

Łódź, dnia 27.01.2024 r.

Dr hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ  
Katedra Neurobiologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Wyroślaka pt. ***Badania mechanizmów plastyczności transmisji GABAergiczej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa myszy***, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego W. Mozrzymasa w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

## 1/ Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ pracy opartej na cyklu artykułów naukowych i składa się z dwóch publikacji oraz powstałego na podstawie wyników przeprowadzonych badań opracowania w języku polskim.

Artykułami stanowiącymi podstawę rozprawy Pana mgr Wyroślaka są:

1/ Praca oryginalna: Marcin Wyroślak, Katarzyna Lebida, Jerzy W. Mozrzymas, (2021) *Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of  $\alpha 5$ -Subunit Containing GABA<sub>A</sub> Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons*; Neuroscience, 467, 39-46; IF: 3,707; MEiN: 140;

2/ Praca oryginalna: Marcin Wyroślak, Grzegorz Dobrzański, Jerzy W. Mozrzymas, (2023) *Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons*; Frontiers in Cellular Neuroscience, 17: 1193383; IF: 6,147; MEiN: 100.

W obu pracach wchodzących w skład ocenianej rozprawy doktorskiej mgr. Wyroślak był pierwszym i korespondencyjnym autorem. Dodatkowo, do obu publikacji dołączono oświadczenia ich współautorów. Co prawda w oświadczeniach nie opisano udziału procentowego każdego z współautorów, jednak treść oświadczeń oraz wspomniana powyżej rola pierwszego i korespondencyjnego autora wskazują jednoznacznie na jego wiodący udział w powstaniu obu artykułów. Prace, będące podstawą rozprawy opublikowane zostały we wiodących czasopismach neurobiologicznych z listy JCR, na co wskazuje ich wysoki współczynnik oddziaływania IF (odpowiednio 3,707 i 6,147). Podsumowując, artykuły naukowe przedstawione przez Pana mgr Marcina Wyroślaka spełniają, w mojej opinii, wszelkie formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim przygotowywanym, jako cykl publikacji.

Drugą, integralną częścią ocenianej rozprawy doktorskiej jest przygotowane w języku polskim opracowanie, które zawiera syntetyczne wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej, wyodrębnione cele badań wraz przyjętymi założeniami, opis zastosowanej metodyki badawczej, podsumowanie uzyskanych wyników badań, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografię oraz załączniki. Układ tej części ocenianej rozprawy również spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim powstałym na podstawie badań eksperymentalnych.

## **2/ Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Główne funkcje sprawowane przez ośrodkowy układ nerwowy (OUN) można sprowadzić do trzech podstawowych procesów: odbioru informacji ze środowiska (zewnętrznego lub wewnętrznego), analizy tych informacji oraz generowania adekwatnej i najbardziej optymalnej dla organizmu odpowiedzi. Jednym z najistotniejszych procesów związanych z analizą docierających ze środowiska bodźców jest „zapisywanie” w obwodach neuronalnych OUN informacji niezbędnych do przyszłego funkcjonowania. Procesy uczenia się, czyli tworzenia mniej lub bardziej trwałych śladów pamięciowych są krytyczne z punktu widzenia możliwości przetrwania zwierzęcia w środowisku i adaptacji do zachodzących w nim zmian. Na poziomie obwodów neuronalnych OUN podstawą dla mechanizmów związanych

z tworzeniem śladów pamięciowych jest zjawisko plastyczności, rozumiane jako zdolność do tworzenia nowych, lub reorganizacji istniejących połączeń synaptycznych. W obrębie pojedynczych synaps, mechanizmy które wskazywane są, jako główne podłoże procesów pamięciowych to zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (long-term potentiation; LTP) oraz długotrwałego osłabienia synaptycznego (long-term depression; LTD). O ile badania nad LTP i LTD generowanymi w synapsach mających charakter pobudzający są bardzo szeroko rozpowszechnione i trwają nieprzerwanie od kilku dziesięcioleci, to zjawiska plastyczne obserwowane w połączeniach synaptycznych o charakterze hamującym są nadal stosunkowo słabo poznane i wymagają intensywnych analiz. Problematyka związana z badaniem zmian plastycznych obserwowanych w hamujących synapsach GABAergicznych jest od kilku lat z powodzeniem realizowana w zespole prof. Jerzego W. Mozrzymasa, a oceniana praca doktorska jest kolejnym, ważnym elementem tych badań. Tematyka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Wyroślaka dotyczy zmian plastycznych, które mogą zachodzić w obrębie pozasynaptycznej transmisji GABAergicznej obserwowanej w neuronach formacji hipokampa. W szczególności Doktorant postanowił zbadać, czy indukcja zależnej od receptorów NMDA długotrwałej plastyczności transmisji hamującej (iLTP) w komórkach piramidowych formacji hipokampa ma wpływ na poziom pozasynaptycznej, tonicznej transmisji GABAergicznej a także określić, czy zmiany plastyczne w tej transmisji mogą być odmienne w różnych typach interneuronów hipokampalnych.

