



Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

☎ (+48-12) 664-53-73

E-mail: marain.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Agaty, Anny SZYMAŃSKIEJ pt.

„Udział receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza”

Rytm theta, będący przedmiotem badań Pani mgr Anny Szymańskiej jest od kilkudziesięciu lat głównym tematem zainteresowań naukowych Katedry Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. Zapoczątkował je Profesor Jan Konopacki, a Jego wychowankowie, następcy profesora z dużym sukcesem dalej kontynuują. Ta oscylacyjna (rytmiczna) aktywność neuronalna ośrodkowego układu nerwowego, obecna zarówno w czasie snu, jak i czuwaniu, odgrywa nie tylko istotną rolę w tak ważnych procesach fizjologicznych, jak: pamięć, integracja czuciowo-ruchowa, nawigacja przestrzenna, ale może także pełnić funkcję nieswoistego markera patologicznej aktywności mózgowia, co przyszłościowo może mieć niesłychanie ważne znaczenie we wczesnym rozpoznawaniu tych dysfunkcji. Mimo wielu lat badań, rytm theta ciągle kryje wiele tajemnic, zarówno jeśli chodzi o elementy strukturalne ośrodkowego układu nerwowego biorące udział jego generowaniu, jak i neuronalno - farmakologiczny mechanizm jego aktywności. Dlatego też badania rytmu theta i wybór tego tematu przez doktorantkę uważam za bardzo ważny.

Cała praca, co wyraźnie podkreślam jest bardzo starannie i jasno napisana, dotyczy to również strony edytorskiej. Praca podzielona jest na 8 rozdziałów, każdy z kilkoma podrozdziałami. Ma klasyczny układ, czyli: alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów, streszczenie po polsku i angielsku, wstęp, cele, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, bibliografia, a kończy ją informacja o dorobku naukowym doktorantki. Praca ma 124 strony, 127 pozycji bardzo dobrze dobranych i wysoko impaktowanych publikacji naukowych związanych z badanym tematem. Pośród nich są zarówno starsze pozycje, na które autorka powołuje się głównie we wstępie, jak i najnowsze, obecne przede wszystkim w dyskusji

wyników doktoratu. Właściwy, syntetyczny dobór literatury, to dowód dobrej znajomości badanego tematu przez mgr Szymańską. Zwracam uwagę na jeszcze jeden element doktoratu. Powstał on w ramach realizacji projektu NCN, którego kierownikiem był promotor doktoratu, co podkreśla znaczenie podjętego tematu, uzyskał on bowiem pozytywną, wysoką ocenę niezależnych recenzentów, specjalistów w tej dziedzinie.

W obszernym, dobrze napisanym wstępie autorka opisuje oscylacyjną aktywność theta. Krótko przedstawia historię jego odkrycia, podział, znaczenie, stosowane modele badawcze. Ilustrując czytelnymi schematami, charakteryzuje neurony związane z aktywnością theta, opisuje miejsca jego generowania, głównie formacje hipokampa i wstępujące układy synchronizujące, szczególnie obszar tylnego podwzgórza, będący kluczowym synchronizatorem rytmicznej hipokampalnej aktywności theta i głównym przedmiotem badań doktorantki. W tych rozważaniach autorka poświęca dużo miejsca i słusznie, wcześniejszym badaniom macierzystej Katedry, w których po raz pierwszy zarejestrowano zdolność tylnego podwzgórza do samodzielnego generowania rytmu theta, zarówno w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Określono jego charakter farmakologiczny, wzorce wyładowań neuronalnych, związane z aktywnością theta, a także jego odrębność od hipokampalnego rytmu theta. Po raz pierwszy w Katedrze Neurobiologii opisano tzw. komórki chronometryczne, którym przypisuje się udział w aktywności wstępującego układu synchronizującego. Biorąc pod uwagę złożoność mechanizmu neurochemicznego w generowaniu aktywności theta w obszarze tylnego podwzgórza oraz wyniki wcześniejszych badań potwierdzające potencjalne zaangażowanie projekcji glutaminianergicznej i przypuszczalną rolę receptorów mineralokortykosteroidowych w modulacji rytmu theta, autorka stawia trzy szczegółowe, jasno sformułowane cele pracy doktorskiej. Sprawdza czy aktywacja i blokada receptorów glutaminianergicznych (NMDA i nieNMDA) wpływa na generowanie lokalnego rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. Charakteryzuje wzór wyładowań pojedynczych neuronów badanej struktury, uczestniczących w glutaminianergicznej aktywności theta oraz określa znaczenie receptorów kortykosteroidowych w tym rytmie.

Pomiary aktywności theta rejestrowane były metodami elektrofizjologii *in vitro*, poprzez zapis EEG, z którego w odpowiedniej i właściwej procedurze odzyskiwano zarówno lokalną aktywność polową, jak i aktywność pojedynczych neuronów. Wszystkie etapy metodyczne, począwszy od przygotowania płynów, poprzez preparatykę,

przygotowanie skrawków mózgowia z obszaru tylnego podwzgórza, rejestrację (amplitudy, częstotliwości i mocy), a także analiza wyników, nie budzą żadnych zastrzeżeń. Dobrze byłoby w opisie wstępnym metody podać czas poszczególnych pomiarów, który przy aktywności rytmicznej, także tej badanej przez autorkę - theta, może mieć znaczenie. Można tylko przypuszczać, że był on zawsze o tej samej porze doby? Cennym uzupełnieniem metodycznym pracy, pomocnym szczególnie przy dyskusji wyników, byłoby wprowadzenie, jako uzupełniających, metod biochemicznych, czy immunohistochemicznych do oznaczenia aktywności białek charakterystycznych dla badanych receptorów. Autorka w dyskusji wyników często odwołuje się do ewentualnej zmiany liczby aktywowanych receptorów, nie podając jednak na to żadnych dowodów własnych badań. Ciekaw jestem komentarza autorki w tej kwestii?

