

Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

ul. Księcia Trojdena 4

02-109 Warszawa

e-mail: jacek.kuznicki@iimcb.gov.pl

tel. (0)22 597 07 06

Warszawa, dn. 19 czerwca 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Cały
pt. „Wpływ procesu starzenia na neuronalne mechanizmy decyzji przestrzennych”
pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Katarzyny Radwańskiej**

Tematyka ocenianej pracy doktorskiej dotyczy starzenia się mózgu i związanych z tym możliwych problemów w ocenie sytuacji przestrzennej. Analizując dane z klatki IntelliCage, Autorka porównuje wybory młodych i starych myszy w różnych warunkach doświadczalnych. Badaniom poddawano myszy typu dzikiego lub myszy, które pod wpływem różnych modyfikacji genetycznych miały obniżony lub podwyższony poziom dzikiego typu białka PSD-95 lub ekspresję zmutowanego białka, które nie mogło ulec fosforylacji przez kinazę II zależną od kalmoduliny. Wyniki zachowań zostały uzupełnione o analizy immunologiczne i fluorescencyjne skrawków mózgu myszy, które brały udział w określonych doświadczeniach. Analizowano je przy pomocy przeciwciał na białko PSD-95 lub pod kątem obecności białek fluorescencyjnych GFP i mCherry. Wszystkie otrzymane wyniki zostały obliczone z użyciem adekwatnych metod statystycznych. Opisując wyniki pracy, Autorka odnosi się do zachowań ludzi w różnym wieku.

Ogólny opis pracy

Rozprawa ma typową strukturę prac doktorskich. Zawiera spis treści, pełną listę stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, krótkie podsumowanie, wnioski, bibliografię oraz suplement. W tym ostatnim znajduje się spis dorobku naukowego Doktorantki oraz dwa programy wykorzystane do analiz. Rozprawa napisana jest poprawnie i praktycznie bezbłędnie w języku polskim, ale nie jest łatwa w odbiorze. Wynika to po części z konieczności stosowania rozbudowanego opisu warunków doświadczenia oraz przerywników w postaci informacji o zastosowanych metodach statystycznych, wynikach analiz, a także odnośników do rycin i do cytowanej literatury. Być może ta opinia wynika

jednak z braku praktycznego doświadczenia recenzenta z tego typu opisami wyników behawioralnych.

Wstęp zawiera informacje o budowie hipokampa, połączeniach neuronów oraz budowie i roli składników synaps. Autorka opisała też molekularne podłoże plastyczności ze szczególnym uwzględnieniem receptorów jonotropowych glutaminianu oraz białek rusztowania synaptycznego. Dokładnie opisała budowę, funkcję i rolę jednego z nich tj. białka PSD-95. W ostatniej części Wstępu zebrała informacje na temat procesów starzenia zachodzących w mózgu, w szczególności w hipokampie oraz zmianach strukturalnych i funkcjonalnych dotyczących receptorów NMDA. Wstęp jest zilustrowany własnymi, bardzo przejrzystymi rysunkami. Całość stanowi dobrą podstawę do sformułowania celu pracy.

Cel pracy

Jako główny cel pracy Autorka wskazała „... określenie, w jaki sposób starzenie się wpływa na strategie behawioralne i procesy synaptyczne w dCA1, które wspierają dokonywanie wyborów przestrzennych.” Aby zrealizować ten cel, Doktorantka sformułowała trzy szczegółowe problemy badawcze: charakterystykę strategii behawioralnych wspomagających decyzje w podeszłym wieku, charakterystykę zmian synaptycznych w dCA1 towarzyszących podejmowaniu decyzji przestrzennych w podeszłym wieku i trzeci - rolę białka PSD-95 w dCA1 i fosforylacji reszty serynowej 73 PSD-95 w podejmowaniu decyzji przestrzennych. Przenosząc to na język mniej specjalistyczny, problemem do wyjaśnienia było opisanie zmian w zachowaniu myszy w korelacji ze zmianami komórkowymi i molekularnymi w synapsach części hipokampa. Można byłoby to uznać za właściwe sformułowanie celu pracy, gdyby nie słowa „w podeszłym wieku”, które w odczuciu recenzenta odnoszą się do ludzi, a nie zwierząt. Czy 18-miesięczna mysz jest w podeszłym wieku? Takie sformułowanie może sugerować, że część pracy wykonano nie tylko na myszach.

