



Uniwersytet  
**ŁÓDZKI**

dr Tomasz Kowalczyk

# **Autoreferat**

Łódź, kwiecień 2015

1. Imię i Nazwisko:

**Tomasz Kowalczyk**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

<b>Magister biologii</b>	1998	Temat pracy magisterskiej: „ <i>Wpływ temperatury na czynność oscylacyjną hipokampa w warunkach pozaustrojowych (in vitro)</i> ” Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki Promotor: prof. dr hab. Jan Konopacki
<b>Doktor nauk biologicznych</b>	2003	Temat rozprawy doktorskiej: „ <i>Aktywność elektroencefalograficzna (EEG) formacji hipokampalnej in vitro: wpływ temperatury oraz profil warstwowy amplitudy i fazy</i> ” Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki Promotor: prof. dr hab. Jan Konopacki

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1999 – 2003	<b>Asystent</b>	Zakład Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego
2003 – obecnie	<b>Adiunkt</b>	Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki:

A. *Tytuł osiągnięcia naukowego:*

**Formacja hipokampa i obszar tylnego podwzgórza, jako generatory aktywności rytmicznej theta – badania *in vitro* oraz *in vivo***

B. *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:*

1/ Konopacki J., **Kowalczyk T.**, Gołębiowski H. (2004) Electrical coupling underlies theta oscillations in hippocampal formation slices. *Brain Res.* 1019: 270-274.

**Impact Factor – 2.389, Punkty MNiSW – 20, Liczba cytowań wg WoS – 22**

2/ Konopacki J., Eckersdorf B., **Kowalczyk T.**, Gołębiowski H. (2006) Firing cell repertoire during carbachol-induced theta rhythm in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 23: 1811-1818.

**Impact Factor – 3.709, Punkty MNiSW – 32, Liczba cytowań wg WoS – 11**

3/ **Kowalczyk T.**, Konopacki J., Bocian R., Caban B. (2013) Theta-related gating cells in hippocampal formation: *in vivo* and *in vitro* study. *Hippocampus.* 23: 30-39.

**Impact Factor – 4.302, Punkty MNiSW – 40, Liczba cytowań wg WoS – 4**

4/ **Kowalczyk T.**, Bocian R., Konopacki J. (2013) The generation of theta rhythm in hippocampal formation maintained *in vitro*. (Review) *Eur. J. Neurosci.* 37: 679–699.

**Impact Factor – 3.669, Punkty MNiSW – 30, Liczba cytowań wg WoS – 3**

5/ **Kowalczyk T.**, Bocian R., Caban B., Konopacki J. (2014) Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: *in vivo* and *in vitro* studies. *Hippocampus.* 24: 7-20.

**Impact Factor – 4.302, Punkty MNiSW – 35, Liczba cytowań wg WoS – 1**

Sumaryczne parametry publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

**Impact Factor (wg JCR) – 18.371**

**punkty MNiSW – 157**

**liczba cytowań – 41**

(Impact Factor oraz punktacja MNiSW podane zgodnie z rokiem publikacji; liczba cytowań wg WoS z dnia 31.03.2015)

C. *Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*

WPROWADZENIE

Rytm theta jest jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców elektroencefalograficznych (EEG) rejestrowanych w mózгах ssaków. Aktywność theta u ludzi występuje w postaci regularnych fal o częstotliwości od 4 do 7 Hz (Mitchel i wsp., 2008). Rola rytmu theta, jako wyznacznika specyficznych procesów nerwowych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego, nie została do końca wyjaśniona, jednak badania prowadzone od kilkudziesięciu lat wskazują na istotne powiązanie rytmu z takimi procesami jak: nawigacja przestrzenna, pamięć operacyjna, sen REM, rozpoznawanie słów czy integracja funkcji czuciowo-ruchowych (Cantero et al., 2003; Caplan et al., 2003; Meador et al., 1991; Mitchell et al., 2008). Występowanie rytmu theta w pewnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego u ludzi, uzasadnia sens badań tego wzorca aktywności EEG, może bowiem doprowadzić do lepszego poznania etiologii takich schorzeń jak padaczka czy choroba Alzheimera (Adaya-Villanueva i wsp., 2010; Colom, 2006).

U szczurów, najczęściej wykorzystywanych zwierząt laboratoryjnych, rytm theta generowany jest w postaci wysokoamplitudowych fal o prawie sinusoidalnym przebiegu i częstotliwości od 3 do 12 Hz. Aktywność theta może być rejestrowana z wielu obszarów układu limbicznego, jednak główną strukturą zaangażowaną w powstawanie tego wzorca EEG jest formacja hipokampa (HPC) (Bland, 1986). Doświadczenia prowadzone w latach 70. i 80. ubiegłego wieku wykazały, że rytm theta u gryzoni ma charakter heterogenny. W zależności od powiązań behawioralnych, wrażliwości na anestetyki oraz podłoża neurochemicznego, można wyróżnić dwa typy rytmu. Rytm theta typu 1, rejestrowany w zakresie częstotliwości od 7 do 12 Hz, jest powiązany z ruchem zwierzęcia, ma charakter niecholinergiczny i znoszony jest przez większość związków anestetycznych. Z kolei rytm theta typu 2, o częstotliwości od 4 do 7 Hz, ma podłoże cholinergiczne, obserwowany jest w stanie znieruchomienia zwierzęcia i nie jest tłumiony po podaniu anestetyków (Bland, 1986; Sainsbury, 1985; Vanderwolf, 1969).

W 1987 roku wykazano, że rytmiczna aktywność wolnofalowa theta może być, w pewnych ściśle określonych warunkach, indukowana również w preparatach formacji

hipokampa utrzymywanych *in vitro*. W badaniach tych wykazano, że perfuzja skrawków hipokampalnych roztworem karbacholu (agonisty receptorów cholinergicznym) skutkuje generowaniem, pojawiającego w kilkusekundowych epizodach, rytmu theta o amplitudzie od 0.1 do 2 mV i częstotliwości w zakresie od 4 do 12 Hz (Konopacki i wsp., 1987). Doświadczenia te zapoczątkowały szeroki cykl badawczy, mający na celu określenie podstawowych parametrów fizjologicznych i podłoża neurochemicznego rytmu theta generowanego *in vitro*, oraz odpowiedź na pytanie, czy rytm rejestrowany w warunkach pozaustrojowych można traktować jako odpowiednik aktywności rytmicznej obserwowanej *in vivo*. Wyniki badań prowadzonych zarówno na skrawkach kory nowej (Bao i Wu, 2003), kory śródwęchowej (Goutagny i wsp., 2008), jak i formacji hipokampa (Konopacki, 1998) wskazują jednoznacznie, że rytm rejestrowany w skrawkach mózgowych *in vitro* odtwarza większość cech rytmu theta typu 2 naturalnie generowanego w mózgach ssaków.

Podstawowymi celami omawianego cyklu publikacji było: i/ poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów związanych z generowaniem rytmu theta rejestrowanego w preparatach formacji hipokampa *in vitro*, ii/ określenie, czy aktywność oscylacyjna w pasmie theta może być rejestrowana poza strukturami układu limbicznego, szczególnie w obszarze tylnego podwzgórza, stanowiącym kluczowy element wstępującego układu synchronizującego czynność formacji hipokampa.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

**Konopacki J., Kowalczyk T., Gołębiowski H. (2004) Electrical coupling underlies theta oscillations in hippocampal formation slices. Brain Res. 1019: 270-274.**

Synapsy elektryczne to błonowe struktury kanałowe określone jako tzw. połączenia szczelinowe (gap junctions, GJs). Badania prowadzone od końca lat 80. ubiegłego wieku wskazywały na istotną rolę synaps elektrycznych w powstawaniu synchronicznej aktywności EEG w ośrodkowym układzie nerwowym. W badaniach tych wykazano, że połączenia szczelinowe biorą udział w generowaniu aktywności epileptycznej (Carlen i wsp., 2000), rytmu gamma (Traub i wsp., 2000) i tzw. szybkich oscylacji (150-200 Hz) (Draguhn i wsp., 1998). Problem bezpośredniego udziału połączeń szczelinowych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta nie był wcześniej analizowany.

Celem przeprowadzonych przez nas badań było określenie roli synaps elektrycznych w powstawaniu rytmu theta, wywoływanego cholinergicznie w preparatach skrawków hipokampalnych *in vitro*.

Aby przeanalizować udział połączeń szczelinowych w generowaniu indukowanego karbacholem rytmu theta oraz związanej z rytmem aktywności pojedynczych neuronów HPC *in vitro*, przeprowadziliśmy dwa niezależne cykle badawcze. W pierwszym z nich, skrawki formacji hipokampa generujące wywołany cholinergicznie rytm theta, poddawano perfuzji roztworami blokerów połączeń szczelinowych: chininy lub karbenoksolonu. Perfuzja skrawków hipokampalnych wspomnianymi blokerami GJs powodowała stopniowy zanik wywołanej wcześniej aktywności oscylacyjnej. Pełny efekt blokowania występował po 40-45 min. i rozwijał się w trzech charakterystycznych fazach. W pierwszej fazie wywołany cholinergicznie rytm theta oraz towarzyszące mu rytmiczne wyładowania komórkowe nie ulegały zmianie. Częstotliwość wyładowań komórkowych oraz częstotliwość i amplituda rejestrowanego rytmu theta były podobne do obserwowanych w kontroli, przed perfuzją skrawków roztworami chininy lub karbenoksolonu. W drugiej fazie, pojawiającej się zazwyczaj 25-35 min. od momentu rozpoczęcia perfuzji preparatów roztworami blokerów GJs, rytm theta ulegał wyraźnej desynchronizacji, a jego częstotliwość ulegała obniżeniu. W ostatniej fazie, obserwowanej po 40-45 min. od chwili rozpoczęcia perfuzji, występował całkowity zanik zarówno aktywności komórkowej, jak i polowej aktywności theta. Blokujący wpływ chininy i karbenoksolonu był nieodwracalny: utrzymywał się nawet po 2-3 godzinach płukania skrawków w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) nie zawierającym blokerów GJs.

Aby ocenić, czy efekt hamowania rytmu theta *in vitro* po zablokowaniu połączeń szczelinowych może być odwracalny, przeprowadziliśmy drugi cykl badań, w którym skrawki inkubowano wstępnie w roztworze chininy lub karbenoksolonu przez 45 min. Po okresie preinkubacji w roztworach blokerów połączeń szczelinowych, preparaty utrzymywano przez kolejne 1, 2 lub 3 godziny w ACSF nie zawierającym blokerów GJs. W preparatach preinkubowanych przez 45 min. w roztworze chininy, a następnie płukanych przez 1 godzinę w ACSF nie rejestrowano aktywności polowej, ani wyładowań komórkowych po podaniu karbacholu. W preparatach płukanych przez 2 godziny w ACSF, a następnie poddanych perfuzji karbacholem, pojawiała się sporadyczna aktywność epileptyczna, która ulegała wyraźnemu nasileniu w preparatach płukanych w ACSF przez 3 godziny. Z kolei w skrawkach

preinkubowanych przez 45 min. w roztworze karbenoksolonu, a następnie płukanych przez 1 lub 2 godziny w ACSF nie rejestrowano żadnej synchronicznej aktywności EEG w odpowiedzi na drażnienie cholinergiczne, natomiast po 3 godzinach płukania, preparaty generowały jedynie rzadkie, nieregularne wyładowania epileptyczne. Wyniki uzyskane w obu cyklach doświadczalnych pozwoliły stwierdzić, że zablokowanie synaps elektrycznych silnie obniża stopień synchronizacji lokalnych sieci neuronalnych formacji hipokampa, co prowadzi do zaniku zdolności do generowania aktywności rytmicznej theta i towarzyszących jej wyładowań komórkowych, a obserwowany efekt jest nieodwracalny.

**Konopacki J., Eckersdorf B., Kowalczyk T., Gołębiowski H. (2006) Firing cell repertoire during carbachol-induced theta rhythm in rat hippocampal slices. Eur. J. Neurosci. 23: 1811-1818.**

Wyniki opisane w przedstawionej powyżej pracy wskazywały, że powstawaniu polowego rytmu theta w preparatach formacji hipokampa towarzyszy aktywność specyficznej grupy neuronów związanych z generowaniem aktywności rytmicznej *in vitro*. Pierwszych zewnątrzkomórkowych rejestracji aktywności neuronów hipokampalnych, wyładowujących rytmicznie podczas generowanego lokalnie rytmu theta dokonano na początku lat 60. ub. wieku (Green i wsp., 1960). System klasyfikacji neuronów, których aktywność związana jest z rejestrowanym polowo rytmem theta, wprowadzony został jednak dopiero w roku 1987 przez Coloma i Blanda (Colom i Bland, 1987). Autorzy ci podzielili neurony, których aktywność skorelowana jest z rytmem theta, na dwie odrębne populacje, które ze względu na relacje pomiędzy generowanymi przez nie potencjałami czynnościowymi a polową aktywnością rytmiczną określili, jako komórki „theta-on” i „theta-off”. Wyznacznikiem charakteryzującym komórki „theta-on” jest wzrost poziomu wyładowań podczas polowego rytmu theta i brak aktywności, gdy w zapisie EEG pojawia się desynchronizacja. Z kolei komórki „theta-off” wyładowują podczas aktywności zdesynchronizowanej natomiast, gdy w zapisie EEG pojawia się rytm theta, pozostają nieaktywne. Oba typy komórek związanych z rytmem posiadają dwie podklasy – komórki toniczne oraz fazowe. Neurony fazowe charakteryzują się wyładowaniami pojawiającymi się w salwach powiązanych z fazą rejestrowanego równocześnie rytmu, podczas gdy neurony toniczne wyładowują pojedynczymi potencjałami czynnościowymi niezwiązanymi z fazą rejestrowanego polowo rytmu (Colom i Bland, 1987; Bland i Colom, 1993).

Opisywane w prezentowanej pracy badania aktywności komórek formacji hipokampa związanych z rytmem theta rejestrowanym w warunkach *in vitro* miały na celu scharakteryzowanie wzorców wyładowań tych neuronów oraz próbę ich sklasyfikowania zgodnie z kryteriami wprowadzonymi w doświadczeniach prowadzonych wcześniej w warunkach *in vivo* (Colom i Bland, 1987).

W badaniach tych zarejestrowaliśmy trzy podstawowe wzorce aktywności neuronów HPC wyładowujących w czasie generowania wywołanego cholinergicznym rytmem theta *in vitro*. Pierwszy wzorzec prezentowały neurony, które sklasyfikowaliśmy jako „theta-on” fazowe, wyładowujące dokładnie w trakcie generowanych równocześnie epizodów połowej aktywności rytmicznej. Neurony te pozostawały „ciche” (nieaktywne) w przerwach pomiędzy epizodami rytmu. Wykazaliśmy, że aktywność neuronów tej grupy związana była ściśle z fazą rejestrowanego równocześnie rytmu theta i charakteryzowała się stałą częstotliwością. Drugi wzorzec aktywności prezentowały neurony „theta-on” toniczne wyładowujące również jedynie w czasie połowej aktywności theta. Wyładowania tych neuronów były nieregularne i niezwiązane z fazą rejestrowanego równocześnie rytmu. Trzeci wzorzec zaobserwowaliśmy w przypadku neuronów wyładowujących jedynie w czasie przerw pomiędzy epizodami rytmu. Analiza wykazała, że komórki tej grupy charakteryzowały się nierytmicznymi wyładowaniami o zmiennej częstotliwości. Neurony te określiliśmy jako komórki „theta-off” toniczne.

Najbardziej interesującym odkryciem omawianego cyklu badań było zarejestrowanie nieopisywanej wcześniej grupy komórek, których aktywność różniła się znacząco od znanych wcześniej wzorców. Wyładowania tych komórek powiązane były z pojawianiem się i zanikaniem rejestrowanych *in vitro* epizodów aktywności rytmicznej, stąd określiliśmy je mianem komórek bramkujących rytm theta. Komórki bramkujące typu A wyładowywały tylko na początku i na końcu każdego kolejnego epizodu rytmu theta, podczas gdy komórki bramkujące typu B wyładowywały w okresie bezpośrednio poprzedzającym epizody rytmu, a ich aktywność zanikała, gdy w połowym połowej pojawiał się rytm theta.

Zarejestrowanie licznej populacji neuronów „theta-on” i „theta-off” w preparatach HPC utrzymywanych w warunkach *in vitro* pozwoliło wykazać, że aktywność pojedynczych neuronów, rejestrowana w czasie generowania wywołanego karbacholem rytmem theta, nie różni się zasadniczo od aktywności komórkowej obserwowanej *in vivo*, a kryteria wprowadzone do klasyfikacji zachowania neuronów związanych z rytmem theta *in vivo*



(Colom i Bland, 1987; Bland i Colom, 1993) są w znacznej mierze uniwersalne. Dodatkowo, wykazaliśmy obecność w sieciach neuronalnych formacji hipokampa neuronów bramkujących, których aktywność może być związana z programowaniem czasu trwania epizodów rytmu theta. Badania opisywane w powyższej pracy finansowane były z funduszy Komitetu Badań Naukowych (Grant KBN nr 0081/P04/2002/23).

**Kowalczyk T., Konopacki J., Bocian R., Caban B. (2013) Theta-related gating cells in hippocampal formation: *in vivo* and *in vitro* study. *Hippocampus*. 23: 30-39.**

Rytm theta rejestrowany w skrawkach formacji hipokampa *in vitro* pojawia się w postaci kilkusekundowych epizodów, przedzielonych okresami ciszy elektroencefalograficznej. Innymi słowy, mimo, że pobudzenie cholinergiczne (stosowane w większości badań *in vitro*) preparatów HPC jest ciągłe (perfuzja roztworem karbacholu), aktywność rytmiczna pojawia się i zanika cyklicznie, podobnie jak ma to miejsce w warunkach *in vivo* (Bland, 1986; Konopacki, 1998). Obserwacje te wskazują, że mechanizmy związane z „włączaniem” i „wyłączaniem” stanu oscylacji w sieciach neuronalnych formacji hipokampa są zlokalizowane wewnątrz samych tych sieci, a synchronizacyjne połączenia z innych struktur mózgu (np. obszaru przysiódkowej przegrody) nie są niezbędne do występowania cykliczności rytmu. W opisanych powyżej doświadczeniach wykazaliśmy, że elementami neuronalnymi związanymi z procesem „włączania” i „wyłączania” epizodów oscylacji w preparatach formacji hipokampa *in vitro* mogą być odkryte przez nas komórki bramkujące.

Pierwszym celem przeprowadzonych badań było ustalenie obecności komórek bramkujących w odseparowanych od siebie wewnątrzhipokampalnych generatorach rytmu theta – skrawkach cząstkowych pól CA1 i CA3c hipokampa właściwego. W związku z tym, że generowanie rytmu theta w obrębie formacji hipokampa (zarówno *in vivo* jak i *in vitro*) jest wynikiem współdziałania dwóch systemów neurotransmisyjnych: cholinergicznego oraz GABAergicznego (Gołębiewski i wsp., 1996; Smythe i wsp., 1992), w omawianych badaniach rytm theta wywoływany był przez perfuzję preparatów HPC roztworami: karbacholu, karbacholu i bikukuliny (antagonisty receptorów GABA<sub>A</sub>) lub karbacholu i 2-hydroksysaklofenu (antagonisty receptorów GABA<sub>B</sub>). Drugim celem doświadczeń było

określenie, czy komórki bramkujące obecne są również w preparatach HPC *in vivo*, podczas generowania rytmu theta typu 2 u anestetyzowanych szczurów.

