



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii
Prof. dr hab. Jerzy Mozrzyk – Kierownik jednostki

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Szymańskiej pt. „Udział receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza”

Badania nad funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego odbywały się w zasadzie od samego początku na wielu różnych poziomach. Niezwykle fascynujące było odkrycie właściwości elektrycznych pojedynczych neuronów kontekście np. ich pobudliwości czy mechanizmu komunikacji między komórkami nerwowymi za pośrednictwem transmisji synaptycznej. Odkryciom tym towarzyszyły obserwacje, że funkcjonowanie neuronów przekłada się na aktywność sieci neuronalnych, która jest czytelna dla eksperymentatora przy pomocy klasycznych technik takich jak np. EEG. Jedną z pierwszych obserwacji było opisanie rytmicznej aktywności tkanki mózgowej. Zrozumienie relacji pomiędzy aktywnością pojedynczych neuronów a zdolnością do generacji przez sieci neuronalne określonych rytmów pozostaje wielkim wyzwaniem w neurobiologii. Wyzwanie to nabiera szczególnego znaczenia gdy zaczęto sobie uświadamiać, że procesy kognitywne takie jak kodowanie czy odczytywanie śladów pamięciowych realizowane są przez duże sieci neuronalne gdzie zapisywane są lub modyfikowane tzw. engramy będące fizyczną reprezentacją pamięci. Engramy bywają „rozsiane” na dużych obszarach mózgowia obejmujących różne jego elementy, którym przypisywane są różne funkcje. Jednym z przełomowych odkryć było dostrzeżenie korelacji pomiędzy procesami kognitywnymi, w tym formowania i odczytywania pamięci, a pojawianiem się rytmów mózgowych. W rzeczy samej, odczytywanie i modyfikowanie rozległych engramów lub zespajanie informacji związanych z różnymi modalnościami, analizowanymi przez różne ośrodki w mózgu, w jeden percept nie byłoby możliwe bez generacji aktywności oscylacyjnych w rozległych sieciach neuronalnych. Mając to na uwadze, niezwykle ważne stały się dwa aspekty badań: jak poszczególne rytmy mózgowie korelują z poszczególnymi funkcjami mózgu oraz jakie są mechanizmy generacji tych rytmów na poziomie lokalnych i globalnych sieci neuronalnych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się zatem w niezwykle ważką tematykę badawczą. Charakteryzowane są rytmy theta na poziomie sygnałów polowych jak również właściwości neuronów wchodzących w skład sieci neuronalnej generującej ten rytm. Co godne szczególnej uwagi, rozprawa dotyczy generacji rytmów theta nie w obszarach mózgowia w sposób oczywisty zaangażowanych w funkcje kognitywne (jak np. kora i hipokamp) ale w podwzgórzu, które pełni szczególną rolę w regulacji procesów fizjologicznych kontrolujących homeostazę organizmu. W tym aspekcie temat rozprawy jest nowatorski i poznawczo bardzo ciekawy. Doktorantka podjęła się scharakteryzowania rytmów theta wywołanych stymulacją glutaminianergiczną stosując różne typy agonistów: kainian, AMPA i NMDA. Badania te poszerzono o zbadanie wpływu aktywacji receptorów kortykosteroidowych na obserwowane rytmy theta. Jest to ciekawe zagadnienie, ubogacające tą rozprawę, albowiem receptory kortykosteroidowe pełnią ważne funkcje związane z aktywacją osi podwzgórze-przysadka-nadnercza.

Wstęp opisuje w dość zwięzły sposób szereg zagadnień dotyczących tematu rozprawy rozpoczynając od krótkiego rysu historycznego i od wymienienia obserwowanych w mózgu oscylacji. Warto dodać, że klasyfikacja ta nie kończy się na rytmach gamma – są jeszcze na przykład wysokoczęstotliwościowe tzw. wyładowania fali ciągłej (sharp wave ripple), które służą do transferu informacji o aktywności w

hipokampie do kory mózgowej. Bardzo przydatny jest podrozdział o wstępującym układzie synchronizującym, w którym wskazano poszczególne obszary mózgowia zaangażowane w generację rytmu theta. W związku z tym, że najwięcej informacji o rytmie theta została uzyskana na badaniach formacji hipokamplanej wydaje mi się, że podrozdział „rytm theta w hipokampie” można było nieco rozbudować omawiając trochę szerzej rolę tego rytmu w procesach kognitywnych oraz udział poszczególnych typów neuronów pobudzających i hamujących w generacji tego rytmu. W szczególności, o roli hamowania GABAergicznego w generacji rytmów theta (i innych) dowiedzieliśmy się w ostatnich dwóch dziesięcioleciach naprawdę bardzo dużo, pozwalając na ugruntowanie poglądu, że to właśnie hamowanie GABAergiczne pełni kluczową rolę w generacji rytmów mózgowych i w kształtowaniu różnych procesów kognitywnych, regulowanych przez te rytmy. Mam jednak świadomość, że piszę tą uwagę z pozycji neurobiologa, który większość swojego naukowego życia poświęcił właśnie hamowaniu GABAergicznemu. Doktorantka poświęca zresztą część wstępu choć faktycznie niemal nie nawiązuje do hamowania GABAergicznego. Najobszerniejszą część wstępu dotyczącą różnych aspektów generacji rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza oceniam wysoko – znajdują się tam niezbędne informacje dotyczące samego tematu rozprawy jak również szeroki kontekst dotyczący tego tematu. W szczególności, dość szczegółowo zostało omówione zagadnienie obszaru tylnego podwzgórza jako niezależnego generatora rytmu theta, co otwarło drogę do badań zaprezentowanych w ocenianej rozprawie. Odnośnie wstępu mam jeszcze uwagę dotyczącą braku omówienia w tym rozdziale kwestii roli receptorów kortykosteroidowych w mózgu ze szczególnym uwzględnieniem ich obecności i funkcji w podwzgórzu. Brak tych informacji sprawia, że czytelnik przystępuje do lektury podrozdziału 4.3 o wpływie pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta bez odpowiedniego wprowadzenia i uzasadnienia celowości podjęcia tych badań. Podrozdział ten został umieszczony natomiast w dyskusji choć zawierał on w niewielkim stopniu typowe dla Dyskusji omówienie własnych wyników na tle informacji literaturowych. To przedstawienie tego podrozdziału stanowi dość istotny błąd edytorski. Cele pracy zostały zaprezentowane bardzo klarownie a ich podział jest pomocny w dalszej lekturze rozprawy.

Metodologia badań przedstawiona w rozdziale „Materiały i Metody” została opisana w sposób bardzo klarowny i generalnie nie mam tutaj zastrzeżeń a co najwyżej kilka pytań. W szczególności metoda pomiarów elektrofizjologicznych potencjałów zewnątrzkomórkowych była stosowana przez łódzką grupę badawczą od bardzo długiego czasu i stanowi kanon tej klasycznej techniki. Na str. 48 mowa jest o perfuzji „związkami farmaceutycznymi” co stanowi oczywiste przejęzyczenie. Odnośnie filtrowania sygnału rejestrowanego z pojedynczych neuronów mowa jest o filtrze górnoprzepustowym o częstotliwości odcięcia 300 kHz a podejrzewam, że rzeczywista wartość częstotliwości odcięcia to albo 300 albo 3000 Hz. Filtrowanie z częstotliwością odcięcia dużo większą niż częstotliwość próbkowania byłaby niecelowa. Bardzo klarowne jest zaprezentowanie w tym rozdziale protokołów doświadczalnych i grup badawczych, które powiązano z celami badawczymi opisanymi uprzednio. Mam kilka pytań odnośnie stężeń poszczególnych czynników zastosowanych w doświadczeniach i zaprezentowanych w tabeli 1 na str. 45. Podane w tej tabeli stężenia wydają mi się bardzo wysokie. Przykładowo, stężenie 20 μM NMDA podane na krótki okres czasu (minuty) indukuje zjawiska plastyczne zmieniające funkcje synaps. Spotkałem się z doniesieniami, że powyżej 100 μM NMDA może być toksyczne dla neuronów. Podobnie, spotykane w literaturze stężenia dla pozostałych czynników wymienionych w tabeli 1 są zazwyczaj dużo niższe. 100 μM AMPA to stężenie quasi wysycające. Jakimi przesłankami kierowała się Doktorantka wybierając takie stężenia w swoich doświadczeniach? Czy podczas rejestracji np. w obecności roztworu zawierającego NMDA obserwowano jakieś zmiany mogące świadczyć o zjawiskach plastycznych lub o toksyczności? Pytania te wydają się zasadne w szczególności dlatego, że preparaty są perfundowane roztworami zawierającymi ww. czynniki w wymienionych w tabeli 1 stężeniach przez długi okres czasu, więc wokół neuronów takich właśnie stężeń należy się spodziewać. Przez jak długi okres czasu trwała perfuzja określonego skrawka mózgowego podczas jednego doświadczenia? Na str. 59 mowa jest o „przynajmniej 30 min” obecności oscylacji – czy obserwacje były prowadzone dużo dłużej? A propos

stężeń mam jeszcze pytanie związane ze stężeniem kainianu: w tabeli 1 mowa jest o stężeniu 2 μM , ale na ryc. 7 przykładowe wyniki są prezentowane dla stężenia 3 μM .