Materiały i metody

Rozdział ten to 11 stron szczegółów dotyczących zastosowanych technik badawczych. W kilku tabelach podano sekwencje starterów, skład mieszaniny i warunki reakcji PCR. Szczegółowo opisano system IntelliCage oraz pokazano na dobrym, własnym schemacie, zasadę głównych doświadczeń behawioralnych, tj. adaptacji i apetytywnych oraz awersyjnych treningów. Podano, jak przeprowadzono perfuzję przezsercową w celu przygotowania skrawków mózgu i jak wykonano na nich barwienia immunofluorescencyjne. Opisano też, jak przeprowadzano iniekcje wektorów wirusowych do hipokampów, jak analizowano wydajność tej procedury oraz mikroskopowo fluorescencję uzyskanych preparatów. Opisy te dobrze dokumentują zastosowane metody, co może ułatwić ewentualne powtórzenie tych doświadczeń przez innych badaczy. Autorka napisała, jakie mikroskopy i programy były wykorzystane do analizy zdjęć. W ostatniej części bardzo

skrótowo podano zastosowane metody i programy statystyczne. Ich bardziej szczegółowy opis znajduje się przy konkretnych doświadczeniach.

Wyniki

W pierwszej, głównej części wyników Autorka analizowała strategie behawioralne wykorzystywane przez młode i stare myszy w wyborze rogów klatki IntelliCage i nie stwierdziła istotnych różnic. Stwierdzono jednak, że stare zwierzęta wykazywały większą zmianę preferencji rogu z nagrodą w czasie treningu, co było miarą poprawnie wykonanych wyborów przestrzennych. Jak stwierdzono na podstawie kolejnych doświadczeń, było to efektem strategii behawioralnej u osobników charakteryzujących się zwiększoną skłonnością do zachowań perseweracyjnych i społecznych.

Następnie Autorka zbadała, jaki wpływ na dokonywanie wyborów przestrzennych starych myszy ma obecność młodych w tej samej klatce. Okazało się, że w obecności młodych myszy, stare wykazują mniejszą częstość zachowań perseweracyjnych oraz, że wysoka skłonność do wizyt perseweracyjnych i interakcji socjalnych starych myszy przyczynia się do silnej preferencji miejsca i nagrody.

Kolejnym etapem pracy było zbadanie wpływu treningu wyborów przestrzennych na plastyczność kolców dendrytycznych. Mierząc całkowitą objętość hipokampów, Autorka nie zaobserwowała zmian neurodegeneracyjnych u starych myszy. Nie stwierdziła również różnic między grupami doświadczalnymi pod względem gęstości kolców dendrytycznych w warstwie promienistej pola dCA1. Natomiast pojawiła się różnica w powierzchni tych kolców. Analizując parametry kolców u starych i młodych myszy oraz zmiany w trakcie treningu, Autorka doszła do wniosku, iż trening przestrzenny prowadził do kurczenia się kolców dendrytycznych w dCA1 u młodych osobników. Natomiast u starych zaobserwowano tworzenie się nowych kolców i wzrost ich średniej wielkości. Na podstawie tych wyników Doktorantka zaproponowała hipotezę, iż w zależności od wieku pojawia się alternatywna forma plastyczności synaptycznej.

Aby zweryfikować tę hipotezę Autorka szczegółowo opisała, jak zmienia się ekspresja białka PSD-95 wraz z wiekiem i w trakcie treningu. Stwierdziła, że trening powodujący kurczenie się kolców dendrytycznych u młodych osobników, powodował jednocześnie obniżenie poziomu białka PSD-95. Natomiast trening starych osobników wywoływał wzrost kolców, a jednocześnie kurczenie się powierzchni punktów zawierających białko PSD-95. Te obserwacje wskazują, iż u tych ostatnich zwierząt nastąpiła dekorelacja tych parametrów.

Kontynuując ten aspekt badań Autorka sprawdzała, czy wzorce plastyczności synaptycznej zależą od rodzaju treningu tylko u młodych myszy. Okazało się, iż wzorce te w przypadku zwierząt poddanych treningowi przestrzennemu (możliwość wyboru rogu z chininą lub sacharozą) charakteryzowały się obniżeniem poziomu PSD-95 oraz kurczeniem się kolców dendrytycznych. Natomiast w nieprzestrzennym treningu, gdy w obu rogach była sacharoza, dochodziło do zwiększenia ilości białka PSD-95 oraz do powiększenia się kolców dendrytycznych. Świadczy to o roli białka PSD-95 w obu procesach. W kolejnym cyklu

doświadczeń Autorka analizowała wpływ obniżonego poziomu PSD-95 wskutek użycia wektorów lentiwirusowych i shRNA skierowanego na sekwencje PSD-95 na badane parametry zachowania. Stwierdziła, iż zmniejszenie poziomu PSD-95 w rejonie dCA1 zaburzało proces dokonywania wyboru przestrzennego u młodych myszy, potwierdzając konkluzje z wcześniejszych badań.

