



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków, 07-09-2023

dr hab. Agnieszka Nikiforuk
Zakład Badań Nowych Leków
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12
31-343 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wardak zatytułowanej:

"Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej,"

Wykonanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN pod kierunkiem promotora - dr hab. Roberta Filipkowskiego oraz promotora pomocniczego – dr Krzysztofa H. Olszyńskiego

Dla szczurów, które w naturalnych warunkach tworzą stada, zachowania społeczne odzwierciedlają najistotniejszą z punktu widzenia gatunku sferę życia. Opisano u nich bardzo bogaty repertuar zachowań społecznych o ściśle sprecyzowanych funkcjach. Zachowaniom tym towarzyszy wokalna komunikacja, której interesującą cechą jest fakt, że większość produkowanych dźwięków jest wydawana w zakresie ultradźwięków. Zachodzący w ostatnich latach postęp metodologiczny pozwolił na dynamiczny rozwój badań nad wokalizacjami ultradźwiękowymi (USV). Dzięki dostępnym obecnie metodom możliwe jest wyodrębnienie różnych podtypów dźwięków i scharakteryzowanie ich struktury oraz kompozycji, co pozwala na bardziej wnikliwą analizę samej wokalizacji ultradźwiękowej oraz charakterystykę ewentualnych deficytów zachodzących w zwierzęcych modelach schorzeń takich jak np. zaburzenia ze spektrum autyzmu. Analiza emisji USV wydaje się skutecznym narzędziem do

badania zarówno patomechanizmów zaburzeń komunikacji społecznej, jak i poszukiwania potencjalnych strategii nakierowanych na ich normalizację. Dlatego też uważam temat podjęty przez Panią mgr Agnieszkę Wardak za niezwykle interesujący. Na uwagę zasługują też fakt, że pomimo znacznego rozwoju badań nad USV, nie wiele jest wiadomo o możliwościach wykorzystania wokalizacji w modelach opartych o warunkowanie instrumentalne.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Agnieszki Wardak ma charakter klasycznej rozprawy i obejmuje 118 stron. Zasadniczą część pracy poprzedza Spis treści, Streszczenie (po polsku i po angielsku), wykaz stosowanych skrótów oraz ujęta w pięciu punktach Innowacyjność rozprawy. Kluczowe rozdziały stanowią: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski oraz Piśmiennictwo obejmujące 100 pozycji. Praca zawiera także spis rycin (32), tabel (3) oraz tabel wchodzących w skład obszernego suplementu statystycznego (20). Praca jest starannie przygotowana pod względem edytorskim i językowym, a jej struktura jest zgodna z obowiązującymi wymogami.

We Wstępie Doktorantka w przystępny i uporządkowany sposób wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Pierwszy rozdział Wstępu dotyczy charakterystyki powstawania reakcji warunkowych z rozróżnieniem na warunkowanie klasyczne oraz instrumentalne. Autorka sugeruje, że proces warunkowania instrumentalnego można uprościć zastępując klasyczne *operandum* (np. dźwignię znajdującą się w klatce Skinnera) naturalną odpowiedzią szczura na niektóre bodźce – tj. emisją wokalizacji ultradźwiękowych. Kolejne rozdziały poświęcone są opisowi USV pasma 50 kHz i 22 kHz, a następnie nielicznym opisanym w literaturze próbom wykorzystania USV w warunkowaniu instrumentalnym. Autorka, przytaczając eksperymenty z użyciem USV jako bodźca w warunkowaniu instrumentalnym, konkluduje, że szczury są w stanie odróżniać od siebie prezentowane dźwięki na podstawie ich parametrów akustycznych, a zaprezentowane USV mogą wpływać na ich stan emocjonalny. Następnie Doktorantka charakteryzuje jedyny opisany w literaturze model warunkowania, w którym wykorzystuje się szczurze USV jako reakcje instrumentalne. Przy pomocy tego protokołu podejmuje się próby odwrócenia zmian w emisji USV, które mogą być traktowane jako odpowiednik deficytów komunikacji werbalnej ludzi. Uzasadnia to wykorzystanie takiego warunkowania w szczurzych modelach chorób związanych z deficytami komunikacji. Co jednak istotne, ten złożony i czasochłonny model wykorzystuje popęd seksualny szczurów (tj. łącznie ich z samicą w rui, a następnie bezpośredni lub pośredni kontakt z samicą) i przynosi efekty

stopniowo w ciągu kilku tygodni trwania treningów. Dlatego też Doktorantka podjęła ambitną próbę utworzenia nowego, uproszczonego protokołu warunkowania, wykorzystującego szczurze USV pasma 50-kHz jako reakcję instrumentalną. Kolejnym celem prowadzonych badań było opisanie długości oraz częstotliwości USV pojawiających się u szczurów w trakcie warunkowania. Kierując się częściowym niepowodzeniem podjętych badań, Doktorantka postanowiła również udowodnić, że zwierzęta są w stanie nabyć reakcje warunkowe w klasycznym protokole.

Rozdział Materiały i metody przedstawia przebieg przeprowadzonych eksperymentów w niezwykle szczegółowy sposób. Autorka charakteryzuje zwierzęta użyte w doświadczeniach oraz zastosowane klatki instrumentalne. Kolejno następuje dokładny opis szeregu protokołów doświadczalnych. Procedura warunkowania, w której wykorzystuje się szczurze USV jako reakcje instrumentalne, ujęta jest w siedmiu protokołach. Osobne protokoły dotyczą doświadczeń kontrolnych, w których zastosowano metodę warunkowania wykorzystującego jako reakcję instrumentalną wsadzanie nosa w otwór (protokół 8-10), czy też uczono zwierzęta rozróżniania dźwięków (protokół 11-12). Z uwagi na złożoność zastosowanych procedur i ilość wprowadzonych modyfikacji bardzo pomocne są tabele zawierające zestawienia poszczególnych protokołów. W sekcji metodologicznej znajduje się też opis analizy plików audio i wideo oraz zastosowanych metod statystycznych.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w usystematyzowany sposób na 24 rycinach opatrzonych szczegółowymi legendami. Wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych zostały zebrane w formie 20 tabel. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały, że niestety szczury nie uczą się wykorzystywać własnych wokalizacji ultradźwiękowych w celu zdobywania nagrody, a żadna z wprowadzonych modyfikacji nie przyczynia się do znaczących postępów w procesie uczenia. Szczury również nie nabywały umiejętności odpowiadania własnymi wokalizacjami na USV odtworzone z głośnika. W doświadczeniach kontrolnych wykazano, że te same zwierzęta są zdolne do nabywania reakcji instrumentalnej polegającej na wsadzaniu nosa w otwór. Szczury nie nauczyły się jednak rozróżniać od siebie dwóch prezentowanych dźwięków.

Pomimo niepowodzenia zastosowanych procedur, Autorce udało się wyodrębnić nieliczną grupę szczurów (20%) określonych jako „potencjalnie uczące się” (PU). W przeciwieństwie do szczurów „nieuczących się” (NU), w grupie PU czas sesji treningowej

ulegał skróceniu. Zwierzęta PU wokalizowały z większą częstością, a odsetek nagrodzonych USV rósł w kolejnych sesjach w stosunku do wszystkich emitowanych USV. Zwierzęta te emitowały większą liczbę dźwięków w pojedynczej serii. Autorka zaobserwowała także zmiany w parametrach akustycznych USV emitowanych przez szczury PU. Wraz z kolejnymi sesjami treningowymi, dźwięki te były nie tylko dłuższe, ale także emitowane z większą częstością. Szczury „uczące się” więcej czasu przebywały w bezpośrednim sąsiedztwie karmnika. Autorka kierując się powyższymi obserwacjami, stwierdza, że w tej grupie zwierząt zachodzą procesy uczenia, a uzyskane wyniki otwierają perspektywę na opracowanie bardziej skutecznego protokołu w przyszłości.

W rozprawie kluczową częścią jest sekcja Dyskusji, w której Doktorantka niezwykle biegle omawia zagadnienia związane z tematyką swojej pracy. Doktorantka nie tylko w krytyczny sposób interpretuje wyniki swoich badań, ale także wyczerpująco uzasadnia, jak jej badania wpisują się w obecny stan wiedzy. Spójna analiza wyników w kontekście rozległej literatury dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Mam kilka uwag, które jednak w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy.

Celem, a także elementem innowacyjnym pracy było opracowanie uproszczonego schematu uwarunkowania. Nasuwa się jednak pytanie, czy nie lepiej byłoby w pierwszej kolejności zastosować oryginalny protokół (choćby w wersji eksperymentu pilotażowego) oceniając tym samym czy opisywana reakcja w ogóle zachodzi w danych warunkach laboratoryjnych.

Wyniki przedstawione są w niezwykle skrupulatny sposób. Wydaje się jednak, że Autorka mogłaby uniknąć zbyt drobiazgowego podziału na grupy (np. NU-D1, NU-SGL, NU-CEN). Wpłynęłoby to w pozytywny sposób na przejrzystość prezentowanych wyników. W niektórych przypadkach liczebność tych grup jest niewielka (N=5), co może podważać sensowność analizy statystycznej. Zasadnicze wnioski są zresztą i tak wyciągane dla grup głównych (PU vs NU).

W jaki sposób była ustalana minimalna liczebność grupy konieczna do uzyskania istotnych statystycznie wyników. W przedstawionej pracy liczebność waha się od 8-20 szczurów (protokół 1-6). Nie jest wykluczone, że odpowiednie zwiększenie N mogłoby pozwolić na zaobserwowanie wpływu modyfikacji w zastosowanych protokołach.

Jakie znaczenie dla uzyskanych wyników miało użycie grupy kontrolnej CTR.

Opisując właściwości akustyczne analizowanych USV, warto by było także odnieść się do stopnia modulacji częstotliwości dźwięku (*bandwidth*).

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Wardak w pełni spełnia postawione cele. To osiągnięcie było możliwe dzięki konsekwentnej realizacji starannie przemyślanych badań. Na uznanie zasługuje również biegła analiza, interpretacja i dyskusja uzyskanych wyników. Fakt, że Doktorantce nie w pełni udało się ustalić protokół pozwalający na wykorzystanie szczurzych USV jako reakcji instrumentalnej, nie tylko nie umniejsza wartości pracy, ale sugeruje bardzo ambitny i nowatorski charakter podjętych działań. Przedstawione wyniki bardzo dobrze wpisują się we współczesny nurt badań nad wokalizacjami ultradźwiękowymi i wnoszą istotny wkład w rozwój tej dziedziny.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Wardak zatytułowana „Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej” spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Wardak do dalszych etapów przewodu doktorskiego wszczętego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.



Agnieszka Nikiforuk