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawia w sposób systematyczny i klarowny rezultaty swoich badań uzyskanych według opisywanego w poprzednich rozdziałach schematu. Ważne informacje dające ogólny ogląd otrzymanych wyników zostały podsumowane w tabeli 2 na str. 57. Jak wynika z tej tabeli wywołanie rytmu theta powiodło się przy aplikacji wszystkich agonistów receptora glutaminianu za wyjątkiem AMPA oraz, że kortykosteron wzmacnia ten rytm (gdy jest wywołany przez kainian). Obserwowane rytmy theta były charakteryzowane pod kątem częstotliwości, amplitudy i mocy dominującego pasma. W tabeli 3 przedstawiono wartości liczbowe dla kainianu i NMDA. Dla większej informatywności można było zaznaczyć np. gwiazdkami, które z przedstawionych parametrów były istotnie różne. Nie ma to jednak większego znaczenia gdyż tej statystyce poświęcono kolejny rozdział i jej wyniki przedstawiono na ryc. 10. W dalszej kolejności zaprezentowano wyniki dotyczące aktywności elektrofizjologicznej pojedynczych neuronów. Atutem tych pomiarów jest dostarczenie jednocześnie informacji dotyczącej potencjału połowego i zewnątrzkomórkowej aktywności pochodzącej od pojedynczych neuronów. Do opisu periodyczności aktywności pojedynczych neuronów zastosowano analizę autokorelacji i korelacji wzajemnej (krzyżowej). Dodatkowo dokonano podsumowania odnośnie liczby poszczególnych typów neuronów (NR, n. chronometryczne, n. theta-on fazowe) dla preparatów, w których rytmy theta wzbudzano kainianem lub NMDA. Wyniki te są interesujące, ich rejestracja i analiza zostały wykonane starannie i wnoszą nowe informacje dotyczące neuronów biorących udział w generacji rytmu theta w tylnym obszarze podwzgórza. Niezwykle interesujące byłoby rozwinięcie tych badań w kierunku identyfikacji neuronów NR, n. chronometryczne, n. theta-on fazowe pod kątem typów komórek nerwowych: czy są to określonego typu neurony glutaminianergiczne lub GABAergiczne i jakiego podtypu? Może Doktorantka ma tutaj już jakieś informacje lub hipotezy dotyczące pełniejszego określenia tożsamości wspomnianych neuronów? Ciekawym uzupełnieniem zaprezentowanych w rozprawie wyników jest przedstawienie rezultatów doświadczeń, w których stwierdzono wzmocnienie rytmów theta wywołanych kainianem poprzez podanie kortykosteronu. Stwierdzono, że kortykosteron istotnie wzmacnia te oscylacje zwiększając ich amplitudę i moc jednakże nie mając wpływu na ich częstotliwość.

Ostatnim rozdziałem rozprawy jest obszerna dyskusja. Na początku Doktorantka dokonuje podsumowania dla każdego z celów rozprawy komentując efekty przeprowadzonych badań. Ocena ta, zgadzam się tutaj z Doktorantką, wypada jak najbardziej pozytywnie. Uzyskano interesujące pozytywne wyniki będące jednocześnie pozytywną weryfikacją postawionych hipotez. Wydaje się, że najważniejszym wnioskiem wpływającym z realizacji postawionych celów było stwierdzenie, że agoniści receptorów glutaminianu (poza AMPA) stanowią bodziec wywołujący rytmy theta w obszarze tylnego podwzgórza. Co więcej, oscylacjom tym towarzyszy aktywność neuronalna w różnych typach neuronów, które Doktorantka zakwalifikowała, jak już wspomniałem, jako n. NR, n. chronometryczne, n. theta-on fazowe. Jest to wynik interesujący gdyż receptory glutaminianu dość licznie występują w tej formacji. Na str. 81 w zdaniu dotyczącym tej informacji stwierdzono, że receptory te są „sporadycznie rozmieszczone w szczurzym podwzgórzu”, co wymaga redaktorskiej korekty. Obserwacja, że NMDA jest czynnikiem wzbudzającym rytmy theta a AMPA nie, jest jednocześnie interesujące i intrygujące. Klasyczny pogląd na wzbudzenie synapsy glutaminianergicznej jest taki, że to właśnie aktywacja receptorów AMPA jest czynnikiem aktywującym receptory NMDA poprzez uwolnienie tych ostatnich od bloku magnezowego dzięki lokalnej depolaryzacji. Choć przedstawione w rozprawie wyniki nie pozwalają na jednoznaczne wskazanie mechanizmu wzbudzania rytmów theta przez kainian i NMDA to jednak bardzo byłbym ciekaw jakie Doktorantka ma przemyślenia dotyczące roli receptorów glutaminianu w tym procesie i w szczególności skąd się bierze ta jakościowa różnica w roli receptorów AMPA i NMDA. Dyskusja zawiera bardzo wiele interesujących i ważkich z punktu widzenia podjętego tematu informacji. Bardzo ciekawe jest porównanie rytmów theta w podwzgórzu i hipokampie. Intrygujące jest to, że pomimo tego, że rytm theta ma w podwzgórzu sporo mniejszą amplitudę niż w hipokampie to jednak jest tam autonomicznie generowany. Istotne jest też zwrócenie uwagi na to, że udział procentowy

zidentyfikowanych neuronów w hipokampie (po aktywacji cholinergiczej) jest inny niż opisany w ocenianej rozprawie po aktywacji glutaminianergiczej. Na uwagę zasługuje też krytycyzm Doktorantki z jakim podchodzi do własnych wyników. W szczególności, ma świadomość, że trudno bezkrytycznie ekstrapolować wyniki badań otrzymanych na odnerwionych skrawkach do badań np. in vivo. Temu aspektowi Autorka poświęca wiele uwagi zarówno we wstępie, gdzie omawia różne modele eksperymentalne jak i oczywiście w dyskusji. Jak już wspomniałem, dość istotnym mankamentem natury redaktorskiej jest umieszczenie w dyskusji podrozdziału 5.3. mającego dotyczyć „Modulacji glutaminianergicznego rytmu theta w PHa poprzez pobudzenie receptorów kortykosteroidowych” a faktycznie będącego w większości ogólnym wstępem o receptorach kortykosteroidowych, który moim zdaniem powinien znaleźć się we wstępie. Na str. 96 znajduje się informacja o wynikach doświadczeń z kortykosteronem (Bocian i wsp. 2016a), które stanowią przesłankę do podjęcia badań w ocenianej rozprawie i jako takie powinny się też znaleźć we wstępie. Ponadto, na str. 96-97 są przytoczone informacje będące bardziej podsumowaniem otrzymanych wyników niż ich dyskusją. Jak już wspomniano, ta część rozdziału pt. „Dyskusja” zawiera tylko niewielką część faktycznej dyskusji otrzymanych wyników.

Rozprawa jest napisana starannie i poprawnie pod kątem językowym. Pojawiają się drobne błędy edytorskie, kilka z nich zasygnalizowałem, ale generalnie jest ich tak mało, że uznałem iż nie warto ich wymieniać i omawiać w tej recenzji.

Podsumowując, przekazaną mi do recenzji rozprawę oceniam wysoko. Opisano szereg oryginalnych i wartościowych wyników badań, które rzucają nowe światło na zagadnienie generacji rytmów theta w obszarze tylnego podwzgórza. Metodologia badań jest jak najbardziej prawidłowa a redakcja pracy jest generalnie bardzo dobra a moje uwagi dotyczące wstępu i dyskusji do zagadnienia receptorów kortykosteroidowych nie zaważają w sposób istotny na całościowej ocenie redakcji tej pracy. Na uwagę zasługuje również dorobek Doktorantki – 5 prac oryginalnych, w których A. Staszelis jest albo pierwszym albo drugim autorem. Jest to dodatkowy dowód na istotną wartość pracy badawczej Doktorantki.

Mając na uwadze powyższe opinie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Anny Szymańskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. W związku z tym, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Agaty Anny Szymańskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

KATEDRA I ZAKŁAD

BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII

kierownik

prof. dr hab. Jerzy Mozzymas

Prof. dr hab. Jerzy Mozzymas