Prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska
Pracownia Neurobiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzetach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71 C
60-625 Poznań

Poznań, 7.07. 2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Daniela Kalinowskiego pt. „Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta"
wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Wydział Biologii i Biotechnologii
pod kierunikem dr hab. Macieja Równiaka †, dr hab. n.med. Anny Kozłowskiej, prof. UMW i promotora pomocniczego dr Krystyny Bogus-Nowakowskiej

1. Zasadność podjęcia tematu pracy doktorskiej

Praca doktorska dotyczy zagadnień zaburzeń lękowych, które dotykają 3%-8% osób rocznie. Co więcej 5%-30% osób badanych boryka się z tego rodzaju problemami przez całe życie. Stąd też zaburzenia te stanowią niezwykle istotny problem zdrowotny i społeczny. Ponadto współwystępują one często z depresją i uzależnieniami od narkotyków. Dodatkowo dane kliniczne wskazują na dwukrotnie częstsze ich występowanie u kobiet w porównaniu z mężczyznami. Dlatego ważne jest poznanie neurobiologicznych podstaw tych zaburzeń.

Niniejsza praca doktorska ma na celu poznanie neuroanatomicznego podłoża zaburzeń lękowych na poziomie ciała migdałowatego, struktury mózgu odpowiedzialnej za generowanie lęku. Autor rozprawy doktorskiej wychodzi z założenia, że za utrzymanie równowagi pomiędzy pobudzeniem i hamowaniem w ciele migdałowatym oprócz neurotransmiterów pobudzającego – glutaminianu oraz hamującego – GABA odpowiadają również hormony steroidowe m.in. estrogeny. Ponadto ciało migdałowate jest silnie modulowane przez układ dopaminergiczny i cholinergiczny,

które działają zarówno na neurony glutaminergiczne, jak i GABA. Liczne badania dowiodły, że wahania poziomu estrogenów przyczyniają się do zwiększonego ryzyka występowania zaburzeń lękowych. Wykazano, np. że obniżony poziom estrogenów, jaki obserwuje się w zespole stresu pourazowego (ang. PTSD), wiąże się ze zwiększonym ryzykiem występowania zaburzeń lękowych. Natomiast suplementacja estrogenami w okresie postmenopauzalnym prowadzi do obniżenia poziomu stresu.

Uważam, że podjęcie powyższej tematyki jest zasadne nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale również klinicznych, gdyż wyniki prowadzonych eksperymentów mogą przyczynić się do zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń lękowych. Ponadto, ponieważ estrogenny działają poprzez receptory estrogenowe ER alfa i ER beta, które występują w ciele migdałowatym, uzasadnione jest również podjęcie badań na mysim modelu pozbawionym tego receptora. Wykazano bowiem we wcześniejszych eksperymentach, iż samice myszy z deficytem ER beta charakteryzowały się zaburzeniami lękowymi.

W ramach rozprawy doktorskiej testowana jest następująca hipoteza badawcza: „Zmieniona sygnalizacja estrogenowa w wyniku deficytu ER beta powoduje istotne zaburzenia w neurotransmisji ciała migdałowatego, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń lękowych". Ponadto mgr Kalinowski zakłada, że zaburzenia te będą obejmowały: 1) zmiany ilościowe w całkowitej populacji neuronów w poszczególnych subpopulacjach GABAergicznych ciała migdałowatego (te zagadnienia są przedmiotem publikacji nr 1) oraz 2) zmiany ilościowe w zaopatrzeniu dopaminergicznym i cholinergicznym ciała migdałowatego (co z kolei jest podane analizie w publikacji nr 2).

