

**Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski**

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Zoologii  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
☎: (+12) 664-53-73  
E-mail: [marian.lewandowski@uj.edu.pl](mailto:marian.lewandowski@uj.edu.pl)

## O C E N A

rozprawy doktorskiej Pana magistra biologii medycznej **Marcina WYROŚLAKA** pt.

### ***"Badanie mechanizmów plastyczności GABAergicznej w interneuronach i komórkach piramidowych hipokampa muszy"***

U podstaw prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (mózgowia) leży zjawisko neuroplastyczności, które od przeszło 40 lat jest intensywnie badane, a jego odkrycie uhonorowane zostało Nagrodą Nobla w roku 1981. Plastyczność neuronów, szczególnie we wczesnym okresie życia osobniczego, tzw. plastyczność rozwojowa, decyduje o prawidłowym odbiorze zmysłowym, jest podstawą procesów poznawczych, a także tak ważnych umiejętności jak uczenie się, zapamiętywanie i pamięć. W neuronalnym mechanizmie tego procesu dominujący udział ma pobudzające unerwienie glutaminergiczne. Zdecydowanie mniej rozpoznane, choć już udowodnione jest zaangażowanie unerwienia hamującego, reprezentowanego przez główny neurotransmitter hamujący GABA. Jest on drugim obok glutaminianu, bardzo istotnym neuroprzekaźnikiem uczestniczącym w prawidłowym funkcjonalnym kształtowaniu się mózgowia, szczególnie we wczesnym okresie jego rozwoju. Praca doktorska Pana Wyroślaka dotyczy udziału pozasynaptycznego (tonicznego) przekaźnictwa GABAergicznego w procesie neuroplastyczności. Jest ono drugą, mniej poznaną poza klasyczną synaptyczną (fazową), formą komunikacji neuronalnej. Grupa Profesora Mozrzymasa, należy do nielicznych, która od wielu już lat z dobrymi efektami zajmuje się badaniem tego zjawiska w wielu procesach neuronalnej komunikacji. **Uważam zatem, wybór tematyki badawczej doktoranta za logiczną konsekwencję wcześniej prowadzonych badań macierzystego zakładu. Biorąc natomiast pod uwagę znaczenie zjawiska neuroplastyczności, w którym bierze udział badane przez doktoranta unerwienie, temat dysertacji uważam za bardzo ważny.** Praca doktorska

jest podsumowaniem dwu oryginalnych publikacji naukowych, powstałych w trakcie realizacji projektu finansowanego przez NCN pod tym samym tytułem, którego kierownikiem był promotor doktoratu. **Zwracam na to uwagę, bowiem te dwa fakty dodatkowo podnoszą wartość merytoryczną dysertacji i także jej ocenę.** Z jednej strony bowiem projekt badawczy został pozytywnie oceniany przez niezależny międzynarodowy zespół ekspertów, z drugiej zaś otrzymane wyniki zanim zostały przyjęte do druku przeszły ocenę, kolejnych recenzentów. W publikacjach wchodzących w skład rozprawy: *Neuroscience* IF = 3.708 i *Frontiers in Cellular Neuroscience* IF=6.147, **doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem**, a Jego dominujący udział w powstaniu publikacji potwierdzają współautorzy stosownymi pisemnymi oświadczeniami.

Praca doktorska ma typowy układ, choć z powodu włączenia w jej treść dwu oryginalnych publikacji, objętość poszczególnych rozdziałów jest ograniczona, co czasami może robić wrażenie pewnego „niedosytu” u czytającego. Niemniej jednak i chciałem to wyraźnie podkreślić, wszystkie istotne fakty dotyczące badanego zjawiska zostały opisane, co potwierdza, **dobrą orientuje autora w badanym temacie.** W wprowadzeniu doktorant zwraca uwagę na dwa sposoby hamowania synaptycznego (toniczny i fazowy) charakterystyczne w GABAergicznej komunikacji neuronalnej. Podkreśla decydujące znaczenie tego pierwszego w utrzymywaniu równowagi funkcjonalnej dychotomii mózgowia - pobudzenia i hamowania. W opisie unerwienia GABAergicznego hipokampa autor sygnalizuje jego udział w tzw. oknie czasowym regulującym pobudzenie synaptyczne. Szkoda, że temu niesłychanie ważnemu zagadnieniu, autor nie poświęcił nieco więcej uwagi, choć zainteresowanych odsyła do oryginalnych publikacji. Doktorant opisuje także aktualny stan wiedzy dotyczący plastyczności GABAergicznej. Z jednej strony podaje argumenty (trudności), które usprawiedliwiają mniejsze zainteresowanie tym tematem badawczym. Z drugiej zaś opisuje wspólne mechanizmy komórkowej pobudzającej i hamującej neuropatyczności oraz bliską błonową lokalizację ich receptorów. Opisuje także białka biorące udział w mechanizmie kotwiczenia w cytoszkielecie komórkowym i ruchliwości receptorów GABA<sub>A</sub>. Fakty te są z kolei silnymi argumentami skłaniającymi do głębszego zainteresowania tym tematem. Doktorant przedstawia także dowody badań wcześniejszych, wskazujących na udział receptorów GABA<sub>A</sub> z podjednostką  $\delta$  w generowaniu prądów tonicznych. Podaje przykłady wielu badań stwierdzających zaangażowanie tonicznego hamowania w procesach poznawczych, uczeniu się, pamięci, a także takich schorzeń

neurologicznych, jak epilepsja czy choroba Alzheimera, co potwierdza ważność podjętego tematu badawczego przez doktoranta. Wszystkie te i wcześniejsze rozważania oparte zostały na bogato cytowanej literaturze ostatnich lat. GABA może także pobudzać, obserwowane jest we wczesnym (krótkim) postnatalnym okresie rozwoju niektórych obszarów kory mózgowej. Wynika to ze zmiany aktywności białek błonowych – transporterów Cl<sup>-</sup> do i z komórki. **Czy taki mechanizm jest także obserwowany w badanym przez doktoranta hipokampie?**

Podstawowym, (ogólnym) celem pracy było sprawdzenie czy w tonicznej transmisji GABAergicznej wywoływanej aktywnością receptorów NMDA przy blokadzie receptorów AMPA, zachodzą procesy plastyczne. Badania były przeprowadzane na neuronach piramidowych obszaru CA1 hipokampa myszy dzikich i interneuronach parwalbuminowych i somatostatynowych u genetycznie modyfikowanych zwierząt. Pomiary elektrofizjologiczne prowadzone były techniką patch-clamp w konfiguracji whole-cell w trybie current-clamp. Do wzmocnienia prądu tonicznego stosowano gaboxadol i etomidat, aktywujący odpowiednio podjednostki  $\alpha_5$  i  $\delta$  receptora GABA<sub>A</sub>, a także odwrotnego agonistę podjednostki  $\alpha_5$  badanego receptora. **Użyte metody pomiarowe, analiza rejestrowanych prądów oraz stosowana precyzyjnie zaplanowana farmakologia, zarówno przy generowaniu neuroplastyczności i analizie udziału poszczególnych podjednostek receptora GABA<sub>A</sub>, a także analiza statystyczna nie budzą zastrzeżeń.**

Otrzymane przez doktoranta wyniki wykazały, że generowana przez aktywację receptorów NMDA plastyczność, powoduje wyraźny wzrost tonicznego prądu GABA w badanych komórkach piramidowych hipokampa. W proces ten zaangażowane są głównie receptory GABA<sub>A</sub> z podjednostkami  $\alpha_5$ . W rozdziale Podsumowanie i Wnioski str. 53-54 autor pisze cyt.: „*Badania prezentowane w ramach niniejszej (brakuje słowa „pracy”) doktorskiej wskazują, że ekstrasynaptyczna pula receptorów  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, które w przypadku komórek piramidowych odpowiadają za zdecydowaną większość mediowanego prądu tonicznego, **zwiększa się**, co prawdopodobnie wynika z egzocytozy receptorów.*” Na bazie jakich badań „w ramach pracy doktorskiej” autor stwierdził, że pula receptorów  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> „zwiększa się”? A jeśli jest to tylko przypuszczenie oparte na wynikach rejestracji prądów synaptycznych, to jakie dodatkowe badania, mogłyby to stanowcze stwierdzenie potwierdzić lub wykluczyć? W interneuronach hipokampalnych doktorant również zarejestrował zmiany plastyczne w prądach tonicznych, które w interneuronach somatostatynowych, podobnie jak

w komórkach piramidowych ulegały zwiększeniu i były zależne od aktywacji receptorów  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>. Natomiast w badanych interneuronach parwalbuminowych ulegały zmniejszeniu, na skutek aktywacji receptorów  $\delta$ GABA<sub>A</sub>. Generalny wniosek przeprowadzonych badań pokazuje jednoznaczny udział przekąźnictwa tonicznego w badanych przez autora procesach plastycznych, które zależą od typu komórki i obu badanych podjednostek ( $\alpha_5$  i  $\delta$ ) receptorów GABA<sub>A</sub>.

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że założony cel pracy doktorskiej Pana mgr Marcina Wyroślaka został osiągnięty. Autor udowodnił udział pozasyptycznych receptorów GABA<sub>A</sub> w modulacji tonicznej transmisji hamującej, jej wpływ na procesy plastyczne neuronów piramidowych i dwóch rodzajów interneuronów badanej formacji hipokampa. Wynikami swojej dysertacji znacznie poszerzył wiedzę na temat znaczenia przekąźnictwa GABAergicznego w tworzeniu sieci neuronalnych i mechanizmie neuroplastyczności.

Czytając polskie opracowanie pracy doktorskiej, zauważyłem kilka błędów edytorskich - literówek „a” zamiast „ą”, „o” zamiast „ó”, powtórzeń „ w zimnym w zimnym”, „następnie...następnie”, „elektrodowej elektrodowym”, czy też zbyt częstych określeń anglojęzycznych np. różne odmiany słowa „mediowanie” „indukowanie”, „inkorporacja”, „kontrybucja”, „aplikacja”.

Oczywiście uwagi te w żaden sposób nie wpływają, co z całą mocą podkreślam, na wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy. **Moim zdaniem uzyskane przez doktoranta wyniki, będące efektem solidnie i logicznie zaplanowanych badań oraz konsekwentnie, systematycznie przeprowadzonych doświadczeń, w istotny sposób uzupełniają i poszerzają istniejącą wiedzę na temat roli tonicznej pozasynaptycznej komunikacji GABAergicznej.**

Uważam zatem, że 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 Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr Marcina Wyroślaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski*

Kraków dnia 16. styczeń 2024.