



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR MARCINA WYROŚLAKA PT: „BADANIE MECHANIZMÓW PLASTYCZNOŚCI TRANSMISJI GABAERGICZNEJ W INTERNEURONACH I KOMÓRKACH PIRAMIDOWYCH HIPOKAMPA MYSZY”

Imię i nazwisko kandydata: Marcin Wyroślak

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie mechanizmów plastyczności transmisji GABAergicznej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy”

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Mozrzymas

Recenzent: prof. dr hab. Krzysztof Tokarski

Przedstawiona do recenzji praca Pana mgr Marcina Wyroślaka „Badanie mechanizmów plastyczności transmisji GABAergicznej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy” powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Praca ma charakter zbioru dwóch tematycznie powiązanych artykułów naukowych opatrzonych dyskusją i wstępem. Napisana została w języku polskim.

WARTOŚĆ NAUKOWA ROZPRAWY

a. Oryginalność badań:

Badania zaprezentowane w pracy są interesujące i naukowo istotne. Autor skupił się na badaniu plastyczności przewodnictwa GABAergicznego zarówno w neuronach projekcyjnych jak i dwóch głównych klasach interneuronów pola CA1 hipokampa, skupiając się na słabo dotychczas poznanej roli tonicznego hamowania GABA. Mechanizmy plastyczności w synapsach glutaminianergicznych i GABAergicznych wykazują pewne podobieństwa, ale też i różnice. Dlatego dokładne zbadanie transdukcji sygnałów molekularnych oraz scharakteryzowanie udziału poszczególnych podjednostek receptorów GABA_A w procesie plastyczności przybliży nas z jednej strony do lepszego poznania samego zjawiska, a z drugiej do ustalenia czy istnieją uniwersalne zasady plastyczności synaptycznej. Wartość recenzowanej pracy doktorskiej wynika zatem po pierwsze z trafnie dobranej problematyki badawczej. Po drugie, na podstawie badań opisanych w publikacjach wchodzących w skład niniejszej rozprawy Autor wnioskuje, że opisanym już w literaturze zmianom plastycznym w fazowym przewodnictwie GABAergicznym towarzyszą również zmiany w przewodnictwie tonicznym – bardzo ważnej komponentce regulującej aktywność sieci neuronalnych i stosunek przewodnictwa pobudzającego do hamującego. Jest to o tyle istotne, że mimo wielu lat badań nad tonicznym przewodnictwem GABAergicznym i jego rolą plastyczności, epileptogenezie czy neurodegeneracji, dotychczas nie ustalono czy toniczne przewodnictwo GABAergiczne może ulegać



plastyczności analogicznie do przewodnictwa fazowego. Zatem recenzowana praca doktorska wnosi szczególną wartość – opisuje nowe fizjologiczne zjawisko regulujące aktywność sieci neuronalnych.

Cele badawcze zostały dobrze zdefiniowane, a zestaw technik eksperymentalnych nie pozostawia zastrzeżeń. Wykorzystując myszy transgeniczne tzw. „reporterowe” możliwe było efektywne prowadzenie rejestracji elektrofizjologicznych z relatywnie rzadko występujących w hipokampie interneuronów parwalbuminowych i somatostatynowych, dzięki czemu scharakteryzowana została plastyczność nie tylko neuronów piramidowych, ale i neuronów GABAergicznych.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Oś pracy stanowią dwa artykuły opublikowane w uznanych czasopismach naukowych (*impact factor*: 3.3, 5.3). Dorobek Autora wyszczególniony w pracy zawiera jeszcze jedną publikację, również opublikowaną w szanowanym czasopiśmie (*impact factor*: 4.6). Prace, na podstawie których przygotowano recenzowaną rozprawę stanowią spójną całość i są rezultatem konsekwentnie i rygorystycznie prowadzonego programu badawczego w grupie prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa. W toku opisanych badań scharakteryzowano fenomen plastyczności tonicznego przewodnictwa GABAergicznego najpierw w neuronach piramidowych, a następnie w interneuronach parwalbuminowych i somatostatynowych pola CA1 hipokampa. Wykazano, że wykorzystanie stosowanego w przypadku fazowego przewodnictwa GABAergicznego protokołu indukcji plastyczności GABAergicznej przez podanie NMDA skutkuje wzrostem tonicznych prądów GABAergicznych w neuronach piramidowych przez zwiększenie udziału podjednostek $\alpha 5$ w funkcjonalnych receptorach GABA_A. W przypadku interneuronów mamy natomiast do czynienia z efektem zależnym od typu komórki. Interneurony somatostatynowe zachowywały się analogicznie do piramidowych, czyli toniczny prąd GABAergiczny nasilał się dzięki zwiększeniu puli $\alpha 5$ GABA_A. Interneurony parwalbuminowe wykazywały z kolei odwrotny efekt – toniczny prąd GABAergiczny zmniejszał się po wywołaniu plastyczności podaniem NMDA, a spadek ten wynikał ze zmniejszenia puli innego podtypu receptora – δ GABA_A.

Opublikowane wyniki są wartościowe naukowo i wpisują się w zdefiniowane w pracy cele naukowe, natomiast towarzyszący im teoretyczny wstęp i dyskusja są dobrze dopasowane do całokształtu tych badań i stanowią ich wartościowe uzupełnienie i podsumowanie.

WARTOŚĆ MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Należy podkreślić, że publikacje naukowe zawarte w recenzowanej rozprawie cechuje wysoki poziom trudności użytych technik, co potwierdzi każdy, kto miał styczność z metodami elektrofizjologicznymi typu whole-cell patch clamp. Połączenie elektrofizjologii z zastosowaniem zwierząt transgenicznych zapewniło Autorowi warsztat eksperymentalny wymagany do wykonania zadań badawczych. Na uznanie zasługuje opanowanie przez Autora trudnych technik elektrofizjologicznych.