Wyniki przedstawione są logicznie i konsekwentnie w stosunku do wcześniej postawionych celów pracy. Ich systematyczność i powtarzalność schematu opisu, uzupełniona oryginalnymi przebiegami rejestrowanej aktywności (analizą częstotliwości, amplitudy i mocy), dodatkowo zebranymi w formie tabelarycznej są bardzo czytelne i jasne w analizie porównawczej poszczególnych badanych grup.

Pani mgr Szymańska jednoznacznie udowodniła znaczący (w 87%) udział kainowych receptorów glutaminianergicznych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. Znacznie mniejsze zaangażowanie w generowanie tego rytmu wykazują receptory NMDA (w 34%). Czy zatem przy tak małym sukcesie, można mówić o ich znaczącym zaangażowaniu w generowanie rytmu theta i jakie może być tego wytłumaczenie? Czy zupełny brak udziału receptorów AMPA w generowaniu badanego rytmu, który autorka udowodniła, nie jest częściowym wytłumaczeniem małej aktywności receptorów NMDA? Charakterystyka aktywności pojedynczych neuronów nie wykazała, oprócz neuronów chronometrycznych, związku z glutaminianergicznym rytmem theta zarówno po aktywacji receptorów kainowych, jak i NMDA. Jednoznaczny, spektakularny i ciekawy jest wynik związany z udziałem receptorów mineralokortykosteroidowych w glutaminianergicznym generowaniu rytmu theta w badanym obszarze mózgowia. We wszystkich badanych preparatach, w których induktorem theta był kwas kainowy, kortykosteron wzmacniał badany rytm, a efekt ten był znoszony (blokowany) po podaniu spironolaktonu, antagonisty aktywowanych receptorów.

Dyskusja uzyskanych wyników jest ostrożna i bardzo merytoryczna. Autorka wyraźnie podkreśla, że są to pierwsze badania próbujące wyjaśnić udział receptorów

glutaminianergicznych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. Doktorantka powraca w dyskusji do różnego jakościowo udziału badanych receptorów glutaminianergicznych w generowaniu badanego rytmu. Zastanawia się nad receptorem AMPA, który mimo udowodnionej obecności w badanej strukturze nie jest zaangażowany w generowanie rytmu theta. Nie ma jasnego wytłumaczenia tego faktu, choć nasuwa się pytanie czy w warunkach *in vivo* (swobodnie poruszających się szczurów), receptory AMPA byłyby podobnie niezaangażowane w badany rytm? Ciekawym była rejestracja tylko 3 neuronów theta-on spośród 64 aktywnych po podaniu kwasu kainowego. Tu też zasadne jest pytanie, o czym pisze autorka, czy w warunkach nienaruszonego mózgowia, przy aktywacji układu ARAS, sytuacja byłaby podobna? W konkluzji tej części dyskusji autorka słusznie potwierdza znaczenie unerwienia glutaminianergicznego w generowaniu oscylacji theta w obszarach tylnego podwzgórza. Podkreśla jednak znacznie większy udział unerwienia cholinergicznego, udokumentowany wcześniej także w badaniach macierzystej Katedry. Udowodniony przez mgr Szymańską wyraźny modulujący wpływ receptorów kortykosteroidowych na aktywność theta generowaną przez unerwienie glutaminianergiczne, może mieć przyszłościowo ogromne znaczenie praktyczne. Szczególnie biorąc pod uwagę istotne znaczenie fizjologiczne hormonów steroidowych, szczególnie kortyzolu (kortykosteronu) w adaptacji do warunków stresowych, a także potwierdzony udział receptorów kortykosteroidowych w zaburzeniach afektywnych, schizofrenii, chorobie Alzheimera, PTSD, czy dysfunkcjach snu. Dodatkowo i jest to niezwykle ciekawe i ważne, że również w mechanizmie cholinergicznej aktywności theta badanej struktury, zaobserwowano ten sam modulujący wpływ receptorów kortykosteroidowych. Dysertację kończy 5 jasno i krótko sformułowanych wniosków, będących odpowiedzią na postawione cele pracy.

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że praca doktorska Pani mgr Agaty Szymańskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Autorka udokumentowała swoją ugruntowaną wiedzę teoretyczną badanego tematu. Postawiła jasne i logiczne cele pracy, które konsekwentnie zrealizowała. Przedstawiła po raz pierwszy zupełnie nowe informacje na temat znaczenia projekcji glutaminianergicznej, poszczególnych jej receptorów, w generowaniu rytmu theta w tylnym podwzgórzu. Udowodniła także modulujący wpływ receptorów mineralokortykoidowych w rejestrowanej aktywności.

Czytając pracę znalazłem tylko jeden błąd literowy str. 48 linia 8 ma być 50 μm , a nie μM . To rzadki przypadek, aby praca była napisana bez żadnych błędów i dodatkowo poprawną polszczyzną.

Uważam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668) i zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Agaty Szymańskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Kraków dnia 26. czerwiec 2024.

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski