

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎: (+12) 664-53-73
E-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Joanny Ewy SOWY pt.

"The involvement of chosen chemokines in neuronal properties and synaptic transmission in central and basolateral complex of the rat amygdala"

Przedstawiona do oceny dysertacja to bardzo solidne, pod względem merytorycznym, a także edytorskim, obszerne opracowanie dotyczące wpływu wybranych chemokin na aktywność neuronalną ośrodkowego układu nerwowego. Od niespełna 30 lat intensywnie badany jest udział tych białek nie tylko w stanach zapalnych i patologicznych, ale także, a może przede wszystkim w procesach fizjologicznych i prawidłowym rozwoju mózgowia. Autorka analizowała udział dwu chemokin (CX3CL1 i CXCL12) i ich receptory w aktywności neuronalnej ciała migdałowatego mózgowia szczura. Obecność tych białek w strukturach odpowiedzialnych za lęk, depresję jest powszechnie udowodniony, choć ciągle niewiele wiadomo, jaki jest mechanizm i efekt ich działania na poziomie podstawowej aktywności i komunikacji neuronalnej w jądrach migdałowatych. **Wybór tematu badawczego dysertacji mgr Joanny Sowy uważam zatem za bardzo trafny i ważny, również z tego powodu, że jest on powiązaniem aktywności układu nerwowego z immunologicznym, co może być w przyszłości dobrym „zaczynem” dalszych badań zmierzających do tworzenia nowych procedur terapeutycznych, na co w swojej dysertacji zwraca uwagę doktorantka.** W badaniach autorka skupiła swoją uwagę na przekaźnictwie nerwowym oraz właściwościach elektrofizjologicznych dwóch jąder ciała migdałowatego, podstawnobocznym (BLA) i środkowym (CeA). Wybór tych miejsc nie był przypadkowy, lecz dobrze przemyślany, stanowią one bowiem odpowiednio, wejście i wyjście jąder migdałowatych.

Dysertacja Pani mgr Joanny Sowy ma typowy układ i napisana jest w języku angielskim. Po streszczeniach, podziękowaniach i dużej liczbie stosowanych skrótów, rozpoczyna ją bardzo „detaliczny” wstęp, który jest wprowadzeniem w badane zagadnienia. Autorka opisuje historię odkrycia chemokin, klasyfikację, strukturę ich poszczególnych klas,

skupiając główną uwagę czytającego na tych, które są przedmiotem Jej badań. Duża część wstępu poświęcona jest chemokinom i ich aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym. Autorka podkreśla także znaczenie tych białek w funkcjach endokrywnych, metabolicznych i tzw. behawiorze pokarmowym. Tu nasuwa mi się pytanie, czy istnieją doniesienie mówiące o powiązaniu aktywności badanych chemokin mózgowych z układem oreksynowym, kluczowym w regulacji zachowań pokarmowych, szczególnie że jądra migdałowe są jednym z miejsc syntezy oreksyn? A także, czy chemokiny bądź ich receptory w ośrodkowym układzie nerwowym wykazują okołodobowy profil swojej aktywności? Wstęp kończy opis aktualnego (anatomicznego i fizjologicznego) stanu wiedzy badanej struktury. **W podsumowaniu tej części pracy, chciałem wyraźnie podkreślić, że mimo iż jest ona objętościowo duża, to zaplanowana została z dużą starannością, bardzo logicznie i konsekwentnie napisana.** Wstęp czyta się z dużym zainteresowaniem i pełnym zrozumieniem. Dodam także, i nie jest to bez znaczenia dla oceny recenzowanej pracy, że uzupełniają go autorskie, bardzo precyzyjne i czytelne schematy, które razem z podsumowaniem, w którym autorka tłumaczy wybór badanej struktury mózgowia, nie budzą żadnej wątpliwości, iż temat badawczy i przedmiot badań, zostały wybrane z pełnym przemyśleniem i zrozumieniem.

Cel badań oparty został na dwu hipotezach: obecności wybranych chemokin i ich receptorów w badanych strukturach jąder migdałowych oraz ich bezpośredniego lub pośredniego, poprzez komórki glejowe wpływu na elektrofizjologiczne parametry błonowe i synaptyczną transmisję neuronalną. Elektrofizjologiczną techniką *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell voltage-clamp* i *current-clamp* mierzone były odpowiednio prądy i napięcie błonowe. Efekt badanych chemokin określany był poprzez zmianę w stosunku do kontroli podstawowych parametrów błonowych, takich jak: potencjał spoczynkowy, oporność błonowa, stała czasowa błony, pojemność błonowa, czy zmiana częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych, wywoływanych w odpowiedzi na zmiany prądowe. Dodatkowo mierzone były spontaniczna i miniaturowa pobudzająca i hamująca transmisja synaptyczna. Farmakologicznie hamowano aktywność astrocytów i mikrogleju, aby potwierdzić lub wykluczyć ich udział w obserwowanych zmianach. Badano także wpływ stosowanych chemokin na plastyczność synaptyczną neuronów badanych jąder i immunohistochemicznie ich kolokalizację z białkiem MAP2 i CAMKII α . Choć te badania, jak autorka pisze, robione były przez inne lub we współpracy z innymi osobami. Myślę, że ta pierwsza deklaracja wymaga wyjaśnienia, dlaczego wyniki niebędące wyłącznym

autorstwem Pani mgr Sowy, włączone zostały do Jej dysertacji? Można bowiem było się na nie powołać, bez ich precyzyjnego opisu. **Stosowane metody badawcze nie budzą żadnych zastrzeżeń, a bardzo szeroki wachlarz przeprowadzonych pomiarów parametrów elektrofizjologicznych i ich analiza uwiarygadniają otrzymane wyniki.**

