



Prof. dr hab. Justyna Rogalska
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Agaty Anny Szymańskiej pt.

„Udział receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została badaniu rytmu theta, podstawowej i bardzo ważnej fizjologicznie neuronalnej aktywności mózgowia. Wartość dysertacji podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN. Temat badawczy Pani mgr Agaty Szymańskiej, doskonale wpisuje się w tematykę badań prowadzonych od lat z dużym sukcesem przez dr hab. Tomasza Kowalczyka, prof. UŁ.

Rytm theta stanowi jedną z najbardziej zsynchronizowanych form aktywności elektroencefalograficznej (EEG) rejestrowanej w mózgach ssaków. Jego rola jako wskaźnika procesów nerwowych w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie jest jeszcze w pełni zrozumiana. Dotychczasowe badania sugerują, że rytm theta jest istotnie związany z procesami takimi jak nawigacja przestrzenna, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP), pamięć operacyjna, sen REM, rozpoznawanie słów oraz integracja funkcji czuciowo-ruchowych. Występowanie rytmu theta w pewnych patologicznych stanach OUN u ludzi uzasadnia potrzebę dalszych badań tego wzorca aktywności EEG. Większość dotychczasowych badań skupiała się na hipokampalnym rytmie theta, natomiast autorka podjęła się badania charakterystyki tylnopodwzgórzowego rytmu theta, który jest znacznie mniej poznany.

Układ pracy jest typowy dla prac doświadczalnych. Zawiera 124 strony podzielone na 7 rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Cele, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, 7. Bibliografia. Na końcu autorka zamieściła swój dorobek naukowy. Każdy z rozdziałów uzupełniony jest szczegółowymi podrozdziałami. Praca zawiera także streszczenie: po polsku i angielsku, oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Cytowana literatura jest bogata liczbowo (176 pozycji!), co dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktorantkę.

We **wstępie** rozprawy doktorantka bardzo czytelnie i jasno przedstawia problem badawczy, Przedstawia historię badań nad rytmem theta z użyciem różnych modeli doświadczalnych, uwzględniając prace macierzystej Katedry. Autorka przedstawia charakterystykę rytmu theta, m. in. opisuje jego parametry elektrofizjologicznie. Ponadto bardzo czytelnie przedstawiła również opis organizacji wstępującego układu synchronizującego rytm theta. Źródło tego niespecyficznego układu mózgowia leży w pniu mózgu, a na wyższych piętrach układu nerwowego tworzą go także badane przez doktorantkę jądra tylnego podwzgórza. W dalszej części wstępu, doktorantka opisuje i klasyfikuje, poznane do tej pory neurony, biorące udział w generowaniu rytmu theta. Ponadto przedstawia dowody modulacji aktywności theta przez synapsy elektryczne. Ostatni rozdział dotyczy tylnego podwzgórza jako niezależnej struktury generującej rytm theta, ze szczególnym uwzględnieniem udziału neuroprzekaźników, zaangażowanych w jego generowanie i modulację. Ten rozdział w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części rozprawy czyli celu podjętych przez doktorantkę badań.

Szczegółowe cele dysertacji, autorka zamknęła w 3 kolejnych, dobrze przemyślanych i logicznie zaplanowanych etapach. Pierwszy, który implikuje kolejne, to określenie zdolności preparatów *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym. Następnym etapem badań było określenie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta. Kolejny, ostatni etap badań miał na celu określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym w preparatach PHa.

Metodyka przeprowadzonych badań nie budzi zastrzeżeń. Badania przeprowadzono na modelu izolowanych preparatów *in vitro*. W badaniach elektrofizjologicznych dotyczących aktywności oscylacyjnej powszechnie stosuje się

metody *in vitro*, ze względu na chociażby stosunkowo łatwą kontrolę warunków środowiska zewnątrzkomórkowego. W przeprowadzonych przez Autorkę badaniach mózgu preparowano skrawki zawierające obszar tylnego podwzgórza. Następnie skrawki perfundowano związkami farmaceutycznymi rozpuszczonymi w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym w celu wywołania, modulacji lub blokowania aktywności rytmicznej theta. Następnie rejestrowano aktywność EEG preparatów PHa zarówno neuronalną aktywność polową, jak również aktywność pojedynczych neuronów. Aktywność theta obserwowana w warunkach pozaustrojowych klasyfikowana jest jako rytm typu 2.

Autorka **wyniki** swojej pracy przedstawia bardzo jasno, konsekwentnie do podjętych zadań badawczych. Ich wizualizacja w postaci oryginalnych przebiegów rejestrowanej aktywności polowej czy histogramy mocy dominującego pasma częstotliwości analizy FFT, a wykresów dodatkowo ułatwia ich zrozumienie. Jedynym mankamentem rycin to ich zbyt mała wielkość, podobnie podpisy pod rycinami również powinny być napisane większą czcionką.

Dobrze przemyślane, logicznie zaplanowane badania, a także ich konsekwentna i precyzyjna realizacja, przyniosły spodziewane efekty. W pierwszym cyklu doświadczalnym badano zdolność preparatów *in vitro* PHa do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych: typu kainowego – podaniem kwasu kainowego, receptorów NMDA – podaniem roztworu NMDA i receptorów AMPA – podaniem roztworu AMPA. Doktorantka po raz pierwszy eksperymentalnie wykazała, że preparaty *in vitro* PHa są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych zarówno typu kainowego, jak również NMDA, natomiast preparaty te nie są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów AMPA.

W kolejnym cyklu badań doktorantka wykazała iż większość neuronów tylnego podwzgórza po aktywacji glutaminianergicznej podaniem kwasu kainowego lub NMDA wykazuje wzorzec aktywności niezwiązany z lokalnym rytmem theta (odpowiednio 60% ogólnej liczby w preparatach perfundowanych KA i 72% w preparatach perfundowanych NMDA). Autorka sugeruje, że komórki te nie są częścią neuronalnych obwodów PHa zaangażowanych w genezę lokalnego rytmu theta, ale mogą uczestniczyć w innych funkcjach sprawowanych przez obszar tylnego podwzgórza jako element wstępującego układu synchronizującego. Tylko pojedyncze komórki w obszarze tylnego podwzgórza sklasyfikowano, jako tzw. neurony theta-

zależne, a dokładniej komórki theta-on. Zidentyfikowano również dużą grupę neuronów chronometrycznych, która jest częścią wstępującego układu synchronizującego aktywność formacji hipokampa, a ich potencjalną funkcją może być przekształcanie tonicznej impulsacji biegnącej z najniższych pięter układu na rytmiczny wzorzec wyładowań sprzyjający rytmogenezie theta w formacji hipokampa. W podsumowaniu tej części badań, doktorantka stwierdza, że prawdopodobieństwo zarejestrowania aktywności neuronów PHa powiązanych z rytmem theta lub komórek chronometrycznych aktywowanych pobudzeniem układu glutaminianergicznego jest stosunkowo niewielkie. Wskazuje to na większy udział transmisji cholinergiczej (w porównaniu z glutaminianergiczną) w powstawaniu lokalnych oscylacji theta w obwodach neuronalnych tylnego podwzgórza.

W ostatnim etapie badań, doktorantka podjęła się oceny wpływu aktywacji receptorów kortykosteroidowych na glutaminianergiczny rytm theta rejestrowany w PHa. Autorka zastosowała kwas kainowy do wywołania rytmu theta i jednocześnie kortykosteron – ligand receptorów kortykosteroidowych. W celu określenia, czy efekt obserwowany po podaniu kortykosteronu związany był z aktywacją receptorów mineralokortykosteroidowych, podawano spironolakton - antagonistę receptorów mineralokortykosteroidowych. Doktorantka wykazała, że pobudzenie receptorów kortykosteroidowych podczas generowania epizodów rytmu theta wywołanych przez aktywację receptorów glutaminianergicznych w preparatach PHa powoduje wzmocnienie oscylacji – zarówno amplitudy, jak i mocy dominującego pasma częstotliwości rejestrowanego lokalnie rytmu theta. Doktorantka sugeruje, że pobudzający efekt kortykosteronu na tylnopodwzgórzową aktywność theta należy wiązać z oddziaływaniem podanego związku na receptory mineralokortykoidowe (MR), bowiem kortykosteron jest ich agonistą, z kolei blokada tych receptorów za pomocą ich antagonisty - spironolaktonu - znosiła obserwowany efekt.

Wiadomo, że zarówno transmisja glutaminergiczna, jak również z udziałem receptorów mineralokortykoidowych odgrywa ważną rolę w procesach plastyczności mózgowej. Czy zatem zaobserwowane zjawisko może mieć wpływ na wzmocnienie plastyczności mózgowej ?

Interesuje mnie jeszcze jedna kwestia. W hipokampie występują oscylacje theta i gamma, które są najbardziej wyraźnymi rytmemi rejestrowanymi w stanie czuwania lub podczas snu REM. Te oscylacje można zaobserwować w zapisach potencjałów polowych i obserwowane są interakcje między nimi, które łączą rozproszone zespoły

komórek przetwarzających powiązane informacje. Jakie znaczenie może mieć to zjawisko? Jestem ciekawa komentarza Autorki w tych kwestiach.

Dyskusja świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Szymańska dowiodła, że doskonale porusza się w zagadnieniach związanych z tematem dysertacji i w tej części pracy elegancko argumentuje w jaki sposób jej badania wpisują się w opracowanie charakterystyki podwzgórzowego rytmu theta. Zakończenie pewnego etapu badań to dobry i dopuszczalny moment, w którym można podzielić się swoimi przemyśleniami i pomysłami dotyczącymi znaczenia zrealizowanych badań i ich potencjalnego wykorzystania w klinice. Proszę doktorantkę o przedstawienie swojego punktu widzenia w tej sprawie.

Podsumowaniem pracy mgr Szymańskiej jest 5 jasno przedstawionych wniosków, uzasadnionych uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych. Doktorantka wykazała, że preparaty *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym typu KA oraz NMDA, natomiast nie są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym AMPA. Kolejny ważny wniosek jest taki, że większość neuronów wzbudzonych w PHa w wyniku aktywacji glutaminianergicznej wykazuje wzorzec aktywności niezwiązany z lokalnym rytmem theta. Stwierdzono również, że liczna grupa neuronów rejestrowanych w obszarze tylnego podwzgórza po pobudzeniu glutaminianergicznym to neurony chronometryczne – zaangażowane prawdopodobnie w generowanie aktywności rytmicznej theta w formacji hipokampa. W ostatnim wniosku doktorantka stwierdza, że pobudzenie receptorów mineralokortykosteroidowych w preparatach PHa powoduje wzmocnienie podstawowych parametrów (amplituda, moc dominującego pasma częstotliwości) lokalnego rytmu theta o podłożu glutaminianergicznym.

Czytając pracę znalazłam kilka niedociągnięć czy literówek, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Jednak nie wpływają one na moją bardzo wysoką ocenę części merytorycznej dysertacji. Przytoczę kilka przykładów:

- w rozprawie nie przedstawiono hipotez badawczych
- w spisie skrótów brakuje skrótu kwasu kainowego -KA
- na str. 50 dysertacji doktorantka zamieściła schemat protokołów eksperymentalnych, na którym brakuje doprecyzowania protokołu 3, opisanego w tekście.
- str. 80 „rytm wywołany w ten sposób znoszony były

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr **Agata Szymańska** wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom i odpowiedniemu doborowi metod i technik przeprowadzenia badań. A zatem przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie mechanizmu generowania rytmu theta w mózgowiu szczura. Należy również podkreślić, że część przedstawionych w dysertacji wyników dotycząca udziału receptorów glutaminianergicznym w generowaniu rytmu theta została już opublikowana w pracy oryginalnej, w czasopiśmie Hippocampus. A zatem, ta część badań uzyskała również pozytywną ocenę recenzentów manuskryptu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. "Udział receptorów glutaminianergicznym i kortykosteroidowym w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza" autorstwa Pani mgr mgr AGATY SZYMAŃSKIEJ stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742) ze zmn., stawiane pracom doktorskim.

Jednocześnie zwracając uwagę na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne, znakomity warsztat naukowy Pani Magister, a także nowatorstwo uzyskanych przez nią wyników, znacznie poszerzających wiedzę w zakresie zrozumienia mechanizmu generowania rytmu theta, niosących ze sobą potencjalne możliwości aplikacyjne – zastosowanie analizy rytmu theta w diagnostyce chorób układu nerwowego, jak również w opracowaniu technik usprawniających funkcje poznawcze mózgu, wnioskuję do Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Justyna Rogalska

Toruń, dnia 10. lipiec 2024