dr hab. Jolanta Orzeł-Gryglewska, prof. UG
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk
jolanta.orzel-gryglewska@ug.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr Daniela Kalinowskiego pt. „Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta", wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Anny Kozłowskiej, prof. UWM i Pani promotor pomocniczej dr Krystyny Bogus-Nowakowskiej.

Ocena układu rozprawy doktorskiej, w tym informacje o jej poszczególnych częściach składowych

Rozprawa doktorska mgr Daniela Kalinowskiego składa się z obszernej polskojęzycznej części pracy, do której zostały dołączone w formie załączników dwa artykuły zamieszczone w wysoko notowanych czasopismach naukowych. Tekst rozprawy zawarty jest na 67 kartkach jednostronnie zadrukowanego maszynopisu i podzielony został na klasyczne części. Pracę rozpoczyna 10-stronicowy wstęp, poprzedzony streszczeniem i wykazem stosowanych skrótów, a zakończony przedstawieniem celu badań oraz hipotez i zadań badawczych. W tej części pracy Doktorant charakteryzuje pojęcie lęku i zaburzenia lękowe, opisuje ośrodkowe struktury odpowiedzialne za powstawanie i regulację strachu, lęku i agresji, a następnie na podstawie dostępnego piśmiennictwa wykazuje związek deficytów recepcji estrogenowej z podwyższonym poziomem lęku u myszy, szczurów i ludzi. W dalszej części rozdziału omawia zalety eksperymentalnego modelu myszy z genetycznym deficytem receptorów estrogenowych i dotychczasowe ustalenia dotyczące zmian neuronalnych w ich mózgach. Następnie Autor opisuje związek sygnalizacji estrogenowej z aktywnością głównych neurotransmiterów OUN, zwłaszcza w obszarze ciała migdałowatego (a także hipokampa, kory czołowej i podwzgórza). Na koniec, nawiązując do złożonej sieci funkcjonalnych powiązań neuromodulacyjnych, wskazuje przydatność metod analizy bioinformatycznej do opisu procesów biologicznych. Ta teoretyczna część pracy napisana jest obszernie i wyczerpująco, Autor sprawnie przedstawia i omawia kolejne zagadnienia, przygotowując czytelnika do wyprowadzenia celu pracy (omówienie celu znajduje się w dalszej części recenzji).

Rozdział 2. to przedstawienie stosowanych w eksperymentach metod i materiałów z tabelarycznymi wykazami użytych odczynników i przeciwciał oraz szczegółowym opisem programu wykorzystanego do automatycznego zliczania neuronów w skrawkach wybranych struktur. W trzeciej części pracy doktorant w skróconej formie prezentuje i omawia uzyskane wyniki, dzieląc je tematycznie na publikację 1 i 2 oraz ilustrując 5 wielopanelowymi rycinami, będącymi nieco zmodyfikowaną, polskojęzyczną wersją niektórych rycin pochodzących z dołączonych artykułów. Dane z analiz statystycznych umieszczone zostały w 2 tabelach. Następne rozdziały zawierają jednostronicowe podsumowanie i wnioski. Na końcu umieszczony został spis piśmiennictwa, spis rycin oraz dwie wspomniane publikacje wraz z oświadczeniami współautorów dotyczącymi indywidualnego wkładu pracy. W artykułach tych znajduje się szczegółowy opis otrzymanych wyników oraz ich obszerna i znakomita dokumentacja fotograficzna. Skrawki mózgów doświadczalnych i kontrolnych przedstawione na zamieszczonych zdjęciach są odpowiednio dobrane, struktury prawidłowo wybarwione i oznaczone, a same fotografie są bardzo dobre technicznie, o właściwym tle i ostrości obrazu. W obu publikacjach znajduje się również wielowątkowe i wyczerpujące omówienie wyników z licznymi odniesieniami do odpowiedniego piśmiennictwa. Układ pracy jest logiczny i w jasny sposób przedstawia badane zagadnienie, sprawnie łącząc część opisową pracy z treścią dołączonych publikacji.

Ocena wykorzystanego piśmiennictwa

Spis piśmiennictwa zawiera 172 nienumerowane anglojęzyczne artykuły, zarówno pozycje klasyczne jak i najbardziej aktualne związane z tematyką rozprawy. Ponad 75% cytowanych prac pochodzi z lat 2001-2022. W załączonych publikacjach cytowano łącznie 210 artykułów (bez powtórzeń), które w większości znajdują się również we wspomnianym spisie. Jest to obszerne piśmiennictwo, które we wszystkich przypadkach zostało właściwie dobrane i prawidłowo wykorzystane.

Wskazanie i ocena celu pracy

Celem podjętych badań, wykonanych na dorosłych samicach myszy z deficytem receptorów estrogenowych beta, było 1/ określenie zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów jąder ciała migdałowatego, a także 2/ zmian ilościowych markerów układu GABA-ergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym tych zwierząt. Myszy takie charakteryzują się nasilonym niepokojem i reakcjami lękowymi, co jest wiadome z piśmiennictwa. Doktorant postawił hipotezę, że deficyt receptorów estrogenowych w ciele migdałowatym zmienia neurotransmisję w tym ośrodku, a to prowadzi do zmian ilościowych w populacji neuronów GABA-ergicznych tej okolicy; co więcej, wskutek plastyczności połączeń neuronalnych ilościowym zmianom ulegnie neuromediacja dopaminergiczna i cholinergiczna w obrębie ciała migdałowatego. Tymi zachodzącymi zmianami Autor próbuje tłumaczyć neuroanatomiczne podłoże zachowań lękowych u myszy pozbawionych receptorów estrogenowych. Przesłanki do podjęcia powyższych badań oparte są na obszernych dowodach naukowych

wskazujących na racjonalność wysuniętej hipotezy oraz potrzebie wyjaśnienia elementów podłoża i mechanizmu zaburzeń lękowych.

Wskazanie i ocena zastosowanych metod badawczych

Do doświadczeń doktorant użył dorosłych, młodych samic myszy z genetycznie określonych szczepów, będących homozygotami pozbawionymi receptorów estrogenowych beta oraz homozygotami z oboma allelami tych receptorów. Wszystkie myszy miały oznaczany cykl płciowy i pobranie ich mózgowia nastąpiło w fazie metestrusu, gdy poziom estrogenu jest najniższy. Po wstępnych procedurach utrwalenia tkanki i uzyskaniu skrawków mózgu, doktorant wykonał szereg barwień immunohistochemicznych aby oszacować liczbę neuronów wchodzących w skład badanych struktur oraz określić zmiany ilościowe oznaczanych markerów. W tym celu zastosował barwienia immunoenzymatyczne, które obejmowały oznaczenie markera białka jądrowego (wyróżnienie dojrzałych neuronów) oraz oznaczenia subpopulacji neuronów GABA-ergicznych za pomocą specyficznych przeciwciał CB (kalbindyny), PV (parwalbuminy) i CR (kalretyniny). Przy użyciu metody barwienia immunofluorescencyjnego doktorant wykonał oznaczenie markerów układu GABA-ergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego oraz markera kwaśnego białka włókienkowego. Różnice ilościowe badanych markerów u myszy pozbawionych receptorów estrogenowych w porównaniu do myszy szczepu dzikiego oceniał za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego w 6 głównych jądrach ciała migdałowatego na 15 przekrojach czołowych w osi przednio-tylnej struktury. Pozyskane dane z ramek testowych przeliczał na jednostkę powierzchni i objętości. Zastosował metodę zautomatyzowanej analizy skanów liniowych (oprogramowanie wyliczające wartości w przestrzeni trójwymiarowej) oraz przeprowadził manualne i zautomatyzowane liczenie komórek nerwowych we wszystkich badanych subpopulacjach neuronalnych (GABA – markery CB, PV, CR; somatostatyna; dopamina – markery D1, D2; acetylocholina - markery AChRM1, AChR-alfa7/N). Ponadto Doktorant wykonał analizę sieci interakcji między badanymi markerami i estrogenami przy pomocy bazy danych interakcji białko-białko (STRING) w celu wskazania potencjalnych funkcji biologicznych badanych markerów dopaminergicznych, cholinergicznych i estrogenowych. Analiza statystyczna wykonana została przy pomocy programu Statistica 13.3, po zbadaniu normalności rozkładu doktorant zastosował testy parametryczne (analizę wariancji i test T-studenta). Podsumowując, Doktorant w przemyślany sposób pobrał materiał doświadczalny, posłużył się złożonym i nowoczesnym warsztatem histochemicznym, dokonał obszernej i dogłębnej analizy obrazu mikroskopowego pozyskanej tkanki oraz przeprowadził prawidłową ocenę funkcjonalną i statystyczną.

Ocena części rozprawy dotyczącej omówienia wyników badań

Wyniki, z podziałem na zakres pierwszej i drugiej publikacji, omówione zostały w części opisowej pracy doktorskiej. Ich bardziej szczegółowy opis znajduje się również w pracach załączonych do rozprawy. Wykazano znaczące zmniejszenie liczby neuronów we wszystkich badanych jądrach ciała migdałowatego u samic

pozbawionych receptorów estrogenowych. W niektórych jądrach zanotowano podwyższony poziom ekspresji markera kwaśnego białka włókienkowego, co może świadczyć o uszkodzeniach (np. stan zapalny) występujących w obrębie tych struktur. Szczegółowe analizy wykazały zmniejszenie liczby neuronów GABA-ergicznych wykazujących ekspresję CB-kalbindyny. Poziom ekspresji pozostałych badanych markerów GABA był podobny u myszy dzikich i knock-out. Natomiast poziom ekspresji niektórych markerów dopaminowych i cholinergicznych (TH, DAT, DA2, M1, alfa7) u myszy pozbawionych receptorów estrogenowych był znacząco wyższy, co może oznaczać że neurony ich ciał migdałowatych były pobudzane przez dopaminę i acetylocholinę w wyższym stopniu niż u myszy kontrolnych. Z kolei poziom ekspresji struktur ciała migdałowatego immunoreaktywnych wobec pozostałych markerów DA i ACh (DA1, AChE, VAChT) w obu badanych grupach był zbliżony.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor sformułował 6 prawidłowych wniosków, wskazujących, że deficyt receptorów estrogenowych beta może prowadzić do zaburzeń lękowych oraz do procesów neurodegradacyjnych i zapalnych w ciele migdałowatym, zaś niedobór GABA-ergicznych neuronów kalbindynowych (głównie interneuronów) może być przyczyną zwiększonej aktywności komórek piramidowych ciała migdałowatego, a to może być także powodem nasilenia zachowań lękowych. Ponadto zachowania te mogą być regulowane przez wpływy dopaminergiczne i cholinergiczne, których działanie prowadzić może zarówno do zmniejszania (poprzez wzrost aktywności TH, DA2, AChR-M1) jak i wzmacniania lęku (DAT). Nieoczywiste, dwukierunkowe efekty w tym zakresie wywierają zwłaszcza receptory ACh-alfa7. Natomiast brak zmian w poziomie ekspresji pozostałych badanych markerów świadczy o tym, że nie biorą udziału w promowaniu zachowań lękowych.

Ocena indywidualnego wkładu kandydata w powstanie pracy

Cała polskojęzyczna część rozprawy w warstwie tekstowej jest oryginalnym utworem Autora. Do pracy dołączone są 2 obszerne artykuły opublikowane w 2022 i 2023 r, w czasopismach z ministerialnej listy, ocenionych na 140 pkt. W obu tych publikacjach Doktorant jest autorem pierwszym i jedynym autorem korespondującym, a pozostałych 3 współautorów są jednocześnie promotorami i promotorem pomocniczym rozprawy. W dołączonych oświadczeniach Autor wykazał swój wiodący udział na wszystkich etapach planowania i wykonania pracy eksperymentalnej, opracowania i wizualizacji wyników oraz przygotowania publikacji. Zgodnie z oświadczeniem Doktorant brał udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu badań i walidacji wyników, analizie uzyskanych danych, zarządzaniu danymi i oprogramowaniem, opracowaniu i wizualizacji wyników, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, udzielaniu odpowiedzi recenzentom i przygotowaniu publikacji do druku. Współautorzy pełnili rolę wspomagania i nadzoru merytorycznego oraz pomagali w udzielaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników

Tematyka przedstawionej pracy mieści się w zakresie badań podstawowych i nie ma bezpośredniego przełożenia na praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników; niemniej poznanie procesów biologicznych związanych z zachowaniami emocjonalnymi i funkcjami poznawczymi warunkowanymi aktywnością estrogenów, ich receptorami oraz czynnością neuronów dopaminergicznych i cholinergicznych w przyszłości może przełożyć się na opracowanie terapii farmakologicznej, skierowanej do osób z podwyższonym poziomem lęku oraz niedoborem estrogenów, np. kobiet w wieku postmenopauzalnym.

Informacja o nieprawidłowościach – błędy, sformułowania

Tytuł rozprawy: „Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta" sugeruje, że głównym tematem badań będą zaburzenia lękowe modyfikowane estrogenami. Tymczasem praca jest histochemiczną analizą ciała migdałowatego u wyżej wspomnianych myszy. Co prawda Autor większość wstępu do pracy poświęca na przytaczanie danych z piśmiennictwa, które dowiodły występowanie podwyższonego poziomu lęku u myszy pozbawionych receptorów estrogenowych, ale to nie jest przedmiotem jego doświadczeń i stanowi wątek poboczny. Potwierdzają to tytuły obu dołączonych artykułów, w których nie ma żadnej wzmianki o zaburzeniach lękowych. Nie ujmując nic całości wykonanej pracy, wydaje się, że jej tytuł został niezbyt trafnie sformułowany.

W podrozdziale opisującym zwierzęta doświadczalne nie podano liczby użytych myszy – można ją znaleźć w metodykach artykułów, nie wiadomo jednak, czy były to te same, czy różne zwierzęta. Z drugiej strony nie ma to szczególnie istotnego znaczenia, ponieważ Autorzy informują, że różnice indywidualne były niewielkie, wzrost liczby n od 3 do 6 nie wpłynął istotnie na uzyskane wyniki, a grupa 6 myszy była wystarczająco liczna do przeprowadzenia właściwej analizy statystycznej.

Uwagi dotyczące edycji: w tekście występują literówki, nieliczne, lecz rażące w wyrazach, które nie są pospolitym tekstem (np. ankjolityczny, aksjogenny), zdarzają się pewne uchybienia w formatowaniu spisu piśmiennictwa (niekonsekwentne wpisywanie et al. po różnej liczbie nazwisk autorów; różne sposoby zapisu tytułów, brak numeracji, niepotrzebne justowanie) oraz w sposobie stosowania przecinków w tekście.

Przedstawione artykuły przed opublikowaniem przeszły już proces wielokrotnej recenzji redakcyjnej, więc można uznać je za poprawne.

<u>Wniosek końcowy</u>

Wszystkie te drobne uchybienia, wymienione z obowiązku recenzenta, nie mają wpływu na ostateczną wysoką ocenę pracy doktorskiej pana mgr Daniela Kalinowskiego. Przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego a poprawnie i wyczerpująco napisana część

teoretyczna oraz obszerne i wielowątkowe dyskusje zawarte w publikacjach potwierdzają ogólną wiedzę posiadaną przez Doktoranta. Pan mgr Kalinowski posiada umiejętność właściwego planowania badań oraz wnikliwej i krytycznej oceny wyników. Badania przeprowadził stosując złożone metody pozyskiwania i analizy danych. Doktorant potwierdził, że potrafi zaplanować ścieżkę badawczą oraz skrupulatnie i samodzielnie realizować poszczególne jej etapy, a przedstawione badania prezentują wysoki poziom naukowy oraz wnoszą nowe i ważne wątki do wiedzy dotyczącej sposobu funkcjonowania ciała migdałowatego w odpowiedzi na działające na nie neurotransmitery.

Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pana mgr Daniela Kalinowskiego spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023.742 ze zm.)

Doktorant w swojej rozprawie przedstawił oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazał się ogólną wiedzą teoretyczną z zakresu biologii, a także umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Oneš-Gryglewska

Gdańsk, 14 lipca 2023 r