## 2.1/ Publikacje wchodzące w skład rozprawy

W pierwszej z przedstawionych prac (*Induction of Inhibitory Synaptic Plasticity Enhances Tonic Current by Increasing the Content of  $\alpha 5$ -Subunit Containing GABA<sub>A</sub> Receptors in Hippocampal Pyramidal Neurons*) określono wpływ indukowanego krótkotrwałym podaniem NMDA iLTP w komórkach piramidowych pola CA1 hipokampa właściwego, na toniczne prądy hamujące związane z aktywacją pozasynaptycznych receptorów GABA<sub>A</sub>. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły wykazać, że indukcja zależnego od NMDA iLTP powoduje, poza wzmocnieniem miniaturowych hamujących prądów postsynaptycznych (mIPSC), znaczny wzrost prądu tonicznego w badanych neuronach piramidowych CA1. Dodatkowo określono, iż zaobserwowane zmiany plastyczne w przewodnictwie tonicznym, zależne były

od receptorów GABA<sub>A</sub> zawierających podjednostki  $\alpha 5$ , podczas gdy receptory zawierające podjednostki  $\delta$  nie brały udziału w zarejestrowanych zjawiskach plastyczności, a ich pula pozostawała niezmienna. W drugiej pracy wchodzącej w skład rozprawy (*Bidirectional plasticity of GABAergic tonic inhibition in hippocampal somatostatin- and parvalbumin-containing interneurons*) badano różnice w możliwości generowania zmian plastycznych tonicznej transmisji GABAergicznej w różnych typach interneuronów hipokampa. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać, że zmiany plastyczne hamującej transmisji tonicznej zachodzą w odmienny sposób w zależności od typu badanego interneuronu a także, podobnie jak ma to miejsce w przypadku neuronów piramidowych, zależne są od rodzaju receptora GABA<sub>A</sub>. Udowodniono, że w interneuronach somatostatyno-pozytywnych (SST+) indukcja iLTP prowadzi do wzmocnienia tonicznej, pozasynaptycznej transmisji GABAergicznej, a wzmocnienie to zależne jest od receptorów GABA<sub>A</sub> zawierających podjednostki  $\alpha 5$ . Odmiennie efekty zaobserwowano w interneuronach parwalbumino-pozytywnych (PV+), w których hamujące prądy toniczne ulegały osłabieniu po indukcji plastyczności. Osłabienie pozasynaptycznych prądów hamujących miało związek ze spadkiem aktywności receptorów GABA<sub>A</sub> zawierających podjednostki  $\delta$  i niewielką, dodatkową rekrutacją receptorów z podjednostką  $\alpha 5$ .

Wyniki uzyskane w ramach badań Doktoranta opublikowane zostały w czasopiśmie o bardzo wysokim poziomie naukowym. Obie prezentowane prace opatrzone są rzeczowym wprowadzeniem, metodyką badań oraz ich wyniki zaprezentowane zostały w sposób przejrzysty i klarowny a otrzymane dane przedyskutowano krytycznie w świetle najnowszej literatury tematu. W związku z powyższym, pod względem merytorycznym, część publikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej oceniam bardzo pozytywnie.

## 2.1/ Opracowanie w języku polskim

Jak wspominałem wcześniej, przedstawiony przez Doktoranta opis w języku polskim ma klasyczny układ, charakterystyczny dla tego typu opracowań.

Wprowadzenie. Teoretyczne tło badań prezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej przedstawione zostało w liczącym 7 stron wprowadzeniu, w którym w opisane

zostały podstawy badań prezentowanych w dalszej części pracy. W tej części opracowania Pan mgr Wyroślak przedstawia charakterystykę transmisji GABAergicznej w formacji hipokampa, opisuje synaptyczny i pozasynaptyczny rodzaj tej transmisji oraz prezentuje najnowsze dane dotyczące zmian plastycznych przekazywania GABAergicznego.

Uwagi.

1/ Tytuł pierwszego podrozdziału „*Hamowanie toniczne i fazowe transmisji GABAergicznej*” wydaje mi się nieprecyzyjny, w podrozdziale tym opisane są dwa rodzaje transmisji GABAergicznej – fazowy i toniczny a nie hamowanie toniczne i fazowe innego rodzaju transmisji synaptycznej.

2/ Opis budowy warstwowej formacji hipokampa zaprezentowany na str. 10-11 jest zbyt lakoniczny, nie podano w nim wielu istotnych informacji, jak choćby obecności komórek ziarnistych zakrętu zębatego (odniesienie na str. 13), stratum pyramidale, stratum oriens (odniesienie na str 19).

3/ Stwierdzenie „*Uważa się, że proces ten jest zależny od sygnalizacji RhoA i ROCK*” (str. 13) powinno zostać wyjaśnione, gdyż o takim rodzaju sygnalizacji nie wspomniano nigdzie indziej w tekście opracowania.

4/ Na str. 14/15 znalazła się informacja o powiązaniu prądów tonicznych niesionych przez receptory GABA<sub>A</sub> z podjednostką  $\delta$  z procesami uczenia się, a dowodem na to mają być badania nad tymi receptorami prowadzone u pacjentów z epilepsją i na mysich modelach epilepsji. Chciałbym poprosić o wskazanie dokładniejszego powiązania procesów pamięciowych z zaburzeniami napadowymi w postaci epilepsji.

5/ W podrozdziale tym (jak również w pozostałych częściach opracowania) znalazłem zaskakująco wiele błędów stylistycznych, literowych, skrótów myślowych, a nawet błąd ortograficzny (*co raz*). Uważam, że Doktorant mógł wykazać się znacznie większą starannością w przygotowaniu tekstu opracowania w języku polskim.

Cel i założenia pracy. W tym podrozdziale Doktorant przedstawił trzy hipotezy badawcze, które postanowił zweryfikować w swojej pracy eksperymentalnej.

Uwagi.

1/ Uważam, cele pracy zostały przedstawione w sposób zbyt lakoniczny, sądzę jednocześnie, że opatrzenie ich krótkim wprowadzeniem pozwoliłoby na lepszy ich odbiór przez czytelnika.

2/ Najistotniejszy zarzut do tej części opracowania dotyczy celu nr 2 – uważam, że jest on nieuprawniony i nie powinien zostać zawarty w opracowaniu. Pierwszy z postawionych celów realizowany był w badaniach opublikowanych w pierwszej pracy stanowiącej rozprawę, z kolei trzeci w pracy drugiej. Drugi cel (hipoteza badawcza) był realizowany w badaniach opublikowanych w artykule niewchodzącym w skład rozprawy, stąd albo nie powinien on zostać sformułowany, albo wyniki badań związanych z jego realizacją powinny zostać szczegółowo opisane i przedyskutowane w przedstawionym opracowaniu.

3/ Stwierdzenie o „użyciu farmakologii” w badaniach (obecne również w dalszych częściach opracowania) jest zbyt daleko posuniętym skrótem myślowym.

Materiał i metody. W tej części opracowania Pan mgr Marcin Wyroślak charakteryzuje wykorzystane procedury doświadczalne i analityczne. Ich bardziej szczegółowy opis zawierają dwie prace z wynikami oryginalnymi. Zamieszczony tekst dostarcza jednak najważniejszych informacji o wykorzystanych zwierzętach, przeprowadzonych badaniach elektrofizjologicznych oraz analizie uzyskanych danych.

Uwagi.

1/ Podrozdział „Podstawowe odczynniki i roztwory” uważam za zbędny – informacje w nim przedstawione pojawiają się ponownie w kolejnych częściach rozdziału metodycznego (np. skład używanych roztworów na stronach 18 i 19).

2/ W części dotyczącej zwierząt powinien pojawić się nr zgody Lokalnej Komisji Etycznej.

3/ Przy opisie doświadczeń elektrofizjologicznych stwierdzono, że identyfikacja neuronów piramidowych i interneuronów dokonywana była na podstawie różnic we wzorcach ich wyładowań, nie opisano jednak w tym miejscu tych wzorców i nie określono jakie są między nimi różnice (informacje te pojawiają się dopiero na str. 23).

4/ Na str. 22 Doktorant przedstawia zarys plastyczności heterosynaptycznej związanej z „wapniowym sygnałem inicjującym”, co nie budziłoby zastrzeżeń, gdyby przebieg indukowania LTP został opisany we wprowadzeniu.

5/ na str. 27 znajduje się informacja o indukcji plastyczności transmisji GABAergicznej w grupach eksperymentalnych, nie podano jednak o jakie grupy eksperymentalne chodziło.

6/ Zdanie: „Podanie pikrotoksyny pozwala obliczyć amplitudę rejestrowanego przed i po podaniu gaboxadolu/etomidatu.” nie wyjaśnia czego amplitudę właściwie obliczano.

Podsumowanie i wnioski. Na niewiele ponad dwóch stronach Pan mgr Marcin Wyroślak przedstawił podsumowanie wyników przeprowadzonych badań eksperymentalnych, opublikowanych w pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i wyciągnął prawidłowo sformułowane wnioski dotyczące zmian plastycznych pozasynaptycznej transmisji GABAergicznej obserwowanych w komórkach piramidowych i interneuronach formacji hipokampa.

Uwagi.

1/ Terminy „uczenie się” i „tworzenie pamięci” wydają się być tożsame, powinny być zatem używane zamiennie a nie prezentowane jako dwa odmienne zjawiska.

2/ Na str. 54 pojawia się odniesienie do 2 celu badań zaprezentowanego przez doktoranta w postaci informacji, że dane zostały opublikowane w pracy niewchodzącej w skład pracy doktorskiej. Brak jest opisu tych danych i wyciągniętych wniosków.

Streszczenie i Abstract. Rozdziały zostały przygotowane zgodnie z zasadami opracowania tego typu rozprawy i zawierają podstawowe informacje o założeniach badawczych, materiałach i metodach, wynikach oraz wnioskach.

Uwagi.

1/ na str. 6 streszczenia znalazło się stwierdzenie, że „fast spiking interneurons” to „interneurony generujące krótkotrwałe potencjały czynnościowe”. Jest ono błędne, gdyż są to komórki generujące potencjały czynnościowe z wysoką częstotliwością, a nie krótsze czy krótkotrwałe potencjały czynnościowe.

Bibliografia. Na wykaz literatury składa się 71 pozycji trafnie wyselekcjonowanego, i aktualnego piśmiennictwa, stanowiącego wystarczające naukowe zaplecze prezentowanych i diskutowanych przez Doktoranta wyników badań.

### 3. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marcina Wyroślaka dotyka bardzo ważnego, w kontekście tworzenia się śladów pamięciowych w OUN, zjawiska plastyczności hamującej transmisji GABAergicznej. Prace oryginalne stanowiące podstawę rozprawy stoją na wysokim poziomie merytorycznym, a opublikowane w nich wyniki i wyciągnięte wnioski stanowią istotny i nowatorski wkład w lepsze zrozumienie mechanizmów synaptycznych zaangażowanych procesy formowania się pamięci. Uważam, że przedstawione przez Doktoranta opracowanie w języku polskim tak istotnych badań, mogło stać na znacznie wyższym poziomie merytorycznym i językowym. Przedstawione w niniejszej recenzji krytyczne uwagi, nie wpływają jednak na mój ostateczny, pozytywny odbiór i ocenę całości przedstawionej rozprawy doktorskiej. W związku z powyższym stwierdzam, że **recenzowana rozprawa doktorska mgr Marcina Wyroślaka spełnia warunki określone w Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Marcina Wyroślaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z wyrazami szacunku  
