

dr hab. Danuta Lewandowska Prof. UG,
Kierownik Pracowni Neurobiologii
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej p. mgr inż. Kamila Tomaszewskiego
pt. "Podłoże neuronalne wygaszania pamięci strachu"
przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Katarzyny Radwańskiej
w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN**

Strach stanowi jedną z pierwotnych emocji, decydującą o naszym nastawieniu do sytuacji życiowych. Z jednej strony umożliwia przetrwanie zagrożenia środowiskowego, z drugiej strony nadmierna reakcja stresowa prowadzi do zaburzeń behawioru, występujących m.in. w zespole stresu pourazowego, u którego podstaw najprawdopodobniej leży upośledzenie wygaszania pamięci strachu. Tematyka pracy mieści się w nurcie badań dotyczących mechanizmów związanych z konsolidacją, wygaszaniem i upośledzeniem pamięci, a w szczególności z mechanizmami wygaszania późnej pamięci strachu, w tym uwarunkowanej reakcji strachu zależnej od bodźców ogólnych. Nie w pełni poznane są mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za procesy związane z powstawaniem i przebudową śladu pamięciowego. Dlatego też praca p. mgr Kamila Tomaszewskiego dobrze wpisuje się w nurt tych badań i jest próbą wyjaśnienia jak zaburzona autofosforylacja izoformy alfa kinazy kalmodulinowej zależnej od wapnia typu drugiego (aCaMKII) wpływa na upośledzenie wygaszania późnej pamięci strachu zależnej od kontekstu u myszy, ze szczególnym uwzględnieniem roli struktur mózgowych zaangażowanych w ten proces. Wybór tematu uważam za właściwy, nie tylko z tego względu, że mechanizmy zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu są stosunkowo słabo poznane, ale również z uwagi na szersze implikacje, zwłaszcza w zakresie opracowania skutecznych terapii zaburzeń poznawczych, w tym lękowych. Badania podjęte przez p. mgr Tomaszewskiego uważam więc za niezwykle istotne.

Oceniana przeze mnie praca wykonana przez p. mgr Kamila Tomaszewskiego, ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, obejmuje 117 stron a zasadnicze jej części zostały zawarte w streszczeniu w języku polskim i angielskim, wstępie, metodyce (materiały i metody), wynikach i dyskusji. Treść pracy uzupełniono rozdziałem „Podsumowanie i wnioski” (nienumerowane) i spisem piśmiennictwa (277 pozycji), suplementem oraz spisem

3 publikacji własnych Autora. Praca została przygotowana starannie. Znalazłam jednak w kilku miejscach potknięcia edytorskie (na przykład strona 11. wykaz skrótów: MS jądro łączące przyśrodkowe zamiast jądro przyśrodkowe przegrody, strona 31, 34, 54: sól fizjologiczna zamiast fizjologiczny roztwór soli, strona 32: tkanka mózgowa zamiast tkanka nerwowa lub strona 45 ilość zwierząt zamiast liczba zwierząt) jednakże nie miało to wpływu na zrozumiałość tekstu czy też poprawność opisywanych wyników.

W stosunkowo krótkim jak na pracę doktorską wstępie (13 stron) Autor w sposób jasny i interesujący przedstawił teorie konsolidacji pamięci: klasyczną i teorię mnogich śladów pamięciowych, wygaszanie pamięci strachu i modele zwierzęce służące do badań tego zjawiska oraz dotychczasowe dane dotyczące obwodów neuronalnych zaangażowanych w wygaszanie wczesnej i późnej pamięci strachu. Cele pracy zostały wyodrębnione w oddzielny rozdział, w którym Autor sformułował 5 zadań badawczych, celem których było poznanie obwodów neuronalnych zaangażowanych w wygaszanie późnej pamięci strachu, zależnej od bodźców ogólnych. Sporym niedociągnięciem tego rozdziału jest brak sformułowanych hipotez badawczych.

