

Warszawa 20.03.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Nikolaiewa**  
zatytułowanej:

„Emotional contagion in *Fmr1* knockout mice, a model of Fragile X Syndrome”.

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Nikolaiewa została przedstawiona w formie manuskryptu w języku angielskim. Streszczenie przedstawiono w dwóch językach: angielskim i polskim. Manuskrypt zawiera 103 strony, 27 rycin, zacytowano 304 pozycje literatury naukowej. Autor przedstawił swoje badania nad zjawiskiem zarażenia emocjonalnego u myszy z zespołem łamliwego chromosomu X. Zespół łamliwego chromosomu X, powodowany jest przez jednogenową mutację w genie *Fmr1*, u ludzi współwystępuje z zaburzeniami ze spektrum autyzmu z deficytami interakcji społecznych oraz deficytami poznawczymi. Podłożem zmian jest zaburzenie procesów plastyczności neuronalnej. Autor zainteresował się tym zespołem współwystępującym z zaburzeniami ze spektrum autyzmu w kontekście różnic parametrów zachowania oraz neurobiologicznego podłoża zmian zdolności empatycznych. Miarą badanych zmian stanowił poziom zarażenia emocjonalnego osobnika zwanego Obserwatorem po ekspozycji na zestresowanego Demonstratora po sesji drażnienia prądem. Autor prowadził badania **zarówno na samcach i samicach pozbawionych aktywnego genu *Fmr1*** oraz zwierzętach grup kontrolnych co dało pełniejszy obraz zmian uwzględniając różnice pomiędzy płciami w zdolnościach empatycznych. W badaniach wykorzystano metodykę analizy podłoża zarażenia emocjonalnego u szczurów i myszy stosowaną od wielu lat przez promotora pracy prof. Ewelinę Knapską i promotora pomocniczego dr Ksenię Meyzę z Pracowni Neurobiologii Emocji, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Trzeba podkreślić, że metodyka ta została przez autora **zmodyfikowana w kierunku automatycznej analizy zachowania i społecznych interakcji**. Autor ocenił możliwości i zalety automatycznej oceny zachowań poprzez porównanie z wynikami uzyskanymi na tych samych zwierzętach, u których zachowanie dla porównania analizowane było również ręcznie przez badacza. W manuskrypcie zwraca uwagę **wysoki poziom dbałości o przyzwyczajenie (habitację) zwierząt do sytuacji doświadczalnej przed rozpoczęciem planowanych procedur**. W efekcie zwierzęta są mniej zestresowane przed doświadczeniami i łatwiej jest określić efekty procedury doświadczalnej na badany proces. Autor zdecydował się na długi proces habituacji i szeroko uzasadnił znaczenie takiego podejścia. Analiza **zachowania przeprowadzona była z dużą starannością** w celu uzyskania faktycznego poziomu zmian wywołanych mutacją genu *Fmr1*. Autor wybrał właściwie grupy kontrolne co wzmacnia rzetelność uzyskanych wyników. Równoległe do danych opisujących zachowanie doktorant wykonał immunocytochemiczne badanie

skrawków mózgu w kierunku zmian poziomu białka Fos w wybranych obszarach ciała migdałowatego oraz kory przedczołowej. Autor dokładnie opisał sposób wizualizacji i liczenia w strukturach neuronów z podwyższonym poziomem białka Fos używając metodę eliminacji ewentualnych zakłóceń i stworzenia obrazu bardziej kontrastowego. W efekcie uzyskano wynik o wyższej dokładności. **Generalnie praca jest ciekawa i rzetelnie wykonana pod względem badania zachowania. Autor opracował i wykorzystał metodę automatycznego badania interakcji społecznych u gryzoni, co może być z powodzeniem wykorzystywane w innych doświadczeniach nad zachowaniami społecznymi.**

**1. Ocena teoretycznej wiedzy ogólnej.** W manuskrypcie znajdziemy opis i współczesne definicje emocji, oraz neuroanatomie pętli zaangażowanych w sterowanie emocjami. Na uwagę zasługuje opis zjawiska empatii, w tym zarażenia emocjonalnego. Autor nakreślił problem zaburzeń ze spektrum autyzmu i w tym kontekście zespół łamliwego chromosomu X. Obszernie określił użyteczność podwyższonego poziomu białka Fos jako znacznika aktywności neuronalnej z uwzględnieniem jego funkcji jako elementu składowego czynnika transkrypcyjnego AP1 uczestniczącego w procesach prowadzących do przebudowy plastycznej w sieciach neuronalnych. Układ manuskryptu jest czytelny. Streszczenie napisane w języku angielskim i polskim zawiera prawidłowo umieszczone podstawowe informacje. Wstęp jest właściwym wprowadzeniem do celu prowadzonych badań. **Cel** pracy został opisany bardzo obszernie i rozbity na trzy cele. W sumie może to być akceptowalne, ale cele powinny być opisane w sposób bardziej zwięzły. **Metody** opisane są obszernie z wyjaśnieniem wszystkich stosowanych procedur. **Wyniki** opisano i pokazano na rycinach, które prezentują dane czytelnie z dodatkowym podaniem poszczególnych pomiarów. Pozwala to lepiej ocenić rozkład danych, jako że doktorant na rycinach posługuje się średnią z błędami standardowymi co dla danych o rozkładzie odbiegającym od rozkładów normalnych mogłoby zakłócać interpretację zmian. **Dyskusja** wyników jest opisana obszernie a uzyskane dane dyskutowane są z wyważeniem ich znaczenia w oparciu o szeroko cytowaną i właściwie dobraną literaturę dotyczącą omawianych zagadnień. W oparciu o te stwierdzenia **wysoko oceniam ogólną wiedzę teoretyczną autora** zaprezentowaną w manuskrypcie.

**2. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.** Doktorant wprowadził szereg usprawnień zarówno w sposobie pozyskiwania jak i analizie danych. Szeroko uzasadniał sposób pracy ze zwierzętami. Wskazuje to na samodzielność, zrozumienie problemów w badaniach behawioralnych i modyfikacji procedury tak aby uzyskiwać możliwie najbardziej rzetelne wyniki. Na uwagę zasługuje szczególnie **wysoki poziom dbałości i zrozumienia wagi przyzwyczajania (habitucją) zwierząt do sytuacji doświadczalnej przed rozpoczęciem planowanych procedur, zmodyfikowanie procedury w kierunku automatycznej analizy zachowania i społecznych interakcji.** Na podkreślenie zasługuje prowadzenie analizy zachowania z dużą starannością, uwzględniając

**testy nie tylko opisujące liniowe zmiany, ale też dynamiczne zmiany zachowania.**

**3. Oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.** Badania prowadzono na modelu zwierzęcym mającym znaczenie w badaniach przedklinicznych zaburzeń ze spektrum autyzmu. Wyniki mogą stanowić ważny element w dyskusji nad neurobiologicznym podłożem zmian w spektrum autyzmu oraz postępowania z osobami z zespołem łamliwego chromosomu X.

#### **Uwagi natury ogólnej.**

W dyskusji wyników poczułem pewien niedosyt omówienia **związku emocji z aktywacją układu autonomicznego**. Nie jest to zastrzeżenie, Doktorant opisuje takie struktury jak kora wyspy, przednia część zakrętu obręczy czy substancja szara okołowodociągowa, które stanowią elementy ponadrdzeniowej regulacji układu autonomicznego. Uważam jednak, że jest to zagadnienie wymagające obszerniejszego naświetlenia w kontekście lepszego zrozumienia stanu emocjonalnego zwierzęcia mierzonego często parametrami autonomicznymi takimi jak rytm serca, zmiany przepływu skórniego, itp. **Drugie pytanie**, które nasuwa mi się po lekturze rozprawy doktorskiej dotyczy **powtarzalności otrzymanych danych behawioralnych a zatem wykorzystania ich w badaniach przedklinicznych**. Może to wynikać z faktu, że opisywanie zmian w zachowaniu przy pomocy używanych powszechnie testów statystycznych stworzonych do analizowania procesów liniowych jest jedynie przybliżeniem opisu zjawisk fizjologicznych opartych na zjawiskach nieliniowych (fraktalnych). Możemy zatem zrozumieć, dlaczego powtarzalność w badaniach behawioralnych na całym świecie jest stosunkowo nieduża. Doktorant dołożył wiele staranności w dobre przyzwyczajenie zwierząt do doświadczeń, trzeba mieć jednak na uwadze, że niski poziom wzbudzenia ogólnego może zmniejszać siłę i kierunek zmian w analizowanych procesach. Stosunkowo niewielkie obserwowane zmiany w zachowaniu jak i pobudzenia sieci neuronalnych w sytuacji, gdy stosowana procedura nie wywołuje drastycznych zmian zachowania typu zneruchomienie (ang. freezing) może wskazywać kierunki terapii osób w spektrum autyzmu. W bardzo obszernej dyskusji manuskryptu doktorant skupił się, co zrozumiałe, głównie na poszukiwaniu różnic pomiędzy kontrolnymi szczepami a tymi w zakładanym spektrum autyzmu. Chciałbym jednak, żeby autor odwrócił problem i odniósł się do mojego **trzeciego pytania**: na ile procedury behawioralne mogą zniwelować różnice pomiędzy kontrolnymi osobnikami, a tymi z zespołem spektrum autyzmu?

## **Szczegółowe uwagi.**

### **Streszczenie:**

- brak słów kluczowych
- niektóre zdania lepiej rozbić na dwa, bo nie zawsze są powiązane logicznie np. „Aby zbadać to zjawisko zastosowałem paradygmat Pośredniego Transferu Strachu, w którym myszy są trzymane w parach przez co najmniej trzy tygodnie przed eksperymentem”. Trzymanie razem trzy tygodnie przed eksperymentem nie jest paradygmatem Pośredniego Transferu Strachu stąd lepiej napisać te myśli w dwóch zdaniach.
- strona 6; przedostatnie zdanie, brak „z” przed słowem „powodzeniem” powinno być z powodzeniem.

### **Wstęp:**

- strona 9; linia 10 od dołu, nawias powinien być po 320
- strona 17; 1 linia od góry, jest medidorsal a powinno być mediodorsal thalamus
- strona 21; 8 linia od dołu, słowo layers w przypadku kory nowej używa się w stosunku do warstw od 1-6 a nie obszarów kory

### **Cele pracy:**

Wydają się być bardzo rozbudowane, zalecałbym krótsze i bardziej wyraziste sformułowanie celów

### **Metody:**

- autor powinien podawać test przesiewowy na podstawie, którego oceniałby, że badane myszy wykazują cechy ze spektrum autyzmu np. nadwrażliwość na bodźce
- brak wyszczególnionego akapitu o podziałach grup, grupy i ich liczebność wyszczególnione są dopiero na ostatniej stronie Metod (str. 40).
- strona 33; 3 linia od góry, zdanie „If the data ....” wydaje się nie być skończone

Statystyka i jej dobór odpowiada rozkładowi danych. Autor powinien oddzielnie opisać testy dla analizy zachowania a potem dla analizy liczebności komórek z białkiem Fos. Nie do końca jest też jasne jak i dlaczego autor łączył (poolował) niektóre dane behawioralne.

W przypadku medialnego ciała migdałowatego powinno się podać czy komórki z Fos zliczano w przedniej części czy tylno-grzbietowej, która jest dymorficzna płciowo.

## **Wyniki:**

- Ryciny 7-10 w legendach nie umieszczono informacji jakich zwierząt dotyczyły zaprezentowane dane. Również zamiast określenia „by hand” proponowałbym słowo manually
- strona 45; pierwsze zdanie powinno być rozbite na dwa zdania
- strona 46; ostatnie zdanie, jeśli piszemy „sniffed more” to powinno to odzwierciedlać znamienność statystyczną zaznaczoną na Rycinie 12. Ten sam problem dotyczy Ryciny 17, strona 53
- strona 54; Rycina 18 B, powinno być Observer selfgrooming zamiast „Observer sefgrooming”
- strona 56-58; Ryciny 19, 20, 21, słabo widoczne gwiazdki na ciemnym tle

## **Dyskusja:**

- strona 74; 4 linia od góry powinno być dodane po Mice „contrary to rats”, linia 17 powinno być „strains” zamiast „species”

Podsumowując moje opinie i uwagi stwierdzam, że: **Rozprawa doktorska mgr Tomasza Nikolaiewa zatytułowana „Emotional contagion in *Fmr1* knockout mice, a model of Fragile X Syndrome” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Tomasza Nikolaiewa do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**



dr hab. Michał Biały

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej,

CEPT, Warszawski Uniwersytet Medyczny,

Banacha 1B, 02-097 Warszawa



Katowice / 21.03.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr Tomasza Nikołajewa:**

**„Emotional contagion in *Fmr1* knockout mice, a model of Fragile X Syndrome”.**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska powstała w Pracowni Neurobiologii Emocji Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, pod kierunkiem promotora, pani prof. Eweliny Knapskiej oraz promotora pomocniczego pani dr Kseni Meyzy.

Dysertacja została zredagowana w języku angielskim w typowym układzie monografii, obejmującej 103 strony składające się na dziewięć rozdziałów podzielonych na dalsze podrozdziały. Zgodnie z życzeniem Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN recenzja została sporządzona w języku polskim.

Treść pracy rozpoczynają streszczenia w języku angielskim i polskim podsumowujące treść dysertacji, a po nich następuje alfabetyczna lista skrótów oraz rozdział pierwszy „Wstęp”.

Rozdział ten oparty na bardzo obszernej bibliografii przybliży czytającemu wszelkie aspekty związane ze zjawiskiem empatii, emocjami i ich przekazywaniem (emotional contagion) oraz badania schorzeń ze spectrum autyzmu w oparciu o modele zwierzęce.

Wstęp zawiera rys historyczny badań na emocjami, opis podstaw anatomicznych i funkcjonalnych tego zjawiska oraz wybrane elementy metodologii badawczej schorzeń spektrum autystycznego. W pracy wykorzystano zwierzęta transgeniczne FVB.129P2-Pde6b+ Tyrc-ch *Fmr1tm1Cgr/J*, będące modelem zespołu łamliwego chromosomu X. W rozdziale 2 autor pracy przedstawił jej cele podzielone na trzy wyodrębnione aspekty badawcze:

1. Ocena występowania zjawiska przekazywania emocji w mysim modelu zespołu łamliwego chromosomu X w modelu badawczym demonstrator/obserwator
2. Stworzenie nowej i bardziej dokładnej metody oceny zachowania u zwierząt poruszających się swobodnie
3. Sprawdzenie czy zmiany zachowania obserwatora korelują z aktywacją połączeń neuronalnych i czy odzwierciedlają podobną aktywację u demonstratora.

Katedra i Zakład Fizjologii  
Wydział Nauk Medycznych  
w Katowicach

40-752, Katowice  
ul. Medyków 18

prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 208 8476



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Rozdział trzeci to „Metody”. Po opisie warunków utrzymania zwierząt, w podrozdziale 3.2. doktorant opisuje metodykę eksperymentu polegającego na transferze zachowań związanych ze strachem w układzie demonstrator/obserwator. Metodyka ta stosowana w pracowni pani profesor Eweliny Knapskiej została wykorzystana już w innych prowadzonych tu badaniach i była przedmiotem rozprawy doktorskiej m.in. pani dr Karoliny Andraki oraz pana dr Kacpra Kondrakiewicza.

W prowadzonych badaniach behawioralnych dużym wyzwaniem była obiektywizacja obserwowanych zachowań myszy. W tym celu, chcąc uniknąć czasochłonnego i obciążonego błędem ludzkim ręcznego zliczania wzorców zachowań, doktorant wykorzystał niekomercyjnie dostępne oprogramowanie DeepLabCut DLC oraz Simple Behavioral Analysis SimBA pozwalające na zautomatyzowanie kwantyfikacji zachowania zwierząt eksperymentalnych. Trzecią metodą rejestracji i analizy zdefiniowanych form zachowania było „ręczne” zliczanie na podstawie zarejestrowanych filmów wideo z wykorzystaniem oprogramowania Behavior autorstwa dr Pawła Boguszewskiego z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Metoda ta posłużyła do walidacji wiarygodności wyników otrzymywanych za pomocą oprogramowania DeepLabCut DLC oraz Simple Behavioral Analysis SimBA. Walidację przeprowadzono przed analizą kompletnego zestawu danych. Techniczne szczegóły rejestracji zostały opisane w dalszych częściach podrozdziału 3.3. Podrozdziały 3.4, 3.5 i 3.6 dotyczą immunohistologicznej części eksperymentu, przygotowania preparatów do analizy oraz analizy obrazu pozwalającej na ilościową analizę ekspresji białka c-Fos. Część metodyczną kończy opis metod statystycznych wykorzystanych w analizie danych eksperymentalnych.

Pierwszą część rozdziału wyniki – 4.1 – stanowią dane pochodzące z „ręcznej” walidacji automatycznej analizy zachowania wykonanej programami DLC i SimBA. Porównanie wyników otrzymanych obiema metodami potwierdziło wiarygodność programów DLC i SimBA.

W rozdziale 4.2 doktorant zebrał wyniki dotyczące poszczególnych elementów zachowania analizowanych w dysertacji:

- Social sniffing
  - anogenital sniffing
  - body sniffing
- Exploration –
  - demonstrator rearing
  - observer rearing
- Stereotypic behavior
- Demonstrator digging
- Observer digging



- Demonstrator selfgrooming
- Observer selfgrooming

Każdy z parametrów behawioralnych był analizowany osobno dla samców i samic. Ponadto każdy z parametrów był dodatkowo analizowany pod względem dynamiki w czasie. Pozwoliło to na wychwycenie dodatkowych różnic między badanymi grupami, również w przypadku, kiedy nie było statystycznie znamiennych różnic wynikających z samych danych liczbowych, np. w parametrze social sniffing. Doktorant podjął też próbę zbadania korelacji pomiędzy zachowaniem par demonstratora i obserwatora poprzez porównanie czasu spędzonego na parametrach behawioralnych wymienionych powyżej. Efektem tej analizy było znalezienie korelacji pomiędzy niektórymi z parametrów, w niektórych grupach eksperymentalnych.

W podrozdziale 4.2.4 wydzielone zostały wyniki dotyczące aktywności lokomotorycznej badanych zwierząt: przebyty dystans całkowity, średnia prędkość poruszania się, średni dystans pomiędzy demonstratorem a obserwatorem. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego ostatni z parametrów, średni dystans pomiędzy demonstratorem a obserwatorem, nie został przeanalizowany z podziałem na samce i samice.

Ostatnim z celów badawczych pracy było podjęcie próby sprawdzenia, które ze struktur mózgowia mogą być odpowiedzialne za przekazywanie emocji związanych ze strachem. W tym celu doktorant badał ekspresję genu wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos w ciele migdałowatym i korze przedczołowej u demonstratorów i obserwatorów. Otrzymane wyniki wykazały aktywację neuronów samic-demonstratorów z grupy KO, w ciele migdałowatym oraz z grupy WT i KO w korze przedczołowej. Nie zaobserwowano oznak aktywacji u żadnej z grup obserwatorów. W mojej opinii, w rozdziale 4.3 należałoby pokazać reprezentatywne obrazy mikroskopowe struktur z pozytywnym sygnałem c-Fos.

Po rozdziale czwartym opisującym wyniki, następuje rozdział „Dyskusja”, w której doktorant omawia otrzymane wyniki oraz porównuje je z wynikami innych grup badawczych zajmujących się zbliżoną tematyką. W części wstępnej dyskusji doktorant zwraca uwagę na bardzo istotny aspekt wszelkich badań, nie tylko behawioralnych, wykorzystujących modele zwierzęce, mianowicie dobór odpowiedniego szczepu, w tym wypadku myszy. Behawior różnych szczepów może się znacząco różnić między sobą, co w skrajnych przypadkach może doprowadzić do zniweczenia całego eksperymentu. Należy zwrócić uwagę, iż doktorant w sposób krytyczny omawia uzyskane wyniki wskazując na ograniczenia zastosowanych metod badawczych oraz podkreślając zalety rozwiązań metodycznych zastosowanych w tej dysertacji.

Po dyskusji następuje rozdział 6 „Podsumowanie” oraz rozdział 7 „Wnioski”. W przypadku rozdziału „Wnioski” oczekiwałbym, iż będzie on zawierał odpowiedzi na pytania i hipotezy postawione w rozdziale „Cele pracy”.

Całość rozprawy kończy bogata bibliografia licząca aż 304 pozycje oraz bibliografia własna doktoranta.

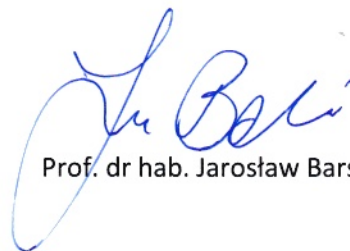
**Podsumowanie:**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską pana mgr Tomasza Nikołajewa oceniam ją wysoko, doceniając jednocześnie znaczący nakład pracy konieczny do jej wykonania.

Opierając się na uzasadnieniu zawartemu w sporządzonej przeze mnie recenzji stwierdzam, iż

1. Treść rozprawy doktorskiej potwierdza ogólną wiedzę jaką prezentuje doktorant w dyscyplinie nauki biologiczne
2. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej
3. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

Na tej podstawie stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie pana mgr Tomasza Nikołajewa do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Mając na uwadze nowatorski charakter ocenianej przeze mnie dysertacji wnioskuję do Wysockiej Rady o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Jarosław Barski



Ocena Rozprawy Doktorskiej p.t. „*Emotional contagion in Fmr1 knockout mice, a model of Fragile X Syndrome*” wykonanej przez  
**mgr Tomasza Nikołajewa**  
w Pracowni Neurobiologii Emocji Instytutu Biologii Doświadczalnej im.  
M. Nenckiego PAN  
pod kierunkiem Prof. **dr hab. Eweliny Knapskiej oraz Dr Kseni Meyzy.**

Kraków, 31 marca 2025

W ostatnich latach coraz wyraźniej widać, że w obliczu globalnych kryzysów zaraźliwe mogą być nie tylko wirusy, ale również emocje, przekonania i zachowania. Społeczne reakcje na pandemię COVID-19 - takie jak gromadzenie zapasów, spontaniczne akty solidarności czy masowe protesty - pokazały jak głęboko zakorzenione w ludzkiej naturze są mechanizmy zarażania emocjonalnego. To ostatnie pojęcie, zgodnie z definicją Hatfield, Cacioppo i Rapson z 1993 roku, odnosi się do automatycznego procesu naśladowania ekspresji i zachowań innych osób, co prowadzi do synchronizacji emocjonalnej w grupach społecznych. Choć badania prowadzone w ostatnich dekadach znacznie poszerzyły naszą wiedzę o tym zjawisku z perspektywy psychologicznej, ewolucyjnej i rozwojowej, jego podstawy neurobiologiczne pozostają stosunkowo słabo poznane. Szczególnie niewiele wiemy na temat tego, w jaki sposób zaburzenia neuropsychiatryczne - takie jak np. zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) - wpływają na podatność na zarażenie emocjonalne i procesy związane z empatią. Na całe szczęście, z pomocą przychodzą nam coraz doskonalsze modele zwierzęce. Jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli zwierzęcych do badania ASD jest mysz z wyłączonym genem FMR1 (Fmr1KO), która odzwierciedla kluczowe cechy zespołu łamliwego chromosomu X (FXS) - jednego z najważniejszych genetycznych korelatów ASD. W modelu tym obserwuje

1

się deficyty w zakresie interakcji społecznych, komunikacji oraz przetwarzania emocjonalnego, które są charakterystyczne dla FXS, dzięki czemu może być on również stosowany do badania neurobiologicznych mechanizmów leżących u podstaw empatii.

Celem przedstawionej mi do oceny Rozprawy Doktorskiej była kompleksowa analiza zdolności empatycznych myszy Fmr1KO(FVB) przy zastosowaniu paradygmatu pośredniego transferu strachu. Doktorant postawił sobie również za zadanie, zbadanie towarzyszącego transferowi emocji, wzorca aktywności w kluczowych strukturach mózgu związanych z przetwarzaniem emocji i empatią – tj. ciele migdałowatym i korze przedczołowej. Dodatkowym celem Rozprawy Doktorskiej była weryfikacja nowego, dokładnego sposobu kwantyfikacji danych behawioralnych przy użyciu zaawansowanych narzędzi opartych na algorytmach uczenia maszynowego.

Dysertacja, wraz z piśmiennictwem liczy 103 strony a jej układ jest typowy dla tego typu prac: spis treści, streszczenie w języku angielskim i polskim, wykaz stosowanych skrótów, liczący 19 stron, wyczerpujący wstęp, jasno sformułowane cele pracy, opis metod badawczych, wyniki zawierające 19 złożonych rycin (plus 1 w sekcji Dyskusja), 11-sto stronicowa dyskusja otrzymanych wyników, zwięzłe podsumowanie, wnioski i rozległy, bo liczący ponad 300 pozycji, spis cytowanej literatury. Na końcu znajdujemy również opis dorobku naukowego kandydata.

Zwięzły wstęp, napisany z dużą znajomością tematu i wyczuciem i umiejętnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w Rozprawie. Autor skutecznie osadza omawianą problematykę w szerokim kontekście literaturowym, obejmującym zarówno badania podstawowe z zakresu neurobiologii, jak i doniesienia kliniczne. Szczególną uwagę poświęcono zjawisku zarażania emocjonalnego jako jednemu z kluczowych komponentów empatii, przy czym jego znaczenie zostało omówione zarówno w odniesieniu do populacji neurotypowej, jak i w kontekście zaburzeń ze spektrum autyzmu. Autor przekonująco uzasadnia wybór modelu myszy Fmr1KO jako narzędzia badawczego umożliwiającego analizę społecznych dysfunkcji charakterystycznych dla ASD, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych różnic płciowych w zakresie analizowanych mechanizmów. Cele badawcze zostały sformułowane w sposób jednoznaczny i logicznie wynikają z przedstawionego przeglądu literatury, który świadczy o bardzo dobrej orientacji doktoranta w aktualnym stanie wiedzy oraz o jego umiejętności krytycznej analizy danych naukowych.

Część metodologiczna rozprawy została opracowana z dużą starannością i zgodnie z obowiązującymi standardami. Autor w sposób przejrzysty i szczegółowy opisuje



zastosowane procedury eksperymentalne, obejmujące zarówno analizy behawioralne, jak i pomiar ekspresji c-Fos. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie różnorodnych podejść do oceny danych behawioralnych, obejmujących zarówno klasyczne „ręczne” metody obserwacyjne (*ang. manual scoring*), jak i zaawansowane narzędzia komputerowe oparte na algorytmach uczenia maszynowego (*DeepLabCut, SimBA*). Tego rodzaju podejście metodologiczne należy uznać za nowoczesne i w pełni zgodne z aktualnymi trendami. Wybór metod statystycznych został dokonany w sposób adekwatny do struktury danych, a ich opis pozwala na replikację analiz. Całość metodologii świadczy o wysokim poziomie kompetencji eksperymentalnych doktoranta oraz o jego dużej świadomości dotyczącej wyzwań analitycznych w nowoczesnych badaniach behawioralnych. Tym niemniej, czytając ten rozdział zastanowiło mnie, dlaczego nagrano akurat pierwsze 9 minut interakcji (a nie np. 8 lub 10)? Zastanowiło mnie również, co stało się z tkanką mózgową ponad połowy samców, która z powodów technicznych została utracona, oraz dlaczego, analizy statystyczne były przeprowadzane w obrębie płci i par Demonstrator - Obserwator, a nie całościowo? Byłbym wdzięczny, gdyby podczas obrony, doktorant mógł wyjaśnić te wątpliwości.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów opisane są zwięźle i w większości poprawnie. Zastanawiam się natomiast, co oznacza, że wyniki uzyskane „ręcznie” i przy użyciu *SimBa* były „podobne” (strona 41)? To samo dotyczy stron 42, 43 i 44. Byłbym wdzięczny, gdyby doktorant mógł wyjaśnić na czym polegało owo „podobieństwo” i w jaki sposób było ono kwantyfikowane? Ponadto, dane dotyczące obwąchiwania (*ang. sniffing*), podnoszenia się (*ang. rearing, str. 49*), kopania czy też „wykopywania” (*ang. digging, str. 53*) i samoiskania (*ang. self-grooming, str. 54*) w grupach eksperymentalnych mogłyby być zaprezentowane w sposób bardziej przejrzysty. Doceniam prezentacje w postaci rozkładu czasowego poszczególnych zachowań, natomiast wyniki analiz statystycznych mogłyby być zaprezentowane np. w postaci okienek z wykresami słupkowymi, z błędem standardowym średniej i gwiazdkami reprezentującymi statystycznie istotne różnice. *Last but not least*, różnice istotnie statystyczne przedstawione na mapach cieplnych są trudne do odczytania z powodu niefortunnego doboru kolorów.

Dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona w sposób wnikliwy, logiczny i spójny z przyjętymi celami badawczymi. Autor umiejętnie interpretuje uzyskane dane, odnosząc je do aktualnego stanu wiedzy w dziedzinie neurobiologii społecznej oraz badań nad zaburzeniami ze spektrum autyzmu. W szczególności na uwagę zasługuje trafne osadzenie wyników behawioralnych oraz analiz ekspresji c-Fos w kontekście

funkcjonowania struktur zaangażowanych w przetwarzanie emocji, takich jak kora przedczołowa i jądra ciała migdałowatego. Autor nie tylko wskazuje na zgodność swoich wyników z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi deficytów społecznych w modelu *Fmr1KO*, lecz także podejmuje próbę wyjaśnienia obserwowanych różnic płciowych, zarówno w zachowaniu, jak i aktywności neuronalnej. Dyskusja wzbogacona została refleksją na temat ograniczeń przeprowadzonych badań i przyszłego ich kierunku. Autor słusznie wskazuje na ograniczenia metody analizy ekspresji *c-Fos*, oraz na możliwość doprecyzowania badań poprzez charakterystykę populacji aktywowanych neuronów - np. rozróżnienie pomiędzy komórkami pobudzającymi i hamującymi, co świadczy o dużej świadomości badawczej. Całość rozważań jest dobrze ustrukturyzowana, krytyczna i wyważona, a przedstawione wnioski zostały adekwatnie wyprowadzone z uzyskanych danych. Taki sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta i umiejętności integracji wyników eksperymentalnych z szerszym kontekstem teoretycznym.

Na podstawie opisanych wyników można stwierdzić, że wszystkie cele pracy zdefiniowane we wstępie zostały osiągnięte. Autor zrealizował główny cel badawczy, jakim była ocena zdolności empatycznych i zarażania emocjonalnego wśród myszy *Fmr1KO* (modelu genetycznego zespołu łamliwego chromosomu X), zarówno na poziomie behawioralnym, jak i neuronalnym (ekspresja *c-Fos*). Badania wykazały istotne różnice w reakcjach na zestresowanego osobnika w zależności od płci i genotypu, co wskazuje na złożoną strukturę mechanizmów empatii u gryzoni. Ponadto autor skutecznie wdrożył i przetestował zaawansowane narzędzia analityczne oparte na uczeniu maszynowym, które pozwoliły na dokładniejszą i bardziej obiektywną ocenę subtelnych zachowań społecznych.

Podsumowując, pomimo kilku lekko krytycznych uwag, które nasunęły mi się podczas lektury, Rozprawę Doktorską p.t. „*Emotional contagion in Fmr1 knockout mice, a model of Fragile X Syndrome*” wykonaną przez mgr Tomasza Nikołajewa w Pracowni Neurobiologii Emocji Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, pod kierunkiem Prof. dr hab. Eweliny Knapskiej oraz Dr Kseni Meyzy, oceniam wysoko.

Autor prezentuje dojrzałość w interpretacji wyników, rozpoznając zarówno znaczenie swoich ustaleń, jak i ograniczenia badania. Na szczególne podkreślenie zasługuje oryginalność ujęcia tematu — autor łączy analizę zachowań społecznych z pomiarem aktywności neuronalnej oraz wykorzystuje zaawansowane, zautomatyzowane metody analizy danych, co pozwala na wykrycie subtelnych efektów nieuchwytnych w standardowych paradygmatach. Wyniki mają istotne znaczenie teoretyczne, gdyż poszerzają rozumienie mechanizmów zarażania emocjonalnego oraz ich zaburzeń w

modelach autyzmu. Co więcej, obserwacje te mogą mieć również potencjalne zastosowanie aplikacyjne — m.in. jako punkt wyjścia do rozwoju nowych narzędzi diagnostycznych lub terapeutycznych opartych na modelach translacyjnych.

Rozprawa, choć nie pozbawiona drobnych niedociągnięć, pokazuje szeroką wiedzę teoretyczną kandydata, wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i stanowi oryginalne rozwiązanie ciekawego problemu naukowego, a tym samym spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana mgr Tomasza Nikołajewa do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Prof. dr hab. n. med. Rafał Ryguła