



25-406 Kielce, ul. Uniwersytecka 7  
tel. (41) 349 6293, fax. (041) 349 6292

biologia.ujk.edu.pl  
instytut.biologii@ujk.edu.pl

dr hab. Jacek Kuchinka, prof. UJK  
Zakład Biologii Medycznej  
ul. Uniwersytecka 7 141/143, 25-406 Kielce  
e-mail: [jacek.kuchinka@gmail.com](mailto:jacek.kuchinka@gmail.com)

Kielce, dnia 18.07.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Daniela Kalinowskiego  
pt. „Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora  
estrogenowego beta”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Macieja Równiaka †  
dr hab. n. med. Anny Kozłowskiej, prof. UWM  
Promotor pomocniczy: dr Krystyna Bogus-Nowakowska

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią dwie publikacje. Doktorant w obu jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Jest również autorem koncepcji i metodyki badań, walidacji wyników, analizy uzyskanych danych, i ich wizualizacji i pierwotnego przygotowania manuskryptu. Czasopisma, w których Doktorant opublikował swoje wyniki cieszą się uznaną renomą w międzynarodowym środowisku naukowym, o czym świadczą wysokie wartości współczynnika oddziaływania. Łącznie wartość Impact Factor wynosi 9,96 a liczba punktów w klasyfikacji MNiSW wynosi 280.

Publikacja 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  $\beta$ -deficient female mice. *J Clin Med.* 2022 Mar 22; 11(7): 1760. DOI: 10.3390/jcm11071760. PMID: 35407369; PMCID: PMC8999607.  
IF = 4,964 punkty MEiN = 140

Publikacja 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  $\beta$  deprivation. *Scientific Reports.* 2023 Jan 17; 13, 897. DOI: 10.1038/s41598-023-28069-2. PMID: 36650256; PMCID: PMC9845293.  
IF = 4,996 punkty MEiN = 140

Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej, zostały poddane dokładnemu/rzetelnemu procesowi recenzji w gronie ekspertów redakcyjnych, a opublikowane w nich wyniki i wnioski stały się podstawą do napisania dysertacji doktorskiej mgr Daniela Kalinowskiego. Dlatego też w dalszej części mojej recenzji skupię się na ocenie przedłożonej dysertacji.

Problematyka badawcza, którą podjął mgr Daniel Kalinowski jest ważna i interesująca z punktu widzenia poznawczego i być może aplikacyjnego. Lęk jest funkcją wielu procesów zachodzących w OUN a przede wszystkim w ciele migdałowatym. Struktura ta generuje i reguluje wszelkie zachowania emocjonalne u zwierząt. Ciało migdałowate jest silnie modulowane przez układy: dopaminergiczny i cholinergiczny. Aktywują one zarówno neurony glutaminergiczne, jak i GABAergiczne, a tym samym mają znaczący wpływ na pobudzająco-hamującą równowagę w tej strukturze. Autor podjął się określenia zmian ilościowych w populacji neuronów tworzących poszczególne jądra ciała migdałowatego oraz określenie/określenia zmian ilościowych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego w strukturach ciała migdałowatego u samic myszy z deficytem ER $\beta$ . Wykorzystując te zwierzęta, charakteryzujące się zwiększonym niepokojem i nasilonymi reakcjami lękowymi, wykazano nieprawidłowości w charakterze i wzorze dystrybucji głównych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego.

Praca zawiera 66 stron maszynopisu i dwa załączniki będące publikacjami (wraz z oświadczeniami współautorów). Wstęp poprzedzony jest streszczeniami w języku polskim i angielskim, wykazem publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz wykazem skrótów. Następnie określony został cel pracy i postawione hipotezy i zadania badawcze. Rozdział „Materiał i metody” zawarty na 9 stronach obejmuje opis materiału zwierzęcego, przygotowania tkanek, zastosowanych barwień immunohistochemicznych, kontroli specyficzności przeciwciał, ocenę zmian ilościowych badanych markerów, systemu analizy skanów, sposobu liczenia komórek nerwowych, analizę sieci interakcji PPI oraz analizę statystyczną. Praca zawiera 5 rycin, 4 tabele i 173 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp do rozprawy napisany został bardzo interesująco co świadczy o dużej znajomości tematu. Część ta zaczyna się od charakterystyki natury lęku w aspekcie zaburzeń psychicznych (DSM) stanowiących poważny problem zdrowotny i społeczny, w skali globalnej. Następnie opisane zostało ciało migdałowate jako złożona, niejednorodna komórkowo struktura odpowiedzialna za lęk. Jego dwa kompleksy: podstawno-boczny i przyśrodkowy wraz z pobudzającymi neuronami piramidalnymi i hamującymi neuronami niepiramidalnymi. W warunkach fizjologicznych powinny one funkcjonować w zakresie pewnej równowagi, a jej zakłócenie może stanowić przyczyniać się do rozwoju chorób psychicznych w tym zaburzeń o charakterze lękowym. W dalszej części omówiono rolę hormonów steroidowych w tym estrogenów (E1, E2) w aspekcie ich wiązania z receptorami estrogenowymi ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Przedstawiono również dane literaturowe uzasadniające wybór myszy z deficytem ER $\beta$  jako właściwy zwierzęcy model do badania zaburzeń lękowych chociaż podkreślono, że mechanizmy, które zwiększają lęk u tych myszy są jak dotąd nieznanne. W dalszej części wstępu zwrócono uwagę na impulsację dopaminergiczną, która może być również regulowana pośrednio poprzez uwalnianie DA, oraz bezpośrednio przez estrogeny, poprzez jej degradację, wychwyty zwrotny i regenerację. W końcowej części wstępu przedstawiono dane dotyczące projekcji do ciała migdałowatego z brzusznej gałki bladej i istoty bezimiennej – struktur mózgowia bogatych w komórki nerwowe syntetyzujące i uwalniające ACh. Ta poprzez receptory muskarynowe i nikotynowe aktywuje neurony projekcyjne i interneurony. Uwalnianie ACh w ciele migdałowatym jest związane z bodźcami, takimi jak: generowanie, warunkowanie i wygaszanie strachu. Podkreślono również znaczenie technologii bioinformatycznej jako narzędzia ułatwiającego identyfikację procesów biologicznych takich jak emocje i funkcje poznawcze u zwierząt laboratoryjnych z udziałem estrogenów i receptora (ER $\beta$ ) oraz neuronów dopaminergicznych i cholinergicznych.

Celem pracy było określenie zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów tworzących jądra ciała migdałowatego, a także zmian ilościowych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym dorosłych samic myszy z

deficytem ER $\beta$ , charakteryzujących się zwiększonym niepokojem i nasilonymi reakcjami lękowymi.

W części „Materiały i metody” Doktorant wyspecyfikował odczynniki chemiczne oraz użyty sprzęt laboratoryjny. Udokumentowano to w dwóch tabelach.

Zwierzęta użyte w badaniach to dojrzałe płciowo samice myszy (w wieku 6–8 tygodni), tj. ER $\beta$ -/- zostały pozyskane z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Zastosowano wszelkie procedury związane z opieką i obchodzeniem się ze zwierzętami. Zadeklarowano ich zgodność z dyrektywą 2010/63/UE Unii Europejskiej w sprawie doświadczeń na zwierzętach. W dalszej części tego rozdziału doktorant przedstawił m.in. procedury tkankowe, zastosowane barwienia IHC, analizę statystyczną.

Skrócona forma wyników badań obejmowała odrębnie:

Publikację 1, w której wykazano istotną redukcję liczby komórek nerwowych we wszystkich głównych jądrach ciała migdałowatego u samic myszy ER $\beta$ -/-, którym towarzyszyła znacznie wyższa ekspresja GFAP. Ponadto w ciele migdałowatym myszy z deficytem ER $\beta$  liczba komórek nerwowych wykazujących ekspresję CB była obniżona w porównaniu do myszy kontrolnych, podczas gdy ekspresja pozostałych markerów GABAergicznym, utrzymywała się na niezmiennym poziomie.

W Publikacji 2 wykazano, że poziom ekspresji struktur wykazujących immunoreaktywność wobec głównych markerów dopaminergicznym (TH, DAT i DA2) był istotnie podwyższony w analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy ER $\beta$ -/-. Poziom ekspresji struktur wykazujących immunoreaktywność wobec DA1 nie uległ zmianie. Brak zmian w poziomie ekspresji odnotowano również w odniesieniu do markerów cholinergicznym: AChE i VACHT. Z kolei, dalsze analizy wykazały istotny wzrost liczby komórek nerwowych zawierających receptory cholinergiczne tj. AChRM1 i AChR $\alpha$ 7 w jądrach ciała migdałowatego samic myszy ER $\beta$ -/- w porównaniu z samicami myszy ER $\beta$ +/+.

Z ciekawości naukowej recenzenta chciałbym w tym miejscu poprosić Doktoranta o ustosunkowanie się do trzech kwestii:

1. W pracy wykazano deficyty neuronalne w jądrach ciała migdałowatego. Jakie mogą być mechanizmy redukcji liczby tych neuronów?
2. Prezentowane przez Pana wyniki badań dotyczą podłoża zachowań lękowych u samic myszy z deficytem receptora estrogenowego beta. Czy znane są dane na ten temat u samców?
3. W jaki sposób można interpretować uzyskane wyniki u myszy z obniżoną sygnalizacją estrogenową w odniesieniu do powszechnie znanych problemów z jakimi borykają się kobiety w okresie menopauzy?

Podsumowując, rozprawa „Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta” mgr Daniela Kalinowskiego jest tematycznie spójna, zawiera nowe, oryginalne i cenne pod względem naukowym rezultaty. Znalezione w tekście niedoskonałości są na tyle nieistotne, że nie uznałem za stosowne ich wymienienie i oczywiście w żaden sposób nie obniżają wartości przedstawionej do oceny pracy. W trakcie jej realizacji Doktorant wykazał się adekwatnym zastosowaniem nowoczesnych technik badawczych, umiejętnością krytycznej analizy i interpretacji wyników oraz ich publikacji w czasopiśmie z listy JCR, i jak przypuszczam także umiejętnością efektywnej pracy w zespole naukowym.

Praca została starannie opracowana od względem edytorskim, układ graficzny pracy, wykresy i tabele są bardzo dobrej jakości, oznaczenia rozdziałów i inne elementy technicznego przygotowania tekstu – prawidłowe.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Daniela Kalinowskiego spełnia warunki określone w art. 187 ust. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023. 742 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauk biologicznych

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Daniela Kalinowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



dr hab. Jacek Kuchinka prof. UJK