Zadania badawcze zostały zrealizowane w dobrze zaplanowanych i adekwatnie opisanych doświadczeniach przy zastosowaniu zróżnicowanego warsztatu badawczego, obejmującego zarówno transdukcję z zastosowaniem wektorów wirusowych, metody behawioralne z użyciem warunkowania instrumentalnego, metody neurofizjologiczne, w tym operacje stereotaktyczne, perfuzję przezsercową, jak również immunocytochemiczne z wykorzystaniem barwień immunofluorescencyjnych i mikroskopów konfokalnych. W odniesieniu do podrozdziału „Analiza statystyczna” mam drobną uwagę, że przy analizie rozkładu danych stosuję test na znamienne odstępstwo od normalności a nie „test na rozkład normalny danych” (str. 37). Rozumiem, że przy tak dużej liczbie przeprowadzonych doświadczeń uwzględnienie obu płci badanych zwierząt mogłoby przekroczyć ramy czasowe doktoratu ale pozostaje niepewność czy istnieją międzypłciowe różnice w obszarach mózgu zaangażowanych w proces wygaszania późnej pamięci strachu, co Autor słusznie podkreśla w podrozdziale „Ograniczenia”. Chciałabym jednak zaznaczyć, że bez względu na drobne uwagi krytyczne, zastosowana w pracy metodyka badań jest imponująca.

Wyniki zostały przedstawione na 37 stronach w sposób zwięzły i szczegółowy. W pierwszej kolejności Autor przeanalizował wpływ autofosforylacji reszty treoninowej w pozycji 286 łańcucha aminokwasowego α CaMKII na wygaszanie pamięci strachu. Doktorant

stwierdził, że konsolidacja późnej pamięci wygaszania strachu, zależnego od bodźców ogólnych jest upośledzona u myszy z linii transgenicznych z tą mutacją (T286A^{+/-}) co zdaniem Autora, dowodzi zaangażowania autofosforylacji reszty treoninowej w pozycji 286 łańcucha aminokwasowego α CaMKII w wygaszaniu późnej pamięci strachu. Następnie Doktorant porównał aktywność obszarów mózgowych podczas wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu i stwierdził, że wygaszanie wczesnej pamięci strachu wiąże się ze wzrostem aktywności w korze mózgowej, wzgórzu i ciele migdałowatym, przy czym aktywność pierwszorzędowej kory wzrokowej oraz części przyśrodkowej jądra środkowego ciała migdałowatego jest regulowana przez α CaMKII. Natomiast u myszy z upośledzeniem wygaszania późnej pamięci strachu (T286A^{+/-}) zaangażowana jest pierwszorzędowa kora wzrokowa oraz wzgórze. Posługując się metodą chemogenetycznego hamowania aktywności komórek nerwowych, Doktorant poddał wnikliwej analizie rolę obszarów mózgu o podwyższonej aktywności w procesie wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu dowodząc silniejszej aktywacji wzgórza, a w szczególności jądra łączącego i przegrody w wygaszaniu późnej pamięci strachu, w porównaniu z procesem wygaszania wczesnej pamięci strachu.

Wyniki to zdecydowanie robiąca największe wrażenie część pracy z uwagi na złożoność przeprowadzonych badań, jak również na szczegółową i ostrożną analizę. Na podkreślenie zasługuje złożoność uzyskanych wyników, którą obrazuje 13 rycin, z których każda ma po kilka paneli, ze schematem eksperymentu, z mikrofotografiami, wykresami słupkowymi lub liniowymi. Ogromnie pomocne dla mnie były schematy doświadczeń i szczegółowe legendy na wszystkich rycinach oraz klarowna metodyka analizy wyników. Zdarzają się też drobne pomyłki w opisie legend na przykład do Ryc. 8E na str.47: „Wygaszanie pamięci wczesnej strachu indukuje wyższy poziom ekspresji c-Fos w PV niż wygaszanie pamięci wczesnej strachu” - powinno być: Wygaszanie pamięci późnej strachu indukuje wyższy poziom ekspresji c-Fos w PV niż wygaszanie pamięci wczesnej strachu”. Ogólna interpretacja wyników nie budzi wątpliwości.

Rozdział „Dyskusja”, który liczy 16 stron, Autor przeprowadził w sposób interesujący, ostrożnie interpretując uzyskane wyniki, co świadczy o bardzo dobrym zorientowaniu w literaturze i dojrzałości naukowej. Cennym uzupełnieniem dyskusji jest przejrzyste skonstruowana rycina, schematycznie obrazująca rolę jaką pełni jądro łączące wzgórza w obwodach neuronalnych wygaszania pamięci strachu.

