



ZAŁĄCZNIK nr 3

Autoreferat

dr Renata Bocian

Łódź, luty 2017

I. DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 1998 **magister biologii**
 dyscyplina: biologia
 specjalność: fizjologia

Tytuł pracy magisterskiej: „*Rola receptorów 5-HT_{1A} w regulacji napędu lękowego*”, praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Romaniuka na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego

- 2005 **doktor nauk biologicznych**
 dyscyplina: biologia
 specjalność: neurobiologia

Tytuł pracy doktorskiej: „*Rola tylnego podwzgórza w generowaniu hipokampalnego rytmu theta in vivo*”, praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Konopackiego na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego

II. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 2005-obecnie Katedra Neurobiologii
 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
 Uniwersytet Łódzki
 Stanowisko: adiunkt
- 2003-2005 Katedra Neurobiologii
 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
 Uniwersytet Łódzki
 Stanowisko: asystent
- 2002-2003 Zakład Neurobiologii
 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
 Uniwersytet Łódzki
 Stanowisko: asystent

1998-2002 Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno-Mikrobiologiczne
 Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
 Uniwersytet Łódzki
Stanowisko: doktorant

III. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wskazanie osiągnięcia naukowego* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

* Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład w powstanie osiągnięcia naukowego zamieszczone zostały w załączniku nr 6.

Formacja hipokampa i tylne podwzgórze jako struktury wstępującego systemu synchronizującego związanego z powstawaniem rytmu theta

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl **6 oryginalnych publikacji naukowych** i **1 pracy przeglądowej**, których sumaryczny **impact factor (IF)** podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi: **22.217**. **Suma punktów MNiSW** podanych zgodnie z ujednoczonym wykazem czasopism punktowanych w roku ukazania się publikacji wynosi: **204**.

IV. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Lp.	Dane bibliograficzne (prace doświadczalne)	IF	Punkty
1.	Bocian R. , Postuszny A., Kowalczyk T., Gołębiwski H., Konopacki J. (2009) The effect of carbenoxolone on hippocampal formation theta rhythm in rats: in vitro and in vivo approaches. Brain Res. Bull. 78(6): 290-298 Liczba cytowań _{WoS} - 20	2.184	27 MNiSW ₂₀₀₉
2.	Bocian R. , Postuszny A., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J. (2011) Gap junction modulation of hippocampal formation theta and local cell discharges in anesthetized rats. Eur. J. Neurosci 33(3): 471-481 Liczba cytowań _{WoS} - 17	3.631	32 MNiSW ₂₀₁₁

3.	Bocian R. , Kazmierska P., Kłos-Wojtczak P., Kowalczyk T., Konopacki J. (2015) Orexinergic theta rhythm in the rat hippocampal formation: in vitro and in vivo findings. <i>Hippocampus</i> 25(11): 1393-1406 Liczba cytowań_{WoS} - 2	4.074	35 MNiSW ₂₀₁₅
4.	Bocian R. , Caban B., Kłos-Wojtczak P., Konopacki J., Kowalczyk T. (2016) Is electrical coupling involved in the generation of posterior hypothalamic theta rhythm? <i>Eur. J. Neurosci</i> 44(6): 2324-2333 Liczba cytowań_{WoS} - 0	2.975	30 MNiSW 2015/2016
5.	Bocian R. , Kłos-Wojtczak P., Konopacki J. (2016) Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm. Recipe for success in recording stable field potential. <i>Brain Res.</i> 1646: 551-559 Liczba cytowań_{WoS} - 0	2.561	25 MNiSW 2015/2016
6.	Bocian R. , Kłos-Wojtczak P., Caban B., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J. (2016) Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm recorded in anesthetized rats and brain slices. <i>Hippocampus</i> 26(10): 1354-1369 Liczba cytowań_{WoS} - 0	4.074	35 MNiSW 2015/2016
Lp.	Dane bibliograficzne (prace przeglądowe)	IF	Punkty
1.	Konopacki J. Bocian R. , Kowalczyk T., Kłos-Wojtczak P. (2014) The electrical coupling and the hippocampal formation theta rhythm in rats. <i>Brain Res. Bull.</i> 107:1-17 Liczba cytowań_{WoS} - 3	2.718	20 MNiSW ₂₀₁₄

Sumaryczne parametry publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

Impact factor (wg JCR) – **22.217**

Punkty MNiSW – **204**

Liczba cytowań_{WoS} – **42**

(Impact Factor oraz punktacja MNiSW podane zgodnie z rokiem publikacji; liczba cytowań wg Web of Science (WoS) z dnia 07.02.2017)

V. OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

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

WPROWADZENIE

Rytm theta to aktywność bioelektryczna, stanowiąca przykład procesów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Pomimo intensywnych badań rola rytmu theta nie została do końca poznana. Wieloletnie badania wskazują na istotne powiązanie tego wzorca EEG z takimi procesami jak: rozpoznawanie słów, pamięć operacyjna, nawigacja przestrzenna, sen paradoksalny, czy integracja funkcji czuciowo-ruchowych (Meador i wsp., 1991; Cantero i wsp., 2003; Caplan i wsp., 2003; Mitchell i wsp., 2008). Obecność rytmu theta w zapisie EEG, obserwowana jest nie tylko w warunkach fizjologicznych, ale także u ludzi cierpiących na schorzenia o podłożu neurologicznym tj.: migrena, padaczka, choroba Picka czy choroba Alzheimera (Colom, 2006; Adaya-Villanueva i wsp., 2010). Występowanie rytmu theta w procesach patologicznych zachodzących na terenie OUN uzasadnia celowość badań tego wzorca EEG, bowiem może doprowadzić do lepszego poznania etiologii wymienionych wyżej jednostek chorobowych.

Amplituda oraz zakres częstotliwości aktywności rytmicznej theta wykazuje silne zróżnicowanie gatunkowe. U szczurów, które są najczęściej wykorzystywane w badaniach elektrofizjologicznych, amplituda rytmu theta sięga 1 mV, a częstotliwość waha się od 3 do 12 Hz. Klasyczne już dzisiaj badania Vanderwolfa (1969, 1975) prowadzone na gryzoniach stały się podstawą sformułowania powszechnie obowiązującej hipotezy zakładającej heterogeny charakter rytmu theta u szczurów. Zgodnie z nią u gryzoni występują dwa typy rytmu theta różniące się między sobą pasmem dominującej częstotliwości oraz wzorcami behawioralnymi. Co więcej, badania farmakologiczne wykazały, że oba typy rytmu mają odmienne podłoże neurochemiczne oraz różną wrażliwość na działanie anestetyków (Vanervolf, 1975; Bland, 1986; Vanderwolf i Baker, 1986). Rytm theta typu 1, rejestrowany w zakresie częstotliwości 7-12 Hz, jest ściśle związany z aktywnością ruchową zwierzęcia, ma charakter niecholinergiczny i blokowany jest przez większość związków anestetycznych. Z kolei rytm theta typu 2, o częstotliwości 4-6 Hz, ma podłoże cholinergiczne, obserwowany jest w stanie znieruchomienia zwierzęcia i jest niewrażliwy na działanie anestetyków.

Warto podkreślić, że rytm theta obserwowany jest nie tylko w warunkach *in vivo* (u zwierząt swobodnie poruszających, czy anestetyzowanych), ale również w warunkach *in vitro*. Wykazano, że skrawki formacji hipokampa perfundowane roztworem karbacholu (agonisty receptorów cholinergicznym) generują kilkusekundowe epizody rytmu theta o amplitudzie od 0.1 do 2 mV

i częstotliwości 4-12 Hz (Konopacki i wsp., 1987). Co więcej, liczne badania prowadzone dodatkowo na skrawkach kory nowej (Bao i Wu, 2003), kory śródwęczowej (Goutagny i wsp., 2008) wskazały, że rejestrowana w skrawkach mózgowych aktywność theta odtwarza większość cech rytmu theta typu 2 obserwowanego w warunkach *in vivo*.

Pierwotnie, występowanie rytmu theta wiązano jedynie z formacją hipokampa (HPC), ponieważ w tej strukturze rytm theta jest najlepiej wyrażoną aktywnością elektroencefalograficzną. Jednak późniejsze badania, prowadzone na różnych modelach doświadczalnych, dostarczyły dowodów na to, że również kora śródwęczowa oraz kora zakrętu obręczy są zdolne do generowania rytmicznej aktywności wolnofalowej (Bland, 1986; Bland i Colom, 1993). Obecnie wiadomo, że generowanie rytmu theta w ściśle określonych obszarach kory limbicznej związane jest nie tylko z lokalną aktywnością komórek nerwowych, lecz zależy od funkcjonalnego współdziałania licznych struktur zlokalizowanych na różnych poziomach OUN tworzących wstępujący system synchronizujący. System ten rozpoczyna się w przednim jądrze siatkowatym mostu oraz jądrze konarowo-mostowym nakrywki, strukturach których włókna unerwiają tylne części międzymózgowia, głównie jądra tylnego podwzgórza oraz jądro nadsuteczkwate. Wstępujące drogi nerwowe ze struktur międzymózgowia docierają następnie do obszaru przyśrodkowej przegrody, który przekazuje pobudzenie do poszczególnych struktur układu limbicznego, takich jak: kora zakrętu obręczy, kora śródwęczowa czy formacja hipokampa. Należy jednak pamiętać, że powstawanie rytmu theta w obszarach generatorowych możliwe jest przede wszystkim dzięki zdolnościom określonych populacji komórek nerwowych do oscylacji potencjału błonowego. Neurony wykazujące właściwości tego typu nazwane zostały komórkami theta-zależnymi (ang. *theta-related cells*). W oparciu o wzór wyładowań neuronów w stosunku do rejestrowanej równolegle połowej aktywności theta Colom i Bland (1987) opisali dwa typy neuronów theta-zależnych: neurony „theta-on” i „theta-off”. Komórki, które zwiększają swoją aktywność podczas rytmu theta oraz przejawiają zmniejszoną aktywność, lub jej brak, w czasie aktywności zdesynchronizowanej nazywane zostały neuronami „theta-on”. Natomiast neurony „theta-off” są aktywne gdy w zapisie EEG pojawia się desynchronizacja, a zmniejszają swoją aktywność lub są nieaktywne w czasie rytmu theta. Dodatkowo, w każdym z typów neuronów wyodrębniono dwa podtypy komórek - neurony fazowe i toniczne. Neurony fazowe generują salwy potencjałów czynnościowych ściśle powiązane z fazą rejestrowanego rytmu, natomiast neurony toniczne generują pojedyncze potencjały czynnościowe nieskorelowane z fazą aktywności theta. W 2006 roku Konopacki i wsp. opisali nową grupę neuronów theta-zależnych, tzw. komórkami bramkujące (ang. *gating cells*), których aktywność jest ściśle związana z pojawianiem się i zanikaniem rejestrowanych w warunkach *in vitro* epizodów rytmu theta.

Celem badań przedstawionych w monotematycznym cyklu badań było:

- 1) sprawdzenie czy synapsy elektryczne, stanowiące podstawę szybkiej komunikacji międzyneuronalnej, uczestniczą w powstawaniu hipokampalnego oraz tylnopodwzgórzowego rytmu theta rejestrowanego w warunkach *in vivo* i *in vitro*;
- 2) zbadanie czy obecne w formacji hipokampa neurony oreksynowe biorą udział w powstawaniu aktywności polowej theta rejestrowanej lokalnie u anestetyzowanego szczura oraz w skrawkach formacji hipokampa;
- 3) ustalenie czy w obszarze tylnego podwzgórza występują neurony, których aktywność skorelowana jest z lokalnie rejestrowaną aktywnością polową theta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Bocian R., Postuszny A., Kowalczyk T., Gołębiowski H., Konopacki J. (2009) The effect of carbenoxolone on hippocampal formation theta rhythm in rats: in vitro and in vivo approaches. Brain Res. Bull. 78: 290-298

Synapsy elektryczne, zwane także połączeniami szczelinowymi (ang. *gap junctions* – *GJs*), to heksamery utworzone z sześciu cząsteczek białka integralnego zwanego koneksyną. W błonie komórkowej białka te tworzą tzw. konekson, przybierający postać półkanału. Ścisłe połączenie dwóch położonych współosiowo koneksonów sąsiadujących neuronów stanowi niskooporową drogę pozwalającą na bezpośredni przepływ między komórkami jonów oraz cząsteczek o masie nie przekraczającej 1 kD. Liczne badania elektrofizjologiczne wykazały, że synapsy elektryczne odgrywają istotną rolę w powstawaniu aktywności epileptycznej (Carlen i wsp., 2000; Jahromi i wsp., 2002; Traub i wsp., 2002), rytmu gama (Traub i wsp., 2001) oraz tzw. szybkich oscylacji (150-200 Hz, Draguhn i wsp., 1998). Powyższe dane pozwalały przypuszczać, że połączenia szczelinowe mogą być również włączone w mechanizm powstawania aktywności rytmicznej w paśmie theta.

Celem opisanych w pracy badań było uzupełnienie wiedzy na temat roli synaps elektrycznych w powstawaniu rytmu theta. Wstępne dane wskazujące na udział *GJs* w generowaniu aktywności oscylacyjnej theta pochodzą z badań prowadzonych na skrawkach formacji hipokampa (Konopacki i wsp., 2004). Autorzy cytowanych badań wykazali, że dodanie do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (ACSF) blokerów synaps elektrycznych (karbenoksolonu – KARB lub chininy – CHIN) znosiło cholinergicznie wywołany rytm theta w obszarze CA3 hipokampa właściwego. Brak rytmu theta w zapisie hipokampalnego EEG po zastosowaniu blokerów *GJs* stanowił pierwszy bezpośredni dowód na aktywny udział hipokampalnych synaps elektrycznych w procesach synchronizacyjnych związanych z powstawaniem cholinergicznie indukowanej aktywności theta. Co ciekawe, w opisywanych badaniach, mimo długotrwałego wypłukiwania z preparatów HPC zastosowanych blokerów, nie odnotowano powrotu aktywności polowej theta w zapisie EEG. Płukanie skrawków

ACSF pozbawionym blokerów GJs pozwoliło jedynie na zarejestrowanie pojedynczych wyładowań epileptycznych. Brak możliwości rejestracji rytmu theta po długotrwałym płukaniu skrawków mógł być wynikiem szkodliwego działania KARB i CHIN na sieć neuronalną hipokampalnych skrawków mózgowych (Ross i wsp., 2000). Rejestracja aktywności epileptycznej w wyflukanych z blokerów skrawkach sugerowała jednak, że działanie zastosowanych w doświadczeniach związków ograniczone było prawdopodobnie jedynie do hamowania mechanizmów synchronizacyjnych.

Ograniczony czas prowadzenia doświadczeń w badaniach *in vitro* i brak impulsacji docierającej z innych obszarów mózgowia, mających decydujące znaczenie dla ostatecznego stanu czynnościowego badanej struktury, stanowił punkt wyjścia do opisanych w pracy badań *ex vivo* oraz *in vivo*. Zastosowanie obu modeli pozwoliło na zweryfikowanie oraz uzupełnienie wiedzy pozyskanej z badań prowadzonych na skrawkach formacji hipokampa. To właśnie ograniczony czas rejestracji aktywności polowej i komórkowej oraz procesy degeneracyjne zachodzące w skrawkach mózgowych podczas długotrwałych rejestracji mogły być przyczyną braku możliwości ponownej rejestracji rytmu theta w badaniach *in vitro*. Dlatego też, w celu ograniczenia ewentualnych procesów degeneracyjnych tkanki wpływających na rejestrowaną aktywność EEG, wykonaliśmy doświadczenia, w których skrawki hipokampalne preparowane były ze szczurów premedykowanych KARB. W omówionych w pracy doświadczeniach dootrzewnowe iniekcje blokera GJs wykonywane były od 1. do 12. godz. przed przygotowywaniem skrawków. Analiza uzyskanych w badaniach *ex vivo* danych wykazała, że skrawki formacji hipokampa przygotowane z mózgowia zwierząt, u których preparatyka wykonywana była do 3. godz. po dootrzewnowych iniekcjach KARB w zasadzie dalszym ciągu nie generowały rytmu theta. Jednak wydłużanie czasu między obwodowym podaniem blokera a przygotowaniem preparatów w znaczący sposób zwiększało prawdopodobieństwo zarejestrowania aktywności polowej theta. W skrawkach uzyskanych od zwierząt premedykowanych KARB od 6. do 8. godz. przed ich przygotowaniem niemalże w połowie przypadków rejestrowano rytm theta. Całkowity powrót zdolności generowania rytmu theta przez hipokampalne skrawki obserwowany był po maksymalnym odroczeniu procedury przygotowania preparatów (12. godz.). Zatem opisane w pracy wyniki wykazały, że działanie KARB jest długotrwałe i w pełni odwracalne. Co więcej potwierdziły, że brak rejestracji theta w badaniach Konopackiego i wsp. (2004) nie był związany z uszkodzeniem hipokampalnej sieci neuronalnej, lecz ograniczonym czasem rejestracji aktywności EEG w procedurze *in vitro*.

Wyniki badań *in vitro*, prowadzonych na skrawkach odizolowanych od wpływów impulsacji biegnących z innych obszarów mózgowia, zweryfikowane zostały następnie w badaniach prowadzonych na modelu anestetyzowanego szczura. Jest to jedyny model doświadczalny umożliwiający rejestrację odpornej na działanie anestetyków i wrażliwej na iniekcje siarczanu atropiny aktywności theta typu 2. W doświadczeniach prowadzonych w warunkach *in vivo* badaliśmy kolejno

wpływ dootrzewnowych oraz dohipokampalnych iniekcji KARB na aktywność EEG formacji hipokampa. Po obwodowym podaniu karbenoksolonu, w dawkach 100–300 mg/kg m.c., nie zaobserwowaliśmy zmian w zapisie hipokampalnego EEG. Zwiększenie dawki do 400 mg/kg m.c. także nie miało wpływu na zapis hipokampalnego EEG. Jednakże po upływie około godziny po dootrzewnowych iniekcjach tak wysokiej dawki blokera, obserwowaliśmy niewydolność krążeniowo-oddechową prowadzącą do śmierci zwierzęcia. W celu wyeliminowania efektu letalnego wykonaliśmy następnie domózgowe iniekcje KARB. Dohipokampalne iniekcje blokera GJs (w dawce 100 µg/µl) znosiły u anestetyzowanych szczurów rytm theta z rejestrowanego lokalnie zapisu EEG. Co ciekawe, hamujący wpływ iniekcji KARB ograniczał się jedynie do zmian w amplitudzie i mocy badanego wzorca EEG.

Przedstawione w omawianej pracy wyniki badań dostarczyły niezbitych dowodów na istotną rolę hipokampalnych synaps elektrycznych w mechanizmach synchronizacyjnych związanych z powstawaniem lokalnie rejestrowanej aktywności rytmicznej. Ponadto wykazały, że sprawne przekąźnictwo chemiczne jest niewystarczające do zapewnienia optymalnego poziomu synchronizacji w sieciach neuronalnych. Badania opisane w omawianej pracy finansowane były z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant MNiSW nr N 401 2811 33).

Bocian R., Połuszny A., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J. (2011) Gap junction modulation of hippocampal formation theta and local cell discharges in anesthetized rats. Eur. J. Neurosci 33 (3): 471-481

Przedstawione w pracy doświadczenia stanowią kontynuację badań nad rolą synaps elektrycznych w powstawaniu aktywności oscylacyjnej w paśmie theta. W badaniach dotyczących mechanizmów związanych z powstawaniem ośrodkowych zjawisk rytmicznych stosowane są powszechnie nie tylko związki chemiczne znoszące przekąźnictwo elektryczne (tzw. blokery), ale również związki usprawniające przekąźnictwo elektrycznego poprzez zwiększenie liczby synaps elektrycznych aktywnie uczestniczących w przekazywaniu pobudzenia między sąsiadującymi komórkami (tzw. „otwieracze”).

W opisanych w pracy badaniach *in vivo* dotyczących ośrodkowych mechanizmów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zastosowana została trimetyloamina (TMA - „otwieracz” synaps elektrycznych). Domózgowe iniekcje tego związku wywoływały w HPC uretanizowanych szczurów dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie i mocy w porównaniu z rytmem rejestrowanym w warunkach kontrolnych. Co ciekawe, iniekcje TMA nie miały wpływu na częstotliwość badanego przez nas wzorca. Obserwowany w badaniach *in vivo* efekt był krótkotrwały (ograniczony do 3 godz.) i w pełni odwracalny. Wydaje się zatem, że mechanizm działania „otwieracza” synaps elektrycznych jest inny niż zastosowanego przez nas blokera GJs

(karbenksolonu). W związku z tym, podjęliśmy próbę wyjaśnienia mechanizmu neuronalnego odpowiedzialnego za zwiększenie amplitudy hipokampalnego rytmu theta po iniekcjach TMA. W sformułowaniu hipotezy tłumaczącej ten mechanizm miały pomóc badania, podczas których prowadzone były równoległe rejestracje polowego sygnału EEG oraz aktywności hipokampalnych neuronów. Analiza uzyskanych danych wykazała, że dohipokampalne iniekcje TMA wywoływały u anestetyzowanych szczurów dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie, któremu towarzyszył wzrost liczby fazowych neuronów „theta-on”. Ponadto, TMA zwiększała liczbę generowanych w salwach potencjałów czynnościowych pojawiających się zgodnie z fazą lokalnie rejestrowanego rytmu theta. Powyższe wyniki są zatem zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na udział fazowych neuronów „theta-on” w kontrolowaniu amplitudy omawianego wzorca EEG. Wydaje się, że usprawnienie transmisji elektrycznej pojawiające się w następstwie otwarcia GJs umożliwia przekazanie, generowanego przez neurony „theta-on” fazowe, rytmicznego wzorca wyładowań na sąsiadujące z tym typem neuronów komórki. Najprawdopodobniej komórki tworzące synapsę elektryczną z neuronem fazowym, zmieniły wzór wyładowań po iniekcjach TMA, tzn. generowały potencjały czynnościowe zgodnie z fazą polowo rejestrowanej aktywności theta. Opisane zmiany prowadziły do zwiększenia liczby rytmicznie wyładowujących neuronów „theta-on” wywołując tym samym wzrost amplitudy rytmu theta. Zwiększenie amplitudy obserwowane było tak długo, jak długo utrzymywało się farmakologiczne działanie zastosowanego w badaniach związku.

Dohipokampalne iniekcje TMA u anestetyzowanych szczurów, poza zwiększeniem liczby neuronów fazowych „theta-on”, obniżały także liczbę aktywnych podczas desynchronizacji komórek „theta-off”. Okazało się, że rejestrowane po podaniu TMA epizody rytmu theta miały nie tylko wyższą amplitudę, ale również dłuższy czas trwania, w porównaniu z epizodami rejestrowanymi w warunkach kontrolnych. Spadek liczby neuronów „theta-off” wynikał zatem z obniżonego prawdopodobieństwa rejestracji wspomnianego typu komórek podczas wydłużonego czasu trwania aktywności rytmicznej.

Podsumowując, przedstawione w pracy wyniki stanowią dodatkowe potwierdzenie, że synapsy elektryczne pełnią kluczową rolę w generowaniu hipokampalnego rytmu theta. Ponadto wskazują, że obserwowany w neuronach związanych z rytmem theta wzór wyładowań nie jest ostatecznie zdeterminowany i może ulec zmianie po zastosowaniu związków chemicznych modulujących aktywność GJs. Badania opisane w omawianej pracy finansowane były z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant MNiSW nr N N 4012 2811 33).

Konopacki J. Bocian R., Kowalczyk T., Kłos-Wojtczak P. (2014) The electrical coupling and the hippocampal formation theta rhythm in rats (Review). Brain Res. Bull. 107:1-17

Celem omawianej pracy przeglądowej było podsumowanie wiedzy dotyczącej roli synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta. Po opisanu morfologii, klasyfikacji oraz rozmieszczeniu synaps elektrycznych w formacji hipokampa w pracy przedstawiony został udział połączeń szczelinowych w procesach oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w OUN. W dalszej części pracy zaprezentowana została wiedza na temat roli GJs w powstawaniu aktywności rytmicznej theta rejestrowanej z HPC podczas doświadczeń prowadzonych na modelach *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo*.

Pierwszych danych wskazujących na udział GJs w powstawaniu rytmu theta dostarczyły badania *in vitro*, w których Konopacki i wsp., (2004) wykazali, że dodanie do płynu mózgowo-rdzeniowego blokerów GJs (karbenoksolonu - niespecyficznego blokera GJs oraz chininy - blokera synaps Cx36 i Cx50) prowadzi do eliminacji z zapisu EEG aktywności theta. Co ciekawe, w opisywanych badaniach, mimo długotrwałego wypłukiwania z preparatów HPC zastosowanych blokerów, nie odnotowano powrotu aktywności polowej theta. Płukanie skrawków w ACSF pozbawionym blokerów pozwoliło jedynie na zarejestrowanie pojedynczych wyładowań epileptycznych. Efekt ten mógł być spowodowany szkodliwym wpływem karbenoksolonu i chininy na sieć neuronalną hipokampalnych skrawków mózgowych. Rejestracja aktywności epileptycznej w wypłukanych z blokerów skrawkach sugerowała jednak, że działanie zastosowanych związków ograniczone było prawdopodobnie jedynie do hamowania mechanizmów synchronizacyjnych. Hipoteza o działaniu uszkodzającym karbenoksolonu podważona została w badaniach *ex vivo*, w których w celu uniknięcia bezpośredniego działania niespecyficznego blokera GJs na tkankę mózgową związek ten podany został obwodowo. Wyniki badań *ex vivo* wyraźnie wykazały, że działanie KARB jest długotrwałe i w pełni odwracalne. Wyniki tych badań opisane zostały szczegółowo w pracy **Bocian i wsp. (2009)** wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego.

W dalszej części pracy omówione zostały badania *in vivo*. Pierwsza próba wyjaśnienia roli GJs w powstawaniu rytmu theta rejestrowanego w warunkach *in vivo* podjęta została przez Blanda i wsp. (2003). Autorzy tych badań stosując halotan (anestetyk o rozpoznanym działaniu blokującym GJs), w dawkach anestetycznych nie zaobserwowali zmian w zapisie hipokampalnej aktywności EEG. Obecność theta w zapisie hipokampalnego EEG była najprawdopodobniej wynikiem zastosowania zbyt niskiej dawki halotanu przez autorów cytowanych badań (sądzi się, że efekt blokujący GJs ujawnia się dopiero po zastosowaniu dawek znacznie przewyższających dawki stosowane w anestezji). Dane wskazujące na bezsporny udział GJs w powstawaniu hipokampalnego theta rejestrowanego w warunkach *in vivo* pochodzą z badań prowadzonych na swobodnie poruszających się kotach (Gołębiowski i wsp., 2006). Wyniki tych badań wykazały, że iniekcje dootrzewnowe KARB i CHIN blokowały aktywność rytmiczną theta, a iniekcje dohipokampalne tych związków tylko ją tłumili. Działanie obu zastosowanych blokerów było długotrwałe i w pełni odwracalne. Wyniki tych

badania potwierdzone zostały w późniejszych doświadczeniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach. Znaczna część opisanych w pracy przeglądowej badań *in vivo* wskazujących na kluczową rolę GJs w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta u anestetyzowanych szczurów to badania omówione szczegółowo w dwóch wcześniej opisanych pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (Bocian i wsp., 2009, 2011).

Bocian R., Kaźmierska P., Kłos-Wojtczak P., Kowalczyk T., Konopacki J. (2015) Orexinergic theta rhythm in the rat hippocampal formation: in vitro and in vivo findings. *Hippocampus* 25: 1393-1406

W 1998 roku, w podwzgórzu odkryto nową grupę neuropeptydów określanych jako oreksyny (ORX) lub hipokretyny, dla których zidentyfikowano dwa typy receptorów OX_1R i OX_2R . Badania mapujące wykazały, że oba typy receptorów są szeroko rozpowszechnione w OUN ssaków. Receptory oreksynowe obecne są m.in. w rdzeniu kręgowym, pniu mózgu, opuszce węchowej, ciele migdałowatym, mózdzku, wzgórzu, śródmózgowiu a także w formacji hipokampa (Kukkonen i wsp., 2013). Obecność receptorów oreksynowych w tak wielu obszarach mózgowia sugeruje zaangażowanie ORX w kontrolę licznych procesów fizjologicznych. Wyniki badań prowadzonych na różnych modelach doświadczalnych potwierdziły powyższą hipotezę i wykazały, że ORX (ORX_A i ORX_B) uczestniczą w regulacji zachowań pokarmowych i seksualnych, oraz kontroli rytmu okołodobowego sen-czuwanie (Kukkonen i wsp., 2013; Xu i wsp., 2013). Przypuszcza się, że oreksyny odgrywają również istotną rolę w regulacji homeostazy energetycznej organizmu, aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz procesach uczenia się i zapamiętywania (Selbach i wsp., 2010; Kukkonen i wsp., 2013). Istnieją także doniesienia wskazujące na udział oreksyn w procesach synchronizacji zachodzących w OUN (Gerashchenko i wsp., 2001).

Celem omawianych w pracy badań *in vitro* i *in vivo* było sprawdzenie czy obecne w HPC receptory oreksynowe uczestniczą w generowaniu lokalnie rejestrowanej aktywności theta. Podczas badań prowadzonych na hipokampalnych skrawkach mózgowych perfundowanych roztworami ORX_A w dawkach od 0.01 μM do 1 μM zaobserwowaliśmy, że ORX_A w najniższej oraz najwyższej dawce indukowała w skrawkach jedynie aktywność o charakterze epileptycznym. W zapisie aktywności elektroencefalograficznej skrawków poddanych działaniu ORX_A w trzech pośrednich dawkach (0.03, 0.1, 0.3 μM) oprócz aktywności epileptycznej obecne były epizody rytmu theta, których amplituda i moc zależała od zastosowanej dawki. Rytm theta rejestrowany w skrawkach perfundowanych ORX_A w dawce 0.1 μM miał najwyższą amplitudę oraz moc rejestrowanego sygnału. Interesujący jest fakt, że efekt wywołany przez ORX_A nie był blokowany, ani przez antagonistę receptorów OX_1R (SB334867), ani antagonistę receptorów OX_2R (TCS OX229). Zanik aktywności rytmicznej w preparatach formacji hipokampa odnotowany został dopiero po kąpeli skrawków w roztworze zawierającym mieszaninę antagonistów obu typów receptorów oreksynowych.

W kolejnej serii doświadczeń *in vitro* badaliśmy wpływ ORX_B na aktywność elektroencefalograficzną skrawków formacji hipokampa. W czasie doświadczeń przetestowanych zostało pięć dawek tego związku o stężeniu od 0.01 μM do 1 μM. Skrawki perfundowane ORX_B w dawkach 0.01 μM i 0.03 μM generowały wyłącznie aktywność epileptyczną. Natomiast preparaty kąpane w płynie mózgowo-rdzeniowym zawierającym ORX_B w dawkach 0.1, 0.3 i 1 μM poza aktywnością epileptyczną generowały epizody dobrze zsynchronizowanego rytmu theta. Najwyższy amplitudowo i wykazujący najwyższą moc rejestrowanego sygnału rytm rejestrowany był po zastosowaniu ORX_B w dawce 0.1 μM. Podobnie jak w przypadku ORX_A, efekt wywołany podaniem ORX_B nie był blokowany ani przez antagonistę receptorów OX₁R, ani antagonistę receptorów OX₂R. Zanik aktywności rytmicznej w preparatach formacji hipokampa odnotowany został dopiero po kąpeli skrawków w roztworze zawierającym mieszaninę antagonistów obu typów receptorów oreksynowych.

Uzyskane w badaniach *in vitro* wyniki, zweryfikowaliśmy następnie w badaniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach. Dohipokampalne iniekcje ORX_A w odpowiedniej dawce zwiększały nie tylko amplitudę rytmu theta, ale były w stanie ją indukować aktywność theta u zwierząt premedykowanych atropiną (blokerem receptorów cholinergicznym). Domózgowe iniekcje ORX_A w najniższej dawce (0.2 μg/0.5 μl) okazały się nieskuteczne w indukowaniu aktywności rytmicznej theta u premedykowanych ATR zwierząt. Z kolei ORX_A podawana w najwyższej dawce (1 μg/0.5 μl) wywoływała aktywność epileptyczną. Dopiero ORX_A podawana w dawce 0.4 μg/0.5 μl indukowała dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie i mocy. Obserwowany efekt był w pełni odwracalny. Brak rytmu w zapisie hipokampalnej aktywności EEG po iniekcji ORX_A u premedykowanych atropiną szczurów, odnotowany został jedynie w doświadczeniach, w których dokonywano lokalnych iniekcji roztworu zawierającego ORX_A oraz dwa blokery receptorów oreksynowych (SB334867 i TCS OX229).

Podobny przebieg miały doświadczenia, w których badano wpływ domózgowych iniekcji ORX_B na aktywność EEG formacji hipokampa u anestetyzowanych szczurów. Najniższa dawka ORX_B (0.1 μg/0.5 μl) nie miała wpływu na zapis EEG rejestrowany z HPC premedykowanych ATR zwierząt, a najwyższa (0.8 μl/0.5 μg) indukowała epilepsję. Dawką, która była skuteczna w wywołaniu rytmu theta u premedykowanych atropiną szczurów była dawka 0.8 μg/0.5 μl. Hipokampalny rytm theta rejestrowany po iniekcji ORX_B w tym stężeniu miał wyższą amplitudę oraz moc w porównaniu z rytmem rejestrowanym w warunkach kontrolnych. Efekt iniekcji ORX_B antagonizowany był przez domózgowe iniekcje mieszaniny ORX_B oraz blokerów obu typów receptorów oreksynowych.

Co ciekawe, obserwowanym po dohipokampalnych iniekcjach ORX zmianom mocy i amplitudy nie towarzyszyły zmiany w częstotliwości omawianego wzorca EEG. Brak zmian w częstotliwości rytmu theta był zgodny z wcześniejszymi doniesieniami o niezależnym programowaniu amplitudy,

mocy oraz częstotliwości hipokampalnej aktywności rytmicznej w paśmie theta (Smythe i wsp., 1991; Bland i Oddie, 2001). W pracach tych wykazano, że częstotliwość jest programowana w niższych partiach mózgowia, których badania zawarte w niniejszej pracy nie obejmowały.

Podsumowując uzyskane w trakcie badań wyniki dostarczyły pierwszych bezpośrednich dowodów na to, że obecne w formacji hipokampa receptory oreksynowe biorą aktywny udział w powstawaniu aktywności rytmicznej w paśmie theta. Opisane w pracy badania finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (grant NCN nr 011/01/N/NZ4/ 01722).

