



dr hab. Justyna Rogalska, prof. UMK
Zakład Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister **Pauliny Kłos-Wojtczak** pt.
**„CHARAKTERYSTKA RYTMU THETA REJESTROWANEGO Z OBSZARU TYLNEGO
PODWZGÓRZA U ANESTETYZOWANEGO SZCZURA”**

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. Ponadto należy podkreślić, że większość przedstawionych w dysertacji wyników została już opublikowana w 3 oryginalnych pracach, które ukazały się w czasopiśmie o wysokim impact factor: Hippocampus, European Journal of Neuroscience i Brain Research, w których **Pani mgr Kłos-Wojtczak** jest współautorem. A zatem, zarówno sama tematyka badań, jak też ich wyniki w postaci opublikowanych prac, przeszły przez „gęste sito” ocen i recenzji specjalistów i uzyskały pozytywną ocenę. To bardzo ułatwia recenzującemu ocenę całego doktoratu.

Temat badawczy Pani mgr Pauliny Kłos-Wojtczak, doskonale wpisuje się w tematykę badań prowadzonych od lat z dużym sukcesem przez prof. dr hab. Jana Konopackiego, promotora dysertacji, jak również dr hab. Renatę Bocian, promotora pomocniczego. Rytm theta jest jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców elektroencefalograficznych (EEG) rejestrowanych w mózgach ssaków. Rola rytmu theta, który jest swoistym wskaźnikiem procesów nerwowych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie została dotąd do końca wyjaśniona. Dotychczasowe badania wskazują na istotne powiązanie tego rytmu z takimi procesami jak: nawigacja przestrzenna, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP), pamięć operacyjna, sen REM, rozpoznawanie słów czy integracja funkcji czuciowo-ruchowych. Występowanie rytmu theta w pewnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego u ludzi uzasadnia sens badań tego wzorca aktywności EEG. Gro zrealizowanych do tej pory

badania dotyczy hipokampalnego rytmu theta, Autorka podjęła się natomiast badań dotyczących charakterystyki tylnopodwzgórzowego rytmu theta, który jest dużo słabiej 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. 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 (259 pozycji!), co dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktorantkę.

We **wstępie** rozprawy doktorantka bardzo czytelnie i jasno przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy, uwzględniając prace macierzystej Katedry. Autorka przedstawia charakterystykę rytmu theta, opisuje jego parametry elektrofizjologicznie, porównuje jego znaczenie fizjologicznie u człowieka i kilku gatunków zwierząt. Wskazuje także, na dwa jego typy u gryzoni, zwracając szczególną uwagę na typ II (obserwowany w stanie znieruchomienia zwierzęcia), który jest przedmiotem badań doktorantki. Opisuje udział neuroprzekazników, które są zaangażowane w jego generowanie i modulację. Niezwykle ważny, z punktu widzenia podjętych badań, jest opis organizacji wstępującego układu synchronizującego rytm theta. Źródło tego niespecyficznego układu mózgowia leży w pniu mózgu, a 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 opisuje budowę połączeń szczelinowych i przedstawia dowody modulacji aktywności theta przez synapsy elektryczne. Ostatni rozdział dotyczący tylnego podwzgórza jako niezależnej struktury generującej rytm theta, 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 opracowanie modelu doświadczalnego *in vivo* umożliwiającego rejestrację rytmu theta z obszaru tylnego podwzgórza (obejmującego jądro tylnego podwzgórza oraz jądro nadsuteczkwate) u anestetyzowanych szczurów. Następny etap to charakterystyka neuronów theta-zależnych w obszarze tylnego podwzgórza na wcześniej opracowanym modelu. Kolejny, ostatni etap badań miał na celu sprawdzenie udziału połączeń szczelinowych w generowaniu rytmu theta.

Metodyka przeprowadzonych badań, nie budzi zastrzeżeń. Były to badania prowadzone *in vivo*. W badaniach elektrofizjologicznych dotyczących aktywności oscylacyjnej powszechnie stosuje się metody *in vitro*, ze względu na chociażby stosunkowo łatwą kontrolę warunków środowiska zewnątrzkomórkowego. Jednak poważnym ograniczeniem tego typu doświadczeń jest badanie procesów w strukturach pozbawionych impulsacji dochodzących z innych obszarów mózgowia, które mają decydujące znaczenie dla ostatecznego stanu czynnościowego badanej struktury. A zatem badania *in vivo* pozwalają na zweryfikowanie oraz uzupełnienie wiedzy pozyskanej z badań prowadzonych w warunkach pozaustrojowych. Wybór modelu czyli szczur