Logicznie zaplanowane przez doktorantkę eksperymenty i konsekwentna ich realizacja, przyniosły efekty w postaci czytelnie opisanych i graficznie przedstawionych wyników poszczególnych mierzonych parametrów elektrofizjologicznych. Autorka jednoznacznie stwierdziła, że obecność chemokiny CX3CL1, zmniejsza pobudliwość neuronów jąder podstawnobocznych i środkowych ciała migdałowatego, odpowiednio poprzez zwiększenie prądu progowego na neuronach BLA i zmniejszenie oporności błonowej na neuronach CeA. Miało to także swoje konsekwencje w zmniejszeniu częstotliwości spontanicznych hamujących prądów postsynaptycznych, a w przypadku jąder podstawnobocznych, także osłabieniu plastyczności synaptycznej. Efekt działania tej chemokiny blokowany był przez agonistę jej receptora i co bardzo ciekawe, także przez zahamowanie aktywności mikrogleju. Druga z badanych chemokin (CXCL12) miała przeciwny do pierwszej efekt, w obu badanych jądrach. Jej podanie powodowało wzrost pobudliwości, choć na neuronach BLA nie był on istotny statystycznie. Obserwowano także wzrost częstotliwości spontanicznych pobudzających i hamujących prądów postsynaptycznych. Aktywność tej chemokiny na badane neurony zależna jest także od astrocytarnych komórek glijowych. Zablockowanie ich aktywności znosiło bowiem jej pobudzający efekt. Szczegółowo przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników w oparciu o bogato cytowaną literaturę pozwala, autorce na sugerowanie udziału przekąźnictwa GABAergicznego w mechanizmie badanych zjawisk.

Nie zwykle cenną częścią pracy, świadczącą o dużej dojrzałości naukowej, krytycyzmie i tzw. pokorze naukowej, jest rozdział pt. „*Limitations*”. Ograniczenia, które autorka wymienia, dotyczą zarówno strony metodycznej (techniki pomiaru, stymulacji, jak i preparatyki skrawków). Można by zapytać, dlaczego autorka nie spróbowała przynajmniej jednej modyfikacji, np. zamiast skrawków czołowych, użyć horyzontalnych?

Podsumowując, stwierdzam, że Pani mgr Joanna Ewa Sowa w przedstawionej dysertacji osiągnęła zamierzone cele. Wynikami swojej pracy, będącej efektem logicznie zaplanowanych, a następnie konsekwentnie wykonanych trudnych i „kapryśnych” elektrofizjologicznych pomiarów, znacząco uzupełniła wiedzę dotyczącą komórkowego mechanizmu działań dwóch strukturalnie różnych chemokin na elektrofizjologiczne

parametry neuronów obu badanych jąder obszaru ciała migdałowatego i ich synaptyczną komunikację. Jednoznacznie stwierdziła ich modulujący wpływ na aktywność neuronów badanych struktur, który realizowany jest przy udziale interneuronów GABAergicznym i komórek gwałowych.

Czytając pracę nie natrafiłem na rażące błędy edytorskie, oprócz drobiazgów np. powtórzeń str.8 linia 5 akapit 2, wręcz przeciwnie, dysertacja napisana jest jasno i przejrzystie. Mam jednak kilka uwag do opisu niektórych figur, które jak już wcześniej wspomniałem są graficznie perfekcyjne, to jednak na kilku ich opis jest niejasny i niekompletny.

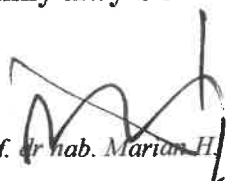
Fig. 1.1, part c i d, na które autorka powołuje się w tekście str. 16, nie ma na rysunku str. 17 i w jej opisie str. 18; **Fig. 1.2**, brak w tekście odnośnika do part c; **Fig. 4.4**, brakuje w opisie figury, objaśnień part e, f, g; **Fig. 4.11**, brakuje na figurze oznaczeń a1, a2; **Fig. 4.12**, brakuje na figurze oznaczeń a1, a2, w opisie b1, b2; **Fig. 4.14**, w opisie jest 2 x opisana part d2; **Fig. 4.16**, nie ma na figurze part b3 i b4 jest c3 i c4; Fig. 4.8, w opisie brakuje opisu d i e.

Te drobne, edytorskie uwagi nie mają jednak wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną dysertacji Pani mgr Joanny Ewy Sowcy.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Joanny Ewy SOWY do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę ważność podjętego tematu badań, jego znaczenie w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, a także jego fizjologii i patologii, duży zakres przeprowadzonych systematycznych elektrofizjologicznych badań, oraz fakt, że były one realizowane w ramach ocenianych projektów NCN, a także to, że część uzyskanych wyników jest już opublikowana w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach, uważam, że praca doktorska Pani mgr Joanny Ewy SOWY zasługuje na wyróżnienie.

Kraków dnia 16 stycznia 2022.


Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski