

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ity Robakiewicz pod tytułem „Określenie struktur mózgu uczestniczących w zachowaniach eksploracyjnych typu autoekspozycji i częściowe zablokowanie ich aktywności w celu wywołania zachowań depresyjnych u szczurów.” w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez Radę Wydziału Psychologii Wyższej Szkoły Finansów i Zarządzania w Warszawie.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr. hab. Roberta Filipkowskiego. Liczy ona 97 stron i ma układ rozdziałów typowy dla tego rodzaju opracowań. Porusza ważną w neurobiologii tematykę identyfikacji struktur mózgu uczestniczących w wykonywaniu określonych czynności behawioralnych oraz zachodzących pomiędzy tymi strukturami związków funkcjonalnych. W szczególności autorka identyfikuje struktury mózgu, których neurony ulegają aktywacji zależnej od zachowań wyzwolonych przez popęd ciekawości.

Doktorantka bada proces samostymulacji u szczura wykorzystując model autoekspozycji, ciekawy model behawioralny służący do badania zachowań nakierowanych na cel. Dodatkowo posługuje się również innymi testami behawioralnymi mierząc: zachowania depresyjne testem wymuszonego pływania, poziom zachowań lękowych testem wzniesionego labiryntu krzyżowego i testem otwartego pola oraz występowanie anhedonii testem konsumpcji roztworu sacharozy.

Wstęp pracy stanowi dobre wprowadzenie w tematykę badań pomimo tego, że jest napisany nieco chaotycznie i mało starannie, czyta się go miejscami nieco ciężko. Zauważalne są problemy z formatowaniem tekstu np. formatowanie nagłówka na stronie 65 pt. „Analiza aktywności zwierząt w doświadczeniu z wyciszaniem białka c-Fos w otwartym polu”. W tekście występuje też niemało błędów stylistycznych. We wstępie w wystarczającym zakresie omówiono zagadnienia dotyczące hipotezy optymalnej stymulacji, a także zachowań zwierząt i ludzi nakierowanych na cel, w tym szczególnie szczegółowo omówiono zostały korelaty mózgowe tych zachowań. Przedstawiono w tym rozdziale również zarysy użytego do badań modelu autoekspozycji na bodźce sensoryczne. Zaprezentowano ponadto

współczesne poglądy na rolę białka c-Fos w procesie uczenia się oraz we wzmocnieniu emocjonalnym w teście samostymulacji, a także na udział c-Fos we wzmocnieniu emocjonalnym z jądra środkowego ciała migdałowego ujawnionym w standardowych testach behawioralnych. Dodatkowo przedstawiono zjawisko wokalizacji ultradźwiękowych u szczura i ich związku ze stanem emocjonalnym tych zwierząt.

W modelu autoekspozycji analizowana była liczba wsadzeń nosa do otworów klatki autoekspozycyjnej (aktywność zwierząt wpływająca na kształtowanie warunków oświetlenia, w którym przebywają) oraz analizowane były szczurze wokalizacje ultradźwiękowe odzwierciedlające stan emocjonalny zwierząt. Struktury mózgu uczestniczące w procesie samostymulacji autorka dysertacji identyfikowała przy pomocy barwienia immunohistochemicznego skrawków mózgu poprzez analizę zależnej od samostymulacji indukcji ekspresji białka c-Fos w strukturach mózgu biorących udział w realizacji zachowań nakierowanych na cel, a wybranych w wyniku analizy literatury (jądro środkowe ciała migdałowego, jądro podstawno-boczne ciała migdałowego, pole CA1 hipokampa, pole CA3 hipokampa, zakręt zębaty hipokampa, rdzeń jądra półleżącego, powłoka jądra półleżącego, kora infra-limbiczna, kora przed-limbiczna). Strukturę sieci połączeń między strukturami mózgu, w których zaszła ekspresja c-Fos, doktorantka ustalała metodami statystycznymi badającymi korelacje. Ponadto autorka badała wpływ zależnego od wektora lentiwirusowego zablokowania ekspresji czynnika transkrypcyjnego c-Fos w jądrze środkowym ciała migdałowego na proces autostymulacji oraz na zachowania depresyjne u szczurów.

Celami badawczymi doktorantki było: 1. określenie struktur uczestniczących w wykonaniu testu autoekspozycji za pomocą barwienia immunocytochemicznego białka c-Fos, 2. określenie typów wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych przez szczury podczas wykonywania testu autoekspozycji, 3. „określenie roli pobudzenia jądra środkowego ciała migdałowego w neuronach, w których zachodzi ekspresja c-Fos, w wykonaniu testu autoekspozycji, w regulacji emocji i zachowań depresyjnych”. Uważam, że dwa pierwsze cele zostały przez doktorantkę zrealizowane. Cel trzeci jest dla mnie nie zrozumiały. Wydaje mi się, że cel ten nie jest prawidłowo określony, nie rozumiem co doktorantka ma na myśli pod takim sformułowaniem celu trzeciego jakie zostało zawarty w dysertacji. Proszę o wyjaśnienie. Być może ten cel powinien brzmieć: określenie wpływu pobudzenia jądra

środkowego ciała migdałowatego na wykonanie testu autoekspozycji oraz emocje i zachowania depresyjne u szczura? Jeśli ten cel, by zdefiniować tak jak proponuję, wówczas sądzę, że również został od przez doktorantkę osiągnięty.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów w modelu samostymulacji doktorantka wykazała, że rośnie aktywność behawioralna szczurów szczepu Long Evans, ale nie szczepu Wistar, jeśli umożliwi się im wpływanie na warunki otoczenia, w którym bytują. Zjawisko to doktorantka tłumaczy istnieniem u szczurów popędu ciekawości popychającego je do eksploracji środowiska bytowego, choć dlaczego nie występuje ona u szczurów Wistar? Dodatkowo uzyskane przez doktorantkę wyniki wskazują, że jeśli w modelu samostymulacji nie pojawi się nowy bodziec emocjonalny to napęd ciekawości ulega habituacji.

Następnie autorka opisuje eksperymenty analizujące zmianę ekspresji c-Fos oparte o immunohistochemiczne barwienie skrawków mózgu szczura, mające na celu identyfikację struktur mózgu uczestniczących w procesie samostymulacji. W wyniki tych badań doktorantka odkryła, że u szczurów szczepu Long-Evans strukturą mózgu, która aktywuje się pod względem ekspresji białka c-Fos w modelu autostymulacji jest pole CA1 hipokampa. W swoich dalszych analizach doktorantka identyfikowała również występowanie w modelu samostymulacji korelacji aktywności szeregu struktur mózgu odgrywających rolę w przebiegu procesów motywacyjnych i zjawisku uczenia się. W konsekwencji ustaliła, że w modelu autoekspozycji u szczurów szczepu Long-Evans występuje korelacja ekspresji białka c-Fos w kilku badanych strukturach, takich jak: ciało migdałowate, jądro półleżące, kora przedczołowa i hipokamp.

W modelu samostymulacji autorka dysertacji analizowała również wzorzec emisji wokalizacji szczurów w paśmie ultradźwiękowym w wyniku czego doszła do wniosku, że zebrane przez nią wyniki sugerują brak sygnalizacji przez poddane badaniom zwierzęta obecności zagrożenia w ich otoczeniu podczas przeprowadzonych badań behawioralnych, a także na brak stanu awersyjnego u badanych szczurów oraz na występowanie u nich pobudzenia pozytywnego. Co ciekawe wyniki te nie ulegały zmianie po zablokowaniu przez lentiwirusowy wektor wyciszający ekspresji białka c-Fos w jądrze środkowym ciała migdałowatego. Doktorantka na podstawie analizy szczurzych wokalizacji sugeruje również, że generowane przez szczury ultradźwięki mogą mieć szerszą niż dotychczas przypuszczano rolę w komunikacji międzypsobniczej np. mogą uczestniczyć w przekazywaniu innym

osobnikom informacji dotyczących swojego położenia, jak i lokalizacji obiektów znajdujących się w ich otoczeniu. Omawiane wyniki wskazują również na istnienie u szczurów dodatniego związku pomiędzy pobudzeniem ruchowym, a emocjonalnym, zjawiska, które mogłoby poprawiać komunikację w stadzie podczas aktywnego badania terenu. Doktorantka ujawnia też, że emitowane w pasmie 50 kHz ultradźwięki typu płaskiego korelującą pozytywnie z ekspresją c-Fos w polu CA1 hipokampa, zatem mogą być wokalnym odzwierciedleniem zależnego od tego regionu mózgu procesu uczenia się.

Doktorantka badała również wzorzec behawioralny występujący u szczurów z zablokowaną wektorem lentiwirusowym ekspresją c-Fos w jądrze środkowym ciała migdałowatego. Analizy te ujawniły, że wyciszenie ekspresji c-Fos prowadzi do wystąpienia obniżonego poziomu zachowań depresyjnych mierzonego czasem bezruchu w teście wymuszonego pływania, natomiast nie wpływa na mierzoną w teście otwartego pola aktywności zwierząt, na analizowany we wzniesionym labiryncie krzyżowym poziom lęku, ani nie powoduje wystąpienia anhedonii w teście konsumpcji roztworu sacharozy.

Wiele rozdziałów dyskusji wygląda na reasumację uzyskanych wyników, a nie ich rzeczywistą dyskusję z wynikami opublikowanymi przez innych autorów. Szczególnie pod tym względem defektywny wydaje się być rozdział pt. „Brak efektu samostymulacji w doświadczeniu z blokowaniem ekspresji białka c-Fos w CeA”, gdzie autorka nie przeprowadza absolutnie żadnej dyskusji swoich wyników. Rozdział ten wydaje się mi być wręcz nieukończony, nawet brakuje w nim reasumacji uzyskanych przez doktorantkę danych badawczych. Szkoda, bo wyniki których tytuł rozdziału dotyczy wydają mi się być jednymi z najbardziej interesujących wśród danych doświadczalnych uzyskanych przez doktorantkę.

Dodatkowe zagadnienia do dyskusji:

1. Wstęp:

- Na stronie 25 doktorantka pisze „Z kolei krótkie USV pasma 22 kHz, pojawiały się często u szczurów, u których podawano niskie, podprogowe dawki samo-podawanej kokainy (Barker i wsp., 2010; Barker i wsp., 2014). Sygnały te obserwowano również w innych nieawersyjnych sytuacjach (wymienione w Barker i wsp., 2015), aczkolwiek ogólnie nie były one obserwowane w modelach nieawersyjnych.” Proszę o wyjaśnienie tego fragmentu, bo wydaje mi się wewnętrznie nielogiczny.

- Na stronie 26 doktorantka pisze „Wprowadzenie do tkanki nerwowej żyjącego zwierzęcia wektora lentiwirusowego (Lv-GFPsh-c-Fos, Ryc. 2), powoduje blokowanie genu c-fos na poziomie mRNA.” Z kolei na stronie 32 autorka napisała „Wykorzystano blokowanie miejscowe ekspresji c-Fos na poziomie translacji, przy pomocy wektora wirusowego Lv-GFP-sh-c-Fos”. Zatem jak działa ten wektor i skąd autorka ma informacje, że omawiany wektor w ogóle działa?
- Na stronie 26 podpis pod ryciną 2 brzmi „Mapa plazmidu unieczynnającego ekspresję białka c-Fos na poziomie mRNA, dostarczanego za pośrednictwem lentiwirusa do neuronów.” Moim zdaniem jest to mapa plazmidu lentiwirusowego. Taki plazmid infekuje komórki samodzielnie i nie potrzebuje do tego lentiwirusa.
- Opis wektora lentiwirusowego zawarty we wstępie na stronie 26 powinien moim zdaniem zostać przeniesiony do rozdziału metody.

2. Metody:

- Str. 33:
 - Dlaczego badania w teście samostymulacji prowadzone były na samcach szczepu Long-Evans podczas, gdy badania z wyciszeniem białka c-Fos wykonywano na samcach szczepu Wistar? Dlaczego brano do doświadczeń szczury szczepu Long-Evans będące w wieku 4 miesięcy, a szczepu Wistar w wieku 2 miesięcy?
 - Dlaczego w badaniach wstępnych wykorzystywano zarówno szczury szczepu Long-Evans, jak i Wistar? Dlaczego były one w różnym od siebie wieku (Wistar w wieku 3 miesięcy, Long-Evans w wieku 6 miesięcy)? Dlaczego ich wiek był inny niż wiek zwierząt użytych do badań w teście samostymulacji?
- Na str. 33 doktorantka pisze: „W badaniach wstępnych 1 i 2 kolejno użyto: 20 samców szczura szczepu Wistar, w wieku 3 miesięcy oraz 12 samców szczura szczepu Long-Evans, w wieku 6 miesięcy. W pierwszym doświadczeniu, w grupie eksperymentalnej było 10 szczurów, a w grupie kontrolnej sprzężonej, było 10 szczurów; natomiast w drugim doświadczeniu były po 4 szczury w grupie doświadczalnej, tj. w grupie eksperymentalnej, kontrolnej.” Zatem w sumie do badań wstępnych 1 i 2 ze zdania pierwszego wynika, że użyto 32 szczury, a ze zdania drugiego, że 28 szczurów. Skąd bierze się ta rozbieżność? Jaka była dystrybucja liczbowa zwierząt pod względem przynależności do szczepu pomiędzy

doświadczeniami wstępnymi 1 i 2 oraz między badanymi grupami zwierząt w tych eksperymentach?

- Dlaczego doktorantka wybrała do wycieszenia ekspresji model lentiwirusowy?
- Na str. 35 doktorantka pisze „Skuteczność użytej partii wirusa Lv-GFP-sh-c-Fos w wycieszeniu ekspresji białka c-Fos, została wcześniej potwierdzona (nie pokazano).” W jakich eksperymentach została potwierdzona ta skuteczność? Kto ją potwierdził? Jak otrzymywano wektory lentiwirusowe użyte do doświadczeń? Kto skonstruował konstrukty wyciszające?

3. Wyniki:

- Na stronie 46 autorka napisała „Eksperymentatorzy nieposiadający wiedzy co do przynależności do grup doświadczalnych szczurów, których tkanka była analizowana, zliczali jądra c-Fos-pozytywne w wybranych strukturach za pomocą automatycznej ekstrakcji z tła, w programie ImageJ (funkcja „Threshold”).” Kto prócz doktorantki uczestniczył w generowaniu tych wyników?
- Numeracja niektórych rycin nie jest zgodna z przebiegiem tekstu np. ryc. 9, pojawia się w tekście po rycinie 10. Utrudnia to ocenę pracy.
- W licznych fragmenty rozdziału opisującego wyniki zostało napisane co zbadano, ale bez stwierdzenia jaki jest wynik tych badań, uważam to za duże niedociągnięcie np. na stronie 63 napisano „Zbadano, czy dla wszystkich zwierząt istniała korelacja między liczbą krótkich dźwięków w paśmie 22 kHz USV, emitowanych podczas dnia habituacji, a liczbą dźwięków w paśmie 50 kHz USV ($p = 0,43$, $p < 0,05$).” Na odpowiedniej rycinie również nie ma konkluzji. Podobnie nazwy podrozdziałów rozdziału Wyniki są niekonkluzyjne, jedynie opisują nazwy eksperymentów, które zawarte są w danym rozdziale. Konkludowanie wyników zostało przerzucone do dyskusji, w której jednocześnie w małym stopniu skonfrontowano je z wynikami opublikowanymi przez innych badaczy o czym już wspominałem powyżej.
- Dużym mankamentem wyników jest to, że są one niejednorodne. Niektóre eksperymenty zostały wykonywane z podziałem na szczepy Wistar ver. Long-Evans, inne nie (i to większość z nich). Czy do pozostałych eksperymentów były brane oba szczepy, w jakiej liczbie? W wielu miejscach rozdziału Wyniki nie ma napisane, które eksperymenty były wykonywane na szczurach Wistar, a które na szczepie Long-Evans,

co zwiększa ogólny brak uporządkowania obecny w wielu miejscach recenzowanej dysertacji doktorskiej oraz utrudnia jej recenzję.

4. Dyskusja:

- Na str. 75 doktorantka napisała „Podczas badań w teście samostymulacji, obserwowaliśmy korelację aktywności szeregu struktur zaangażowanych w układ motywacyjny i uczenie się.” Kto to zaobserwował?

Podsumowując pragnę podkreślić, że pomimo obecnych w dysertacji niedociągnięć ogólnie uważam, że w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej zaprezentowano nowatorskie i interesujące wyniki badawcze. Doktorantka porusza w swoich badaniach ciekawe problemy naukowe, zwłaszcza podejmuje się określenia anatomicznego podłoża zachowań eksploracyjnych typu autoekspozycji na bodźce sensoryczne, a uzyskane przez nią wyniki badawcze rzucają pewne światło na ten jeszcze mało zbadany problem naukowy. Dodatkowo badaczka analizuje wokalizacje ultradźwiękowe u szczurów uzyskując bardzo nowatorskie, pionierskie w doświadczeniach behawioralnych stosujących subtelną stymulację, takich jak autoekspozycja, wyniki pokazujące strukturę tych wokalizacji i sugerujące ich funkcje. W konsekwencji po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Iry Robakiewicz stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016r. poz. 882), dlatego wnoszę do Radę Wydziału Psychologii Wyższej Szkoły Finansów i Zarządzania w Warszawie o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marcin Ryłski

Kierownik Zakładu Cytologii Klinicznej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

Kierownik Zakładu Cytologii Klinicznej
prof. nadzw. w CMKP

Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie