

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej p. mgr inż. Edyty Balcerek pt.  
"Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy:  
znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek  
wizualnych w procesach nawigacyjnych" przygotowanej pod opieką  
dr hab. Rafała Czajkowskiego, prof. Instytutu Nenckiego PAN  
w Pracowni Pamięci Przestrzennej  
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN**

Tematyka pracy mieści się w nurcie badań neurobiologicznych, dotyczących procesów decyzyjnych, związanych z nawigacją, opartych na mechanizmach pamięci przestrzennej, a w szczególności powiązań neuronalnych pomiędzy korą retrosplenia a hipokampem u myszy, odpowiadających za zdolności nawigacyjne organizmu. Pomimo upływu ponad 10 lat od przyznania nagrody Nobla za odkrycie komórkowych mechanizmów neuronalnych, stojących u podstaw mózgowego systemu pozycjonowania, wewnętrznego GPS, który pozwala nam orientować się w przestrzeni, procesy nawigacji przestrzennej, z uwagi na ich złożoność i trudną metodykę pomiaru, nie są w pełni poznane. Dlatego też opracowanie przez p. mgr inż. Edytę Balcerek nowatorskiego modelu behawioralnego, który pozwala na badanie naturalnych mechanizmów poznawczo-przestrzennych w warunkach laboratoryjnych dobrze wpisuje się w nurt tych badań i jest próbą wyjaśnienia wyboru strategii nawigacyjnych u myszy w zależności od przestrzennych wskazówek wizualnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli kory retrosplenia, zaangażowanej w ten proces. Wybór tematu uważam za właściwy, nie tylko z tego względu, że rola kory retrosplenia w procesach pozycjonowania organizmu i pamięci przestrzennej nie jest w pełni poznana, ale również z uwagi na szersze implikacje, zwłaszcza w zakresie opracowania skutecznych terapii zaburzeń pamięci przestrzennej, typowej dla choroby Alzheimera. Badania podjęte przez p. mgr inż. Balcerek uważam więc za niezwykle istotne.

Oceniana przeze mnie praca wykonana przez p. mgr inż. Edytę Balcerek, ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, obejmuje 150 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), spisem piśmiennictwa (Bibliografia: 267 pozycji) oraz spisem publikacji własnych Autorki, w tym jednej dotyczącej bezpośrednio wyników pracy doktorskiej oraz suplementem. Praca została przygotowana bardzo starannie. Znalazłam jedynie w kilku miejscach potknięcia edytorskie (na przykład wykaz skrótów strona 8: ATN posiada dwa różne tłumaczenia, strona 10: PBS buforowany roztwór soli fizjologicznej zamiast buforowany roztwór fizjologicznego roztworu soli, zwyczajowo geny wczesnej aktywacji *c-fos* piszemy kursywą, strona 38: do wzrostu cFos w RSC zamiast do wzrostu stężenia białka Fos w

komórkach RSC) jednakże nie miało to wpływu na zrozumiałość tekstu czy też poprawność opisywanych wyników.

We wstępie Autorka w sposób jasny i interesujący przedstawiła komórkowe podłoże mechanizmów pamięci przestrzennej oraz dotychczasowe dane dotyczące obwodów neuronalnych zaangażowanych w ten proces, ze szczególnym uwzględnieniem roli kory retrosplenialnej w nawigacji przestrzennej, jako miejsca integracji wizualnych wskazówek kontekstowych z aktywnością ruchową a także przedstawiła test labiryntu T, jako podstawę do zaprojektowania i wdrożenia automatycznego systemu do badań pamięci przestrzennej u myszy. Cel pracy został wyodrębniony w oddzielny rozdział, w którym Autorka sformułowała 6 celów szczegółowych. Zasadniczym celem badań było opracowanie behawioralnego modelu do badań pamięci przestrzennej myszy pod kątem zależności nawigacji od prezentowanych wskazówek przestrzennych oraz poznanie udziału kory retrosplenialnej i hipokampa w tych mechanizmach. W tej części pracy zabrakło sformułowanych hipotez badawczych.