poddany anestezji uretanowej jest również jak najbardziej adekwatny. Jest to jedyny model doświadczalny umożliwiający rejestrację aktywności theta typu II. Stosowanie anestezji uretanowej pozwala regulować głębokość snu zwierząt i utrzymywać go na poziomie umożliwiającym naprzemienne rejestrowanie w zapisie EEG rytmu theta i aktywności zdesynchronizowanej (LIA). W badaniach prowadzonych na szczurach poddanych narkozie uretanowej doktorantka testowała wpływ podawanych domózgowo substancji modulujących rytm theta.

Jedyna moja uwaga do tej części pracy dotyczy braku informacji o wieku badanych zwierząt w I etapie badań, a okazuje się, że wiek jest bardzo ważną zmienną determinującą charakterystykę rytmu theta, co było również przedmiotem recenzowanej pracy i zostało opisane w części wynikowej rozprawy.

Autorka **wyniki** swojej pracy przedstawia bardzo jasno, konsekwentnie do podjętych zadań badawczych. Ich wizualizacja w postaci oryginalnych przebiegów rejestrowanej aktywności neuronalnej, histogramów analizy FFT, a także zbiorczych tabel i schematów lokalizacji rejestrowanych komórek, dodatkowo sprawiają, że są one bardzo czytelne. Jedyne zbyt małe są wykresy prezentujące wyniki analizy FFT, a przez to zupełnie nieczytelne są skale na osiach X i Y.

Dobrze przemyślane, logicznie zaplanowane badania, a także ich konsekwentna i precyzyjna realizacja, przyniosły spodziewane efekty. Doktorantka podjęła się opracowania modelu eksperymentalnego, w którym można wywołać rytm theta w tylnym podwzgórzu testując różne dawki związków farmakologicznych (karbacholu, karbenoksolonu i kwasu kainowego). Badania wykazały, że wszystkie te związki są zdolne do wywołania aktywności theta, jednak okazało się, że karbachol (agonista cholinergiczny) jest najbardziej efektywnym związkiem farmakologicznym w generowaniu rytmu theta w podwzgórzu. Autorka określiła stężenie tej substancji konieczne dla wywołania optymalnego efektu, i to stężenie stosowała w kolejnych etapach badań. Ponadto stwierdziła, że wiek zwierząt jest ważnym czynnikiem determinującym efektywność opracowanej metody.

W kolejnym cyklu badań doktorantka wykazała obecność w podwzgórzu komórek, których aktywność jest powiązana z rytmem theta. Stwierdziła obecność neuronów theta-ON i theta-OFF tonicznych, jak również neuronów bramkujących typu B, które wyładowują jedynie w okresie, który poprzedza moment pojawienia się w zapisie epizodu theta. Neurony bramkujące odpowiadają prawdopodobnie za programowanie rytmu theta w podwzgórzu wyznaczając czas trwania poszczególnych epizodów oraz przerw pomiędzy nimi, a zatem zarejestrowanie przez doktorantkę nowego typu neuronów bramkujących typu D, które wykazują wzmożoną aktywność na początku każdego epizodu rytmu theta jest szczególnie istotne. Autorka stwierdziła, że ta pula neuronów wykazywała cyt. „wzorec wyładowań dotychczas nieopisany”. Kolejna pula neuronów, które po raz pierwszy mgr Kłós-Wojtczak zarejestrowała w warunkach *in vivo* to komórki opisane przez autorkę jako „komórki czasowe”. Zacytuję „Ponadto wyizolowano i zarejestrowano nieopisany dotychczas wzorec aktywności komórkowej określonej jako „komórki czasowe” (ang.

„timing cell””. To jest niewątpliwe osiągnięcie i istotny nowy wkład autorki w badania rytmu theta. Jednak tutaj proszę o wyjaśnienie czy „nieopisany wzorzec” odnosi się do podwzgórza ? czy też taki rodzaj komórek nie został stwierdzony w żadnym innym obszarze mózgowia ?