Zakres podjętych badań i przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki uważam za istotne i wartościowe. Przedstawienie po raz pierwszy roli autofosforylacji α CaMKII w wygaszaniu późnej pamięci strachu oraz zbadanie aktywności mózgu u zwierząt z deficytami wygaszania późnej pamięci strachu stanowi nowość naukową i może mieć istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia podłoża neuronalnego wygaszania pamięci strachu. Praca p. mgr inż. Tomaszewskiego stanowi również dobrą podstawę do dalszych badań tego zagadnienia, m.in. w zakresie wyjaśnienia roli wzgórza w regulacji odnowienia reakcji strachu czy też wpływu różnic płciowych w zakresie neuronalnego podłoża wygaszania lub upośledzenia wygaszania reakcji strachu.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że przedstawione w rozprawie wyniki stanowią znaczny wkład w badania nad przebudową śladu pamięciowego i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorant jest bardzo dobrze przygotowany pod względem teoretycznym, jak również znajomości wielu trudnych technik metodycznych, do pracy naukowej. Autor wykazał się umiejętnością rozwiązywania złożonego i ciekawego problemu badawczego, precyzyjnego przeprowadzenia badań oraz dojrzałością do odpowiedniego opracowania uzyskanych oryginalnych wyników.

W odpowiedzi na recenzję proszę o przedyskutowanie następujących kwestii:

1. Co wiadomo o różnicach płciowych ludzi i zwierząt w reakcji na zagrożenie i czego należałoby się spodziewać odnośnie wpływu tych różnic płciowych na neuronalne podłoże wygaszania reakcji strachu?
2. Jaki może być potencjalny mechanizm silniejszej aktywacji wzgórza a w szczególności projekcji z jądra łączącego wzgórza do jądra przyśrodkowego przegrody w procesie wygaszania późnej, w porównaniu z wygaszaniem wczesnej, pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych?
3. Jak Doktorant ocenia ewentualne aplikacyjne wykorzystanie uzyskanych wyników?

Uważam, że recenzowana praca w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Na tej podstawie przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN wniosek o dopuszczenie pana mgr inż. Kamila Tomaszewskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Gdańsk, 19.08.2023 r.



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr. inż. Kamila Filipa Tomaszewskiego "Podłoże neuronalne wygaszania strachu"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Kamila Filipa Tomaszewskiego została wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem Prof. dr hab. Katarzyny Radwańskiej.

W pracy tej podjęta została próba wyjaśnienia mechanizmów wygaszania pamięci strachu, szczególnie jej późnej fazy. Jest to niezwykle ważny temat, głównie ze względu na obserwowany u ludzi zespół stresu pourazowego (ang. Post Traumatic Stress Disorder). Myszy natomiast ciągle stanowią dobry model chorób ludzkich, ze względu na podobieństwo genetyczne, anatomiczne oraz fizjologiczne. Odkrycie potencjalnych celów terapeutycznych, zarówno na poziomie molekuł jak i zaangażowanych struktur mózgu, może w przyszłości zaoowocować skutecznymi terapiami, wspomagającymi psychoterapię.

Celem przedstawionej dysertacji była identyfikacja obszarów mózgu zaangażowanych w wygaszanie fazy późnej pamięci strachu, ich weryfikacja z wykorzystaniem chemogenetycznego hamowania aktywności tych struktur i ich projekcji oraz określenie roli autofosforylacji CaMKII w neuronach położonych w tych rejonach. W szczególności wykazano rolę jąder wzgórza, w tym jądra łączącego wzgórza (RE), podczas procesu wygaszania. Wykazano, że zaburzona autofosforylacja kinazy CaMKII ma istotne znaczenie przy wygaszaniu fazy późnej a nie wczesnej pamięci strachu.

Praca liczy 117 stron i posiada klasyczny układ, podzielony na (1) Wstęp, (2) Cele pracy, (3) Materiały i Metody, (4) Wyniki, (5) Dyskusję, (6) Podsumowanie i wnioski, (7) Bibliografię, (8) Suplement oraz (9) Spis publikacji własnych oraz streszczenia w j.



polskim i angielskim. Praca jest napisana językiem zrozumiałym, aczkolwiek doktorant nie ustrzegł się pewnych błędów edytorskich, opisanych poniżej.

Rozprawę rozpoczyna 26 stronicowy wstęp. Na uwagę zasługuje dość szeroki wachlarz literaturowy (bibliografia obejmuje 277 pozycji literaturowych), który we wstępie pomaga czytelnikowi wejść w tematykę badawczą podejmowaną przez doktoranta. Momentami jednak autor stosuje niezbyt precyzyjny język, zawierający skroty myślowe, które mogą wprowadzić w błąd. Dla ilustracji przykład z pierwszego paragrafu wstępu, gdzie autor rozgranicza pamięć krótkotrwałą od długotrwałej poprzez ulokowanie zmian powstałych w jej wyniku na synapsach (pamięć krótkotrwała) oraz w obwodach neuronalnych (pamięć długotrwała). Jako, że synapsy są integralną częścią neuronów, które wchodzą w skład obwodów neuronalnych, siłą rzeczy zmiana w synapsach czyli miejscach połączeń neuronów, będących składową obwodów musi mieć wpływ na funkcjonowanie całego obwodu neuronalnego. Ten skrót myślowy dotyczył zapewne rozmiaru obserwowanych zmian w neuronach w obu typach pamięci lub zmiany lokalizacji komórkowej, niemniej jednak utrudnia to płynne czytanie tekstu. Warto natomiast podkreślić, że powyższa uwaga nie odnosi się do braku wiedzy doktoranta, tylko dotyczy uważności przy formułowaniu myśli podczas opisu tak skomplikowanych zagadnień. Podobnych przykładów można odnaleźć we wstępie więcej.

Szczególnie istotne z pkt widzenia wyników pracy wydaje się szczegółowe wyjaśnienie we wstępie wpływu autofosforylacji podjednostki α CaMKII na działanie tej kinazy, którego brak. Nie znalazłem w całej pracy podstawowej informacji, że substytucja aminokwasu T na A w pozycji 286 tej kinazy uniemożliwia autofosforylację w tej pozycji, jedynie wyrażenia 'zaburzona autofosforylacja', które dla osoby nie pracującej bezpośrednio z tym mutantem mogą być niewystarczające.

W rozprawie doktorskiej na uwagę zasługuje zastosowanie nowoczesnych metod manipulacji genetycznej aktywnością neuronów np. chemogenetyki. Z tego względu wydaje się zasadne, aby część wstępu wprowadzająca w te metody była bardziej rozbudowana. Ponadto warto było zamieścić rycinę struktur mózgu zaangażowanych w procesy omawiane w rozprawie. Taki zabieg znacząco ułatwiłby śledzenie zmian i zależności między strukturami podczas tworzenia i przebudowy engramu pamięci strachu przedstawione we wstępie.

Cele pracy doktorskiej zdefiniowane są w sposób prawidłowy. Sekcja Materiały i Metody zawiera szczegółowy opis zastosowanych procedur z kilkoma uwagami opisanymi poniżej. Stosowane w rozprawie materiały i metody badawcze są opisane zwięźle, ale wystarczająco do tego aby zrozumieć istotę doświadczeń. Brak jest natomiast jasnego



opisu czy utrzymywanie badanych zwierząt było prowadzone w tzw. "odwróconej dobie". Jest tylko informacja, że doświadczenia behawioralne wykonywano w fazie jasnej czyli fazie odpoczynku zwierząt, co sugeruje, że myszy przetrzymywano w fazach zgodnych z naszymi/ludzkimi fazami. Jako, że myszy są zwierzętami nocnymi jest to szczególnie istotna informacja, w kontekście badań zachowania zwierząt. Z moich własnych doświadczeń wynika, że w przypadku gryzoni, przy zastosowaniu "normalnego/ludzkiego" reżimu dzień/noc, bardzo trudno jest utrzymać następujące po sobie fazy cyklu odpoczynku i aktywności. Spowodowane jest to tym, że w fazie jasnej/odpoczynku dla gryzoni, prowadzimy normalną aktywność laboratoryjną, która zakłóca tę fazę i może mieć znaczący wpływ na metabolizm i zachowanie, szczególnie na funkcje kognitywne.

W opisie dotyczącym wektorów wirusowych AAV znalazłem informację, że posiadają one mały współczynnik dyspersji. Biorąc pod uwagę ich mały rozmiar (około 20 nm średnicy) jest to informacja dość zaskakująca, gdyż powszechnie wiadomo, że cząsteczki AAV rozchodzą się w sposób w zasadzie nieograniczony w macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki mózgu np. w porównaniu z wektorami lentiwirusowymi. Moją uwagę zwrócił również fakt, że miano wektora wirusowego kontrolnego pAAV1/2- α CaMKII-mCherry było o około 2 rzędy wielkości mniejsze niż pozostałych wektorów. Bardzo proszę o wyjaśnienie jak poradzono sobie z tym problemem.

Ponadto z drobnych uwag co do tej sekcji zauważyłem, że na stronie 31 znajduje się informacja, że do obszaru kory V1 wstrzykiwano 200 μ l wektora wirusowego. Czy to pomyłka, czy miało to jakieś uzasadnienie. Często używane jest również wyrażenie 'sperfundowano' które wydaje się kolokwializmem, jak również w tym rozdziale znajduje się szereg literówek.

Opis sekcji wyników w znacznej części jest logiczny, aczkolwiek wyrażony w zwięzłej formie. Poniżej przedstawiam kilka uwag dotyczących tej części. Podczas doświadczenia wstępnego mającego określić pamięć wczesną i późną strachu określono parametry wykorzystywane również w późniejszych doświadczeniach. Pamięć strachu w dniu testu w obu przypadkach kształtowała się na poziomie obserwowanym w ostatnich minutach warunkowania. Czy doktorant nie rozważał wydłużenia czasu wygaszania lub zwielokrotnienia sesji wygaszania tak aby osiągnąć poziomy pierwotne. Ponadto w niektórych przypadkach sesja wygaszania prowadzona jest przez 20, a w niektórych przez 30 minut. Powstaje ogólne pytanie czy heterozygoty T286A nie są w stanie w ogóle wygasić późnej pamięci strachu czy proces ten jest wydłużony w czasie. Powyższe może



zmieniać zarówno wartość translacyjną otrzymanych wyników jak i odpowiedni dobór punktów czasowych do analizy np. białka c-Fos.

Przechodząc do wyników mapowania białka c-Fos w mózgu zwierząt, traktowanego tutaj jako marker zmian plastycznych w neuronach, bezpośrednio zaangażowanych w badane zjawiska, wybrano 5 grup doświadczalnych: 3 grupy kontrolne oraz 2 grupy doświadczalne: 1. po wygaszaniu warunkowanej pamięci strachu wczesnej oraz 2. po wygaszaniu warunkowanej pamięci późnej. Ogólną uwagę zwraca niewielka liczba zwierząt wykorzystanych w tych doświadczeniach, co przy dość dużych rozrzutach utrudnia prawidłową interpretację. Jeśli chodzi o grupy kontrolne to pierwszą z nich była grupa zwierząt z klatki domowej 'naïve'. Ponieważ wszystkie wyniki z mapowania białka c-Fos prezentowane są w odniesieniu do tej grupy, w mojej opinii jest to bardziej grupa standaryzująca/referencyjna. Co do pozostałych dwóch grup brak jest jasnego uzasadnienia wyboru tych właśnie grup. Ponadto prezentowane wyniki liczby komórek c-Fos dodatnich w poszczególnych grupach wyrażane są $\log_{10}[\text{c-Fos/mm}^2 \text{ vs. naïve}]$, a oś rzędnych zawiera wartości od 0,01 do 100. Gdyby przyjąć, że te wartości oznaczają rzeczywiście wartość logarytmiczną to już przy 10 mielibyśmy doczynienia z liczbą komórek mózgu (10^{10}) znacznie przekraczającą liczbę neuronów mózgu myszy. Z matematycznego punktu widzenia taki zapis jest nieprawidłowy i w przypadku logarytmu powinien zawierać wartości -2, -1, 0, 1, 2. W moim rozumieniu mamy raczej do czynienia ze zwykłym ilorazem liczby komórek c-Fos pozytywnych do liczby komórek w grupie referencyjnej i w takim przypadku powinna zostać użyta odpowiednia podziałka. Przy okazji chciałbym zapytać jak rozwiązano sytuację (pewnie niezwykle rzadką) gdy liczba komórek c-Fos w danej strukturze mózgu w grupie naïve wynosiła 0?