Zadania badawcze zostały zrealizowane w bardzo dobrze zaplanowanych i adekwatnie opisanych doświadczeniach przy zastosowaniu zróżnicowanego warsztatu badawczego, obejmującego zarówno zaprojektowanie i wdrożenie zautomatyzowanej wersji aparatu behawioralnego z automatycznym dyspenserem nagrody, metody behawioralne z zastosowaniem treningu kontekstowego, testy w oparciu o zróżnicowane bodźce wzrokowe, jak i metody neurofizjologiczne, w tym operacje stereotaktyczne, perfuzję przezsercową, techniki immunohistochemiczne, obrazowanie mikroskopowe, inaktywacja kory retrosplenialnej poprzez transdukcję z zastosowaniem wektorów wirusowych. W odniesieniu do podrozdziału „Analiza statystyczna” zabrakło informacji czy przy wstępnej analizie rozkładu danych zastosowano test na znamienne odstępstwo od normalności? Chciałabym podkreślić, że opisana bardzo szczegółowo metodyka badań zastosowana przez Doktorantkę jest imponująca.

Wyniki zostały przedstawione na 30 stronach w sposób zwięzły a jednocześnie szczegółowy i bardzo przejrzysty. W pierwszej kolejności Autorka przedstawiła etapy powstawania automatycznego systemu do badań pamięci przestrzennej u myszy wraz z problemami technicznymi i ich optymalizacją. Następnie wykonała treningi myszy w skonstruowanym aparacie i przeanalizowała wpływ dwóch odrębnych strategii treningowych: alternacyjny i złożony na uczenie się nawigacji u myszy w oparciu o wskazówki wizualne. Doktorantka zaobserwowała istotne podobieństwo przebiegu krzywych poprawnych wyborów w grupie alternacyjnej i złożonej, co, zdaniem Autorki, potwierdza wrodzoną tendencję u myszy do naprzemiennych wyborów. W warunkach przeprowadzonego po treningu testu obie grupy (alternacyjna i złożona) osiągnęły podobny poziom poprawności wyborów. Doktorantka stwierdziła, że wskazuje to na wysoki poziom zdolności do asocjacji prezentowanych wskazówek wizualnych z wyborem kierunku skrętu zarówno w grupie trenowanej zgodnie ze schematem alternacyjnym, jak i w grupie ze złożonym treningiem. W kolejnym etapie badań Doktorantka posługując się metodą oznaczania ekspresji białka Fos oraz chemogenetycznego hamowania aktywności komórek nerwowych, porównywała zaangażowanie kory retrosplenialnej i hipokampa podczas różnych schematów uczenia się nawigacji w oparciu o wskazówki przestrzenne. Autorka wykazała istotny

przeciwstawny udział w tych procesach grzbietowej części pola CA1 hipokampa (większa aktywność podczas treningu złożonego) i przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej (obniżona aktywność podczas treningu złożonego), co zdaniem Doktorantki potwierdza hipotezę o istnieniu dwóch równoległych obwodów neuronalnych, odpowiedzialnych za nawigację przestrzenną, z których jeden związany jest z formacją hipokampa a drugi zależy od kory retrosplenialnej. Badając wpływ zróżnicowanych wskazówek wizualnych na proces nawigacji przestrzennej u myszy Autorka zaobserwowała, że myszy są zdolne do podejmowania decyzji nawigacyjnych zarówno na podstawie pełnego zestawu znanych wskazówek, jak i w oparciu o wskazówkę indywidualną. Ponadto Doktorantka stwierdziła, że wskazówka indywidualna wywiera wpływ dominujący na proces nawigacji i wiąże się to ze zwiększoną aktywnością przedniej części agranularnej kory retrosplenialnej. Jednakże czasowe zahamowanie tej struktury nie wpływa na proces nawigacji w oparciu o wskazówki wizualne.

Wraz z częścią metodyczną wyniki stanowią imponującą część pracy z uwagi na złożoność przeprowadzonych badań, jak również na szczegółową i ostrożną analizę. Na podkreślenie zasługują bardzo przejrzyste, szczegółowe legendy do każdej ryciny wraz z syntetycznym ich podsumowaniem. Ogromnie pomocna dla mnie była również klarowna metodyka analizy wyników. Ogólna interpretacja wyników nie budzi wątpliwości.

Rozdział „Dyskusja”, który liczy 16 stron, został podzielony na podrozdziały, co ułatwia odbiór czytelnikowi. Autorka przeprowadziła dyskusję w sposób interesujący, ostrożnie interpretując uzyskane wyniki, co świadczy o bardzo dobrym zorientowaniu w literaturze i dojrzałości naukowej.

