

Zakład Interakcji Międzykomórkowych
Międzywydziałowa Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

92-215 Łódź
ul. Mazowiecka 6/8
tel. 042 272 56 54

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kłos-Wojtczak

pt. „Charakterystyka rytmu theta rejestrowanego z obszaru tylnego podwzgórza
u anastetyzowanego szczura”

Wprowadzenie w drugiej połowie ubiegłego wieku rejestracji czynności bioelektrycznej eksplantów struktur mózgu *in vitro*, a kilkanaście lat temu optogenetyki, przyniosły znaczący postęp w zrozumieniu źródeł i mechanizmów korowej i podkorowej synchronizacji oscylacji fal mózgowych w różnych zakresach częstotliwości. Zespoły wolnofalowe rejestrowane przez encefalogram, bądź przez elektrody wprowadzone do określonych struktur mózgu w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, także podczas operacji neurochirurgicznych, są wyrazem synchronicznej aktywności dużej liczby neuronów istotnej w procesach poznawczych. Wśród nich uczenie i zapamiętywanie wymaga skoordynowanej aktywności bardzo wielu sieci neuronalnych, w których wiodącą rolę (szczególnie w pamięci przestrzennej i epizodycznej) pełnią gęsto upakowane piramidowe neurony pola C1 hipokampa. Równolegle do siebie i równomiernie ułożone dendryty tych komórek są zdolne do generowania prądów jonowych w tym samym kierunku, dzięki czemu powstają fale o dużej amplitudzie. U czuwających, aktywnych szczurów zarejestrowano z formacji hipokampa trzy główne zespoły oscylacji, związane z różnymi aspektami procesu zapamiętywania. Rytm theta od 4 do 12 Hz, nazywany też rytmiczną aktywnością wolnofalową (RSA) jest związany z odbiorem i zapamiętywaniem nowych informacji. Drugi rodzaj aktywności elektrycznej hipokampa to kompleksy fal wysokoamplitudowych o niskiej częstotliwości (do 3Hz) oraz niskonapięciowych fal o częstotliwości pomiędzy 110 a 250 Hz, które mogą być związane z konsolidacją informacji przestrzenno-sensorycznej. Trzeci rodzaj fal rejestrowanych w hipokampie to zespół fal gamma o częstotliwości 25-100 Hz, co do których znaczenia w procesie poznawczych nie uzyskano jeszcze konsensusu. Rytm theta formacji hipokampa człowieka ma niższą częstotliwość 4 – 7,5 Hz i jest charakterystyczną oscylacją neuronów kory limbicznej: hipokampa, kory śródwęchowej i zakrętu obręczy. U zwierząt odbierany jest głównie podczas aktywnej eksploracji ruchowej oraz lokomocji połączonej z ruchami głowy związanymi ze wzrokowym i węchowym pobudzeniem sensorycznym. Występuje także podczas faz REM snu.

W generowaniu rytmu theta formacji hipokampa biorą udział neurony przegrody oraz obszar tylnego podwzgórza, którego rola w systemie synchronizacji oscylacji hipokampa jest nadal dyskutowana. Więcej wiadomo o mechanizmie synchronizacji wyładowań formacji hipokampa przez przegrodę, w której bierze udział GABAergiczna projekcja docierająca do hamujących interneuronów zakrętu zębatego i pól CA3 i CA1 hipokampa oraz cholinergiczna projekcja pobudzająca hipokampalne komórki theta-on. Kolejne wieloletnie badania, w których duży udział mają pracownicy Katedry Neurobiologii UŁ wykazały, że rytm theta może być generowany w warstwie wschodowej pola CA1 i CA3 izolowanej formacji hipokampa w warunkach *in vitro*. Odkrycie przez zespół neurobiologów UŁ komórek bramkujących, aktywnych na początku i na końcu każdego epizodu oscylacji w zakresie theta, może potwierdzać istnienie wewnątrzhipokampalnej sieci synchronizującej rytm theta. Jak wykazała rejestracja oscylacji hipokampa i szerzej kory węchowej przez zespół Gyorgy Buzsaki oraz molekularne badania metodami inżynierii genetycznej m. in. Wulfa i współ. (2009), istnieje złożona sieć połączeń pomiędzy dendrytami komórek piramidowych i wieloma rodzajami interneuronów w polach CA1 i CA3, tworząca generator oscylacji theta. Na podstawie anatomicznych i eksperymentalnych parametrów elektrofizjologicznych, Marianne

Bezire i współ. (2016) stworzyli algorytm interakcji izolowanej sieci połączeń w polu CA1 jako generatora hipokampalnego rytmu theta. Można zatem założyć, że wewnątrzhipokampalny generator oscylacji rytmu theta znajduje się pod wpływem zewnętrznego synchronizatora w postaci GABAergicznych i cholinergicznych kompleksów neuronów przegrody przysiódkowej (MS/vDBB), w którym bierze udział podwzgórze. System wielopoziomowego synchronizatora oscylacji theta formacji hipokampa jest „zasilany” przez neurony wstępującego aktywującego układu siatkowatego pnia mózgu z jądra siatkowatego i konarowo-mostowego, prawdopodobnie za pośrednictwem obszaru tylnego podwzgórza. Nadal nie wyjaśniono jednak kwestii, czy neurony tylnego podwzgórza są elementami sieci neuronalnej generatora rytmu theta formacji hipokampa, czy mają współdziałanie w tworzeniu „napędu” generatora oscylacji theta w hipokampie, czy mają rolę podrzędną, czy może tworzą niezależne sieci oscylacyjne świadczące o procesach konsolidacji informacji docierającej do podwzgórza. Dlatego podjęte przez mgr Paulinę Kłos-Wojtczak opracowanie techniki umożliwiającej rejestrację aktywności rytmu theta z tylnego podwzgórza i z jądra nadsuteczkowego u szczurów w narkozie uretanowej oraz scharakteryzowanie generatorowych komórek theta poprzez farmakologiczne modulowanie ich aktywności uważam za celowe i istotne w poznaniu organizacji systemu synchronizacji aktywności formacji hipokampa.

Ocena merytoryczna

Część teoretyczna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest liczącym 125 stron opracowaniem naukowym z typowym podziałem na rozdziały: 1. Wstęp podzielony na dziewięć podrozdziałów, 2. Cele, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, 7. Bibliografia. Na początku rozprawy Doktorantka dołączyła bibliografię trzech prac oryginalnych, w dwóch z nich jest drugim, a w jednej trzecim autorem. Prace są opublikowane w specjalistycznych i cenionych czasopismach: *Hippokampus* (IF 3,9), *Brain Res* (IF 3,1) oraz *Eur J Neurosci* (IF 2,9). Wartości współczynników oddziaływania czasopism (IF) nie zostały podane w tekście rozprawy. Ponadto, zamieszczona jest lista siedmiu komunikatów zjazdowych z lat 2014-2015, których Doktorantka jest współautorem: w tym pięciu komunikatów na konferencje zagraniczne i dwóch na międzynarodowe konferencje w Polsce. Kolejne nienumerowane strony znajdujące się przed zasadniczą częścią rozprawy zawierają: Wykaz stosowanych skrótów oraz zwięźle i jasno napisane streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp jest obszerny, obejmuje 43 strony. Doktorantka przedstawiła w nim rys historyczny badań elektrofizjologicznych i rozwój elektroencefalografii do lat 70-tych ubiegłego wieku. W mojej ocenie brakuje opisu współczesnych możliwości rejestracji i analizy uzyskanych zapisów fal mózgowych różnej częstotliwości, zastosowań klinicznych EEG i do tworzenia interfejsów wykorzystujących czynność bioelektryczną mózgu do komunikowania się z innymi osobami i sterowania wykonywaniem różnych czynności. Choć rozprawa dotyczy wąskiego zagadnienia synchronizacji rytmu theta w tylnym podwzgórzu, to rozwój technologiczny i informatyczny pozwala na coraz szersze zastosowanie analizy parametrów rytmów obszaru limbicznego do oceny zmian poznawczych w chorobach psychicznych, neurologicznych i w uzależnieniach. To stawia elektrofizjologię, jako narzędzie diagnostyczne lub monitorujące wiele zaburzeń czynności mózgu. Dlatego szkoda, że najnowsze cytowane badania w rozdz. „Aktywność bioelektryczna formacji hipokampa” kończą się na latach 2011 - 2012. W następnych rozdziałach opisana jest wyczerpująco i przejrzysto aktywność bioelektryczna formacji hipokampa u gryzoni, badania dotyczące generowania rytmu theta, różnice pomiędzy oscylacją theta 1 i theta 2 oraz organizacja struktur zaangażowanych w różne aspekty jego synchronizacji.

Jako recenzentka mam kilka drobnych uwag:

(1) dotyczy niezręczności słownych: zamiast określenia „pozacholinergiczny” użyłabym określenia „niecholinergiczny” charakter; zamiast „doprzegrodowe infuzje”- infuzje do przegrody; zamiast „neurotransmisyjne podłoże” - podłoże neurochemiczne; zamiast „wymapowano” – zidentyfikowano/znaleziono; zamiast elektrody „rejestracyjne” – elektrody rejestrujące; na str. 70 użyto słowo „wyizolowano”, choć jak się domyślam z kontekstu ma oznaczać „znaleziono”;

(2) znalazłam kilka drobnych błędów językowych i formalnych. Trudno mówić o zniszczeniu zakończeń współczulnych po dokomorowej infuzji 6-OHDA (str. 12). Brak informacji o autorstwie ryciny 4, czy jest autorstwa Doktorantki, czy została opracowana na podstawie wcześniejszych publikacjach, jeśli tak – to czyich. Str. 23 – mowa jest o mikroiniekcji GABA-A, które zwyczajowo jest oznaczeniem receptora dla GABA, a skrót ten nie znajduje się w spisie. Chyba lepiej by było nazwać neurony wyładowujące się w rytmie theta po prostu jako neurony theta zamiast theta-zależne, co sugeruje ich zależność od oscylacji theta w sensie podporządkowania rytmowi, a nie jego ewentualnego źródła oscylacji synchronicznej.

Mimo tych uwag, cała praca jest bardzo dobrze zaprojektowana i starannie napisana w języku polskim zarówno pod względem ortograficznym jak i stylistycznym, czyta się ją z przyjemnością.

Część doświadczalna

Część eksperymentalna doktoratu obejmuje trzy cykle doświadczeń. Wolframowe elektrody o oporności 0.3-0.9 M Ω do rejestracji aktywności polowej zostały umieszczone w tylnym podwzgórzu (PH) i w jądrze nadsuteczkowym (SuM), jeśli rytm theta nie był wykrywany w PH, przy użyciu aparatu stereotaktycznego i współrzędnych wg. atlasu dla szczura (Paxinos i Watson, 1997). Elektrody szklane wypełnione octanem sodu z barwnikiem do rejestracji aktywności pojedynczych neuronów umieszczono w PH i SuM za pomocą mikromanipulatora (model 660, f-my Kopf), w celu znalezienia neuronów aktywnych w poszczególnych fazach polowego rytmu theta. Do rejestracji sygnałów elektrycznych użyto wzmacniacza P511 firmy Grass-Astromed. Ponieważ istnieje duża dynamika fuzji firm i zmian ich nazw, dobrze by było podać rocznik tego urządzenia. W wyszukiwarce internetowej znalazłam tylko firmę Astro-Med, a nie Grass-Astromed, która ok. 2012 roku przekształciła się w AstroNova.

Pytanie 1. Czy wzmacniacz właśnie tej firmy był używany w doświadczeniach?

Schemat rejestracji aktywności polowej był wykonywany przez 5 min. przed infuzją badanych związków do prawego PH, a następnie co 15 min. przez 1 godz. po mikroiniekcji karbenoksolonu, przez 1,5 godz. po kwasie kainowym oraz przez 2 godz. po podaniu karbacholu. Harmoniczne częstotliwości w przedziale od 1 do 15 Hz każdego odcinka czasowego były wykrywane algorytmem szybkiej transformaty Fouriera (FFT) w dziesięciu 2-sekundowych odcinkach zapisu przy użyciu programu Spike2, a następnie analizowane statystycznie za pomocą testów statystycznych w programie Statistica 6.0.

Pytanie 2. Proszę bliżej wyjaśnić pojęcie mocy, analizowanej algorytmem FFT. Domyślam się, że nie chodzi tu o moc fizyczną, która jest ilością pracy wykonanej w jednostce czasu wyrażanej w Watach, tylko o widmową gęstość mocy rejestrowanego sygnału elektrycznego. Jeśli mam rację, to termin ten powinien być podany dokładniej (to są różne pojęcia).

W trakcie rejestracji aktywności polowej zapisywano zewnątrzkomórkową aktywność neuronów, którą później analizowano znajdując aktywne neurony theta-zależne, aktywne w trakcie rytmu theta i theta-niezależne, aktywne w rytmach wyładowań synchronicznych i niesynchronicznych. Następnie Doktorantka identyfikowała wśród neuronów theta-zależnych neurony:

(a) theta-on, aktywne wyłącznie w zakresie rytmu synchronicznego, ze słabą aktywnością w okresie zdesynchronizowanym (LIA),

(b) theta-off, aktywne wyłącznie w okresie zdesynchronizowanym odcinka pomiarowego.

Komórki theta-on zostały podzielone na neurony fazowe, o aktywności harmonijnej z amplitudą aktywności polowej theta oraz na neurony toniczne, o wyładowaniach niezależnych od fazy rytmu theta. Ponadto, identyfikowano neurony „bramkujące”: typu A – aktywne na początku i na końcu epizodu aktywacji theta, typu B – aktywne w czasie LIA tuż przed synchronizacji theta oraz typu C – aktywne tuż przed końcem epizodu theta i sygnalizujące rozpoczęcie LIA.

Każdorazowo, po zakończeniu doświadczenia szczury uśmiercano, mózgi utrwalano w 10% formalinie i po pocięciu mrożonych skrawków weryfikowano lokalizację elektrody rejestrującej aktywność polową oraz

mikroelektrod szklanych, dzięki zawartemu w nich barwinkowi SkyBlue i 14-minutowej biegunowo zmiennej stymulacji prądem o natężeniu 15 mA.

Pytanie 3. Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej nr 74/ŁB 688 została wydana w 2013r. Ustawa z 15 stycznia 2015 r. zmieniła zapisy ustawy z 21 sierpnia 1997 r. dlatego proszę o wyjaśnienie czy doświadczenia zostały wykonane zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawowymi.

I cykl doświadczeń

Do opracowania stabilnego zapisu rytmu theta Doktorantka przetestowała karbachol w czterech dawkach (0.5, 1.0, 1.5 i 2.0 μ g/0.5 μ l), karbenoksolon w dwóch dawkach 25 i 50 μ g /0.5 μ l oraz kwas kainowy w dwóch dawkach (0.1 i 0.25 μ g /0.5 μ l). Każde stężenie badanego związku testowano na siedmiu szczurach (razem przetestowano pięćdziesiąt osiem szczurów). Mikroiniekcje do prawego PH wykonywano strzykawką Hamiltona 710N.

Pytanie 4. Ze współrzędnych implantacji elektrod szklanych do PH i SuM wnioskuję, że różniły się głównie głębokością implantacji. Interesuje mnie sprawa techniczna. Jeśli nie odebrano aktywności polowej w PH to zagłębiano dalej tę samą elektrodę rejestrującą do jądra SuM (odległość od bregmy dla lokalizacji PH i SuM była ta sama, odległość od linii środkowej różniła się 0,3 mm)? Czy była to inna elektroda?

Na reprezentatywnym zdjęciu przekroju czołowego utrwalonego mózgu, udokumentowano ślad po elektrodzie rejestrującej. Strzałka wskazuje jej widoczny ślad, natomiast nie wskazuje mniej widocznego na zdjęciu końca elektrody, który powinien znajdować się w PH lub SuM.

Wyniki tych doświadczeń przedstawione są w podrozdziale 4.1.

Podrozdz. 4.1.1. przedstawia procent spontanicznej aktywności zarejestrowanej z PH w trzech grupach wiekowych zwierząt: 40-45 dni, 50-65 dni oraz 70-75 dni. Opis podziału na grupy wiekowe pojawia się dopiero w rozdziale Wyniki, natomiast w rozdziale Metodyka, podane są tylko masy szczurów (120-300g) wziętych do doświadczeń, a ich różnicy wieku można się tylko domyślać. Ponadto, wyniki podają procent zarejestrowanych spontanicznych oscylacji theta w danej grupie wiekowej. Nie jest to prawdopodobieństwo ani w sensie potocznym, ani w sensie matematycznym, które określa częstość lub pewność wystąpienia danego zdarzenia w skończonym zbiorze wszystkich możliwych zdarzeń elementarnych należących do tego zbioru. *Podrozdziały 4.1.2 do 4.1.4* przedstawiają reprezentatywne zapisy 2-sekundowej rejestracji aktywności polowej z PH oraz ich analizę FFT w postaci wykresu słupkowego rozkładu częstotliwości. Z powodu dużego zmniejszenia tych wykresów na rycinach, opis osi X i Y jest całkowicie nieczytelny. Najbardziej efektywny w synchronizacji i stabilizacji zapisu theta okazał się karbachol w stężeniu 2 μ g/ μ l (Ryc. 3A i 3B), który statystycznie, istotnie zwiększył o ok. 80% amplitudę oscylacji theta do 1,5 godz. W histogramach FFT oraz na wykresie słupkowym zauważalna jest zwiększona częstotliwość rytmu theta w 15 i 30 min. rejestracji (Ryc. 3B).

Pytanie 5. Rozumiem, że słupki na wykresie są średnią arytmetyczną z analizowanych odcinków czasowych uzyskanych od poszczególnych szczurów. Czy są średnią zapisów wszystkich siedmiu szczurów dla testowanego stężenia karbacholu i pozostałych związków? Czy słupki błędem oznaczają SEM czy SD?

Karbenoksolon najlepiej stabilizował rytm theta w stężeniu 100 μ g/ μ l (Ryc. 4A), ale amplituda oscylacji theta była podwyższona tylko podczas rejestracji w 30 min. po podaniu karbenoksonolu (Ryc. 4B). Doktorantka zaobserwowała także, że karbenoksonol wprowadzony do PH wyzwał aktywność theta także wtedy, kiedy nie była ona rejestrowana przed podaniem blokera połączeń szczelinowych (Ryc. 5).

Mikroiniekcja do PH 0.2 μ g/ μ l kwasu kainowego nie wpłynęła na parametry rytmu theta, natomiast stężenie 0.5 μ g/ μ l po 15 min. indukowało padaczkopodobne wysokonapięciowe fale oraz tłumilo rytm theta. Po 30 min. zapis synchronizował się w rytmie theta i trwał przez 1 godz. Kwas kainowy wprowadzany do PH miał także właściwości inicjujące rytm theta (Ryc. 8). Na ryc. 7B widać wzrost amplitudy rytmu theta o ok. 40%, choć istotność statystyczna nie jest podana.

Pytanie 6. Proszę o komentarz, dlaczego tak duży wzrost nie był istotny statystycznie?

II cykl doświadczeń został wykonany na stu czterdziestu trzech samcach szczura szczepu Wistar. W tych doświadczeniach Doktorantka zastosowała karbachol w stężeniu 2ug/ul infundowany jednostronnie do prawego HP i identyfikowała neurony theta-on (fazowe i toniczne), theta-off oraz komórki bramkujące w PH, SuM i poza tymi obszarami. Wyniki tego cyklu opisane są w rozdz 4.2.1. Tylko ok. 28% neuronów spośród 381 zarejestrowanych, miało związek z rytmem theta. Z tego komórek theta-on tonicznych było ponad 50%, a theta-off tonicznych ok. 37%. Theta-on znaleziono więcej w PH, a theta-off więcej w SuM. Pozostałe neurony zostały zakwalifikowane jako bramkujące typu B (4 neurony), typu D (6 neuronów) oraz dotychczas niesklasyfikowane nazwane jako „czasowe” (11 neuronów), znajdujące się głównie w PH. Ten typ komórek wykazywał regularną aktywność, niezależnie od początku i końca w zakresie częstotliwości theta i nie był skorelowany z oscylacją tego rytmu w PH (Ryc. 17).

III cykl doświadczeń, został przeprowadzony na pięćdziesięciu czterech samcach szczura szczepu Wistar podzielonych na cztery grupy doświadczalne. Miał on na celu zbadanie wpływu blokowania połączeń szczelinowych i udziału mineralokortykoidów w mechanizmie generowania oscylacji theta w PH.

1 grupa (20 szczurów) miała rejestrowaną aktywność połową PH po podaniu do prawej części PH karbenoksolonu w stężeniu 75µg/µl, niższym niż w I cyklu doświadczeń. Mikroiniekcja blokera połączeń szczelinowych spowodowała statystycznie istotny wzrost amplitudy oscylacji theta o 63% i częstotliwości rytmu o 0,8Hz w 30 min. u jedenastu szczurów (Ryc. 18A i 18B). U pozostałych szczurów, karbenoksolon indukował rytm theta przy braku aktywności spontanicznej (Ryc. 19).

2 grupa (liczby szczurów nie podano), otrzymała do PH mikroiniekcję trimetyloaminy (40µg/µl). Związek ten nie wpłynął znacząco na oscylacje rytmu theta, jedynie nieznacznie obniżył amplitudę rytmu theta (Ryc. 20A i 20B). Oprócz sformułowań, że trimetyloamina jest „otwieraczem połączeń szczelinowych” nie znalazłam cytatów literaturowych, które dokumentują takie jej działanie. Sądząc, na podstawie jej budowy chemicznej może mieć bardziej uogólnione działanie, niż specyficznie działanie na GJ.

Pytanie 7. Proszę bardziej szczegółowo wyjaśnić molekularne działanie trimetyloaminy na neurony.

3 grupa (liczby szczurów nie podano), miała infundowany do PH najpierw bloker receptorów MR – spironolakton (10µg/µl), a po 10 min. mieszaninę tego blokera z karbenoksolonem (w stężeniu 75µg/µl). Spironolakton znosił aktywność synchroniczną theta a karbenoksolon podany razem z blokerem MR nie aktywował rytmu theta (Ryc. 22).

4 grupa (liczby szczurów nie podano), była premedykowana obwodową infuzją atropiny w dawce 10µg/kg m.c. i po 10 min. otrzymywała do PH mikroiniekcję karbenoksolonu (w stężeniu 75µg/µl). W tym układzie doświadczalnym po zablokowaniu receptorów muskarynowych, karbenoksolon również nie aktywował rytmu theta (Ryc. 23).

Dyskusja została napisana na siedemnastu stronach, oddzielnie dla każdego cyklu doświadczeń. Rozdział ten jest bardzo wnikliwy, widać w nim ogromną wiedzę Doktorantki dotyczącą mechanizmu synchronizacji oscylacji theta formacji hipokampa oraz udziału tylnego podwzgórza i jąder suteczkowatych w systemie generowania synchronicznej oscylacji kory limbicznej.

Uwagi dotyczące Dyskusji.

1. Zawiera ona spore fragmenty ponownego opisu wyników, które można by pominąć i zwiększyć czytelność interpretacji własnych wyników w kontekście wyników innych autorów.
2. Podejmuję polemikę z proponowanym wytłumaczeniem mechanizmu działania karbenoksolonu w stymulacji rytmu theta. Rzeczywiście, połączenia szczelinowe w neuronach są po to, aby usprawniać przewodność jonową pomiędzy neuronami, dlatego ich zablokowanie powinno ingerować w proces synchronizacji przepływu prądów jonowych hamująco lub desynchronizująco. Dlatego słusznie Doktorantka poszukuje innego

wytłumaczenia uzyskanych wyników. Upatruje go w działaniu karbenoksolonu, jako blokera dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej, która dezaktywuje kortykosteron. W związku z tym, jej zablokowanie zwiększa jego działanie na procesy transkrypcji zarówno przez MR, jak i GR. Długoterminowe działanie fizjologicznych stężeń kortykosteronu za pośrednictwem MR w hipokampie jest związane z zwiększeniem plastyczności neuronów, w związku z tym toruje procesy zapamiętywania. Skutki obserwowane w czasie minut po mikroiniekcji kortykosteronu do jader PVN i SON podwzgórza oraz do pola CA1 hipokampa, to zwiększenie częstotliwości miniaturowych EPSPs i IPSC, zwiększenie mobilności AMPA-R w błonach oraz ilości mMR i mGR w hipokampie. Skutkiem zwiększenia ilości receptorów kortykosteroidowych może być nasilenie działania tzw. nie-genomowej ścieżki sygnałowej za pośrednictwem kinaz aktywowanych przez białka błonowe m. in. kaskadę Ras/Raf/MAPK. To krótka lista poznanych skutków działania kortykosteronu w strukturach formacji hipokampa oraz podwzgórza, do tego odbywa się za pośrednictwem receptorów MR i GR. W obecnie stosowanym modelu badano wpływ karbenoksolonu na synchronizację rytmu theta w ostrym doświadczeniu, do tego u zwierząt w narkozie uretanowej. Mam wątpliwość, czy przy tak zróżnicowanych czasowo i przestrzennie działaniach kortykosteronu, przez dwa typy receptorów, zlokalizowanych w różnych kompartmentach neuronów: w cytoplazmie i w błonach, w jego działaniu za pośrednictwem MR można upatrywać synchronizatora oscylacji wolnofalowej w PH czy w hipokampie.

3. Sądzę, że zaobserwowane zmniejszenie procentu wykrywalności spontanicznego rytmu theta u zwierząt 2,5-miesięcznych może wynikać z przyczyn technicznych przeprowadzenia operacji jak sugeruje Doktorantka, ale może także wynikać z małej grupy zwierząt w tej grupie wiekowej (trzyńaście szczurów).

Opis części eksperymentalnej kończy sześć jasno sformułowanych wniosków.

Pytanie 8. Proszę o rozwinięcie wniosku piątego. Które z uzyskanych wyników wskazują, że połączenia szczelinowe nie biorą udziału w modulowaniu oscylacji theta w PH?

Bibliografia została bardzo czytelnie napisana i obejmuje 259 pozycji, niestety znalazłam tylko 25 prac datowanych po roku 2010.

Podsumowanie

Stwierdzam, że techniczne i farmakologiczne opracowanie modelu stabilnej rejestracji oscylacji w zakresie theta z obszaru tylnego podwzgórza u szczurów w narkozie uretanowej może przyczynić się do wyjaśnienia roli tej struktury w wielopoziomowym systemie generowania i synchronizacji sieci neuronalnych w strukturach obszaru limbicznego. Zadane pytania i uwagi nie obniżają wysokiej oceny przeprowadzonych badań na każdym ich etapie: planowania, technicznego wykonania oraz opracowania i przedstawienia uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kłos-Wojtczak jest samodzielnym rozwiązaniem problemu naukowego i stanowi dowód posiadanej przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej i praktycznej w zakresie eksperymentalnych technik elektrofizjologicznych. Rozprawa spełnia również warunki prawne, zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r, z późniejszymi zmianami.

Z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Kłos-Wojtczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę istotność przeprowadzonych badań składam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

dr hab. n. med. Anna Walczewska, prof. nadzw.

Łódź, 7 stycznia 2019 r.