



Warszawa, 19 wrzesień 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Agnieszki Wardak pt.:

Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Instytucie Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej

PROMOTOR: dr hab. Robert Filipkowski
PROMOTOR pomocniczy: Dr Krzysztof H. Olszyński

Pani Agnieszka Wardak uzyskała tytuł magistra - 29 czerwca 2015 r. na Uniwersytecie Warmińsko – Mazurskim w Olsztynie, nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora. Doktorantka uczestniczyła w realizacji 2 projektów naukowych, w tym jednego grantu NCN. W latach 2017-2022 odbyła 4 kursy i staże. Doktorantka jest współautorką 4 publikacji nie opartych na wynikach przedstawionej pracy doktorskiej, jest autorką/współautorką 4 doniesień zjazdowych.

2019 – 2022, interdyscyplinarne, stacjonarne studia doktoranckie „Rozwój i wykorzystanie metod bioinżynieryjnych i informatycznych w prewencji, diagnostyce i terapii chorób cywilizacyjnych – kompleksowy rozwój kompetencji zawodowych młodej kadry naukowej” – POWER Och!Dok; Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Pracownia Behawioralno-Metaboliczna, „Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej”, promotor: dr hab. Robert Filipkowski, promotor pomocniczy: dr Krzysztof H. Olszyński;

2017 – 2022, studia doktoranckie; Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Pracownia Behawioralno-Metaboliczna, „Wykorzystanie szczurzych wokalizacji ultradźwiękowych jako reakcji instrumentalnej”, promotor: dr hab. Robert Filipkowski, promotor pomocniczy: dr Krzysztof H. Olszyński;

2014 – 2015, studia podyplomowe; Collegium Humanitatis, „Psychologia zwierząt – zagadnienia podstawowe i aplikacyjne”;

2013 – 2015, studia magisterskie; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Wydział Biologii i Biotechnologii, Biotechnologia, specjalizacja: biotechnologia molekularna, „Pasożyty wewnętrzne piskląt kormorana czarnego *Phalacrocorax carbo sinensis* L. 1758.”, Katedra Zoologii, promotor: dr hab. Janina Dziekońska – Rynko, prof. UWM);

2010 – 2013, studia licencjackie; Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Przyroda, „Aktywność dobową kormorana *Phalacrocorax carbo sinensis* w okresie budowy gniazda i inkubacji”, Pracownia Ekologii i Etologii Kręgowców, promotor: dr Michał Goc).

Dane dotyczące doktorantki podano na podstawie informacji dostarczonych przez Dział Organizacji Badań Naukowych IMDIK.

W badaniach podstawowych uczymy zwierzęta wykonywania różnych zadań. Można szczura nauczyć, że jak zajrzy do otworu lub naciśnie dźwignię to dostanie nagrodę. Psa można nauczyć, że jak szczeknie, to dostanie smakołyk. Wiadomo, że zwierzęta, w tym gryzonie porozumiewają się w pasmie ultradźwiękowym. Spodziewano się, że uda się wytworzyć u szczura asocjację między „zawołaniem” w tym pasmie a nagrodą pokarmową. Celem badań było zaprojektowanie protokołu warunkowania instrumentalnego wykorzystującego szczurze USV 50 kHz jako obserwowane reakcje i charakterystyka USV pojawiającego się u szczurów w trakcie treningów. W prezentowanej rozprawie u 80 % szczurów to się nie udało mimo usilnych starań. Być może 20% jest w stanie nauczyć się takiej reakcji instrumentalnej. W prezentowanych badaniach wiele uwagi poświęcono próbie zrozumienia czy rzeczywiście można to osiągnąć i dlatego tylko u 20%.

W pracy jest sporo drobnych literówek. Z ważniejszych: str 48 ryc. 14c na osi x powinno być dzień testu; str 51 ryc. 16 użyto oznaczeń PL i NL zamiast PU i NU

Popelniono pewne błędy w cytowaniu literatury np.: niezgodnie z wynikami cytowanej pracy Burgdorf i wsp. 2001 we wstępie napisano, że podanie morfiny wywołuje wzrost częstości 50 kHz USV. Morfina raczej hamuje emisję USV, natomiast szczury wokalizują w reakcji na kontekst podawania morfiny patrz też Hamed i wsp. (2012) DOI: 10.1016/j.bbr.2012.01.053.

Odnośnie opisów w rozdziale Materiały i metody: proszę o wyjaśnienie:

Str 26: Dlaczego dla I test trwał 5 min a dla II 10 min?

Str 32: Protokół 7: Jak odróżniano USV będące odpowiedzią od USV emitowanego i pozostałych USV? Czy można wykluczyć pomylenie odpowiedzi USV z innymi USV? Proszę o podanie szczegółów nagradzania, tzn. jak udostępniano nagrodę itp.

Str 34. W warunkowaniu instrumentalnym z użyciem otworu na nos wykorzystano szczury (32+4 WAR i 8 CTR) z doświadczeń 2, 5, 6, 7 w których brało udział 56 WAR i 8 CTR. Jakie były kryteria wyboru szczurów WAR? Jaki był wśród nich odsetek PU i NU?

Odnośnie rozdziału Analiza statystyczna:

Czy wszystkie badane parametry miały rozkłady nie normalne? Czy próbowano je normalizować np. przez logarytmowanie, pierwiastkowanie itp.?

Wyniki

Mimo, że doktorantka analizowała otrzymane wyniki bardzo dociekliwie (32 ryciny, 20 tabel) w trakcie czytania tego rozdziału nasunęły mi się dodatkowe pytania:

Str 41 ryc. 9 W którym z protokołów 1-6 szczury najczęściej wokalizowały? W badanym układzie doświadczalnym są różne związane z procedurą czynniki, które mogły indukować emisję USV: (i) przerwanie izolacji (udział w doświadczeniu, kontakt z eksperymentatorem) i pozytywnie się kojarzący kontekst klatki pomiarowej; (ii) mająca na celu zwiększenie wokalizacji „pozorowana” obecność innego szczura (USV z głośnika, ściółka) oraz ewentualnie (iii) same nagrody. Z moich obserwacji wynika, że odpowiedź 50 kHz USV na kilka czynników nefarmakologicznych nie sumuje się, że jest efekt sufitowy. Uważa się, że zapach innego szczura i playback zwiększają wokalizację. Czy wprowadzenie czynników (ii) (protokoły 4-6) zwiększyło intensywność wokalizacji? Czy też było porównywalne z samym (i) (protokoły 1-3)? Czy nagrody same w sobie mogły wywoływać wokalizację? Doktorantka cytuje pracę Browning i wsp. 2011, której autorzy piszą, że cukier indukuje emisję USV. Na podstawie obserwacji z naszego laboratorium uważam, że szczury wokalizują w odpowiedzi na kontekst a nie na cukier. Proszę zwrócić uwagę, że w cytowanej pracy Browning nie wygaszano reakcji na kontekst (odnośnie wokalizacji w reakcji na kontekst tzw. anticipation USV i znaczenia jej wygaszania patrz Kuchniak i wsp. 2019, doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112187).

Jak wyglądają zmiany w czasie wokalizacji szczurów w poszczególnych treningach? Czy w jakimś przedziale czasu występuje maksimum? Czy jego położenie się zmienia w kolejnych treningach? Czy szczury otrzymujące 30 nagród wokalizowały więcej? Czy zmiany częstości wokalizowania w czasie były podobne do tych z protokołów 1-3? Zwiększenie dostępnej liczby nagród (protokół 4) powoduje spadek odsetka uzyskiwanych nagród. Czy przyczyną może być nasycenie i w konsekwencji utrata zainteresowania nagrodą? Czy suma uzyskiwanych nagród była większa niż w protokołach 1-3? Nie zauważyłam analizy USV dla szczurów CTR. Czy wokalizacja szczurów CTR zmieniała się między poszczególnymi treningami i protokołami? Czy różniła się między WAR i CTR? Czy treningi powodowały zróżnicowanie poziomu wokalizacji

między CTR i WAR? Czy wokalizacja i zmiany jej charakterystyki (częstość, długość, częstotliwość itp.) w poszczególnych protokołach różniły się między CTR i WAR?

Protokół 7: Szczury, które dostawały nagrodę tylko wtedy kiedy odpowiadały emisją USV na USV z głośnika dostały mniej nagród niż szczury z pozostałych protokołów. Jaki był stosunek liczby USV emitowanych w odpowiedzi na USV z głośnika do liczby wszystkich USV emitowanych w tej grupie? Czy szczury te wokalizowały z podobną intensywnością jak te z protokołów 1-6? Czy USV emitowane w odpowiedzi miały charakterystykę podobną do tych nadawanych z głośnika? Czy w tym badaniu były różnice w częstości wokalizacji między CTR i WAR? Oczekiwano, że szczur będzie odpowiadać na wokalizację innego szczura. Czy mamy pewność, że gryzonie odpowiadają wokalizacją na wokalizację? A może wokalizacja jest to przekaz tylko w jedną stronę? Przecież na ostrzeżenie USV 22 kHz gryzonie (chyba?) nie odpowiadają ultradźwiękiem. Może wokalizacja w reakcji na 50 kHz USV to nie jest odpowiedź na USV innego szczura ale wyrażenie pozytywnej emocji na niesiony przez USV przekaz: „inny szczur jest w pobliżu”?

str 53: Ryc 17. Podano liczbę USV/min dla poszczególnych grup. Ale trening kończył się po uzyskaniu maksymalnej liczby nagród, więc w tych grupach, w poszczególnych dniach dla poszczególnych szczurów był różny czas treningu. Czy również był różny czas pomiaru? Intensywność wokalizacji na ogół zmienia się dynamicznie w czasie (patrz poprzednie pytanie o przebieg w czasie intensywności wokalizacji, patrz np.: Kuchniak i wsp., 2019). Jak na różnice między PU-SUM i NU-SUM wpływa czas treningu/pomiaru?

Str 68 Na ryc. 26 porównano czas przebywania szczurów PU w różnych strefach. Dlaczego nie ma takiej analizy dla szczurów NU? Jak się one zachowywały? Na ryc. 28 jest porównanie między PU i NU-D1 dla 1. sesji treningowej. Czy dla 7 i 14 było podobnie? Czy dla innych NU wyglądało tak jak dla NU-D1?

Ryc. 30. 35% szczurów uznano za ostające. To ponad 1/3, to bardzo dużo. Czy to były szczury z doświadczenia 5 czy 6? Czy wyróżniały się czymś w tamtych doświadczeniach? Może raczej należało ten zabieg opisać jako analiza dla wydzielonej grupy a nie analiza po odrzuceniu odstających?

Str 44: Szczury wykazują duże różnice indywidualne w skłonności do wokalizacji. Jak doktorantka zauważyła, być może, gdy szczury dużo wokalizują zdobywają dużo nagród bez związku z uczeniem się. Szczury PU dostawały więcej nagród, bo więcej wokalizowały. Dlatego, że należały do wysoko wokalizujących? Ale jak słusznie zauważono, szczury NU-D1 dużo wokalizowały i dostały dużo nagród w czasie 1. sesji treningowej, tyle co PU-MAX. Ale potem nie. A szczury PU-PROG na początku wokalizowały umiarkowanie a potem dużo. Bo zarówno szczury wysoko jak i nisko-wokalizujące nie są jednorodnymi grupami? W protokole 3 i u szczurów NU-D1 odsetek uzyskanych nagród sukcesywnie maleje, zmiany te przypominają wygaszanie. Czy różnice między 1 i ostatnim treningiem były statystycznie znamienne? Czy to dlatego, że „rozczarował” je pierwszy trening? Czy to tolerancja na nagradzające czynniki w doświadczeniu? Czy szczury uczą się (powoli), że zapach i dźwięk wcale nie oznaczają towarzystwa kolegi i wygasa efekt „pozorowanego szczura” (ściółki i USV)? Czy może wiąże się to z tym, że potrzebny do wywołania USV wzrost uwalniania dopaminy w jądrze półleżącym obserwuje się tylko przy pierwszej emisji USV z głośnika (Willun i wsp., 2014)? U PU intensywność wokalizacji i uzyskiwanych nagród mogła wzrastać z czasem (ryc. 12.B) z powodu uczenia się, że za emisję USV jest nagroda. Albo USV wzrastało z powodu reakcji na związany z nagrodą kontekst (PU). Ze wzrostem intensywności wokalizacji wzrastała liczba nagród, kontekst stawał się coraz bardziej nagradzający.... Ciekawe jakby PU zachowywały się gdyby były

nagradzane tylko za odpowiedź na emitowane z głośnika USV. Grupa z protokołu 7. nie miała odpowiedniej liczebności by to ocenić.

Str 91, Ryc. 17 tab. S7. Wnioski dotyczące zmian częstości wokalizowania powinny być wyciągane ostrożniej. W przypadku NU wydaje się, że spadek dotyczy NU-D1, które stanowią tylko około 28% i jest on związany z wysoką w tej podgrupie wokalizacją podczas pierwszego treningu.

Wiele z postawionych przeze mnie pytań wykracza poza cele tej pracy, niektóre z nich zostały zadane prowokacyjnie, być może odpowiedź na nie przyczyni się do zrozumienia niektórych zagadnień związanych z używaniem USV przez gryzonie. Ciekawa byłaby (w kolejnych badaniach) charakterystyka zarówno behawioralna (lękliwość, podatność/oporność na stres, wrażliwość na nagrody naturalne i narkotyki w tym ocena samo podawania, sensytyzacji lub CPP) jak i neurobiologiczna podgrup NU i PU.

Str 93. Przypuszczenia autorki, że izolacja może prowadzić do zwiększenia intensywności wokalizacji w odpowiedzi na przyjemne bodźce są słuszne. Z moich obserwacji wynika, że szczury trzymane pojedynczo udział w eksperymencie lub kontakt z przyjaznym eksperymentatorem traktują jako nagradzający, doświadczenia z użyciem ticklingu też są robione na mieszkających pojedynczo szczurach. Rozpatrywane trzymanie zwierząt grupowo jest korzystne ze względu na podobieństwo do naturalnych warunków bytowania. Obawiam się jednak, że będą bardzo słabo wokalizowały.

Ultradźwięki 50 i 22 kHz są rozróżniane, w cytowanej pracy Saito szczury rozróżniały dźwięki w zakresie słyszalnym,. W prezentowanym badaniu szczury nie rozróżniały ultradźwięków 55,1 i 78,1 kHz. Czy niepowodzenie wynika ze zbyt krótkiego treningu czy może z tego, że użyte tu ultradźwięki należące do pasma apetytywnego 55,1 i 78,1 kHz mają bardzo podobny przekaz? Ciekawe, czy badane tu szczury rozróżniałyby dźwięki słyszalne, takie jak zastosowane przez Saito. Zastanawiający jest bardzo długi czas (kilka-kilkanaście m-cy) uczenia się reakcji instrumentalnych związanych z USV opisywany w cytowanych przez autorkę publikacjach. Czy to na pewno jest uczenie? Znowu powraca pytanie czy one uczyły się, czy uzyskiwały nagrody bo bardzo intensywnie wokalizowały? Ciekawe jak zmienia się częstość wokalizacji u CTR podczas kilku miesięcznego udziału w doświadczeniu. Czy NU nauczyłyby się po 12 miesiącach (jak w cytowanych pracach)? Nie wiemy. Jakie mogą być tego przyczyny tak długiego czasu? Dodam, że ja nie mam pojęcia. Z drugiej strony szczury PU uczyły się bardzo szybko... Czy znane są przypadki uczenia się innych reakcji instrumentalnych, które by trwało by aż tak długo?

Jak wokalizowały szczury CTR? Czy możliwe jest wyodrębnienie wśród nich (n=36) szczurów dużo i mało wokalizujących i prześledzenie, czy w trakcie doświadczeń zachodzą zmiany w częstości wokalizowania i we właściwościach USV w tych dwóch podgrupach? Mogłoby to być pomocne w eliminacji możliwości, że dotyczące PU zmiany wokalizacji są związane z tym, że w większości należały one do wysoko wokalizujących oraz że sama wielotygodniowa procedura zmienia wokalizację.

Str 106 Autorka wspomina w dyskusji, że emisja USV wiąże się raczej z emocjami niż ze zdobywaniem nagrody. Wydaje się, że jest to jeszcze jeden powód, dla którego osiągnięcie celu było trudne: Szczurom, u których chcemy wywołać USV farmakologicznie podajemy np. amfetaminę. W uproszczeniu wygląda to tak, że amfetamina uruchamia neurobiologiczne „mechanizmy przyjemności”, tzn. aktywuje układ nagrody i szczury emitują 50 kHz USV. Szczury, u których chcemy wywołać wokalizację „nie chemicznie” są najczęściej trzymane pojedynczo. Tickling, „atrakcja” typu kontakt z eksperymentatorem, obecność innego szczura

(zapach, USV), czyli wszystko co „przeciwdziała samotności” jest dla nich przyjemne, aktywuje układ nagrody, czego skutkiem jest emisja 50 kHz USV. W opisanych powyżej sytuacjach wokalizację poprzedza aktywacja układu nagrody wraz z neurochemicznymi konsekwencjami. Celem prezentowanej pracy było doprowadzenie do sytuacji, w której szczur wyemituje USV i w zamian za to dostanie nagrodę. Czyli odwrócenie kolejności. Czy do emisji 50 kHz USV nie są konieczne pewne zmiany neurobiologiczne, czy nie musi jej poprzedzić „przyjemność” aktywująca układ nagrody? Czy wokalizacja jest możliwa bez uprzedniej aktywacji układu nagrody? Czy sama motywacja do otrzymania nagrody może aktywować układ nagrody? Czy zatem szczur odpowiada USV na słyszane USV czy wyraża przyjemność? Czy możliwe jest zatem nauczenie szczura by emitował USV „na życzenie”? Ale 15 spośród 76 szczurów się uczyło. Przynajmniej robiło takie wrażenie. Doktorantka nazywa je PU. Bardzo pochwalam tę ostrożność. Recenzja tej pracy była ciekawa ale jednocześnie była dużym wyzwaniem. Śledząc analizę prezentowanych wyników, podobnie jak przy analizie swoich danych dotyczących USV, miałam wrażenie, że jest to, mimo licznych doświadczeń kontrolnych, rozwiązywanie układu 3 równań z 4 lub więcej niewiadomymi. Mimo coraz większej wiedzy dotyczącej USV nadal mamy duże braki, cały czas coś nam umyka. Część tej recenzji jest próbą włączenia się w dyskusję, zadałam dużo pytań, które nasunęły mi się podczas czytania. Tylko na niektóre można odpowiedzieć na podstawie danych uzyskanych w przeprowadzonych doświadczeniach, odpowiedź na pozostałe wydaje się wymagać kolejnych badań.

Bardzo ciekawą obserwacją jest to, że tylko 20% szczurów wykazuje zdolność (potencjalną) do uczenia się (szczury PU). Należy zwrócić uwagę, że wiele z zaburzeń dotyczących OUN obejmuje 10-20% populacji. Np.: spośród osób mających kontakt z substancjami psychoaktywnymi uzależnia się tylko 10-20 % a reszta może brać bezkarnie. Wiadomo również, że przeważająca część populacji spotyka się z traumatycznymi zdarzeniami w ciągu życia i tylko u około 10% wywołują one zaburzenia typu depresji czy PTSD a u pozostałych zwiększają odporność i zdolność do przewycięzania trudności w przyszłości. Wiele wiemy na temat neurobiologicznych mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń OUN ale prawie nic o tym, dlaczego ten sam bodziec u jednych wywołuje ciężkie zaburzenia a u innych prowadzi do zwiększenia odporności. W wielu badaniach prowadzonych na grupie 10 szczurów, co jak na badania podstawowe jest liczną grupą, te 10-20%, czyli 1-2 szczurów może odzwierciedlać reakcję patologiczną lub predyspozycje do niej. Jeżeli wyniki dla tych szczurów odstają, często zgodnie z regułami analizy statystycznej odrzucamy je, tym samym pozbawiamy się możliwości oceny grupy potencjalnie podatnej na patologie takie jak na przykład te wymieniane przez doktorantkę (schizofrenia, parkinsonizm, autyzm). Polecam pracę Caretto i wsp. 2021 doi.org/10.1523/ENEURO.0033-21.2021 zwracającą uwagę na to zagadnienie.

Doktorantka rozważa preselekcję szczurów ze względu na ich skłonność do wokalizacji. Chciałam zwrócić uwagę, że ocenianie szczura na podstawie jednego pomiaru wokalizacji nie musi być miarodajne. Wright i wsp. (2010) chcąc opisać typy USV musiała oprzeć badania na szczurach wokalizujących. By je wybrać dokonywała selekcji na podstawie 3 pomiarów robionych w ciągu 5 dni. Wydaje się jednak, że badania powinny być prowadzone na całej grupie, ponieważ to zwiększa szanse, że obejmie ona osobniki nie tylko z tak zwanej normy ale też te podatne na rozwój patologii, które być może stanowią tylko niewielki odsetek populacji (patrz wyżej). Preselekcja może uniemożliwić nam zauważenie odmienności związanej z patologią. Z tego powodu wydaje się, że lepszym wyjściem jest nie preselekcja szczurów a ich scharakteryzowanie behawioralne przed rozpoczęciem treningów oraz behawioralne i neurobiologiczne po zakończeniu badań, co może rzuciłoby światło na przyczyny różnicowania, które być może leżą

u podstaw niektórych zaburzeń. Ujawnienie takich różnic wymaga jednak badań na dużych grupach.

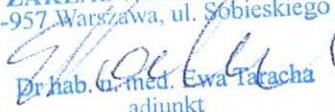
Podsumowując:

Praca ma typowy układ, wyniki przedstawiono na 32 starannie opracowanych rycinach, wyniki odpowiednio dobranych analiz statystycznych umieszczono w 20 tabelach. Praca liczy 118 stron, 8 rozdziałów, piśmiennictwo jest obszerne i wyczerpująco omawia/dyskutuje zagadnienia związane z prezentowanymi badaniami. Cele zostały jasno określone. Wybór metod badawczych jest adekwatny do założonych celów. Na obecnym etapie otrzymane wyniki nie pozwalają na praktyczne zastosowanie. Brakuje analizy grup CTR. Prezentowana rozprawa stanowi oryginalne badanie dotyczące wykorzystania USV jako reakcji instrumentalnej. Wstęp oraz omówienie i dyskusja wyników wskazują na znajomość badanej dyscypliny. Sposób przeprowadzenia badań i interpretacja wyników wskazują na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań.

Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630)". W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Wardak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Mimo, że doktorantka stwierdza, że nie udało się osiągnąć założonego celu, mimo, że postawiłam dziesiątki dodatkowych pytań, bardzo wysoko oceniam zaangażowanie w poszukiwanie efektywnych rozwiązań poprzez wprowadzenie wielu dodatkowych protokołów. Również uznanie budzi dociekliwość w interpretacji wyników obejmująca setki analiz statystycznych. Za szczególnie interesujące uważam połączenie nieróżniących grup, co umożliwiło analizę większej niż zazwyczaj jest to dostępne liczby szczurów i w konsekwencji doprowadziło do ujawnienia ciekawych obserwacji. Dlatego wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

Dr hab. n. med.
Ewa Taracha
Instytut Psychiatrii i Neurologii
ZAKŁAD NEUROCHEMII
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9

Dr hab. n. med. Ewa Taracha
adiunkt