Zakres podjętych badań i przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki, które wskazują, że integracja wskazówek wizualnych stanowi podstawę procesów decyzyjnych związanych z nawigacją u myszy uważam za istotne i wartościowe. Zaprojektowanie, zoptymalizowanie i wdrożenie innowacyjnego aparatu behawioralnego jako obiektywnego narzędzia badawczego, umożliwiającego pełne uzależnienie decyzji nawigacyjnych myszy od prezentowanych wskazówek wizualnych stanowi nowość naukową i może mieć istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia podłoża neuronalnego i deficytów pamięci przestrzennej. Praca p. mgr inż. Edyty Balcerek stanowi również dobrą podstawę do dalszych badań tego zagadnienia, m.in. w zakresie wyjaśnienia zakresu zaangażowania kory retrosplenialnej i hipokampa, zwłaszcza w połączeniu z nowoczesnymi technikami neuroobrazowania, w procesie nawigacji przestrzennej.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że zarówno zaprojektowanie aparatu behawioralnego, jak i przedstawione w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnoszą znaczny wkład w badania nad mechanizmami pamięci przestrzennej w procesach nawigacyjnych. Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana pod względem teoretycznym, jak również w zakresie znajomości wielu trudnych technik metodycznych, do pracy naukowej. Autorka wykazała się umiejętnością rozwiązywania złożonego i ciekawego problemu badawczego, począwszy od konstrukcji innowacyjnego aparatu behawioralnego a następnie precyzyjnego przeprowadzenia badań oraz

dojrzałością do odpowiedniego opracowania uzyskanych oryginalnych wyników.

W odpowiedzi na recenzję proszę o przedyskutowanie następujących kwestii:

1. Jakie argumenty przeważały nad wyborem labiryntu T do badań procesu nawigacji u myszy a nie labiryntu Y, którego układ ramion jest bardziej naturalny i uczenie przestrzenne jest łatwiejsze dla zwierzęcia?
2. Czy na zróżnicowanie tempa uczenia się przestrzennego u myszy obserwowane w pracy (szybkie i wolne) mogły mieć również wpływ różnice w spontanicznej aktywności lokomotorycznej (tzw. nisko- i wysokoaktywne ruchowo zwierzęta w teście nowości) ?
3. Co wiadomo o połączeniach neuronalnych pomiędzy korą retrosplenialną, hipokampem a innymi strukturami odpowiedzialnymi za pamięć przestrzenną?

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 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Edyty Balcerek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, z uwagi na innowacyjny charakter badań poparty opublikowaniem części wyników w wysokopunktowanym czasopiśmie oraz szeroki wachlarz metodyczny zastosowany w pracy, wnoszę również o wyróżnienie pracy.

*Stanisław Losandoborski*

Gdańsk, 16.03.2025 r.



Kraków, 30 marca 2025

dr hab. Mateusz Hohol, prof. UJ  
Mathematical Cognition and Learning Lab  
Centrum Kopernika Badań Interdyscyplinarnych  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

**Recenzja dysertacji doktorskiej mgr inż. Edyty Balcerek**  
***Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy:  
znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek wizualnych w procesach  
nawigacyjnych***

Zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) oraz z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Nenckiego PAN z dnia 29 stycznia 2025 r. przedstawiam moją recenzję dysertacji doktorskiej mgr inż. Edyty Balcerek pt. „Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy: znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek wizualnych w procesach nawigacyjnych”. Dysertacja ta przygotowana została w Pracowni Pamięci Przestrzennej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora dr. hab. Rafała Czajkowskiego, prof. Instytutu Nenckiego PAN.

**1. Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej mgr inż. Edyty Balcerek, ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Po lekturze dysertacji przedstawionej przez doktorantkę, stwierdzam, że jej ogólna wiedza teoretyczna w dyscyplinie nauki biologiczne została zaprezentowana w sposób przekonujący, spełniając wymóg postawiony w Art. 187.1 Ustawy.



*Uzasadnienie:*

Rozprawa mgr inż. Edyty Balcerek obejmuje obszerny, około czterdziestostronicowy, wstęp teoretyczny, w którym z dużą erudycją opisuje ona historię badań behawioralnych i neurobiologicznych nad nawigacją przestrzenną, wprowadzając niezbędne tło dla omówienia przez nią aktualnego stanu wiedzy, stanowiącego z kolei podstawę dla sformułowania własnych celów badawczych. We wstępie do rozprawy widać bardzo dobrą orientację doktorantki w literaturze oraz rozumienie przez nią współczesnych teorii nawigacji przestrzennej wraz z niuansami interpretacyjnymi oraz dyskusjami toczącymi się wciąż na tym polu. W moim przekonaniu szczególną erudycję doktorantki widać zwłaszcza w zakresie opisu komórkowego poziomu mechanizmów nawigacji przestrzennej, przy czym godne pochwały jest bardzo sprawne przechodzenie przez nią przez różne poziomy złożoności tych mechanizmów. Doktorantka prezentuje ponadto gruntowaną wiedzę w zakresie wpływu rozwoju metod doświadczalnych na kształtowanie stanu wiedzy nad nawigacją przestrzenną, co wpływa zdecydowanie korzystanie na wybór metod i narzędzi badawczych, w oparciu o które zaprojektowała ona i przeprowadziła własne doświadczenia.

W pracy znalazłem następujące nieścisłości. Opisując zachowanie gryzoni w labiryncie promienistym, doktorantka stwierdza, że „szczury zamiast zapamiętywać konkretną sekwencję ruchów (np. ile razy trzeba skręcić w lewo lub prawo), miały w głowie «mentalny obraz» labiryntu i wiedziały, gdzie znajduje się pokarm”. O ile w nowszej literaturze psychologicznej niekiedy rzeczywiście wiąże się kompetencje do tworzenia poznawczych map przestrzeni z wyobraźnią (reprezentacjami obrazowymi), zgodnie z moją wiedzą Tolman w cytowanych pracach nie odwoływał się do obrazów mentalnych (ani innych bliskich znaczeniowo terminów teoretycznych). W sekcji na temat komórek prędkości i czasu doktorantka stwierdza, że te ostatnie są prawdopodobnie częścią mechanizmu pamięci epizodycznej. O ile teza ta jest ugruntowana w pracy Alexandra et al. (2020, *Brain and Neuroscience Advances*), doktorantka pominęła inny kluczowy artykuł w tym zakresie (Umbach et al., 2020, *PNAS*). Dodatkowo nie przedyskutowano trudności teoretycznej, jaką jest przypisywanie pamięci epizodycznej zwierzętom innym niż człowiek, co oznacza trudność w jej modelowaniu na zwierzętach. Jak

wiadomo Tulving twierdził oryginalnie, że jest to wyłącznie ludzka kompetencja. Z drugiej jednak strony o pamięci epizodycznej (lub epizodycznopodobnej) współcześnie mówi się w odniesieniu do innych naczelnych, ptaków czy gryzoni (zob. np. Bevandić et al., 2024, *Neuron*; Crystal, 2021, *JEP:ALC*). Warto byłoby ten aspekt przedyskutować. Kolejna kwestia jest następująca. Sekcję na temat umiejscowienia kory retrosplenialnej w obwodzie pamięci przestrzennej autorka rozpoczyna od wprowadzenia konstruktów teoretycznych pamięci autobiograficznej. W tym przypadku sytuacja wydaje się jeszcze trudniejsza, ponieważ pamięć autobiograficzna jest bardzo szczególnym przypadkiem pamięci epizodycznej (powiązanym również z innymi typami pamięci), który trudno poddaje się modelowaniu na zwierzętach. Uważam, że sekcja zyskałaby na klarowności bez wprowadzania tego konstruktów.

Moje powyższe uwagi polemiczne w żaden sposób nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną ocenę ogólnej wiedzy teoretycznej doktorantki w dyscyplinie. Wiedza ta jest bez wątplenia dogłębna i szeroka. Chciałbym również podkreślić, że doktorantka jest współautorką trzech artykułów opublikowanych w czasopiśmie międzynarodowych (Balcerek et al., 2024, *Scientific Reports*; Sadkowski et al., 2018, *BMC Genomics*, oraz Balcerek et al., 2021, *Molecular Brain*), do których bezpośrednio odwołuje się ona w rozprawie. Ponieważ artykuły te były przedmiotem niezależnych recenzji i ewaluacji przez redaktorów czasopisma, stwierdzam, że tylko wzmacniają one moje jednoznacznie pozytywne przekonanie o wysokim poziomie wiedzy teoretycznej doktorantki, niezbędnej do zaprojektowania i przeprowadzenia badań własnych.