W przeprowadzonych badaniach zarejestrowaliśmy aktywność 299 komórek związanych z rytmem theta w preparatach formacji hipokampa *in vitro* oraz *in vivo*. Dwadzieścia spośród wszystkich 299 neuronów (6.6%) sklasyfikowaliśmy jako komórki bramkujące. Zaobserwowaliśmy aktywność trzech odmiennych typów komórek bramkujących rytm theta zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Komórki bramkujące typu A wyładowywały tylko na początku i na końcu każdego kolejnego epizodu rytmu theta, komórki bramkujące typu B wyładowywały w okresie bezpośrednio poprzedzającym epizody rytmu, a ich aktywność zanikała, gdy w zapisie aktywności polowej pojawiał się rytm theta, a komórki bramkujące typu C wyładowywały tylko na początku przerwy pomiędzy kolejnymi epizodami rytmu theta.

W pierwszym etapie doświadczeń (badania *in vitro*) zarejestrowaliśmy aktywność 207 komórek związanych z rytmem theta w preparatach cząstkowych, w których aktywność rytmiczna wywoływana była perfuzją roztworami: karbacholu, karbacholu i bikukuliny lub karbacholu i 2-hydroksysaklofemu. Szesnaście spośród wszystkich 207 neuronów (7.5%) sklasyfikowano jako komórki bramkujące (3 komórki typu A, 6 komórek typu B oraz 7 komórek typu C), przy czym 5 neuronów bramkujących zlokalizowanych było w preparatach cząstkowych CA1, a 11 neuronów bramkujących w preparatach CA3c. Należy zwrócić uwagę na fakt, że metoda wywoływania rytmu theta (perfuzja roztworami: karbacholu, karbacholu i bikukuliny lub karbacholu i 2-hydroksysaklofemu) nie miała wpływu na lokalizację neuronów bramkujących w opisywanych badaniach.

W drugim etapie doświadczeń (badania *in vivo*) zarejestrowaliśmy aktywność 92 komórek związanych z rytmem theta w preparatach anestetyzowanych szczurów. Cztery spośród wszystkich 92 neuronów (4.3%) sklasyfikowano jako komórki bramkujące (1 komórka typu A, 1 komórka typu B oraz 2 komórki typu C), przy czym weryfikacja histologiczna wykazała, że wszystkie neurony bramkujące zlokalizowane były w obszarze komórek piramidowych pola CA3. Podsumowując wyniki obu cykli doświadczalnych można stwierdzić, że opisywane neurony bramkujące mogą pełnić funkcje związane z programowaniem w formacji hipokampa czasu trwania epizodów polowej aktywności theta oraz czasu trwania przerw pomiędzy epizodami. Co więcej, wewnętrzny mechanizm bramkowania rytmu wydaje się być uniwersalny, na co wskazuje obecność wszystkich trzech

typów komórek bramkujących zarówno w preparatach *in vitro*, jak i w warunkach *in vivo* – w formacji hipokampa anestetyzowanych szczurów. Badania przedstawione w powyższej pracy finansowane były z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant MNiSW nr N N303 091834).

**Kowalczyk T., Bocian R., Konopacki J. (2013) The generation of theta rhythm in hippocampal formation maintained *in vitro*. (Review) Eur. J. Neurosci. 37: 679–699.**

Celem omawianej pracy przeglądowej było scharakteryzowanie podstawowych mechanizmów związanych z generowaniem aktywności rytmicznej theta w skrawkach formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych. W artykule przedstawiliśmy podsumowanie wyników badań nad rytmem theta rejestrowanym w warunkach pozaustrojowych, które dotyczyły jego podłoża farmakologicznego, rozmieszczenia wewnątrzhipokampalnych generatorów aktywności theta, wpływu zmian temperatury oraz udziału synaps elektrycznych w generowaniu rytmu, podsumowaliśmy także wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe mechanizmy związane z generowaniem omawianego wzorca aktywności EEG *in vitro*. Porównanie zaprezentowanych badań z wynikami doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vivo* wskazuje jednoznacznie, że rytm theta rejestrowany w warunkach pozaustrojowych stanowi odpowiednik rytmu obserwowanego w formacji hipokampa *in vivo*. Połączenie wniosków płynących z omówionych badań pozwoliło nam przedstawić prawdopodobny mechanizm generowania aktywności oscylacyjnej w obrębie skrawka formacji hipokampa. W warunkach *in vitro* toniczne pobudzenie cholinergiczne skrawków HPC prowadzi do aktywacji komórek bramkujących rytm theta – neuronów odpowiedzialnych za uruchamianie mechanizmów oscylacyjnych w formacji hipokampa. Wyładowania specyficznych komórek bramkujących powodują aktywację komórek „theta-on” w trakcie epizodów rytmu theta oraz komórek „theta-off” w trakcie przerw pomiędzy epizodami rytmu. Zsumowane rytmiczne wahania potencjału błonowego fazowych komórek theta-on obserwowane są w postaci epizodu polowego rytmu theta. Odpowiedni poziom synchronizacji elementów sieci neuronalnych formacji hipokampa, zaangażowanych w powstawanie rytmu, utrzymywany jest dzięki występowaniu między nimi połączeń szczelinowych (synaps elektrycznych). Tak generowany rytm theta charakteryzuje się specyficznym profilem warstwowym powstającym w wyniku

równoczesnego generowania polowej aktywności rytmicznej w dwóch niezależnych generatorach: warstwach komórek piramidowych pól CA1 i CA3 hipokampa właściwego. W opisywanej pracy przeglądowej przedstawiono m.in. badania finansowane ze środków Komitetu Badań Naukowych (Grant KBN nr 4 P05A 060.15.98; Grant KBN nr 0081/P04/2002/23), Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant MNiSW nr N N303 091834) oraz Narodowego Centrum Nauki (Grant NCN nr UMO-2011/01/B/NZ4/00373).

**Kowalczyk T., Bocian R., Caban B., Konopacki J. (2014) Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: *in vivo* and *in vitro* studies. Hippocampus. 24: 7-20.**

W warunkach *in vivo* generowanie rytmu theta w formacji hipokampa oraz innych strukturach układu limbicznego zależne jest od aktywacji szeregu struktur, od pnia mózgu, przez międzymózgowie, aż do podstawnych części kresomózgowia, które stanowią tzw. wstępujący system synchronizujący (Bland i Oddie, 1998; Vertes i Kocsis 1997). Szlaki systemu synchronizującego mają początek w przednim jądrze siatkowatym mostu oraz jądrze konarowo-mostowym nakrywki, których włókna unerwiają tylne części międzymózgowia, głównie jądra tylnego podwzgórza oraz jądra nadsuteczkwate. Wstępujące drogi nerwowe z obszaru tylnego podwzgórza docierają następnie do obszaru przyśrodkowej przegrody, który przekazuje pobudzenie z wstępującego systemu synchronizującego do poszczególnych struktur układu limbicznego, takich jak: kora zakrętu obręczy, kora śródwęchowa oraz formacja hipokampa. Rytmiczne impulsy, przekazywane z przegrody do wymienionych części układu limbicznego są bezpośrednim bodźcem do generowania w nich polowej aktywności oscylacyjnej – rytmu theta (Bland, 1986; Bland i Oddie, 1998; Vertes i Kocsis 1997). Obszar tylnego podwzgórza (PHa) wydaje się być kluczowym elementem wstępującego systemu synchronizującego (Oddie i wsp., 1994). Udowodniono, że zarówno w jądrach tylnego podwzgórza, jak i jądrach nadsuteczkwatych występuje duża liczba komórek „theta-on” fazowych, ponadto drażnienie elektryczne lub iniekcje agonistów cholinergicznym do tego obszaru prowadzą do generowania dobrze zsynchronizowanego rytmu theta w formacji hipokampa. Wykazano również, że prawdopodobnie w PHa programowana jest częstotliwość rytmu theta generowanego w formacji hipokampa (Oddie i wsp., 1994). Nigdy jednak nie prowadzono systematycznych badań dotyczących generowania lokalnego rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza.

Celem doświadczeń przedstawionych w omawianej pracy było zbadanie zdolności obszaru tylnego podwzgórza do samodzielnego generowania aktywności rytmicznej theta oraz określenie, czy obserwowany lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza rytm generowany jest niezależnie od rytmu theta rejestrowanego w formacji hipokampa. Drugim celem było określenie, czy rytm theta może być obserwowany w obszarze tylnego podwzgórza również w warunkach całkowitego odnerwienia struktury – w preparatach PHa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych.

W pierwszym etapie badań wykazaliśmy, że rytm theta może być generowany spontanicznie w obszarze tylnego podwzgórza w preparatach anestetyzowanego szczura. Szczegółowe badania topograficzne pozwoliły ustalić, że rytm rejestrowany lokalnie w PHa generowany jest w dwóch strukturach – jądrze tylnego podwzgórza oraz jądrze nadsuteczkowatym. Wykazaliśmy ponadto, że rejestrowana aktywność rytmiczna ma podłoże cholinergiczne, muskarynowe – podanie siarczanu atropiny prowadziło do blokowania rejestrowanego w PHa rytmu theta. W kolejnym etapie badań *in vivo* prowadziliśmy równoczesne rejestracje aktywności EEG w obszarze PHa oraz w formacji hipokampa. W doświadczeniach tych wykazaliśmy, że aktywność theta rejestrowana równocześnie w obu tych strukturach ma najczęściej odmienny przebieg czasowy. Zaobserwowaliśmy 4 podstawowe wzorce współwystępowania rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza i formacji hipokampa: 1/ rytm theta generowany był równocześnie w PHa i HPC i charakteryzował się taką samą częstotliwością, 2/ rytm theta generowany był równocześnie w PHa i HPC, ale charakteryzował się odmienną częstotliwością, 3/ w PHa rejestrowano rytm theta podczas aktywności zdesynchronizowanej obserwowanej w HPC, 4/ w PHa rejestrowano aktywność zdesynchronizowaną podczas generowania rytmu theta w HPC. Opisane powyżej wyniki wskazywały, że rytm theta rejestrowany lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza u anestetyzowanego szczura generowany jest niezależnie od hipokampalnego rytmu theta. Model rejestracji aktywności polowej w preparatach anestetyzowanych zwierząt *in vivo* nie daje jednak ostatecznej odpowiedzi na pytanie, czy dana struktura mózgu zdolna jest do samodzielnego generowania aktywności oscylacyjnej. W związku z tym przeprowadziliśmy kolejną serię doświadczeń.

W badaniach, które wykonane zostały na preparatach PHa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych, wykazaliśmy, że aktywność rytmiczna theta może być generowana w obszarze tylnego podwzgórza również w warunkach pełnego odnerwienia

struktury. W doświadczeniach tych zarejestrowaliśmy rytm theta w skrawkach PHa perfundowanych roztworem agonisty cholinergicznego – karbacholu. Co więcej, rytm rejestrowany w warunkach *in vitro* generowany był w identycznych obszarach preparatów tylnego podwzgórza, jak miało to miejsce w badaniach *in vivo* – w jądrze tylnego podwzgórza oraz jądrze nadsuteczkwatym. Rytm theta rejestrowany w skrawkach PHa zanikał po perfuzji preparatów roztworem siarczanu atropiny, co wskazywało na jego muskarynowy charakter.

Podsumowując, można stwierdzić, że w omawianych badaniach po raz pierwszy udowodniliśmy, iż obszar tylnego podwzgórza zdolny jest do samodzielnego generowania rytmu theta zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Wykazaliśmy również, że rytm obserwowany w PHa ma podłoże cholinergiczne, muskarynowe i jest generowany niezależnie od rytmu theta obserwowanego w formacji hipokampa. Badania przedstawione w opisywanej pracy finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (*Grant NCN nr UMO-2011/01/B/NZ4/00373*).

Za najważniejsze osiągnięcia wynikające z opisywanego cyklu prac można uznać:

- 1/ Wykazanie po raz pierwszy, że synapsy elektryczne zlokalizowane w sieciach neuronalnych formacji hipokampa mają udział w powstawaniu rytmu theta w tej strukturze mózgu.
- 2/ Odkrycie obecności w formacji hipokampa, zarówno w preparatach *in vitro*, jak i u anestetyzowanych zwierząt, komórek bramkujących rytm theta. Neurony te biorą prawdopodobnie udział w programowaniu długości epizodów aktywności rytmicznej oraz długości przerw pomiędzy epizodami.
- 3/ Udowodnienie, że obszar tylnego podwzgórza nie jest, jak sądzono do tej pory, jedynie stacją przekaźnikową dla impulsów płynących do formacji hipokampa z pnia mózgu, ale jest zdolny do samodzielnego generowania lokalnej aktywności rytmicznej theta powstającej niezależnie od rytmu obserwowanego w hipokampie.