W ostatnim etapie badań, autorka zastosowała związki chemiczne (tzw. blokery i „otwieracze”) zmieniające właściwości elektrofizjologiczne synaps elektrycznych, które jak się wydaje mają ogromne znaczenie dla generowania aktywności typu theta. Cechą charakterystyczną blokerów jest znoszenie lub osłabianie transmisji elektrycznej, natomiast „otwieraczy” usprawnienie przekazywania elektrycznego poprzez zwiększenie liczby synaps elektrycznych aktywnie uczestniczących w przekazywaniu pobudzenia między sąsiadującymi neuronami. Doktorantka stwierdziła, że blokowanie, jak i aktywacja połączeń szczelinowych nie miały znaczącego wpływu na generowanie aktywności theta w badanej strukturze. **Trimetyloamina** tzw. „otwieracz” synaps elektrycznych pozostała bez wpływu na aktywność w paśmie theta. Natomiast **karbenoksolon** - bloker synaps elektrycznych podany do podwzgórza spowodował wzrost mocy i amplitudy rytmu theta. Doktorantka sugeruje, że pobudzający efekt iniekcji karbenoksolonu na tylnopodwzgórzową aktywność theta należy wiązać z oddziaływaniem podanego związku na receptory mineralokortykoidowe (MR), bowiem karbenoksolon jest ich agonistą, z kolei blokada tych receptorów za pomocą ich antagonisty - **spironolaktonu** - znosiła obserwowany efekt.

W dyskusji poświęcono dużo miejsca potencjalnej roli receptorów mineralokortykoidowych w aktywności theta. Dyskutując tę część wyników, doktorantka pisze: „Takie objawy ze strony autonomicznego układu nerwowego wskazują na właściwości karbenoksolonu do blokowania 11- β -HSD, a co za tym idzie aktywacji MR, i wywołania efektu pobudzającego. Mechanizm ten został również potwierdzony w niniejszej rozprawie”. Jednak przeprowadzone badania z zastosowaniem agonistów i antagonistów receptorów MR mają jedynie charakter pośredni, nie badano zmian w gęstości czy aktywności receptorów MR w podwzgorzu, ani aktywności enzymu 11- β -HSD, zaangażowanego w przemiany metaboliczne kortykosteronu. Uważam, że powyższe stwierdzenie jest na wyrost; to zdanie powinno być napisane w trybie przypuszczającym, tak jak zostało to sformułowane we wnioskach: „Pobudzający efekt działania karbenoksolonu na tylnopodwzgórzową oscylację theta **może** być indukowany za pośrednictwem receptorów mineralokortykoidowych”. Nie mniej jednak rola receptorów mineralokortykoidowych w modulowaniu rytmu theta jest bardzo interesująca. W mózgowiu ligandem dla receptorów mineralokortykoidowych (MR) jest kortykosteron. Jeżeli są one zaangażowane w regulację rytmu theta to zmiany poziomu kortykosteronu powinny mieć wpływ na występowanie czy charakterystykę tego rytmu. Czy wiadomo coś na ten temat ? Jeżeli tak jest to pojawia się kolejne pytanie o udział w regulacji rytmu theta receptorów glikokortykoidowych (GR), dla których kortykosteron jest także ligandem. Oba typy receptorów mają różne powinowactwo do kortykosteronu, przy niskich stężeniach aktywowane są receptory MR, a przy wysokich - GR, ponadto różne są konsekwencje aktywacji jednych i drugich

receptorów. Nie był to oczywiście przedmiot badań w tej pracy, ale jestem ciekawa komentarza Autorki w tej sprawie.

Dyskusja świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Kłos-Wojtczak 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 dysertacji to dobry i dopuszczalny moment, w którym można podzielić się swoimi przemyśleniami i pomysłami dotyczącymi znaczenia zrealizowanych badań i ich potencjalnego wykorzystania w klinice. Tego mi w pracy zabrakło, stąd chciałabym aby doktorantka przedstawiła swój punkt widzenia w tej sprawie.

Podsumowaniem pracy mgr Kłos-Wojtczak jest 6 jasno przedstawionych wniosków, uzasadnionych uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych. Doktorantka wykazała, że karbachol ze względu na najdłuższy czas działania oraz brak początkowych efektów epileptogennych jest optymalnym związkiem farmakologicznym indukującym pojawienie się rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza i taki model *in vivo* wydaje się najodpowiedniejszy do długotrwałych rejestracji aktywności komórek theta-zależnych w podwzgórzu. Kolejny ważny wniosek jest taki, że w podwzgórzu istnieje populacja neuronów zaangażowanych w wyzwalamie i modulację rytmu theta: komórki theta-zależne toniczne oraz kilka rodzajów komórek bramkujących. Po raz pierwszy opisano nowy wzorzec komórkowej aktywności nazwanej „komórkami czasowymi”, które mogą brać udział w ułatwianiu synchronizacji komórek tonicznych w obszarze tylnego podwzgórza. Dowiedziono, że połączenia szczelinowe nie biorą udziału w powstawaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza, a wzrost niektórych parametrów tylnopodwzgórzowego rytmu theta po iniekcji karbenoksolonu – blokera połączeń szczelinowych, może być związany z oddziaływaniem tego związku na receptory mineralokortykoidowe.

Czytając pracę znalazłam kilka literówek czy skrótów myślowych, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Przytoczę kilka przykładów:

- słowo „anestetyzowanych”, w wielu miejscach pracy napisano „anastetyzowanych„ (nawet w tytule dysertacji !) lub
 - „dohipokamplane” zamiast dohipokampalne.
 - Str. 10 „rejestracji theta” powinno być „rejestracji rytmu theta”
 - Str. 45 „rytm theta obserwowany w tylnym podwzgórzu miał niższą częstotliwością”, powinno być „częstotliwość”
 - Str. 50 „Akwizycja danych aktywności polowej hipokampa była możliwa dzięki użyciu programu komputerowego Spike 2 (Cambridge Electronic Design Ltd., Anglia)”. Powinno być „podwzgórza”
- Jeżeli chodzi o skróty myślowe to na jeden chciałam zwrócić uwagę.

Np. na str. 7 w streszczeniu napisano:

„rejestracje lokalnych neuronów związanych z rytmem theta obserwowanym w obszarze tylnego podwzgórza” to zdanie powinno brzmieć „rejestracje **aktywności** lokalnych neuronów

związanych z rytmem theta obserwowanym w obszarze tylnego podwzgórza”. Wszak prowadzi się rejestrację jakiegoś parametru. Ten skrót myślowy pojawia się w wielu innych miejscach, np. „rejestracji populacji neuronów”, „rejestracja 381 neuronów”, „rejestracja komórek theta-zależnych”, „zewnątrkomórkowa rejestracja pojedynczych neuronów”.

Chociaż trzeba nadmienić, że w wielu miejscach sformułowania są poprawne, jak np. rejestracja aktywności komórek, rejestracja rytmu theta itd.

I jeszcze jedna nieścisłość, która pojawia się w pracy.

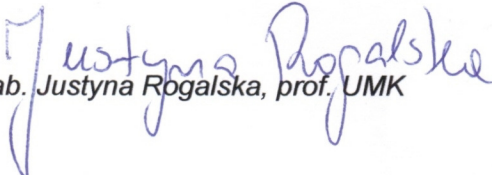
Na str. 45 czytamy: „ Charakterystyka neuronów theta-zależnych rejestrowanych z obszaru tylnego podwzgórza oraz jądra nadsuteczkowego u uretanizowanych szczurów” i podobnie na str. 54 „Ocena wpływu farmakologicznego modulowania połączeń szczelinowych w obszarze tylnego podwzgórza oraz jądra nadsuteczkowego na lokalną aktywność w paśmie theta”

Taki zapis sugeruje, że jądro nadsuteczkowe nie należy do obszaru tylnego podwzgórza, a oczywiście należy, o czym zresztą Autorka pisze w wielu miejscach dysertacji.

Większość tych błędów nie ma istotnego znaczenia, a z całą pewnością nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę części merytorycznej dysertacji. Nie mniej jednak, warto aby młodzi naukowcy z większą uwagą podchodzili do takich wydać by się mogło „detali”, ponieważ staranność w pisaniu pracy naukowej tworzy pewien wizerunek autora, ale co ważniejsze czasami taka nazwijmy to „nieuwaga” może prowadzić do niezamierzonych błędów merytorycznych.

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr **Paulina KŁOS-WOJTCZAK** wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom, a także ich konsekwentnej realizacji z wykorzystaniem technik elektrofizjologii *in vivo* w połączeniu z farmakologią. Wykazała zdolność badanej struktury mózgowia do generowania rytmu theta. Po raz pierwszy określiła nowe rodzaje komórek w tylnym podwzgórzu związanych z aktywnością theta. A zatem przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie mechanizmu generowania rytmu theta w mózgowiu szczura.

Konkludując, uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 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 zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny KŁOS-WOJTCZAK do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Justyna Rogalska, prof. UMK

Toruń, dnia 05. styczeń 2019