Na rycinie 7 zmiany c-Fos wykazano dla CA1, DG, CeM, IL, V1, CM oraz PV. Czy na histogramach pokazano wszystkie istotnie statystycznie zmiany? Jest to ważne, gdyż w niektórych przypadkach widać zmiany również w grupie KONTEKST, co może sugerować zaangażowanie danych struktur w rozpoznanie kontekstu, niezależnie od procesu wygaszania pamięci. Natomiast w przypadku CeM w grupie 5US wszystkie osobniki (poza jednym) nie zawierają c-Fos pozytywnych komórek, czym to jest spowodowane?

W kolejnych rycinach pokazujących zróżnicowaną ekspresję c-Fos w różnych reżimach doświadczalnych oraz u mutantów T286A, porównywano tylko grupy doświadczalne po wygaszaniu. Dlaczego dla grupy po wygaszaniu pamięci późnej nie



zastosowano grup kontrolnych 5US – 30 dni oraz KONTEKST – 30 dni – KONTEKST. Wyniki takich porównań mogłyby ujawnić inne zaangażowane struktury.

Ze względu na wątpliwości niektórych badaczy dotyczące wpływu CNO wstecznie przekształcanego w organizmie do klozapiny (Manvich et al., 2018), należy szczególnie docenić, że doktorant przeprowadził doświadczenia kontrolne, wykazujące brak wpływu różnych stężeń CNO na warunkowanie strachu u myszy WT.

Sekcja Dyskusja zawiera dogłębną analizę otrzymanych danych i umieszczenie otrzymanych wyników w kontekście literatury światowej. Chciałbym również podkreślić, że część otrzymanych wyników jest oryginalnym wkładem autora w badania dotyczące tematyki pamięci strachu. Mgr inż. Kamil Filip Tomaszewski jest współautorem 3 prac badawczych opublikowanych w indeksowanych czasopismach. Przynajmniej jedna z tych prac jest bezpośrednio metodycznie związana z prezentowaną rozprawą, brak jednak publikacji z wyników badań opisanych w rozprawie.

Uwagi i wątpliwości zawarte powyżej nie mają na celu podważenia wysokiej jakości recenzowanej pracy doktorskiej, a są wynikiem wnikliwego zapoznania się z dysertacją. Dlatego też uważam, że praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie naukowej oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr. inż. Kamila Filipa Tomaszewskiego spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017. Poz. 1789). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Kamila Filipa Tomaszewskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto ze względu na zastosowanie szerokiego wachlarza nowoczesnych technik do badania obwodów neuronalnych oraz całościową i wnikliwą analizę otrzymanych wyników zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej dysertacji.

Dr hab. Witold Konopka



Łukasiewicz PORT

Polski Ośrodek Rozwoju Technologii



Warszawa, 04.09.2023

Marta B Wiśniewska
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej
Centrum Nowych Technologii UW
ul. Banacha 2C
02-097 Warsaw, Poland
E.mail: m.wisniewska@cent.uw.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ KAMILA TOMASZEWSKIEGO

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana Kamila Tomaszewskiego została wykonana w Instytucie im. Marcelego Nenckiego pod kierunkiem prof. Katarzyny Radwańskiej. Założeniem pracy było znalezienie neuronalnych korelatów wygaszania uwarunkowanego strachu oraz zbadanie zaangażowania izoformy α kinazy CaMKII w ten proces. Wygaszanie strachu jest kluczowe w terapii zespołu stresu pourazowego oraz samo w sobie jest niezwykle intrygującym zjawiskiem.