Niemniej jednak nieco rozczarowuje nie do końca rzetelne podejście do statystyki i analizy danych. Choć w skład rozprawy wchodzi prace już opublikowane, a zatem już zrecenzowane, nie zostały poprawione pewne statystyczne potknięcia, które co prawda na szczęście nie zmieniają interpretacji wyników, ale mimo wszystko świadczą o pewnych brakach w edukacji statystycznej Autora. Przykładowo w pierwszej pracy (Wyroślak i in., 2019) do analizy zmian w tonicznym prądzie GABAergicznym towarzyszących indukcji plastyczności (Fig. 1B) zastosowano szereg sparowanych oraz niesparowanych testów t-Studenta bez korekcji na wielokrotność porównań, podczas gdy struktura eksperymentu wyraźnie wyróżnia dwa czynniki: podanie etomidatu oraz indukcja plastyczności. To narzuca wykorzystanie na przykład klasycznej dwuczynnikowej analizy wariancji z jednym czynnikiem sparowanym (etomidat), a drugim nie (plastyczność). Ponadto szczegóły analizy statystycznej prądów tonicznych nie zostały opisane w rozprawie w części „Materiały i metody” – nie został opisany proces otrzymania histogramów rozkładu prądów, a przecież nawet po kształcie histogramów zaprezentowanych chociażby w Fig. 1A w Wyroślak i in. (2021) widać, że prądy fazowe zostały,



oczywiście poprawnie, odfiltrowane przed konstrukcją histogramu aby nie zakłócać pomiaru prądów tonicznych. Byłbym wdzięczny, gdyby Autor wyjaśnił dlaczego nie opisał tych metod statystycznych, zarówno w rozprawie jak i w samych publikacjach oraz podjął się tego wyjaśnienia w trakcie obrony.

Same publikacje, jak również ich teoretyczna obudowa w postaci ocenianej rozprawy, prezentują zebrane dane w sposób klarowny, rozsądny i krytyczny. Zaś dyskusja podsumowująca zebrane artykuły jest napisana syntetycznie i zwięzłe; nie stanowi jedynie powtórzenia czy powielenia dyskusji z poszczególnych prac.

POPRAWNOŚĆ REDAKCYJNA ROZPRAWY

Recenzowana praca posiada klarowny i czytelny układ, zawarto w niej wszelkie wymagane sekcje. Jak wspomniałem wcześniej – sekcja metodologiczna zawiera zbyt ubogie informacje na temat zastosowanych procedur analizy danych. Jeśli chodzi o wstęp i dyskusję – mamy do czynienia z klarowną, przemyślaną wypowiedzią. Językowo praca stoi na satysfakcjonującym poziomie, choć można znaleźć w niej literówki oraz uchybienia stylistyczne często wynikające z tzw. „kalki językowej” z języka angielskiego czy drobne edytorskie pomyłki (przykłady wyszczególnione poniżej), które nie zmieniają sensu wypowiedzi, nie utrudniają jej zrozumienia ani nie wpływają na płynność lektury. Całość jest napisana w sposób czytelny i zwięzły.

UWAGI KRYTYCZNE

Jak wspomniano powyżej, w tekście można znaleźć niezbyt poważne błędy edytorskie, najczęściej są to proste literówki trudne do wychwycenia w korekcie; przykładowo „skupia się na badania”. Rozprawa zawiera też, co jest częstym problemem, stanowczo za wiele przecinków i zdań wielokrotnie złożonych, co może skutkować utrudnionym czytaniem ze zrozumieniem. Do błędów edytorskich należy również zaliczyć nie pisanie kursywą łacińskich nazw anatomicznych. Wszystkie wspomniane uwagi to oczywiście detale nie zmieniające w istotny sposób całościowego odbioru dzieła, nie ma zatem sensu wymieniać ich szczegółowo.

Kilka nasuwających się w związku z opisanymi w rozprawie badaniami kwestii, o które chciałbym zapytać:

- W ramach recenzowanej rozprawy scharakteryzowano plastyczność tonicznego przewodnictwa GABAergicznego w obrębie pola CA1 hipokampa. Czy Autor mógłby się pokusić o hipotezę jak owa plastyczność wyglądałaby w neuronach ziarnistych oraz interneuronach zakrętu zębatego hipokampa? Zwłaszcza mając na względzie anatomiczne różnice w udziale poszczególnych podjednostek kanałów GABA_A.
- Bardzo prosiłbym o próbę odpowiedzi na pytanie czy i w jaki sposób stres i/lub podniesiony poziom kortykosteronu mogłyby wpłynąć na plastyczność tonicznego przewodnictwa GABAergicznego? Czy Autor uważa, że mogłoby to mieć znaczenie kliniczne? Jeśli tak, to jakie?
- Kwestia płci: w pracy jest mowa o wykorzystaniu obydwu płci myszy do badań. Jednak nigdzie nie jest opisane czy w ogóle brano pod uwagę czynnik płci oraz czy różnicował on otrzymane wyniki. Proszę o komentarz w tej sprawie.

OCENA KOŃCOWA

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca jest wartościowa poznawczo, prezentowane badania są dobrze uzasadnione i ciekawe, a sama treść rozprawy stoi na satysfakcjonującym poziomie naukowym, edytorskim i językowym. Spełnia ona wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim.



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Marcina Wyroślaka spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Marcina Wyroślaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie wniosku.

TAK/NIE

Prof. dr hab. Krzysztof Tokarski