Kolejnym etapem pracy było uściślenie wpływu fosforylacji seryny 73 w białku PSD-95 na dokonywanie wyboru przestrzennego u młodych myszy. Doświadczenia te możliwe były po uzyskaniu nadekspresji dwóch wersji białka fuzyjnego PSD-95 z mCherry: formy dzikiej oraz mutantu, który nie mógł być fosforylowany na tej reszcie aminokwasowej. Nadekspresję przeprowadzono wykorzystując wektor adenowirusowy. Okazało się, że dzika forma białka PSD-95 nie wpływała na zmianę zachowań, natomiast w przypadku mutantu następowało upośledzenie podejmowania decyzji przestrzennych we wczesnych fazach treningu i powodowało, że młode myszy (tylko te były badane) były bardziej skłonne do podejmowania decyzji perseweracyjnych oraz ograniczały spontaniczne patrolowanie przestrzeni.

Następnie Doktorantka sprawdziła, jak obniżenie poziomu PSD-95 w dCA1 wpłynie na podejmowanie decyzji przestrzennych u starych myszy. W tym celu ponownie wykorzystwała wektory wirusowe z shPSD95 podawane drogą mikroiniekcji stereotaktycznej. Podobnie, jak w przypadku młodych myszy, nie wywoływało to zaburzeń zachowania u zwierząt i nie miało wpływu na decyzje przestrzenne. Zapobiegało jednak wzrostowi aktywności myszy wywołanej treningiem i zmniejszeniu liczby wizyt patrolujących.

W Podsumowaniu pracy Doktorantka konkluduje, iż wybór przestrzenny młodych zwierząt jest regulowany przez procesy zależne od PSD-95 i fosforylację reszty serynowej tego białka. Stwierdza, że PSD-95 znajdujące się w dCA1 nie jest zaangażowane w kodowanie pamięci nagrody. Natomiast stare myszy wykorzystują inną strategię, która jest niezależna od białka PSD-95 w dCA1. Strategia ta polega, zdaniem Autorki, na obserwacji innych zwierząt i zachowaniach perseweracyjnych.

Dyskusja

W Dyskusji Autorka dokonuje analizy uzyskanych wyników, dzieląc ją na kilka części. W pierwszej dyskutuje zagadnienie plastyczności neuronalnej w dCA1 w związku z dokonywaniem wyborów przestrzennych. Na podstawie wyników swojej pracy Autorka dowodzi, iż u młodych myszy plastyczność synaptyczna zależna od białka PSD-95 w dCA1 jest ważna dla procesów dokonywania wyborów przestrzennych, ale nie dla pamięci przestrzennej. Sugeruje, że zmienia się to wraz z wiekiem, ponieważ u starych myszy poziom PSD-95 w dCA1 nie miał wpływu na ich wybory przestrzenne.

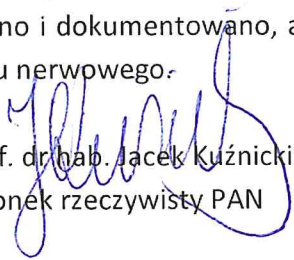
W kolejnej części dyskusji Autorka podejmuje temat wpływu interakcji społecznych na zachowania starych myszy i konkluduje, iż niektóre funkcje dCA1, które wymagają obecności PSD-95 są u nich zachowane. Kolejnym ciekawym elementem dyskusji jest

wskazanie, iż kolce dendrytyczne u starych osobników są mniej stabilne niż u młodych i że brak jest korelacji między ilością PSD-95, a rozmiarami tych kolców u starych myszy. Jak sugeruje Autorka, jest to prawdopodobnie cechą starzejącego się mózgu. Ponieważ poziom PSD-95, może wpływać na sygnalizację wapniową, to powoduje, że wraz z wiekiem zmienia się stabilność synaps, co prowadzi do konieczności zmiany strategii wykorzystywanej podczas treningu. Tę hipotezę potwierdza obserwacją Autorki, iż zaburzona przebudowa rusztowania PSD-95 w synapsach młodych zwierząt powoduje pojawienie się zachowań charakterystycznych dla myszy starych. W podsumowaniu dyskusji Autorka stwierdza, że prawidłowa przebudowa PSD-95 w dCA1 jest kluczowa dla podejmowania prawidłowych decyzji przestrzennych oraz do swobodnej eksploracji przestrzeni.

Podsumowanie

Autorka podjęła ciekawy i trudny temat wymagający wyrafinowanych testów behawioralnych i analiz statystycznych wyników. Ponadto, przeprowadziła genetyczne modyfikacje ekspresji białka w określonej strukturze mózgu *in vivo*, by następnie przy pomocy specyficznych metod obrazowania określić jego poziom i występowanie w utrwalonych preparatach. Pod względem metodycznym oceniam pracę i warsztat Doktorantki bardzo wysoko. Wysoko oceniam uzyskane wyniki, które mają dużą wartość naukową, choć prawdopodobnie w założeniach pracy oczekiwano znacznie większych różnic między młodymi a starszymi zwierzętami. Pod względem graficznym praca jest też godna uznania. Rysunki i schematy są przejrzyste. Jedyną uwagą krytyczną jest opis wyników i dyskusji. Ta ostatnia jest w zbyt dużej części powtarzaniem wyników przemieszanych z wynikami innych autorów na podobny temat. Brak jest jednak szerszego spojrzenia na problem i odniesienia do problemów starzenia się mózgu u ludzi. Być może dobrym pomysłem byłaby zbiorcza tabela wyników z różnych testów, co ułatwiłoby czytanie i dostrzeżenie ogólniejszych prawidłowości. Tym niemniej uważam pracę za bardzo dobrą i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Cały spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. Tym samym składam do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o nadanie Autorce stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie tej pracy, wyniki opublikowano w bardzo dobrych czasopismach, gdyż dotyczy ona ważnego tematu, a doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem różnych, wyrafinowanych technik badawczych wymagających ogromnej dokładności, starannie je opracowano i dokumentowano, a wyniki znacząco poszerzają wiedzę w zakresie funkcjonowania układu nerwowego.


Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Członek rzeczywisty PAN



Kraków, 26.06.2021 roku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Cały

p.t. „Wpływ procesu starzenia na neuronalne mechanizmy decyzji przestrzennych”

wykonanej w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

pod opieką prof. dr hab. Katarzyny Radwańskiej

Rozprawa doktorska Pani Anny Cały opisuje cykl doświadczeń skupionych na komórkowych i molekularnych procesach odpowiadających za plastyczność kolców dendrytycznych w polu CA hipokampa, w tym w szczególności zmiany, jakim ulegają one wraz z wiekiem. Zatem przedmiotem badań jest najbardziej podstawowe zagadnienie z obszaru neuronauk, neuronalne podłoże pamięci, a jednocześnie podjęta jest próba wskazania mechanizmów komórkowych, które będą miały szczególne znaczenie dla rozwoju otępień umysłowych. Tematyka badań opisanych w rozprawie ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia działania mózgu, jednocześnie posiadając ważne implikacje medyczne.

Przedstawiona do oceny praca została przygotowana w języku polskim, liczy 109 stron nie licząc suplementu i ma klasyczny układ z podziałem na Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Bibliografię. Praca zawiera również wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, które zwięźle opisują przeprowadzone badania. Dodatkowo, do pracy dołączony został suplement zawierający skrypty dla programu Fiji zastosowane podczas analizy danych oraz podsumowanie dorobku naukowego doktorantki. Wstęp, po krótkim wprowadzeniu w anatomię hipokampa mózgu, rozpoczyna rozważania o neuroplastyczności wprost od odniesienia się do badań Jerzego Konorskiego i Donalda Hebba, po czym przechodzi do skrótowego, ale kompleksowego opisu mechanizmów plastyczności neuronalnej. Osią dla przedstawianych informacji jest połączenie ze sobą plastyczności strukturalnej, czyli zmian w morfologii neuronów, a w szczególności kolców dendrytycznych, z plastycznością funkcjonalną, czyli zjawiskami długotrwałego wzmocnienia lub osłabienia synaptycznego (LTP i LTD). Doktorantka obszernie opiera wprowadzenie w literaturze i zręcznie próbuje połączyć procesy zachodzące od poziomu receptorów do zmian w aktywności sieci połączeń. Niemniej w moim odczuciu wskazanie na ścisłą zależność między plastycznością kolców a LTP jest arbitralnym uproszczeniem, nawet w przypadku wybranych neuronów w polu CA1 hipokampa. Między jednym a drugim zjawiskiem są dwa rzędy wielkości różnicy w procesach komórkowych. Istnieje szereg opisanych form plastyczności na poziomie pojedynczych neuronów, które nie muszą być zależne od morfologii i liczby kolców dendrytycznych (np. zmiana rodzajów podjednostek receptorów lub skalowanie homeostatyczne). Co więcej, przedstawiony opis skupia się bardzo mocno na roli receptorów NMDAR i AMPAR oraz synapsach pobudzających, co oddaje stopień nacisku, jaki dotychczasowe



badania kładły na ten mechanizm i może być właściwy dla neuronów w CA1, ale niekoniecznie jest główną formą plastyczności dla wszystkich komórek nerwowych. Druga część Wstępu skupia się na białku PSD-95, będącym częścią wewnątrzkomórkowych rusztowań, w których osadzone są receptory NMDA i AMPA. Dokładnie opisana jest rola przypisywana PSD-95 w plastyczności neuronalnej oraz wpływ zaburzeń funkcji PSD-95 u zwierząt doświadczalnych na ich zachowanie, w tym - zdolności poznawcze. Całość ilustrowana jest wysokiej jakości rycinami, które systematyzują obszerną ilość przytaczanych w pracy informacji. Wstęp zamyka wskazanie na potencjalną rolę PSD-95 w zmianach związanych z procesem starzenia i demencją, co jest umiejętnym wprowadzeniem w badania przedstawione w rozprawie.

Jako główny cel pracy postawione zostało określenie wpływu starzenia się na strategie behawioralne i procesy synaptyczne w grzbietowym polu CA1 zaangażowanych w dokonywanie wyborów przestrzennych. Cele zostały postawione przejrzysto i jednoznacznie. Moim jedynym zastrzeżeniem jest opis badanych zachowań jako „wyborów przestrzennych”; można spierać się w jakim stopniu jest to formalnie poprawne określenie dla wyboru między butelkami, dostępnymi w różnych częściach klatki.

Metody są opisane zwięźle, ale zrozumiale i właściwie objaśniają wszystkie procedury badawcze. Wyczerpująco opisane są metody analizy danych, zastosowana analiza statyczna nie budzi zastrzeżeń – z wyjątkiem stosowania *a posteriori* po analizie wariancji w niektórych przypadkach testu LSD Fishera, który nie jest zalecany ze względu na niedokładne szacowanie znamienności. Niemniej, wybór tej metody nie ma znaczenia dla interpretacji przedstawionych danych - w każdym z przypadków, gdzie jest użyta, wynik ANOVA jest wystarczający dla postawionej konkluzji.

Badania przedstawione w Wynikach opierają się na zadaniu behawioralnym, wykonywanym w klatce IntelliCage przez samice myszy w różnym wieku, z zastosowaniem wprowadzonych za pomocą wektorów wirusowych modyfikacjami działania PSD-95 w grzbietowym hipokampie. Doktorantka analizowała zachowanie zwierząt, w szczególności picie z butelek, gdy po okresie adaptacji w jednej z dwóch z butelek wodę zastępowano 5% (w./obj.) roztworem sacharozy. W analizie wyników wyróżniono trzy wzorce zachowania: „pamięć nagrody”, „persewerację” i „podążanie” (zdefiniowane jako wizyty różnych osobników oddzielone od siebie o mniej niż sekundę). Zaprezentowane w pracy metody analizy zachowania oparte są o ponad dekadę doświadczeń w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania i trudno polemizować z szeregiem opublikowanych prac, na których oparto wybór wzorców zachowania, niemniej jednak chciałbym spróbować. Patrząc na rycinę 7 (oraz 8, 13 i 14) odnoszę wrażenie, że pamięć nagrody i perseweracja są sobie równe co mogłoby sugerować, że butelka z sacharozą została umieszczona w preferowanym narożniku. „Pamięć nagrody” jest bardzo zbliżona do preferencji nagrody, a „perseweracja” w tym przypadku może też być interpretowana jako preferencja narożnika klatki. W moim odczuciu zrównywanie tych zachowań z pamięcią przestrzenną i nawykowym powtarzaniem wyborów jest dość daleko idącą interpretacją. Dodatkowo czas analizy zmian preferencji jest dość krótki i przypuszczam, że niektóre punkty czasowe na wykresach pamięci nagrody odpowiadają jedynie kilku wizytom w picim z butelki. Wreszcie zawężenie efektów społecznych na wybór narożnika jedynie do wyborów następujących natychmiast po sobie również może być dyskusyjne. Niemniej zaznaczam, że powyższe zastrzeżenia są dyskusją z interpretacją zachowań. Zdecydowanie uważam, że wskazana różnica w zachowaniu zwierząt młodszych i starszych oraz efekt umieszczenia razem zwierząt w różnym wieku są w pracy przekonywująco wykazane.



Kluczową częścią zaprezentowanych w Wynikach badań są zmiany w liczbie i powierzchni kolców dendrytycznych, związane z udziałem teście behawioralnym, wiekiem oraz upośledzoną/zmienioną funkcją PSD95. Doktorantka wykazała, że wiek zwierząt był powiązany ze znamienne mniejszą powierzchnią kolców dendrytycznych na neuronach w CA1 oraz że efekt przeprowadzenia badania behawioralnego miał różnicowane konsekwencje u zwierząt młodych i starych. Doktorantka przeanalizowała również, jak na liczbę i powierzchnię kolców wpływało zastąpienie w teście butelki z wodą roztworem sacharozy i zaobserwowała potencjalnie przeciwstawne efekty na zmiany w powierzchni kolców u zwierząt. Wywołane za pomocą interferencji RNA obniżenie ilości białka PSD 95 wywołało spodziewaną redukcję w ilości kolców, niemniej efekty na zachowanie młodych samic w IntelliCage były (w mojej subiektywnej ocenie) dość wybiórcze i znamienne przede wszystkim w zachowaniu, określonym jako wybór przestrzenny, przy czym nie zaobserwowano równoważnych zmian u zwierząt starych. Ekspresja wariantu PSD95 z mutacją S73A wpłynęła z kolei na aktywność (patrowanie) oraz pamięć nagrody. W mojej ocenie zaprezentowane w rozprawie analizy liczności i powierzchni kolców dendrytycznych oraz ich zależności z obserwowanym zachowaniem wnoszą szereg nowych informacji do stanu wiedzy względem zmian w neurplastyczności zachodzących z wiekiem i znaczenia tych zmian w procesach pamięci.

Dyskusja rozpoczyna się od nawiązania do Wstępu i roli receptorów NMDA w CA1 w tworzeniu pamięci przestrzennej, jednak w tym przypadku w moim odczuciu zachowana jest większa ostrożność i wskazywane są utrzymujące się wciąż kontrowersje. Następnie doktorantka omawia główne uzyskane wyniki, przytaczając obszerny kontekst literaturowy. Podsumowanie kończące dyskusję jest ostrożne i skupia się na postawieniu tezy, że u młodych zwierząt zachowanie jest zależne od funkcji PSD-95, ale nie jest ona wymagana do zakodowania pamięci nagrody. Z drugiej strony u zwierząt starych wykształcają się mechanizmy kompensujące rolę PSD95 w uczeniu się. W mojej ocenie doktorantka z powodzeniem zrealizowała postawiony cel i oznaczyła wpływ starzenia się na strategie behawioralne i procesy synaptyczne w grzbietowym polu CA1.

W odpowiedzi na niniejszą recenzję prosiłbym o odniesienie się do następujących kwestii:

1. Ile wizyt na przedział czasowy analizowanych jest jako pamięć przestrzenna?
2. Czy zgodnie z uzyskanymi danymi u samic w wieku 18 miesięcy można wskazać na jakiegokolwiek upośledzenia procesów poznawczych?
3. Czy wyniki świadczą o roli w analizowanych zachowaniach PSD95, plastyczności kolców dendrytycznych, czy też raczej grzbietowego CA1?
4. Jakie inne struktury przodomózgowia powinny zostać przeanalizowane przy zastosowaniu podobnego podejścia jak na rycinie 9 lub 10?
5. Czy płeć zwierząt może mieć wpływ na obserwowane fenotypy?



Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. Wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr Anny Cały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W recenzji przedstawiłem cały szereg uwag krytycznych, poddawałem w wątpliwość interpretację wybranych wyników i polemizowałem z częścią konkluzji. Niemniej nie mam wątpliwości, że przedstawione w rozprawie przez Panią Annę Cały wyniki są znaczącym wkładem w zrozumienie mechanizmów neuroplastyczności, czego dobitnym dowodem jest opublikowanie istotnej części z nich z pierwszym autorstwem doktorantki w najbardziej poważanym czasopiśmie w obszarze neuronauk. Dlatego też zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

Dr hab. Jan Rodriguez Parkitna

Zastępca Dyrektora ds. Naukowych

Kierownik Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Smętna 12, 31-343 Kraków, tel.: +48 12 6623328, e-mail: janrod@if-pan.krakow.pl

Warszawa, 15/08/2021

Dr hab. Marta B. Wiśniewska, profesor uczelni
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej
e.mail: m.wisniewska@cent.uw.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Cały

p.t. „Wpływ procesu starzenia na neuronalne mechanizmy decyzji przestrzennych”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania przeprowadzone przez mgr Annę Cały w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego. Celem pracy było zrozumienie, jak starzenie wpływa na strategie behawioralne przy wyborach przestrzennych i jak strategie te różnią się na poziomie mechanizmów plastyczności. Publikacja oparta na pracy doktorskiej mgr Anny Cały ukazała się w tym roku w czasopiśmie Journal of Neuroscience, którego wysoka ranga jest dobrze znana. Badania zawarte w rozprawie przeszły więc przez wymagający proces recenzyjny, a mi pozostaje zgodzić się, że wnoszą oryginalny i ważny wkład w dziedzinę.

W skrócie, doktorantka pokazała, że zarówno młode, jak i stare myszy dokonują skutecznie decyzji przestrzennych, stosując jednak inne taktyki, różniące się na poziomie komórkowym zależnością od plastyczności w polu CA1 hipokampa. Starsze myszy w porównaniu z młodymi w większej mierze opierają wybory przestrzenne na obserwacji innych osobników (informacja społeczna) oraz trzymaniu się wybranej lokalizacji (perseweracja). Strategie te nie wymagają plastyczności synaptycznej w polu CA1. W dobie starzenia się społeczeństwa są to badania szalenie ciekawe i bez wątpienia potrzebne.

Jeżeli chodzi o stronę formalną, rozprawa ma klasyczny układ. Wstęp wraz z czterema figurami zajmuje 26 stron, cele pracy – jedną stronę, materiały i metody - 10 stron, wyniki zawierające 8 złożonych figur – 32 strony, i w końcu dyskusja liczy 8 stron. Rozprawa napisana jest ładnym językiem, a edycja jest bardzo staranna. Zacytowano 285 prac, z których jednak tylko niecałe 20% stanowią prace z ostatnich 10 lat, a prac z ostatnich 5 lat jest zaledwie 17. Mało aktualna bibliografia jest najpoważniejszym zarzutem, jaki mam do rozprawy. Brakowało mi także końcowego rozdziału, który podsumowałby najważniejsze wnioski, ale ponieważ rozprawa napisana jest jasno i konkretnie, rozdział taki, choć przydatny, nie był niezbędny. Rozprawa zawiera wszystkie potrzebne treści i jest stosunkowo krótka, co uważam za dużą zaletę.

Wstęp nie jest przeładowany informacjami i naturalnie prowadzi do postawienia problemu badawczego. Został skonstruowany tak, żeby z jednej strony nakreślić szerszy kontekst, a z drugiej podać niezbędne szczegóły. W zrozumieniu zagadnień bardziej szczegółowych pomagają ryciny. Pewien chaos wkradł się tylko w opis wpływu starzenia na strukturę i funkcję receptorów NMDA oraz poziom PSD-95. Trudność polegała na tym, że doniesienia literaturowe na ten temat są sprzeczne. Myślę, że możliwe było lepsze usystematyzowanie wiedzy i ustrukturyzowanie tej części wstępu.

Do części metodycznej nie mam zastrzeżeń, wręcz chcę podkreślić, że projekt eksperymentów i warsztat badawczy są modelowe. Doktoranta przeprowadziła analizy behawioralne oraz analizy mikroskopowe. Zaobserwowane zależności pomiędzy zmianami w zachowaniu i zmianami komórkowymi badała stosując wyciszenie ekspresji genów specyficznie w polu CA1 hipokampa z zastosowaniem shRNA, wektorów wirusowych i iniekcji stereotaktycznych. W ten sposób wyszła z poziomu badań korelacyjnych. Doświadczenia zostały bardzo dobrze zaprojektowane. Na przykład, w celu rozróżnienia efektów wyborów przestrzennych i pamięci nagrody współwystępujących w podstawowym eksperymencie, gdzie stosowany był bodziec apetytywny (nagroda) w kontekście przestrzennym, Doktorantka przeprowadziła dodatkowe eksperymenty z bodźcem apetytywnym bez kontekstu przestrzennego oraz z bodźcem awersyjnym z kontekstem przestrzennym. To pozwoliło na wyciągnięcie mocnych wniosków w logicznym toku myślenia.

Wyniki zostały opisane bardzo przejrzyście, co było sztuką przy tak złożonym projekcie. Jak wspominałam, zostały one zaaprobowane przez recenzentów, którzy z

pewnością znają się na tematyce badań lepiej niż ja, trudno więc doszukiwać się w nich błędów.

Częścią pracy, która podobała mi się najbardziej jest porównanie zachowania zwierząt utrzymywanych w grupie równowiekowej i różnowiekowej. W pewnej mierze strategie stosowane przez myszy stare, wyraźnie inne od strategii myszy młodych, stają się podobne, kiedy myszy stare i młode żyją razem w jednej klatce. W czasie lektury pojawia się jednak wątpliwość dotycząca liczby powtórzeń w doświadczeniu behawioralnym pokazanym na rycinie 7. Z opisu odniosłam wrażenie, że seria doświadczeń na osobno testowanych grupach myszy młodych i starych została wykonana tylko raz, co nie jest wystarczające, ponieważ na zachowanie zwierząt mogły wpłynąć niekontrolowane czynniki. Ponadto $n=6$ jest dosyć niskie jak na badania behawioralne. Kwestia liczby powtórzeń i liczebności grup powinna zostać jasno opisana, a takiego opisu brakuje.

W części komórkowo-molekularnej zachwyciły mnie analizy statystyczne obrazów mikroskopowych, zwłaszcza analiza korelacji powierzchni punktów PSD-95-pozytywnych z wielkością kolca dendrytycznego, która elegancko pokazała, że taka korelacja nie zawsze występuje. Autorka zastosowała różne techniki automatycznych pomiarów i metody statystyczne. Zwracam na to uwagę, ponieważ przeprowadzanie tak solidnych analiz nie jest wcale w biologii standardem, chociaż bez nich trudno o obiektywizację i wyciąganie przekonujących wniosków. Do tej części mam dwa małe zastrzeżenia. Po pierwsze, nie jest dla mnie jasne, co znaczy określenie „średnia wartość w skali szarości” w odniesieniu do poziomu białka PSD-95. Domyślam się, że chodzi o gęstość optyczną, ale nie wiem, czy chodzi o średnią wartość dla pola powierzchni, czy średnią wartość na punkt PSD-95-pozytywny. Druga kwestia dotyczy sposobu przedstawienia wyników. Ten sam parametr (gęstość kolców dendrytycznych z PSD-95 i bez PSD-95 na jednostkę długości dendrytu) został pokazany na wykresie innego rodzaju na rycinie 10 i 11. Utrudnia to porównywanie wyników z eksperymentów przedstawionych na tych rycinach.

W krótkiej ale treściwej dyskusji Autorka przedstawiła interpretację wyników i jasno wyjaśniła wkład swoich badań w rozwój wiedzy. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły m.in., że przy treningu wyborów przestrzennych myszy korzystają także z informacji społecznych, że plastyczność synaptyczna w polu CA1 hipokampa jest ważna dla dokonywania wyborów przestrzennych oraz że u starych zwierząt korelacja wielkości synaps i ilości PSD-95 jest zaburzona. Autorka postawiła również nowe pytania wynikające z jej

badan, na przyklad jak wytumaczyc, ze nabywanie nowej pamieci moze sie wiazac z eliminacja synaps (a nie ich wzrostem i stabilizacja) oraz jakie znaczenie ma korelacja wielkosci snapsy i ilosci PSD-95. Postarala sie na te pytania odpowiedziec, stawiajac hipotezy. Tych pytan nasuwa sie zreszta wiecej. Czy zmienione strategie behawioralne sa mechanizmem kompensujacym mniejsza plastycznosc synaptyczna? Jakie zjawiska komorkowe i molekularne stoja za zmiana strategii wyborow przestrzennych starych myszy przebywajacych z mlodymi? Ciekawa jestem, czy w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania beda prowadzone badania na ten temat.

Podsumowujac, prace mgr Anny Caly oceniam bardzo wysoko. Czytanie tej klarownej, logicznej i spornej rozprawy bylo przyjemnoscia i rozbudziło moje zainteresowanie tematyka. Szczegolna wartoscia przeprowadzonej pracy badawczej jest powiazanie bardzo konkretnych zjawisk behawioralnych i zjawisk molekularno-komorkowych w mozgu. Bardzo ciekawy i spolecznie aktualny jest kontekst porownania strategii zachowania zwierzat starych i mlodych.

Stwierdzam, ze przedstawiona do recenzji rozprawa speinia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim, stawiam wniosek do Rady Instytutu Biologii Doswiadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie o dopuszczenie pani mgr Anny Caly do dalszych etapow przewodu doktorskiego i zgłaszam wniosek o wyroznienie.