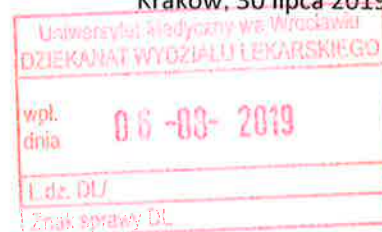




Dr hab. Tomasz Błasiak
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. (+48) 604-404-941
e-mail: tomasz.blasiak@uj.edu.pl

Kraków, 30 lipca 2019



OCENA

rozprawy doktorskiej mgr **Katarzyny Lebidy** pt.

„Wpływ treningu warunkowania klasycznego oraz aktywności metaloproteinaz na długotrwałą plastyczność synaptyczną w korze somatosensorycznej myszy”

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie jak warunkowanie klasyczne oraz aktywność metaloproteinaz wpływa na długotrwałą aktywność plastyczną w korze baryłkowej myszy. Opisane w dysertacji badania są częścią prowadzonych w wielu laboratoriach na świecie badań nad neuroplastycznością, leżącą u podstaw fundamentalnych funkcji naszego mózgu. Autorka we wstępie swojej rozprawy, **w oparciu o dobrze dobraną literaturę**, przedstawia istniejący stan wiedzy dotyczącej plastyczności neuronalnej, skupiając się na zagadnieniach najistotniejszych w świetle przeprowadzonych i opisanych badań naukowych. **Oryginalne cele naukowe**, które wyznaczyła sobie mgr Lebida są w rozprawie doktorskiej **jasno i poprawnie sformułowane**. Są one zebrane nie tylko w osobnym rozdziale pracy, ale również w odpowiednich podrozdziałach obszernego wstępu, gdzie Autorka przedstawiając aktualny stan wiedzy, stawia bardzo ciekawe pytania podkreślające **trafność podjętej problematyki naukowej**.

W swoich badaniach, opisanych w rozprawie doktorskiej, mgr Katarzyna Lebida prowadziła obserwacje zjawisk biologicznych wykorzystując techniki elektrofizjologiczne *in vitro* oraz zymografię *in situ* połączoną z technikami immunofluorescencyjnymi. Zabiegi eksperymentalne mające na celu wprowadzenie zmian w obserwowanych zjawiskach, a tym samym wyjaśnienie mechanizmów leżących u ich podłoża, , polegały na poddaniu zwierząt (myszy) treningowi warunkowania klasycznego albo farmakologicznym blokowaniu aktywności metaloproteinaz. **Szczegóły użytych technik eksperymentalnych oraz metod analizy uzyskanych danych zostały dość należycie opisane** w osobnym rozdziale rozprawy doktorskiej. Niestety część wykresów zawarta w rozdziale 3 (opisującym materiały i metody użyte podczas badań), została przygotowana na bazie tzw. zrzutów ekranu, co znacznie

utrudniło, a w niektórych przypadkach wręcz uniemożliwiło odczytanie zawartych na nich informacji, np. skali i jednostek osi. Na korzyść pracy, wpływa fakt, że treści wybranych wykresów, które uznane zostały przez Autorkę za istotne, zostały zmodyfikowane tak, by dało się je odczytać. Pomimo dokładnej lektury dysertacji, niektóre aspekty strony technicznej przeprowadzonych eksperymentów wciąż pozostały dla mnie niejasne. Autorka niestety nie określa w oparciu o jakie/czyje obserwacje stwierdzono, że zastosowany szok elektryczny podawany na ogon zwierzęcia podczas warunkowania klasycznego „(...) powoduje ruch ogona, ale nie wokalizację”. Ponadto, nie zostało wyraźnie wyjaśnione ani poddane dyskusji, dlaczego uzyskanie takiej, a nie innej reakcji zwierzęcia na zastosowany bodziec było istotne. Dla ogólnej interpretacji i odniesienia uzyskanych wyników do istniejącej wiedzy na temat plastyczności obwodów neuronalnych jest ważne, czy przeprowadzone warunkowanie klasyczne było awersyjne, czy też nie. Należy jednak podkreślić, że **dobór technik eksperymentalnych i wieloletnie, udokumentowane obszernym dorobkiem naukowym, doświadczenie mgr Katarzyny Lebidy w ich stosowaniu, jest trafny i bez wątpienia pozwolił osiągnąć wyznaczone cele naukowe.**

Rezultaty przeprowadzonych przez panią Lebidę badań zostały klarownie przedstawione w czterech logicznie ułożonych podrozdziałach. Każdy z nich przedstawia wyniki odpowiadające na kolejne pytania Autorki niniejszej rozprawy doktorskiej. Wyniki badań zostały dość precyzyjnie opisane i jasno zilustrowane graficznie, choć niektóre kwestie budzą moje uwagi.

Dużym problemem przy szacowaniu wiarygodności wyników przeprowadzonych badań jest brak informacji na temat liczby zwierząt, które zostały wykorzystane w poszczególnych grupach eksperymentalnych. Tym samym nie wiadomo, na ile reprezentatywne są liczby neuronów wykorzystane przy obliczaniu parametrów opisujących badane zjawiska neurofizjologiczne. Jest to szczególnie ważne w przypadku mało liczebnych prób, w oparciu o które doktorantka określiła niektóre parametry podane w pracy (np. gęstość prądu tonicznego w neuronach FS u zwierząt poddanych warunkowaniu klasycznemu). Ufam, że podane liczby neuronów „pochodziły” z odpowiedniej liczby zwierząt, o czym zapewne doktorantka poinformuje podczas obrony swojej pracy.

Autorka rozprawy doktorskiej niestety nie wyłamała się z powszechnej w pracach naukowych, lecz złej praktyki, podawania wartości średnich w celu opisanie prób, których rozkład odbiega od normalnego. W takim przypadku, należy podać wartość środkową

(medianę) i przedział międzykwartylowy próby. Należy jednak podkreślić, że autorka pracy poprawnie uzależniła dobór zastosowanych testów statystycznych od rozkładu badanej próby, a tym samym opisane w pracy zmiany parametrów opisujących procesy biologiczne nie budzą zastrzeżeń. Szkoda jedynie, że nie podano dokładnych wartości statystyki p, w szczególności w przypadku uznania różnic, za statystycznie nieistotne.

Autorka pracy w rozdziale 4.1.2. stwierdza, że STDP wywołana precyzyjnym zgraniem czasowym potencjałów czynnościowych i EPSP, prowadzi u zwierząt kontrolnych (grupy nazwane w pracy naive oraz PSEUDO CS + UCS), do powstania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. Niestety nie wiadomo, czy obserwowany wzrost amplitudy EPSP po procedurze zgrania ze sobą w czasie EPSP i AP, jest istotny statystycznie (np. czy znormalizowany EPSP po indukcji różni się istotnie od jedności). W przypadku wyników opisujących LTD, podobnie jak w przypadku wyników dotyczących LTP, ich wiarygodność można by wzmocnić poprzez dodatkową analizę statystyczną. Szczególnie byłoby to cenne dla poparcia stwierdzenia pojawiającego się w podrozdziale 4.3.5. rozprawy, że pomimo osłabienia indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego przy obecności DMSO w ACSF, zjawisko LTP wciąż zachodzi.

Odnoszę wrażenie, że dynamika i siła indukowanych procesów plastyczności długotrwałej (zarówno LTP, jak i LTD) w grupach kontrolnych („naive” vs „ctr”; rysunek 4.2.A. vs 4.9.A. dla LTP; rysunek 4.3.A. vs 4.10.A. dla LTD) są różne. Jeśli tak, to z czego to mogło wynikać? Z różnych warunków podczas przeprowadzania różnych serii eksperymentów? A może z faktu, że grupa „naive” była przyzwyczajana do unieruchamiania (dybowania), a grupa „ctr” nie?

Autorka rozprawy niezbyt fortunnie opisuje zmiany w amplitudzie EPSP po indukcji długotrwałych zmian plastycznych poprzez wywołanie STDP, używając określenia „średni wzrost amplitudy” dla podanych znormalizowanych wartości (np. rozdział 4.3.2., strona 113: „Średni wzrost amplitudy EPSP (...) po indukcji LTP, w stosunku do amplitudy EPSP przed indukcją LTP wyniósł: 1.58 ± 0.31 (...)”, podczas gdy średni wzrost (w stosunku do wartości przed indukcją), w tym przypadku wyniósł 0.58; rozdział 4.3.3., strona 115 „Średnia redukcja amplitudy EPSP przed indukcją LTD wynosiła: 0.66 ± 0.26 , $n = 6$ i 0.75 ± 0.13 , $n = 5$, (...)”, podczas gdy średnie redukcje wynosiły odpowiednio (podają bez wartości błędów): 0.34 i 0.25). Na końcu rozdziału 4.2. autorka stwierdza, że analiza statystyczna parametrów opisujących właściwości elektrofizjologiczne interneuronów typu FS w różnych grupach zwierząt (naive,

PSEUDO CS + UCS, CS + ucs), wykazała brak istotnych różnic, lecz nie przytacza żadnych wyników statystyk oraz nie określa zastosowanego testu.

Uważnie przyglądając się przedstawionym w pracy zmianom amplitudy EPSP po indukcji STDP, u zwierząt poddanych warunkowaniu klasycznemu, można odnieść wrażenie, że następuje nie tyle upośledzenie LTP, jak twierdzi autorka, co proces długotrwałego osłabienia synaptycznego. To przeświadczenie, oraz budzące się niejasności, ulegają wzmocnieniu podczas lektury kolejnego rozdziału (4.1.3.), w którym autorka zmiany amplitudy EPSP o podobnej wartości, tym razem wywołane procedurą odwróconego parowania, nazywa długotrwałym osłabieniem synaptycznym. Podobne zjawisko, polegające na zmianie charakteru długotrwałych zmian plastycznych (LTP->LTD) w wyniku manipulacji eksperymentalnych, autorka opisuje w rozdziałach dotyczących metaloproteinaz, ale tym razem unika wcześniej wspomnianego braku precyzji w opisie obserwacji. Należy podkreślić, że autorka pracy zauważa wywołane warunkowaniem klasycznym odwrócenie kierunku zmian plastycznych (ze wzmocnienia na osłabienie synaptyczne) wywoływanych przez zastosowany model indukcji, i wyraźnie podkreśla to ciekawe zjawisko na początku dyskusji. Co więcej, autorka rozprawy w tej części dyskusji bardzo sprawnie wykorzystuje swoją szeroką wiedzę, przytaczając szereg podobnych obserwacji poczynionych przez innych naukowców badających plastyczność synaptyczną w innych obszarach mózgu (np. korze motorycznej i wzrokowej, niektórych elementach kompleksu jąder migdałowych, hipokampie). Bardzo silną stroną dyskusji tej części wyników, jest podkreślenie różnic pomiędzy opisanymi obserwacjami, a wynikami doświadczeń przeprowadzonych na innych obwodach mózgowych. Nie sposób się nie zgodzić z propozycją autorki pracy, że różnice te mogą wynikać z innego modelu indukcji procesów synaptycznych jakie stosowano w przytoczonych pracach. **Świadczy to o umiejętności autorki do osadzenia wyników swoich badań w szerszym kontekście.**

W pracy doktorskiej mgr Katarzyny Lebidy występują określenia i sformułowania którym, moim zdaniem, brakowało precyzji, choć z szerszego kontekstu można było się domyślić ich dokładnego znaczenia. Przykładem są użyte przez autorkę nazwy niektórych parametrów opisujących właściwości elektrofizjologiczne badanych komórek nerwowych: jest „potencjał błonowy neuronu (V_m)”, precyzyjniej by było „spoczynkowy potencjał błonowy neuronu (V_m)”; jest „szybka hiperpolaryzacja następcza (fAHP)”, precyzyjniej by było „amplituda szybkiej hiperpolaryzacji następczej (fAHP)”. Przykładem zbyt daleko idącego skrótu myślowego jest stwierdzenie w podpisie rysunku 4.4., że „Prąd toniczny wywołano

za pomocą aplikacji 100 μ M PTX". Tekst pracy doktorskiej sprawia **pozytywne wrażenie od strony formalno-językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej**, którego nie zaburzają pojawiające się w nim niezbyt liczne, drobne błędy literowe i językowe.

W dyskusji **autorka rozprawy doktorskiej w jasny i przejrzysty sposób dokonuje syntezy uzyskanych wyników z istniejącą, obszerną wiedzą** na temat procesów plastyczności w obwodach korowych, w szczególności w korze baryłkowej gryzoni. Podobnie jak we wstępie, autorka opiera się na dobrze dobranej i prawidłowo cytowanej literaturze naukowej. Szczególnie warte docenienia jest to, że w wielu miejscach dyskusji opisanych wyników, autorka rozprawy stawia istotne pytania dotyczące elementów badanego zjawiska i trafnie sugeruje dalsze kierunki badań. Ze sposobu prowadzenia dyskusji można wywnioskować, że pani Lebida jest świadoma ograniczeń badań naukowych oraz zdaje sobie sprawę z granic interpretacji uzyskanych wyników (np. związanych z identyfikacją typów interneuronów GABAergicznym). Autorka pracy, dyskutując uzyskane wyniki, proponuje również ciekawe badania, które pozwoliły by poszerzyć i doprecyzować obserwacje opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Badania pani Lebidy pokazały, że warunkowanie klasyczne, w którym bodziec warunkowy jest odbierany przy pomocy wibrysów, zaburza długotrwałe wzmocnienie synaptyczne indukowane w korze baryłkowej oraz zmniejsza gęstość tonicznego prądu hamującego w niektórych typach komórek warstwy II/III tego obszaru korowego. Co więcej, opisane wyniki pozwoliły stwierdzić, że metaloproteinaza 9 ma istotne znaczenie podczas zachodzenia procesów neuroplastyczności w korze baryłkowej myszy. Podsumowując, **w swojej rozprawie doktorskiej pani Katarzyna Lebida opisuje oryginalne badania naukowe, których wyniki poszerzają naszą aktualną wiedzę neurobiologiczną.**

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Katarzyny Lebidy oceniam pozytywnie, stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 ust 1 ustawy 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 wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Lebidy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Tomasz Błasiak