## **2. Ocena umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej przez doktorantkę**

Na podstawie lektury rozprawy stwierdzam, że mgr inż. Edyta Balcerek posiada umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej, a co za tym idzie spełnia wymóg przedstawiony w Art. 187.1 Ustawy.

*Uzasadnienie:*

Na umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej składa się szereg kompetencji, takich jak formułowanie celów badawczych, przygotowywanie aparatury badawczej, planowanie i



przeprowadzanie eksperymentów, analiza wyników, ich interpretacja oraz komunikacja całego procesu społeczności naukowej. Główny cel dysertacji, jakim jest „opracowanie behawioralnego modelu umożliwiającego badanie pamięci przestrzennej myszy w kontekście zależności nawigacji od prezentowanych wskazówek przestrzennych” został rozbity na sześć celów szczegółowych. Dotyczą one kolejno: opracowania zautomatyzowanej aparatury do pomiarów behawioralnych gryzoni; zbadania wpływu strategii treningowych na nawigację przestrzenną opartą o bodźce wizualne; zbadania zaangażowania (którego wskaźnikiem jest poziom białka c-Fos) kory retrosplenialnej i hipokampu w nawigację opartą o wskazówki wzrokowe z uwzględnieniem strategii uczenia się, opracowania paradygmatu, w którym nawigacja gryzoni zależna jest od bodźców wzrokowych; zbadania wpływu różnych wskazówek wzrokowych na proces nawigacji i jego mózgowie komponenty; wreszcie, zbadania przyczynowej roli kory retrosplenialnej (poprzez jej dezaktywację) na nawigację opartą o znane wskazówki bądź zróżnicowaną dostępność wskazówek jednego rodzaju. Cele szczegółowe pracy są ambitne i bez wątplenia układają się w spójny i dojrzały metodologicznie program badawczy, w którym każdy kolejny krok nadbudowany jest na poprzednich.

Jeśli chodzi o aparaturę, kluczowe dla realizacji celów postawionych sobie przez doktorantkę było zaprojektowanie, zoptymalizowanie i wdrożenie do badań zautomatyzowanego labiryntu T. Sam projekt i jego wykonanie są niezwykle imponujące. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że w rezultacie uzyskano narzędzie, sprzyjające—by zacytować samą doktorantkę—„stabilności i powtarzalności eksperymentalnej, przy jednoczesnym wyeliminowaniu czynnika ludzkiego i stresu zwierząt uczących się nawigacji”. Badania składające się na rozprawę zostały zaplanowane i przeprowadzone profesjonalnie, co wymagało od doktorantki opanowania pokaźnego zestawu umiejętności pracy laboratoryjnej, począwszy od technik behawioralnych, przez obrazowanie białka c-Fos w neuronach, po korzystanie z chemogenetycznego systemu modulacji aktywności neuronalnej opartego o DREADD-y, umożliwiającego testowanie przyczynowego zaangażowania obszarów mózgu. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że umiejętności badawcze doktorantki w zakresie opracowywania aparatury oraz wykorzystywania kluczowych dla współczesnej neurobiologii technik są na wyróżniającym się poziomie.







Kolejną umiejętnością jest przeprowadzanie analiz statystycznych, będących elementarnym aparatem matematycznym nauk biologicznych, oraz prezentacja ich wyników. Częstotliwościowe analizy statystyczne zostały przeprowadzone przez doktorantkę poprawnie. Do doboru poszczególnych metod nie mam zastrzeżeń, a wizualizacje wyników są informatywne. Moja podstawowa uwaga krytyczna dotyczy natomiast rezygnacji przez doktorantkę z raportowania miar wielkości efektu (np.  $d$  Cohena dla testu  $t$  czy  $\eta^2$  dla analizy wariancji). W przyszłych badaniach zachęcałbym doktorantkę do raportowania wielkości efektów. Jest to kluczowe dla uwzględniania wyników w metaanalizach, szacowania wielkości prób, wzmacniania replikowalności i transparentności badań, a także informatywne dla interpretacji teoretycznej wyników. Jeśli chodzi o to ostatnie, mogłoby to mieć zastosowanie np. gdy doktorantka pisze, że „...percepcja wyłącznie wskazówki kontekstowej skutkuje nieznacznym obniżeniem odsetku poprawnych decyzji wyboru kierunku, przy zachowaniu istotności statystycznej sukcesu nawigacyjnego”. Dodatkowo uważam, że uzupełnienie przedstawionych w rozprawie analiz częstotliwościowych ich Bayesowskimi odpowiednikami, mogłoby być również pomocne w interpretacji nieistotnych statystycznie wyników (np. „Podobną tendencję większego pobudzenia neuronów zaobserwowaliśmy również w przypadku dCA3 i dDG, choć efekt nie uzyskał istotności statystycznej”).

Do umiejętności prowadzenia samodzielnych badań zaliczam również komunikację naukową, co prowadzi mnie do oceny warstwy językowej rozprawy. Opisy prac badawczych są szczegółowe. Wykonanie językowe jest ogólnie zadowalające, przy czym nieco razi brak poprawnej odmiany niektórych nazwisk, takich jak Lippitt (nawiasem mówiąc, choć jego praca znajduje się w bibliografii, w tekście głównym brakuje cytowania), O’Keefe, Epstein, Jacob czy Molaison (czyli słynny H.M.). Niektóre terminy nie są konsekwentnie stosowane (np. *cognitive map* to czasem „mapa poznawcza”, a czasem „mapa przestrzenna”). Wreszcie, w pracy natknąłem się na nieprecyzyjne zdania. Przykładowo, pisząc o komórkach miejsca w hipokampie doktorantka pisze, że „ich aktywność jest silnie zlokalizowana w przestrzeni”, co oczywiście jest prawdziwe, ale niedystynktywne, bo aktywność każdej komórki jest zlokalizowana w





przestrzeni. Precyzyjniejsze byłoby np. sformułowanie typu „ich aktywność reprezentuje lokalizację zwierzęcia w przestrzeni”). Moje powyższe uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej oceny umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej przez doktorantkę.

### **3. Ocena czy rozprawa doktorska mgr inż. Edyty Balcerek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.**

Stwierdzam z pełnym przekonaniem, że rozprawa zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a co za tym idzie spełnia w pełni wymóg z Art. 187.2 Ustawy.

#### *Uzasadnienie:*

Nawigacja przestrzenna stanowi jedną z najbardziej fundamentalnych kompetencji życiowych zwierząt, co przekłada się na to, że stojące za nią mechanizmy neuropoznawcze należą do najlepiej przebadanych. Z drugiej strony, nasza wiedza o mózgowym mechanizmie orientacji w przestrzeni jest daleka od kompletności, a stosowanie kolejnych technik badawczych umożliwia formułowanie coraz bardziej szczegółowych pytań na temat komponentów tego mechanizmu. W tym kontekście doktorantka postawiła przed sobą szereg ambitnych celów badawczych, które układają się w spójny i dojrzały metodologicznie program badawczy, a następnie zrealizowała ten program z powodzeniem przeprowadzając serię dobrze przemyślanych eksperymentów, wykorzystujących specjalnie zaprojektowaną aparaturę oraz bogaty repertuar technik neurobiologicznych. Wyniki części niniejszej dysertacji zostały już opublikowane w czasopiśmie międzynarodowym (Balcerek et al., 2024), co zwiększa rozpoznawalność oryginalnych badań przeprowadzonych przed doktorantką. Warto podkreślić, że doktorantka szczegółowo opisała perspektywy dalszych badań, co pozwala mieć nadzieję na kontynuację programu badawczego w oparciu o, między innymi, zautomatyzowany labirynt opracowany w ramach dysertacji. Rezultaty zaprezentowane przez doktorantkę stanowią istotny wkład do badań nad mechanizmami nawigacji przestrzennej, w szczególności w zakresie wykazania zdolności gryzoni do elastycznego dostosowywania strategii uczenia się oraz ich możliwości do dopasowywania sposobu nawigacji do konkretnych wymagań, a także dostarczenia solidnego



wsparcia empirycznego na rzecz hipotezy o istnieniu dwóch równoległych obwodów nawigacyjnych, tj. opartego na hipokampie oraz na korze retrosplenialnej.

**Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy: znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek wizualnych w procesach nawigacyjnych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Edyty Balcerek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, mając na uwadze wysoki poziom naukowy badań przedstawionych w rozprawie wnioskuję o jej wyróżnienie.**

Warszawa, 31.03.2025

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Edyty Balcerek**

**pt.: „Behawioralny model badania pamięci przestrzennej u myszy: znaczenie strategii treningowych i integracji wskazówek wizualnych w procesach nawigacyjnych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Pracowni Pamięci Przestrzennej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR: dr hab. Rafał Czajkowski, prof. Instytutu Nenckiego

W pracy przedstawiono strategie nawigacyjne myszy analizowane w oparciu o innowacyjny model badania pamięci przestrzennej, skoncentrowany na integracji wskazówek wizualnych i strategii treningowych w procesach nawigacyjnych. Dodatkowo analizowano zaangażowanie kory retrosplenialnej oraz obszarów hipokampa w procesy nawigacji oparte na wskazówkach przestrzennych.

Prawidłowe procesy decyzyjne związane z poruszaniem w przestrzeni są niezwykle istotne dla prawidłowej adaptacji organizmów. Są one związane z pamięcią oraz tworzeniem asocjacji.

Dlatego należy uznać, że niniejsza rozprawa przedstawiająca innowacyjny, zautomatyzowany system badawczy do analizy asocjacji między wskazówkami oraz nagrodą apetytywną oraz ocena zaangażowania struktur mózgu w te procesy jest w pełni uzasadniona.

Część wyników zawartych w tej rozprawie została opublikowana w pracy oryginalnej, której doktorantka jest pierwszym autorem, ponadto doktorantka jest współautorką 2 publikacji nie opartych na wynikach przedstawionej pracy doktorskiej. Praca liczy 158 strony, 11 rozdziałów, 1 załącznik. Zacytowano 267 pozycji literatury.

We **wstępie** omówiono mechanizmy nawigacji w przestrzeni na podstawie wskazówek wizualnych oraz zaangażowanie struktur ośrodkowego układu nerwowego zwłaszcza hipokampa i kory retrosplenialnej w te procesy. Omówiono znaczenie oraz lokalizację komórek mózgu zaangażowanych w tworzenie mapy przestrzennej środowiska takich jak komórki miejsca, komórki siatki, komórki kierunku głowy, komórki granicy oraz komórki prędkości i czasu. Niezwykle szczegółowo opisano rolę kory retrosplenialnej w orientacji w przestrzeni i pamięci. Dodatkowo opisano rolę białka c-Fos produktu genu szybkiej odpowiedzi komórkowej jak markera pobudzenia i jego rolę plastyczności synaptycznej. Odniesiono się do aktywności c-Fos w korze retrosplenialnej. Dodatkowo przedstawiono podtawy zastosowanego w systemie behawioralnego jego zalety i wady. Wartości wstępu nie umniejszają pojedyncze literówki. Informacje zawarte w podrozdziale 4.12 dotyczące mapowania białka c-Fos w korze retrosplenialnej zasadniej byłoby przedstawić w dyskusji.

**Cele:** ich przedstawienie nie budzi większych zastrzeżeń, natomiast bardziej zasadne wydaje się sformułowanie celów behawioralnych i badających zaangażowanie struktur mózgu w procesy decyzyjne.

**Materiały i metody:** Robi wrażenie poziom użytych technik. W części behawioralnej zastosowano układ behawioralny zaprojektowany przez doktorantkę, który został stworzony w oparciu o konwencjonalny labirynt T. Zbudowano system w pełni automatyczny, wykorzystaniem wskazówek wizualnych, które były wyświetlane i zmieniały się. Szczegółowo opisano wymiary i wykonanie tego labiryntu, opisując również sposoby poruszania się zwierząt i automatyzacje narzędzia. Zrozumienie poszczególnych doświadczeń ułatwia duża liczba rycin przedstawiających zarówno schemat automatycznego labiryntu oraz jego zdjęcia. Opisano dokładnie schemat doświadczeń, habituację, nagrody stosowane w doświadczeniach. Wątpliwość budzi opis ryciny 8 w której zamiast określenia D' zamiast wskazówka indywidualna użyto punkt odniesienia.

Metody behawioralne zostały dokładnie opisane, zawierają one wiele szczegółów, w tym habituację do eksperymentatora oraz wzmocnienia apetytywnego. Opisano dokładnie procedury treningu oraz testowe.

Bardzo dokładnie została również opisana technika chemogenetyczna, służąca selektywnej, przejściowej inaktywacji kory retrosplenialnej. Wątpliwość może budzić odwoływanie się do alternatywnych metod, które przez autorkę, nie były wykorzystywane.

Do detekcji białka c-Fos użyto zaawansowanych technik obrazowania mózgow w mikroskopie. Brakuje informacji jaki to był mikroskop. Opisu techniki immunocytochemicznej mającej na celu wyznaczenie białka c-Fos jest niezwykle szczegółowy. Wybór narzędzi stosowanych w analizie statystycznej jest prawidłowy.

Przy opisie zwierząt korzystne byłoby podanie całkowitej liczebności zwierząt oraz liczby zwierząt użytych w poszczególnych doświadczeniach. Pojedyncze literówki i błędy interpunkcyjne nie umniejszają wartości tej części. Wątpliwość może budzić również fakt stosowania w poszczególnych eksperymentach myszy w różnym wieku. Wybór metod jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń.

**Wyniki:** W tym rozdziale zamieszczono wykresy przedstawiające otrzymane wyniki. Cenne jest to, że przedstawiono na nich wartości dla poszczególnych zwierząt w grupach eksperymentalnych. Niestety nie przedstawiono zdjęć analizowanych preparatów. Rozdział ten zawiera niepotrzebne treści między innymi bardzo szczegółowy wraz z rycinami opis prototypowych rozwiązań dotyczących oraz parametrów automatycznego systemu do badania pamięci przestrzennej u myszy m.in. podającego średnią prędkość drzwiczek. Cenny jest również fakt, że na podstawie dynamiki uczenia wyodrębniono dwie grupy myszy, szybko i wolno uczące.

**Dyskusja:** Dyskusja liczy 19 stron, zawiera liczne cytowania. Pojedyncze literówki i błędy interpunkcyjne nie zmniejszają jej wartości. Podzielona została na podrozdziały, które niestety nie zostały ponumerowane. W dyskusji zbyt szczegółowo omówiono behawioralny model umożliwiający badanie pamięci nawigacyjnej myszy zależnej od prezentowanych wskazówek przestrzennych. Po raz kolejny doktorantka podobnie jak we wstępie, metodach i wynikach przedstawiła wysoką wartość zastosowanego modelu. Przedstawione zostały zalety modelu w tym brak zależności decyzji nawigacyjnych myszy od pamięci roboczej. Przeprowadzone badania wykazały zdolność myszy do wykorzystania różnych strategii uczenia. Zostały przedyskutowane uzyskane wyniki, omówione szczegółowo dane literaturowe dotyczące znaczenia funkcjonalnego aktywowanych struktur w kontekście tej pracy. Zinterpretowano wyniki wskazujące na wysoką ekspresję białka c-Fos w obszarze CA1 hipokampa w czasie testów nawigacyjnych. Przedstawiono rolę kory retrospleniałnej w nawigacji, próbowano wyjaśnić rozbieżności dotyczące zaangażowania kory retrospleniałnej mierzonej poziomem gęstości komórek c-Fos pozytywnych, a jej czasową inaktywację. Dojrzałość doktorantki udowadnia fakt, że przedstawiając interpretację braku zaangażowania kory retrospleniałnej w nawigację opartą na prezentowanych bodźcach wzrokowych, przedstawia potencjalne doświadczenia, które mogą to wyjaśnić w przyszłości. Dostatecznie szczegółowo opisano rolę kory retrospleniałnej i hipokampa w pamięci przestrzennej.

Reasumując doktorantka zastosowała nowoczesne, zaawansowane techniki i otrzymała interesujące wyniki. Uważam, że w przedstawionej rozprawie założone cele zostały zrealizowane.

W związku z tym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska pani mgr inż. Edyty Balcerek 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)". W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego o dopuszczenie mgr inż. Edyty Balcerek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz jej wyróżnienie.

Dr hab. n. med. Aleksandra Wisłowska-Stanek

Warszawa, 31.03.2025

A. Wisłowska-Stanek