BIBLIOGRAFIA

- 1/ Adaya-Villanueva A., Ordaz B., Balleza-Tapia H., Márquez-Ramos A., Peña-Ortega F.: Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides*, 2010; 31: 1761-1766
- 2/ Bao W., Wu J.Y.: Propagating wave and irregular dynamics: Spatiotemporal patterns of cholinergic theta oscillations in neocortex, *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, 2003; 90: 333-341
- 3/ Bland B.H.: The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.*, 1986; 26: 1-54
- 4/ Bland B.H., Colom L.V.: Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.*, 1993; 41: 157-208
- 5/ Bland B.H., Oddie S.D.: Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 259-273
- 6/ Cantero, J.L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M.J., Madsen, J.R., Kocsis, B.: Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.*, 2003; 23, 10897-10903.
- 7/ Caplan, J.B., Madsen, J.R., Schulze-Bonhage, A., Aschenbrenner-Scheibe, R., Newman, E.L., Kahana, M.J.: Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning. *J. Neurosci.*, 2003; 23, 4726-4736.
- 8/ Carlen P.L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Kushnir M., Perez-Velazquez J.L.: The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2000; 32: 235-241
- 9/ Colom L.V.: Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 2006: 96: 609-23
- 10/ Colom L.V., Bland B.H.: State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 1987; 422: 277-286
- 11/ Draguhn A., Traub R.D., Schmitz D., Jefferys J.G.: Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus *in vitro*. *Nature*, 1998; 394: 189-192
- 12/ Gołębiewski H., Eckersdoef B., Konopacki J.: Cholinergic/GABAergic interactions in the production of EEG theta oscillations in rat hippocampal formation *in vitro*. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1996; 56: 147-153
- 13/ Goutagny R., Manseau F., Jackson J., Danik M., Williams S.: *In vitro* activation of the medial septum-diagonal band complex generates atropine-sensitive and atropine-resistant hippocampal theta rhythm: an investigation using a complete septohippocampal preparation. *Hippocampus*, 2008; 18: 531- 535

- 14/ Green J.D., Maxwell D.S., Schindler W.J., Stumpf C.: Rabbit EEG "theta" rhythm: Its anatomical source and relation to activity in single neurons. *J. Neurophysiol.*, 1960; 23: 403-420
- 15/ Konopacki J.: Theta-like activity in the limbic cortex *in vitro*. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 311-323
- 16/ Konopacki J., MacIver M.B., Bland B.H., Roth S.H.: Carbachol-induced EEG "theta" activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.*, 1987; 405: 196-198
- 17/ Meador, K.J., Thompson, J.L., Loring, D.W., Murro, A.M., King, D.W., Gallagher, B.B., Lee, G.P., Smith, J.R., Flanigin, H.F.: Behavioral state-specific changes in human hippocampal theta activity. *Neurology*, 1991; 41, 869-872.
- 18/ Mitchell D.J., McNaughton N., Flanagan D., Kirk I.J.: Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal "theta". *Prog. Neurobiol.*, 2008; 86: 156-185
- 19/ Oddie, S.D., Bland, B.H., Colom, L.V., Vertes, R.P.: The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 1994; 4: 454-473
- 20/ Sainsbury R.S.: Type 2 theta in the guinea pig and the cat. W: *Electrical activity of the archicortex*. red.: Buzsáki G., Vanderwolf, C.H. Akademiai Kiado, Budapest, 1985; 11-22
- 21/ Smythe J.W., Colom L.V., Bland B.H.: The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1992; 16: 289-308
- 22/ Traub R.D., Bibbig A., Fisahn A., LeBeau F.E., Whittington M.A., Buhl E.H.: A model of gamma-frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 4093-4106
- 23/ Vanderwolf C.H.: Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1969; 26: 407-418
- 24/ Vertes R.P., Kocsis B.: Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 1997; 81: 893-926

##### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

W roku 1993 podjąłem studia biologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. W 1996 roku, w ramach pracowni magisterskiej w Zakładzie Neurobiologii UŁ, rozpocząłem badania wpływu temperatury na czynność elektroencefalograficzną preparatów formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych. W badaniach tych wykazaliśmy, że istnieje pewien optymalny zakres



temperatur, w którym preparaty HPC utrzymywane *in vitro* zdolne są do generowania rytmu theta, który poza tym optymalnym zakresem przechodzi w epilepsję. Opisywane badania wskazywały, że w temperaturze około 29-30°C zaczyna działać specyficzny mechanizm synchronizujący, który pozwala na przejście od pojedynczych, silnych wyładowań epileptycznych do oscylacji o przebiegu zbliżonym do sinusoidalnego, obserwowanych jako rytm theta. W czerwcu 1998 roku obroniłem pracę magisterską, wykonywaną pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Konopackiego, zatytułowaną „*Wpływ temperatury na czynność oscylacyjną hipokampa w warunkach pozaustrojowych (in vitro)*”. W październiku tego samego roku podjąłem studia w ramach Studium Doktoranckiego Fizjologiczno–Mikrobiologicznego Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UŁ, a w roku 1999 zostałem zatrudniony na etacie asystenta w Zakładzie Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. W tym czasie uczestniczyłem już aktywnie w przygotowaniu artykułu przeglądowego dotyczącego rytmu theta rejestrowanego w warunkach pozaustrojowych (**Konopacki i wsp., *Acta Neurobiol. Exp.*, 2000, 60: 67-85**).

Badania, które prowadziłem w ramach pracy doktorskiej związane były, podobnie jak miało to miejsce w przypadku pracy magisterskiej, z rytmem theta rejestrowanym w preparatach formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych i dotyczyły dwóch zagadnień. Pierwszym z nich była kontynuacja i uzupełnienie badań wpływu temperatury na aktywność EEG rejestrowaną w preparatach HPC *in vitro*, natomiast drugim była analiza profili warstwowych amplitudy oraz fazy rytmu theta rejestrowanego *in vitro*. W pierwszym cyklu doświadczeń wykazaliśmy, że podstawowe parametry rytmu theta (częstotliwość, amplituda, czas trwania epizodów rytmu i czas przerw między epizodami), rejestrowanego w wyniku cholinergicznego pobudzenia preparatów formacji hipokampa *in vitro*, stabilizują się na optymalnym poziomie w zakresie temperatur od 33 do 37°C. Wskazuje to, że temperatura tkanki mózgowej może mieć bezpośredni wpływ na mechanizmy synchronizacyjne w sieciach neuronalnych formacji hipokampa, powodując zmianę aktualnie generowanego wzorca EEG (przejście aktywności epileptycznej w rytm theta w temperaturze ok. 33°C i rytmu theta w epilepsję w temperaturze ok. 37°C). W drugim cyklu doświadczeń wchodzącym w skład mojej pracy doktorskiej, dotyczącym topografii aktywności theta generowanej w warunkach pozaustrojowych, posłużyliśmy się techniką rejestracji profili warstwowych amplitudy i fazy rytmu theta. Badania topograficzne rytmu theta *in vitro* prowadziliśmy w płaszczyźnie przechodzącej przez trzy postulowane

wcześniej wewnątrzhipokampalne generatory rytmu, tzn. przez pole CA1 komórek piramidowych, górną blaszkę zakrętu zębatego (DG) oraz pole CA3c komórek piramidowych. W doświadczeniach tych zarejestrowaliśmy profile warstwowe amplitudy i fazy rytmu theta *in vitro* zbliżone do profili obserwowanych wcześniej w warunkach *in vivo*. Wskazywało to na podobne mechanizmy leżące u podstaw generowania aktywności rytmicznej w obrębie formacji hipokampa *in vivo* oraz *in vitro*. Najbardziej interesujący w omawianych badaniach był fakt, że nie zarejestrowaliśmy szczytu amplitudy rytmu theta w rejonie komórek ziarnistych zakrętu zębatego. Przeciwnie, w rejonie tym (uważanym wcześniej za jeden z wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu) obserwowaliśmy wyraźny spadek amplitudy fal theta, co sugerowało, że obszar ten może nie być zdolny do samodzielnego generowania rytmu w warunkach pozaustrojowych. Omówione badania stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Aktywność elektroencefalograficzna (EEG) formacji hipokampalnej *in vitro*: wpływ temperatury oraz profil warstwowy amplitudy i fazy”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Konopackiego. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w dwóch artykułach z listy JCR (**Kowalczyk i wsp., Brain Res., 2001, 901: 184-194; Kowalczyk i Konopacki, Brain Res. Bull., 2002, 58: 569-574**). Całość badań przeprowadzonych w ramach przygotowania mojej rozprawy doktorskiej finansowana była z funduszy Komitetu Badań Naukowych (Grant KBN nr 4 P05A 060.15.98). Przed obroną rozprawy doktorskiej odbyłem sześciomiesięczny staż naukowy w Anglii, w Department of Pharmacology, Bradford University. W trakcie stażu, którego opiekunem naukowym był dr James W. Smythe odbyłem szkolenie w zakresie techniki rejestracji aktywności EEG oraz aktywności pojedynczych neuronów w warunkach *in vivo*, w preparacie anestetyzowanego szczura.

Po obronie rozprawy doktorskiej, w roku 2002, zostałem zatrudniony w Zakładzie Neurobiologii (obecnie Katedrze Neurobiologii) Uniwersytetu Łódzkiego na stanowisku adiunkta, gdzie pracuję do dnia dzisiejszego. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych kontynuowałem pracę naukową związaną z badaniem podstawowych mechanizmów leżących u podstaw generowania aktywności rytmicznej theta w preparatach mózgowych utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych. Kontynuowałem badania dotyczące topografii wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu theta. W doświadczeniach tych, prowadzonych z wykorzystaniem dwóch technik eksperymentalnych – techniki rejestracji profili warstwowych amplitudy i fazy rytmu theta

oraz techniki rejestracji aktywności EEG z tzw. skrawków cząstkowych (izolowanych, wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu) wykazaliśmy, że obszar górnej blaszki zakrętu zębatego, oddzielony od dwóch pozostałych wewnątrzhipokampalnych generatorów aktywności rytmicznej, nie generuje samodzielnie rytmu theta w warunkach pełnej deafferentacji. Rytm theta rejestrowany z okolic komórek ziarnistych górnej blaszki DG w nienaruszonym preparacie formacji hipokampa jest prawdopodobnie przewodzony biernie z innych rejonów skrawka, na przykład, z bezpośrednio sąsiadującej z nim warstwy splotowodrobinowej pola CA1 (**Kowalczyk i wsp., Brain Res. Bull., 2009; 80: 139-146**). Powyższe badania finansowane były w całości z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant MNiSW nr N N303 091834).

Kolejnym, istotnym tematem mojej pracy naukowej było badanie udziału połączeń szczelinowych (synaps elektrycznych) w generowaniu hipokampalnego rytmu theta w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. W opisywanych wcześniej badaniach, stanowiących część osiągnięcia naukowego (**Konopacki i wsp., Brain Res., 2004, 1019: 270-274**) wykazaliśmy, że zablokowanie synaps elektrycznych w warunkach *in vitro* blokuje zdolność preparatów formacji hipokampa do generowania rytmu theta, a efekt ten wydaje się być nieodwracalny. Podejrzewaliśmy jednak, że brak odwracalności efektu blokowania synaps elektrycznych w preparatach *in vitro* wynikać może z ograniczonego czasu rejestracji aktywności polowej i komórkowej lub/oraz procesów degeneracyjnych zachodzących w skrawkach mózgowych podczas długotrwałych rejestracji rytmu theta w preparatach HPC. Dlatego też, w celu ograniczenia ewentualnych procesów degeneracyjnych tkanki, wpływających na rejestrowaną aktywność EEG, przeprowadziliśmy badania, w których skrawki hipokampalne preparowane były ze szczurów premedykowanych roztworem blokera synaps elektrycznych, karbenoksolonem. W omawianych doświadczeniach dootrzewnowe iniekcje stosowanego blokera GJs wykonywane były od 1 do 11 godz. przed przygotowywaniem skrawków. Analiza uzyskanych danych wykazała, że skrawki formacji hipokampa pobrane od zwierząt, u których preparatyka wykonywana była do 3 godz. po dootrzewnowych iniekcjach karbenoksolonu nie generowały rytmu theta w wyniku zastosowanego pobudzenia cholinergicznego. Jednak wydłużanie czasu między obwodowym podaniem blokera GJs a przygotowaniem preparatów w znaczący sposób zwiększało prawdopodobieństwo zarejestrowania aktywności polowej theta. Całkowity powrót zdolności generowania rytmu theta przez skrawki obserwowany był po 11 godzinnym odroczeniu procedury przygotowania preparatów. Wykazaliśmy zatem, że

hamowanie zdolności generowania rytmu theta w formacji hipokampa *in vitro* po zablokowaniu synaps elektrycznych jest długotrwałe, ale w pełni odwracalne (**Konopacki i wsp., Sen, 2004; 4(2): 41-48; Bocian i wsp. Brain Res. Bull., 2009, 78: 290-298**).

Dalsze badania dotyczące udziału synaps elektrycznych w powstawaniu aktywności rytmicznej w formacji hipokampa prowadziliśmy przy użyciu modelu anestetyzowanego szczura. W doświadczeniach tych wykazaliśmy, że dohipokampalne iniekcje karbenoksolonu znosiły u anestetyzowanych szczurów rytm theta z rejestrowanego lokalnie zapisu EEG (**Bocian i wsp. Sen, 2008; 8(1): 31-40; Bocian i wsp. Brain Res. Bull., 2009; 78: 290-298**). Obserwowany efekt blokowania rytmu theta rozwijał się od ok 30 minuty po dohipokampalnej iniekcji karbenoksolonu i osiągał maksimum ok. 3 godzin po iniekcji.

W kolejnych badaniach *in vivo* dotyczących udziału GJs w generowaniu rytmu theta, poza karbenoksolonem stosowaliśmy także trimetyloaminę (TMA), tzw. „otwieracz” synaps elektrycznych. Dohipokampalne iniekcje TMA wywoływały u anestetyzowanych szczurów dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie, któremu towarzyszył wzrost liczby rejestrowanych fazowych neuronów „theta-on” oraz spadek liczby rejestrowanych neuronów „theta-off”. Na podstawie powyższych wyników postawiliśmy wniosek, że usprawnienie transmisji elektrycznej pojawiające się w następstwie otwarcia GJs pomiędzy komórkami formacji hipokampa, umożliwia przekazanie generowanego przez neurony „theta-on” fazowe, rytmicznego wzorca wyładowań na sąsiadujące z tym typem neuronów komórki (**Bocian i wsp. Eur. J. Neurosci., 2011; 33(3): 471-481**).

Wyniki naszych badań dotyczących udziału synaps elektrycznych w generowaniu aktywności oscylacyjnej theta w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* posłużyły za podstawę dwóch artykułów przeglądowych (**Bocian i Kowalczyk, Post. Med. Hig. Dośw., 2012; 66:702-713; Konopacki i wsp., Brain Res. Bull., 20014; 107: 1-17**) oraz rozdziału w książce (**Konopacki i wsp., w: Dere (red), Elsevier, 2013; 101-125, ISBN 978-0-12-415901-3**).

W roku 2012 nawiązałem współpracę z prof. dr hab. inż. Pawłem Grybosiem oraz dr inż. Mirosławem Żołądziem z Katedry Metrologii i Elektroniki Wydziału Elektroniki, Automatyki, Informatyki i Inżynierii Biomedycznej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Celem współpracy jest wprowadzenie w Katedrze Neurobiologii UŁ techniki multielektrodowych rejestracji potencjałów polowych oraz aktywności pojedynczych neuronów w preparatach struktur mózgowych utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych (**Żołądz i wsp., PAK, 2012; 58(4): 355-357**). Dotąd udało nam się

opracować i wróżyć do prac eksperymentalnych 16-kanałowy system rejestracji aktywności EEG i wyładowań komórkowych w skrawkach mózgowych.

Obecnie kontynuuję badania dotyczące mechanizmów związanych z generowaniem aktywności oscylacyjnej theta w obszarze tylnego podwzgórza w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Badania te dotyczą postnatalnego rozwoju aktywności rytmicznej oraz towarzyszących jej wyładowań neuronów związanych z rytmem theta. Prace te finansowane są z funduszy Narodowego Centrum Nauki (Grant NCN nr UMO-2013/11/B/NZ4/04873).

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje autorstwo lub współautorstwo dwudziestu oryginalnych publikacji, w tym czternastu z listy JCR. **Łączny Impact Factor (IF) powyższych artykułów wynosi 35.959** (zgodnie z rokiem opublikowania), **suma punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 375** (zgodnie z rokiem opublikowania), a **indeks Hirscha wynosi 7** (według *Web of Science*, 31.03.2015). Publikacje, których jestem współautorem **cytowane były łącznie 117 razy** (według *Web of Science*, 31.03.2015). Wyniki badań, w których współuczestniczyłem prezentowane były na 31 konferencjach międzynarodowych i krajowych w postaci 59 doniesień oraz 7 wygłoszonych przeze mnie referatów.

Jak wspomiano powyżej, badania, które współprowadziłem były w większości finansowane ze środków przyznawanych w ramach postępowań konkursowych. Byłem kierownikiem jednego projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (**UMO-2011/01/B/NZ4/00373**) oraz głównym wykonawcą lub wykonawcą czterech innych projektów finansowanych ze środków Komitetu Badań Naukowych (**4 P05A 060.15.98 oraz 0081/P04/2002/23**), Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (**N N303 091834**) i Narodowego Centrum Nauki (**UMO-2013/11/B/NZ4/04873**).

#### Działalność dydaktyczna

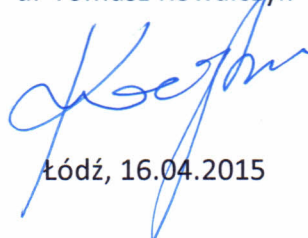
Istotnym elementem mojej dotychczasowej pracy była działalność dydaktyczna. Aktualnie prowadzę trzy pełne wykłady kursowe dla studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ („Fizjologia zwierząt”, „Choroby ośrodkowego układu nerwowego” oraz „Anatomia i fizjologia człowieka”). Prowadzę ponadto zajęcia laboratoryjne z „Fizjologii zwierząt”, „Fizjologii zwierząt II” i „Metod neurochemicznych i elektrofizjologicznych w neurobiologii”, a także pracownię specjalistyczną i magisterską oraz seminarium

licencjackie. W trakcie swojej pracy dydaktycznej byłem promotorem 11 prac licencjackich i sprawowałem opiekę nad przygotowaniem 10 prac magisterskich. Aktualnie jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Bartosza Cabana. Jestem również głównym wykonawcą grantu dydaktycznego „Implementacja nowatorskiego kursu z fizjologii zwierząt dla studentów biologii przy wykorzystaniu wysoce zaawansowanych programów komputerowych” finansowanego ze środków funduszy norweskich i funduszy EOG, pochodzących z Islandii, Liechtensteinu i Norwegii. Celem tego projektu jest wprowadzenie nowoczesnego modelu kształcenia przedmiotu „Fizjologia zwierząt” dla studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Za swoją działalność dydaktyczną otrzymałem w roku 2001 Nagrodę Zespołową II Stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego.

#### Działalność organizacyjna i popularyzatorska

W trakcie swojej pracy zawodowej angażowałem się również w działalność organizacyjną oraz w popularyzowanie nauki. Byłem członkiem komitetów organizacyjnych trzech konferencji naukowych, w tym jednej konferencji o zasięgu międzynarodowym (10th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Łódź, Polska, 2011) oraz dwóch konferencji krajowych (Techniki elektrofizjologiczne w badaniach zjawisk bioelektrycznych – od kanałów jonowych po sieci neuronalne, 2002 i 2006). W roku 2011 zostałem wybrany na członka Komisji Wyborczej Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (2011-2013). Uczestniczyłem w programach popularyzujących naukę, takich jak „Uniwersytet zawsze otwarty” (2012), „Wykłady otwarte dla licealistów” (2012) oraz „Piknik Nauki i Wiedzy Uniwersytetu Łódzkiego” (2012). Od trzech lat współuczestniczę również w prowadzeniu zajęć laboratoryjnych i pokazów w ramach „Ogólnopolskiej Nocy Biologów” (2013, 2014, 2015).

dr Tomasz Kowalczyk



Łódź, 16.04.2015