

Wzrost 08.08.2019
M. Rodzowski Ochocka



nencki institute
of experimental biology



Prof. dr hab. Małgorzata Kossut
Laboratorium Neuroplastyczności
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, Warszawa 02-093

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KATARZYNY LEBIDY PT. „WPŁYW
TRENINGU WARUNKOWANIA KLASYCZNEGO ORAZ AKTYWNOŚCI
METALOPROTEINAZ NA DŁUGOTRWAŁĄ PLASTYCZNOŚĆ SYNAPTYCZNĄ W
KORZE SOMATOSENSORYCZNEJ MYSZY”.

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Lebidy jest dla mnie bardzo interesująca, gdyż zawarte w niej doświadczenia badają mechanizmy uczenia się w modelu eksperymentalnym stworzonym w mojej pracowni. W tym modelu trening prowadzony jest w paradygmacie warunkowania klasycznego, w którym pobudzenie rzędu wibryss na pyszczku myszy kończy się bodźcem awersyjnym – niewielkim szokiem elektrycznym w ogon. Naturalną reakcją myszy na taki szok jest znieruchomienie, w naszych warunkach przejawia się to ustaniem ruchów głowy w kierunku stymulatora pobudzającego wibryssy. W nawiązaniu do znanej reakcji zamierania (ang. freezing) występującej w kilku innych modelach warunkowania klasycznego, nazwaliśmy tę reakcję „mini-freezing”. Pokazaliśmy, że 24 godziny po zakończeniu treningu reakcja ta występuje po samym pobudzeniu wibryss (bodziec warunkowy), co świadczy o wytworzeniu asocjacji pomiędzy bodźcem warunkowym i bezwarunkowym, czyli o uczeniu asocjacyjnym. Proces warunkowania w naszym modelu doświadczalnym wywołuje powiększenie reprezentacji pobudzanych w treningu wibryss w pierwotnej korze somatosensorycznej w obszarze reprezentacji wibryss, czyli w korze barylkowej, co pokazaliśmy za pomocą autoradiografii [^{14}C]-2-

deoksyglukozy. Zmiany te są najsilniejsze w IV warstwie kory i zrobiliśmy sporo badań charakteryzujących je w tym miejscu. Praca Katarzyny Lebidy posuwa granice naszej wiedzy dalej, gdyż dotyczy połączeń pomiędzy czwartą a trzecią warstwą kory. W doświadczeniach badano STPD – formę plastyczności synaptycznej występującą w warstwach nadziarnistych.

Rozprawa doktorska Katarzyny Lebidy jest rozbudowana i, w mojej opinii, zawiera materiał eksperymentalny, który wystarczyłby na dwa doktoraty. Ma bardzo długi wstęp, będący kompendium informacji na temat anatomii i fizjologii kory baryłkowej. Jest to godne uznania. Pewne nieścisłości, które zauważyłam to częste wymienianie jednym tchem wyników dotyczących myszy i szczura. Mimo, że struktury drogi czuciowej od wibryss do baryłek w korze są bardzo podobne, to, jak mówi tytuł znanej pracy „a mouse is not a little rat”, jednak nie są identyczne i przy podawaniu dokładnych danych liczbowych trzeba uważać i odnosić je do gatunku. Np. septa między baryłkami są szerokie u szczura a bardzo wąskie u myszy (o czym autorka zresztą wspomniała) co powoduje zapewne inną integrację sygnału z wielu wibryss u tych gatunków.

Inne drobne uchybienia: schemat połączeń (Rys. 1.1.) nie pokazuje projekcji dokorowej z jądra tylnego wzgórza, opisywanej w tekście. Błędnie nazwana jest gałąź nerwu szczękowego unerwiająca wibryssy – nie podczołowa, a podoczodołowa. Oficjalna nazwa wąsów twarzowych to wibryssy, nie wibrysy. Podawane na str. 15 dane o wymiarach pojedynczej baryłki są bez znaczenia, gdyż baryłki mogą być duże albo małe, należy podać której konkretnie dotyczy pomiar (np. C3). Rozdział o plastyczności jest w całości bardzo dobry, zwracam jednak uwagę na to, że eksternalizacja i internalizacja receptorów AMPA nie jest jedynym mechanizmem plastyczności homeostatycznej. W rozdziale na temat plastyczności kory baryłkowej brakuje powołania się na prace pokazujące ogromną plastyczność aksonów wewnątrzkorowych w korze baryłkowej, a także plastyczność połączeń korowo-wzgórzowych w tym obszarze.

Metody są opisane znakomicie (z jednym wyjątkiem) i mogą stanowić wzór do naśladowania przez doktorantów. Niestety nie udało mi się w nich znaleźć informacji co do odległości czasowej momentu eutanazji i pobrania mózgów od zakończenia treningów. W większości prac na tym modelu było to 24 godziny po zakończeniu

treningu, tak, aby obserwować relatywnie trwałą zmianę plastyczną ale oczywiście można badać inny etap powstawania zmian plastycznych.

Wyniki opisane są bardzo dobrze i bardzo dobrze zilustrowane. Wykresy i tabele są wyczerpująco opisane, a zastosowane testy statystyczne są właściwe. Badania w ramach rozprawy doktorskiej obejmują doświadczenia elektrofizjologiczne robione techniką patch-clamp oraz zymografię in situ. Przebadano w tych samych testach skrawki mózgu z trzech grup zwierząt – warunkowanych, pseudowarunkowanych i kontrolnych.

Bardzo ważny wynik to wysycenie LTP indukowanego w paradygmacie STDP w projekcji z czwartej do trzeciej warstwy kory. Interpretacja takiej zmiany opiera się na przypuszczeniu, że warunkowanie wywołało w tej projekcji LTP o takiej sile, że większej odpowiedzi nie można już uzyskać. W wielu pracach dotyczących dowodów na udział LTP w uczeniu się takie wysycenie jest dowodem na zaangażowanie LTP w mechanizm uczenia się. To pierwsza w historii badań tego modelu eksperymentalnego dana dotycząca zmian w projekcji z IV warstwy do warstw nadziarnistych.

Następnym etapem było badanie GABA-ergiczných prądów tonicznych w neuronach górnych warstw kory. Znalezione zmniejszenie gęstości GABA-ergicznego prądu tonicznego w interneuronach, ale nie w neuronach piramidowych, u myszy warunkowanych. Podobne wyniki dla interneuronów warstwy IV znalazła uprzednio inna praca z laboratorium prof. Mozrzymasa, jednak wyraźnie wpływ warunkowania na piramidy IV warstwy jest różny niż na piramidy III warstwy, mimo że analiza parametrów potencjałów czynnościowych i biernych własności błony nie wykazała żadnych różnic.

Druga część pracy to badanie roli metaloproteinaz w plastyczności kory baryłkowej wywołanej warunkowaniem. Działanie metaloproteinaz jest niedawno odkrytym mechanizmem współpracującym w plastyczności neuronalnej. Między innymi pokazano, że w nokaut metaloproteinazy 9 w korze baryłkowej upośledza zmiany plastyczne wywołane deprywacją sensoryczną. Doktorantka odkryła, że inhibitor aktywności metaloproteinaz uniemożliwia wywołanie LTP w projekcji z IV do III warstwy, mimo braku wpływu na bazową transmisję synaptyczną. Przedłużone działanie inhibitora spowodowało powstanie LTD zamiast LTP. Natomiast na efekt

stymulacji wg. protokołu wywołującego LTD inhibitor metaloproteinaz nie miał wpływu. Doktorantka stosując różne inhibitory stwierdziła, że zaobserwowany efekt był skutkiem działania MMP9. Przy okazji pokazała, że stosowanie powszechnie używanego w podaniach domózgowych rozpuszczalnika DMSO znacząco wpływa na wielkość LTP – to jest poważne ostrzeżenie dla wielu eksperymentatorów.

Doktorantka pokazała również wpływ warunkowania na aktywność tkankową metaloproteinaz w kolumnie korowej należącej do stymulowanej wibryssy. W warstwie IV zaobserwowała wzrost aktywności żelatynolitycznej, natomiast nie było jej w II/III warstwie kory. Łącząc zymografię in situ z immunoreakcją na VGlut-2, co znakuje zakończenia aksonów ze wzgórza, pozwoliło zlokalizować wzrost aktywności żelatynolitycznej w okolicy zakończeń tych aksonów. Doktorantka podkreśla tu glutaminianoergiczny charakter tych zakończeń, jednak nie wydaje mi się to istotne. Wszystkie połączenia wewnętrzne także są glutaminianoergiczne. Ważnym czynnikiem musi więc być jakiś proces, który zachodzi akurat w tych, a nie w innych synapsach glutaminianoergicznych. Dyskusja wyników tego nie uwzględnia, a powinna, bowiem pokazanie aktywności MMP 9 w pobliżu zakończeń aksonów ze wzgórza to ważny wynik.

Doktorantka w dyskusji rekapitułuje wyniki pracy i stara się je wytłumaczyć; nie zawsze jest to możliwe nawet w oparciu o dane literaturowe. Rozważania dotyczą wszystkich aspektów wyników i są staranne i inteligentne. Doktorantka udowadnia w dyskusji dobrą znajomość literatury tematu i swoją umiejętność wyciągania wniosków. Natomiast nagle zaczyna używać sformułowanie „zmiany plastycznościowe”, czego nie robiła we wstępie w rozdziale o plastyczności. To brzydki neologizm, radzę trzymać się przyjętej nomenklatury. Również nie powinno się stosować terminu „glutamatergiczny” tylko glutaminianoergiczny.

Przedstawiona mi rozprawa doktorska zawiera wiele wyników istotnych dla zrozumienia mechanizmów plastyczności mózgu. Pomysłowe testowanie plastyczności synaptycznej w paradygmacie STDP wydaje mi się znakomitym pomysłem. Zgadzam się z konkluzjami o roli czwartej warstwy kory zmianach plastycznych wywołanych warunkowaniem i doceniam odkrycie plastyczności synaptycznej w połączeniach między czwartą i trzecią warstwą. Udowodnienie roli MMP 9 w plastyczności kory mózgowej wywołanej przez uczenie się jest ważnym odkryciem.

Podsumowując, rozprawa zawiera bogaty materiał eksperymentalny, a badania dotyczą mechanizmów uczenia się i pamięci, będących w centrum zainteresowań światowej neurobiologii. Doświadczenia są zmyślnie zaprojektowane i dobrze opracowane analitycznie. Uważam, że rozprawa pani mgr. Katarzyny Lebidy spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, oz.595, z późn.zm.). Wnioskuje do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Lebidy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pracę oceniam bardzo wysoko i wnoszę o jej wyróżnienie.



Małgorzata Kossut

Warszawa, 31.07.2019