Doktorant przeprowadził szeregu badań z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych, które są adekwatne do testowania powyższej hipotezy badawczej. Autor rozprawy doktorskiej zastosował badania immunohistochemiczne (metodę immunoenzymatyczną oraz immunofluorescencję) dokonując oceny ilościowej badanych markerów. Ponadto mgr Daniel Kalinowski wykorzystał bazę danych STRING, która jest doskonałym narzędziem bioinformatycznym, pozwalającym na analizę fizycznych i funkcjonalnych powiązań pomiędzy białkami. Przy użyciu wyżej opisanych metod Doktorant dokonał zautomatyzowanej analizy skanów liniowych, jak również manualnego i automatycznego liczenia komórek nerwowych. Wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 13.3. Metody badawcze stosowane w ocenianej rozprawie doktorskiej są dobrze dobrane do testowania postawionej hipotezy badawczej.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorant wysuwa następujące wnioski:

1) Samice myszy z deficytem ER beta charakteryzowały się:
   a) Znaczną redukcją liczby komórek nerwowych we wszystkich głównych jądrach ciała migdałowatego
   b) Wyższym poziomem ekspresji astrocytów szczególnie w jądrze przyśrodkowym, podstawno-przyśrodkowym i korowym
   c) Obniżoną liczbą komórek nerwowych wykazujących ekspresją kalbindyny (CB)
   d) Wzrostem ekspresji hydroksylazy tyrozynowej (TH), transportera dopaminy (DAT) i receptora dopaminergicznego D2-podobnego (DA2) w wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego
   e) Wzrostem liczby komórek nerwowych w jądrach ciała migdałowatego zawierający receptory cholinergiczne tj. receptor muskarynowy acetylocholiny typu 1 ($AChR_{M1}$) i receptor nikotynowy acetylocholiny alfa-7 ($AChR_{alfa7}$)

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wniosek, że samice myszy z deficytem ER beta charakteryzują się nieprawidłowościami w charakterze i wzorze dystrybucji głównych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego. Wykazane zmiany mogą z kolei prowadzić, bądź być efektem zmienionej sygnalizacji przyczyniającej się do zakłócenia plastyczności synaptycznej ciała migdałowatego u tych zwierząt. Doktorant upatruje, iż powyższe obserwacje dotyczące nieprawidłowości na poziomie neuroanatomicznym mogą przyczyniać się do powstawania zaburzeń lękowych. Choć jak Autor słusznie zauważa, to ostatnie stwierdzanie wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej eksperymenty i analiza wyników są bardzo czasochłonne oraz wymagają cierpliwości oraz skrupulatności, którymi niewątpliwie musiał wykazać się Doktorant. Uzyskane wyniki przyczyniają się do zrozumienia na poziomie neuroanatomicznym mechanizmów, które mogą leżeć u podstaw zaburzeń lękowych. Niewątpliwie tego typu badania są ważnym elementem koniecznym do prowadzenie dalszych eksperymentów behawioralnych z wykorzystaniem prezentowanego w rozprawie doktorskiej modelu zwierzęcego. Badania mogą przyczynić się do zrozumia powiązań pomiędzy zmianami w mózgu i w zachowaniu charakteryzującym zaburzenia lękowe. Powyższe podejście jest dobrym przykładem obrazującym przydatność modeli zwierzęcych do badania problemów lękowych, które są powszechne we współczesnym świecie.

2. Ocena formalna pracy doktorskiej

Praca doktorska ma postać monotematycznego cyklu dwóch publikacji wraz z ich omówieniem. Opracowanie liczy 67 strony i posiada układ typowy dla pracy doktorskiej, tj. składa się z następujących rozdziałów: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis skrótów (2 ½ strony), wstęp (str. 12-21), hipoteza i cele pracy (1 strona), materiały i metody (str. 23-32), wyniki (str. 33-43), podsumowanie (1 strona), wnioski (1 ½ strony), piśmiennictwo (15 stron), spisu rycin (1 strona), załączniki (1 strona) oraz załączone 2 publikacje wraz z oświadczeniami współautorów.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzą następujące publikacje:

1) **Kalinowski D,** Bogus-Nowakowska K, Kozłowska A, Równiak M. Expression of Calbindin, a Marker of Gamma-Aminobutyric Acid Neurons, Is Reduced in the Amygdala of Oestrogen Receptor β-Deficient Female Mice. **J Clin Med.** 2022 Mar 22;11(7):1760. doi: 10.3390/jcm11071760.
2) **Kalinowski D,** Bogus-Nowakowska K, Kozłowska A, Równiak M. Dopaminergic and cholinergic modulation of the amygdala is altered in female mice with oestrogen receptor β deprivation. **Sci Rep.** 2023 Jan 17;13(1):897. doi: 10.1038/s41598-023-28069-2.

W obu publikacjach Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, co wskazuje na znaczący Jego wkład w ich powstanie. Ponadto oświadczenia współautorów potwierdzają powyższe stwierdzenie. Artykuły ukazały się dobrych czasopismach o IF odpowiednio 4,964 i 4,996 i 140 pkt MEiN. Praca napisana jest językiem naukowym z dużą dokładnością, zawiera 5 starannie przygotowanych ryciny i obejmuje bogate, liczące 15 stron piśmiennictwo.

3. Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

We wstępie Autor przedstawia problem zaburzeń lękowych, który niewątpliwie pogłębił się w ostatnich czasach w związku z pandemią COVID 19 (o czym jednak mgr Kalinowski nie wspomina). Z kolei Doktorant płynnie przechodzi do omówienia zagadnień związanych z neuroanatomicznymi podstawami zaburzeń lękowych generowanych na poziomie ciała migdałowatego. Doktorant opisuje anatomię ciała migdałowatego oraz neurotransmitery modulujące działanie tej struktury, tj. glutaminian i GABA, a także układ dopaminergiczny i cholinergiczny. Mgr Daniel Kalinowski również wprowadza zagadnienie regulacji ciała migdałowatego poprzez hormony steroidowe,

a w szczególności estrogeny odwołując się do licznych i dobrze dobranych przykładów badań, np. dotyczących PTSD, czy terapii hormonalnych w badaniach postmenopauzalnych kobiet. Ten zabieg umożliwia przejście do badań prowadzonych na zwierzętach modelowych, tj. mających deficyt ER beta. Samice myszy z tym defektem charakteryzują się bowiem zaburzeniami lękowymi.

Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że jest ona napisana w zwięzły i interesujący sposób. Autor przedstawia zagadnienia będące tematyką doktoratu powołując się na obszerną literaturę. Do tej części pracy doktorskiej mam pytanie i uwagi, które zamieszczam poniżej.

1. Na str. 12 napisano „ Zaburzenia te stanowią poważny problem zdrowotny i społeczny, ponieważ często towarzyszy im depresja, uzależnieni od narkotyków czy też alkoholu". Czy Doktorant uważa, że alkohol nie jest narkotykiem ?
2. Przy omawianiu anatomii ciała migdałowatego (str. 13) można było umieścić rycinę obrazującą podział tej struktury na omawiane kompleksy podstawno-boczny i przyśrodkowy.
3. Przy opisywaniu wyników badań powołując się na innych autorów z wykorzystaniem myszy z deficytem ER beta warto wspomnieć o fazach cyklu, w których prowadzone były eksperymenty.

Cele badań i hipotezy badawcze są jasno przedstawione. Postawiana hipoteza badawcza brzmi: „Zmieniona sygnalizacja estrogenowa w wyniku deficytu ER beta powoduje istotne zaburzenia w neurotransmisji ciała migdałowatego, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń lękowych". Ponadto Doktorant zakłada, że zaburzenia te będą obejmowały: 1) zmiany ilościowe w całkowitej populacji neuronów w poszczególnych subpopulacjach GABAergicznych ciała migdałowatego (te zagadnienia są przedmiotem publikacji nr 1) oraz 2) zmiany ilościowe w zaopatrzeniu dopaminergicznym i cholinergicznym ciała migdałowatego (co z kolei jest podane analizie w publikacji nr 2).

Rozdział **Materiały i metody** opisuje metody stosowane w pracy i zaopatrzony jest w dwie tabele zawierające szczegółowe informacje dotyczące użytych odczynników chemicznych, sprzętu laboratoryjnego oraz wykaz przeciwciał wykorzystanych w badaniach prezentowanych w publikacjach 1 i 2. Tabele te są pomocne i w jasny sposób przedstawiają dane dotyczące odczynników. Do tej części rozprawy doktorskiej mam kilka uwag i pytań.

1. Choć w poszczególnych publikacjach poddane są liczby zwierząt użyte w eksperymentach, to w części Materiały i metody ich brak.

2. W części polskojęzycznej rozprawy doktorskiej nie ma również informacji na temat numeru zgody komisji etycznej, na podstawie której przeprowadzono badania.
3. Na str. 27 Autor napisał „Wybrane skrawki płukano trzykrotnie…" Do czego odnosi się sformułowanie „wybrane", na jakiej podstawie dokonano tego wyboru ?
4. Na str. 28 napisano: „Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w prezentowanych badaniach zostały starannie dobrane oraz potwierdzoną ich swoistość przedstawiono w Publikacji 1." Czy Doktorant mógłby przedstawić procedury kontrolne wymagane w badaniach immunohistochemicznych ?
5. Str. 29 Co Autor rozumie pod pojęciem „gęstości numerycznej" ? i na czym polegała „zautomatyzowana analiza skanów liniowych".

Wyniki zostały przedstawione w jasny sposób i są ilustrowane pięcioma rycinami i dwoma tabelami. Do tej części rozprawy doktorskiej mam również kilku pytań.

1. Str. 35 Na czym polegała „ocena arbitralna skrawków" ?
2. Str. 39 Doktorant napisał, że obecność TH i DAT zaobserwowano przede wszystkim we włóknach nerwowych i zakończeniach synaptycznych. Co mogło być przyczyną takiego stanu rzeczy ? To samo pytanie dotyczy receptorów dla dopaminy DA_1 i DA_2 (str. 40).
3. Rycina 5, str. 45 Dlaczego wyodrębniono na diagramie kołowym „uczenie się i pamięć" oraz „uczenie się asocjacyjne ?" Uczenie się asocjacyjne jest przecież jednym z rodzajów uczenia się.

Podsumowanie właściwie częściowo powiela się z następującą częścią, czyli wnioskami. Jako recenzent czuję trochę niedosyt gdyż brakuje mi części, która zwykle znajduje się w rozprawach doktorskich, a mianowicie dyskusji. Co prawda w publikacjach stanowiących integralną część rozprawy doktorskiej wyniki są dyskutowane, to jednak w opisie w języku polskim tego nie ma. Być może jest to podyktowane zaleceniami macierzystej uczelni dotyczącymi sposobu przygotowania rozprawy doktorskiej.

Wnioski sformułowane są jasno, choć można było je przedstawić w formie zdań, a nie od myślników i ponumerować. Mgr Kalinowski napisał w jednym z wniosków (str. 48), że wyższy poziom ekspresji GFAP w jądrze podstawno-przyśrodkowym i korowym, który towarzyszył obniżonej liczbie komórek nerwowych, może być związany z nasileniem stanu zapalnego w jądrach ciała migdałowatego. Sądzę, że ten wniosek jest trochę za daleko idący. Autor nie badał bowiem markerów stanu zapalnego, np. cytokinin proinflamacyjnych.

4. Uwagi edycyjne, językowe i inne

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

1. Tabela 3, str. 38 i tabela 4 str. 46 – legenda nie zawiera opisu skrótów stosowanych w tabelach.
2. Na rycinie 5, str. 45 brak jest liter A i B. Znajdują się one jedynie w legendzie do ryciny.
3. Brak stosowania akapitów w części rozprawy doktorskiej napisanej w języku polskim.

5. Podsumowanie

Stwierdzam, że przestawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Daniela Kalinowskiego pt. **„Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta”** spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2023.742 ze zm.).

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



prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska