny? Prace oryginalne, do których Doktorantka odwołuje się w opisie metodyki analitycznej, nie zawierają takich informacji.
4. W lekturze opracowania w języku polskim pomogłoby, gdyby Autorka wymieniła geny, których ekspresję badano metodą real-time PCR. Skróty nazw tych genów (ale nie pełne nazwy) odnaleźć można dopiero w pracy oryginalnej, do której odsyła tekst opracowania.
5. Wyrażenie „tkanka mózgowa”, użyte w tytule paragrafu 3.3.1 jest nieprawidłowe. Właściwą nazwą jest „tkanka nerwowa”. Tytuł tego fragmentu powinien jednak odzwierciedlać fakt, że do analizy HPLC pobierano nie „tkankę nerwową”, lecz izolowane dyskretne struktury mózgu. Zatem, tytuł ten powinien brzmieć: „Oznaczanie stężenia monoamin i aminokwasów w dyskretnych strukturach mózgu”.
6. Tytuł podrozdziału 3.3.3. powinien zawierać określenie „stężenie” a nie „poziom”, a tytuł podrozdziału 3.3.5 powinien, zgodnie z jego treścią, odnosić się tylko do prostaglandyny E<sub>2</sub>.

**Omówienie wyników.** Rozdział liczący bez mała dziesięć stron jest najdłuższą częścią opracowania. Przedstawiono w nim najważniejsze wyniki badań własnych wraz z ich interpretacją na tle piśmiennictwa specjalistycznego, odnoszącego się przede wszystkim do prac prowadzonych

na modelu szczura. Godne podkreślenia jest to, że Doktorantka zrezygnowała tu ze standardowej formy referowania kolejno wyników z poszczególnych prac oryginalnych na rzecz przedstawienia najistotniejszych danych w formie pięciu wyodrębnionych zagadnień. Dotyczyły one wpływu wagotomii przedprzeponowej w warunkach septycznych i nieseptycznych na: (a) obwodowe markery stanu zapalnego (kortykosteron, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i PGE $_2$  - badania opisane w pracach 2,3,4); (b) neurotransmisję monoaminergiczną w wybranych strukturach układu limbicznego (c) zachowanie zwierząt w teście uniesionego labiryntu krzyżowego (oba badania opisane w pracy 2); (d) neurotransmisję aminokwasową i ekspresję specyficznych mRNA podwzgórzu (badania opisane w pracy 3); oraz (e) neurotransmisję monoaminoergiczną i enkefalinergiczną w prążkowie (badania opisane w pracy 4). Dzięki takiemu zamysłowi koncepcyjnemu powstał oryginalny tekst naukowy, który w przemyślany sposób ukazuje złożoność oraz komplementarny charakter przeprowadzonych badań. Zwraca też uwagę na konsekwentną integrację obu (zestawu prac i opracowania w języku polskim) części rozprawy. Jej wyrazem w rozdziale „Omówienie wyników” są liczne odwołania do rycin i schematów zamieszczonych wyłącznie w pracach oryginalnych. Rozdział zawiera natomiast własny schemat, opracowany na podstawie wyników opisanych w trzech pracach, w którym Doktorantka zaproponowała model dynamiki uwalniania cytokin prozapalnych po 30-dniowym okresie rekonwalescencji samców szczura poddanych pełnej wagotomii przedprzeponowej. Podsumowując, rozdział „Omówienie wyników” zamieszczony w ocenianej rozprawie doktorskiej świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Pani mgr Anny Kobrzyckiej do twórczej pracy koncepcyjnej.

**Wnioski.** Sześć wniosków końcowych stanowi logiczną, mającą oparcie w uzyskanych danych, odpowiedź na przyjęte hipotezy i założenia badawcze. We wnioskach 2,4,6, stosownie do otrzymanych danych, Doktorantka nie przesądza jednoznacznie, lecz jedynie wskazuje na możliwe mechanizmy zaangażowane w badanych przez siebie procesach. Taka ostrożność w formułowaniu końcowych wniosków dowodzi dojrzałości naukowej Autorki.

**Streszczenie i Abstrakt.** Oba rozdziały zostały przygotowane zgodnie z kanonem opracowania tego typu tekstu naukowego i zawierają syntetycznie podane informacje o założeniach badawczych, celu badań, materiałach i metodach, wynikach oraz wnioskach.

**Piśmiennictwo.** Naukowym zapleczem rozprawy jest umiejętnie dobrane piśmiennictwo specjalistyczne. Lektura rozdziałów „Wprowadzenie” i „Omówienie wyników” w pełni przekonuje o wnikliwej i wszechstronnej znajomości przedmiotu przez Doktorantkę. Rozdział „Piśmiennictwo” zawiera 150 pozycji, spośród których 71 to prace opublikowane od 2012 r., natomiast 40 pozycji ukazało się w latach 2017-2021. Najwięcej cytowanych prac (13) pochodzi

z 2018 roku. Cytacje zamieszczone w tekście pracy są dokładnie i alfabetycznie odzwierciedlone w Spisie literatury. Formalny zapis piśmiennictwa jest bez zarzutu.

### **III. Podsumowanie**

Przedstawiona do oceny rozprawa jest oryginalnym, wnikliwie przemyślanym dziełem naukowym, którego powstanie wymagało od Doktorantki nabycia odpowiedniej kompetencji w zakresie teoretycznych podstaw podjętej tematyki, umiejętności formułowania celów i zadań badawczych, biegłości w posługiwaniu się nowoczesnymi technikami analitycznymi, a także wykazania się umiejętnością opracowania i przygotowania do druku publikacji naukowej. W moim przekonaniu szczególnym osiągnięciem badawczym Doktorantki jest (i) wykazanie, że w warunkach długotrwałej neuropatii związanej z przedprzeponowym przecięciem gałązek nerwu błędnego pojawia się kompensacyjny mechanizm przekazywania sygnału zapalnego z obwodu do dyskretnej struktur centralnego układu nerwowego, (ii) wykazanie, że charakterystyczne cechy zachowania zwierzęcia w chorobie: unikanie kontaktów społecznych, samoizolacja, większa wrażliwość na ból znajdują swoje biochemiczne podłoże w postaci specyficznym lateralnie zlokalizowanych różnic aktywności specyficznych szlaków monoaminergicznym, jak też szlaku enkefalinergicznym w prążkowi.

Wnioskując na podstawie przekazanej mi do oceny rozprawy doktorskiej oceniam, że Pani mgr Anna Kobrzycka jest w pełni przygotowana merytorycznie do podjęcia samodzielnej pracy naukowej.

### **IV. Wniosek końcowy**

Oryginalne wyniki badań własnych Pani mgr Anny Kobrzyckiej zawarte są w pracy opublikowanej w czasopiśmie indeksowanym w bazie Web of Science Core Collection oraz w dwóch manuskryptach złożonych przez Autorkę do druku. Ponadto, do publikacyjnej części rozprawy należy praca przeglądowa, zawierająca też wyniki badań własnych, która ukazała się w naukowym czasopiśmie recenzowanym. Spełniając wymóg oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w ich powstaniu, po zapoznaniu się z pisemnymi oświadczeniami złożonymi przez wszystkich współautorów czterech przedstawionych prac jednoznacznie potwierdzającym kluczową rolę Doktorantki przy planowaniu, wykonywaniu i całościowym opracowaniu otrzymanych wyników oceniam, że indywidualny, twórczy wkład Pani mgr Anny Kobrzyckiej w zakresie wykonanej pracy koncepcyjnej, eksperymentalnej i edytorskiej jest wystarczający do uznania Jej za Autorkę przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Reasumując pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: **”Ośrodkowe mechanizmy kompensacji długotrwałego upośledzenia immunosensorycznej i immunosupresorowej funkcji nerwu błędnego”**, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w dziedzinie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz.595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Anny Kobrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jak też z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

#### **V. Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy.**

Pani mgr Anna Kobrzycka uzyskała nowatorskie dane dotyczące obwodowego mechanizmu kompensującego w warunkach zapalnych immunosensoryczną funkcję nerwu błędnego, jak i oryginalne wyniki charakteryzujące dynamikę zależnych od funkcjonalnego stanu nerwu błędnego zmian w transmisji monoaminergicznej i aminokwasowej w dyskretnych strukturach mózgu. Wykazała także, że pojawiające po długim okresie rekonwalescencji po wagotomii i wywołane stanem zapalnym zmiany zachowania zwierząt w postaci większej wrażliwości na ból i obniżonej aktywności społecznej, znajdują swoje biochemiczne podłoże w postaci specyficznym lateralnie zlokalizowanych różnic aktywności specyficznych szlaków monoaminergicznych, jak też szlaku enkefalinergicznego w prążkowiu. W moim przekonaniu połączenie badań na poziomie obwodowym, centralnym i behawioralnym okazało się bardzo cenne poznawczo. Szeroki i wnikliwie zaplanowany zakres badań został wykonany z pełnym zachowaniem wysokich standardów metodologicznych. Zatem, biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, naukową wartość uzyskanych wyników, jak też kompetencje Autorki w ich opracowaniu, z pełnym przeświadczeniem wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Prof. dr hab. Alina Gajewska