Rozprawa jest jasno ustrukturyzowana. Całość, nie licząc Spisu treści, Streszczenia, Wykazu skrótów i Bibliografii, zmieściła się na 80 stronach. Po kilkanaście stron zajęły Wstęp z Celami pracy i Dyskusja z Podsumowaniem i wnioskami. Wyniki wraz z kilkunastoma figurami zajęły około 40 stron a Materiały i Metody 10 stron. Taka długość rozprawy wydaje mi się optymalna. Rozprawę czytało się lekko także dzięki temu, że została napisana dobrym stylem. Bardzo pomocny był Wykaz skrótów. W pewną konfuzję wprowadziło mnie Streszczenie, z którego odniosłam wrażenie, że badania dotyczyły głównie „upośledzenia wygaszania pamięci (...) u myszy, które wykazywały obniżony poziom fosforylacji (...) α CaMKII”, podczas gdy w rozprawie był to raczej wątek dodatkowy, zgodnie z założonymi Celami. W rozprawie zacytowano 277 publikacji. Bodajże najstarsze były publikacje sprzed 40 lat, ale większość stanowiły publikacje z ostatnich dziesięciu-kilkunastu lat, w tym także publikacje najnowsze, co świadczy o dobrej znajomości zarówno klasycznych prac, jak i literatury bieżącej. We Wstępie Autor wykazał się umiejętnością doboru treści i syntezy, płynnie

przeprowadzając czytelnika przez skomplikowane zagadnienia. W takim formacie uniknięto nużących szczegółowych analiz literatury, co uważam za sztukę w przypadku omawiania zjawiska pamięci, na temat którego napisano nieskończenie dużo prac, a które jest jednocześnie zjawiskiem mało zrozumianym od strony neurobiologicznej.

Projekt został logicznie zaplanowany. Cele osiągnięto w kilku etapach, na które złożyły się testy behawioralne warunkowania i wygaszania strachu, analizy molekularne aktywności neuronów w ponad dwudziestu obszarach mózgu (aktywacja markera plastyczności cFOS) oraz badanie skutków chemogenetycznego hamowania neuronów aktywowanych w wybranych obszarach w czasie sesji wygaszania uwarunkowanych reakcji lękowych. Ten ostatni etap pracy był najwięcej wnoszącą częścią badań, ponieważ zweryfikowano faktyczny udział badanych obszarów mózgu i połączeń między nimi w wygaszaniu strachu, uzyskując wyniki poszerzające wiedzę na ten temat. W niektórych eksperymentach wykorzystano myszy transgeniczne z obniżoną fosforylacją α CaMKII, żeby zbadać związek między fosforylacją α CaMKII a skutecznym wygaszaniem wyuczonego strachu, potwierdzając udział α CaMKII w wygaszaniu pamięci strachu.

Doktorant bardzo dobrze zaplanował grupy kontrolne i badawcze, żeby móc wyciągać prawidłowe wnioski dotyczące regulacji procesów wygaszania reakcji strachu w przypadku pamięci wczesnej i późnej. W sumie było to pięć grup. Taki sam układ eksperymentu został zastosowany w przypadku badań behawioralnych, molekularnych i chemogenetycznych. Przebieg eksperymentu w poszczególnych grupach został przedstawiony na rycinach (ryc. 4, 6A), co było bardzo pomocne dla czytelnika przy analizie przedstawionych wyników i wniosków. Utrudnieniem była niespójność w zapisach dotyczących grupy SU5. Zgodnie ze schematem na ryc. 6A i opisem na str. 41 próby zbierano dzień po warunkowaniu strachu. Według opisu na str. 43 próby z tej grupy zbierano 90 minut od rozpoczęcia ostatniej ekspozycji na klatkę treningową. Z kolei w tytule Ryc. 7 grupę SU5 opisano jako grupę „w trakcie warunkowania strachu”.

Zastosowano dobrze dobrane testy statyczne. Moją jedyną wątpliwość budzi liczba n w analizach aktywacji cFOS, wynosząca od 4 do 6. W przypadku kilku (z ponad 20 badanych) obszarów mózgu, biorąc pod uwagę duże rozrzuty wyników, liczba ta wydaje mi się zbyt niska do wyciągania solidnych wniosków, nawet jeżeli test statystyczny wykazuje różnicę. Szczególnie duże rozrzuty wystąpiły w gęstości komórek cFOS+ w jądrze boczno-grzbietowym wzgórza (LD) i części przyśrodkowej jądra środkowego ciała migdałowatego (CeM). Trudno przekonać się do pozytywnych wyników dla CeM (Fig. 7B i 9B), nawet jeżeli poziom istotności został osiągnięty. Z powodu małej liczby n i niskiej jakości preparatów (słusznie) nie uwzględniono wyników dla jąder przegrody grupy SU5 (Fig. 7C). Dla kilku innych grup także rozważyłabym usunięcie niektórych wyników albo powtórzenie analiz z większą

liczbą prób, zarówno ze względu na możliwe wyniki fałszywie pozytywne, jak i fałszywie negatywne. Podkreślę jednak, że ta część pracy była rodzajem „screeningu” w celu wybrania do dalszych badań kilku szczególnie interesujących struktur, i może nie warto było spędzać czasu na wykonywanie długich eksperymentów, żeby powtórzyć analizy dla kilku struktur, które i tak nie były w dalszej części analizowane. Autor zdawał sobie zresztą sprawę z niedoskonałości tych wyników, czemu dał wyraz w rozdziale Ograniczenia, gdzie wyjaśnił, że w niektórych obszarach mózgu ekspresja cFOS jest niska.

Wysoko oceniam solidność badań, na przykład przeprowadzenie optymalizacji metody hamowania neuronów systemem DREADD. Punktem ciężkości pracy są wyniki uzyskane metodą hamowania chemogenetycznego. Uzyskano bardzo ciekawe wyniki dla jądra łączącego przysiódkowego przegrody i jądro łączącego wzgórza. Zahamowanie neuronów w czasie sesji wygaszania uwarunkowanego strachu w którejkolwiek z tych struktur lub zahamowanie specyficznie neuronów jądra łączącego wzgórza dających projekcje do jądra łączącego przysiódkowego przegrody dramatycznie osłabiało wygaszanie późnej pamięci. Tym samym odkryto nieznan do tej pory obwód zaangażowany w regulację wygaszania późnej pamięci strachu. Ponadto w przypadku hamowania neuronów jądra łączącego wzgórza zaobserwowano znaczne wzmocnienie wygaszania wczesnej pamięci strachu. Oznacza to dwukierunkowe działanie neuronów tej struktury, w zależności od czasu, jaki upłynął od zdarzenia warunkowania.

Na koniec chciałabym przedyskutować interpretację wyników dla jądra łączącego wzgórza. Dodatkowe w tym jądrze zastosowano dwa promotory do ekspresji receptora hM4Di w neuromodulacji chemogenetycznej. Według autora promotor *Syn1* powinien indukować ekspresję hM4Di we wszystkich neuronach, natomiast promotor *Camk2a* jedynie w neuronach pobudzeniowych. Na podstawie porównania wyników tych dwóch wariantów eksperymentalnych wysunięto wniosek, że inne populacje neuronów tej struktury zaangażowane są w regulację wygaszania pamięci strachu, a inne w konsolidację pamięci wygaszania, i w tym drugim przypadku nie są to neurony pobudzeniowe. Uważam ten wniosek za intrygujący, ale przedwczesny. Mam wątpliwości, czy stosując promotor *Camk2a* faktycznie może rozróżnić między populacją neuronów glutamatergicznych i nieglutamatergicznych. Po pierwsze, nie jestem przekonana, że, jak twierdzi Autor, aktywność promotora *Camk2a* ograniczona jest do neuronów pobudzeniowych. Na przykład neurony zakrętu zębatego hipokampa, które są GABAergiczne, wykazują wysoką ekspresję genu *Camk2a*. Po drugie, nie byłabym pewna, czy stosując promotor *Camk2a* można uzyskać wystarczającą ekspresję hM4Di we wzgórzu, ponieważ promotor ten wykazuje słabą aktywność w tej strukturze. Można to zobaczyć na przykład u myszy *Cre^{Camk2a}* w Allen Brain Atlas lub w publikacjach badań, w których używając myszy linii *Cre^{Camk2a}* uzyskano nokaut genu w korze i hipokampie, ale nie we wzgórzu. Bardzo proszę Autora o komentarz.

Podsumowując, pracę Pana Kamila Tomaszewskiego oceniam bardzo wysoko, będąc przekonaną, że wniosła ona oryginalny i ważny wkład w badania nad wygaszaniem uwarunkowanego strachu. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Instytutu im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie Pana Kamila Tomaszewskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz o wyróżnienie rozprawy.