Bocian R., Caban B., Kłos-Wojtczak P., Konopacki J., Kowalczyk T. (2016) Is electrical coupling involved in the generation of posterior hypothalamic theta rhythm? Eur. J. Neurosci 44(6): 2324-2333

W 2014 roku Kowalczyk i wsp. wykazali, że obszar tylnego podwzgórza (PHA) jest nie tylko stacją przekaźnikową, która przekazuje impulsy płynące z pnia mózgu do formacji hipokampa, ale także obszarem zdolnym do samodzielnego generowania aktywności rytmicznej theta.

W świetle danych wskazujących na kluczową rolę synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta celem przedstawionych w pracy badań było zbadanie wpływu iniekcji związków modulujących aktywność GJs (karbenoksolonu i trimetyloaminy) na aktywność theta rejestrowaną z PHA w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W badaniach prowadzonych na tylnopodwzgórzowych skrawkach mózgowych wykazaliśmy, że KARB i TMA dodane do ACSF nie miały wpływu na zdolność generowania aktywności theta pojawiającej się w odpowiedzi na stymulację receptorów cholinergicznym. Ponieważ brak wpływu obu związków na rytm theta rejestrowany w PHA był dla nas zaskoczeniem zaplanowaliśmy dodatkowe serie doświadczalne mające na celu weryfikację hipotezy zakładającej brak udziału GJs w powstawaniu rytmu theta w badanym przez nas obszarze mózgu. W serii doświadczalnej, w której skrawki mózgowie inkubowane były w roztworze karbacholu, a następnie opłukiwane ACSF zawierającym oprócz karbacholu karbenoksolon, zaobserwowaliśmy aktywność w paśmie theta, która jakościowo różniła się od indukowanego cholinergicznym rytmu theta. Obecność KARB w ACSF sprawiła, że rytm theta miał wyższą amplitudę i moc. Uzyskane wyniki sugerowały zatem brak udziału GJs w powstawaniu rytmu theta w PHA. Ponieważ karbenoksolon oprócz działania blokującego GJs wykazuje także działanie agonistyczne w stosunku do receptorów mineralokortykoidowych (MR) rejestracja rytmu o podwyższonej amplitudzie i mocy po zastosowaniu tego związku została przez nas wytłumaczona oddziaływaniem KARB na wspomniany wyżej typ receptorów. Powyższa sugestia została potwierdzona przez nas w późniejszych badaniach. Okazało się bowiem, że obserwowany we wcześniejszych doświadczeniach torujący efekt niewidoczny był w doświadczeniach, w których skrawki generujące indukowany karbacholem rytm theta omywane były roztworem zawierającym oprócz karbacholu mieszaninę agonisty i antagonisty MR

(odpowiednio karbenoskolonu i spironolaktonu – SPL). W ostatniej serii badań *in vitro* wykazaliśmy, że sam SPL nie miał wpływu na parametry rytmu theta wywołanego pobudzeniem cholinergicznym tylnopodwzgórzowych skrawków mózgowych.

Wyniki badań *in vitro* wskazujące na udział MR, a nie GJs, w generowaniu podwzgórzowego rytmu theta zweryfikowaliśmy następnie w doświadczeniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach. Dopodwzgórzowe iniekcje KARB indukowały dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie i mocy w porównaniu z aktywnością rejestrowaną w warunkach kontrolnych (przed iniekcją związku). Interesujący jest fakt, że domózgowe podanie KARB nie tylko modulowało rejestrowaną w kontroli aktywność theta, ale także ją indukowało w sytuacji kiedy w kontroli nie obserwowano rytmu theta. Podobnie jak w przypadku badań *in vitro*, w badaniach *in vivo* nie zaobserwowaliśmy wpływu iniekcji trimetyloaminy (związku usprawniającego transmisję synaptyczną odbywającą się za pośrednictwem GJs) na aktywność EEG rejestrowaną z PHa. W kolejnej serii doświadczeń w celu potwierdzenia udziału MR w powstawaniu podwzgórzowego rytmu theta, premedykowanym SPL szczurom podawano do PHa mieszaninę karbenoksolonu i spironolaktonu. W zapisie EEG zwierząt tej grupy obecna była wyłącznie aktywność zdesynchronizowana. Aktywność o charakterze nieregularnym obserwowaliśmy także w ostatniej serii doświadczeń, w których szczurom poddanym uprzednim iniekcjom atropiny podawano lokalnie KARB.

Podsumowując, prezentowane w pracy wyniki wykazały, że karbenoksolon wzmacnia nie tylko indukowany cholinergicznie rytm theta w odnerwionych skrawkach tylnego podwzgórza, ale także tylnopodwzgórzowy rytm theta rejestrowany u anestetyzowanych szczurów. Co więcej, po raz pierwszy dostarczyliśmy dowodów na to, że KARB nie tylko moduluje aktywność theta w PHa, ale także jest w stanie ją indukować, a pobudzający efekt KARB na aktywność EEG tylnego podwzgórza związany jest z oddziaływaniem tego związku na receptory mineralokortykoidowe. Badania opisane w omawianej pracy finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (grant NCN nr 2011/01/B/NZ4/ 00373).

Bocian R., Kłós-Wojtczak P., Konopacki J. (2016) Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm. Recipe for success in recording stable field potential. Brain Res. Bull. 1646: 551-559

W 2014 roku Kowalczyk i wsp. opublikowali dane potwierdzające zdolność obszaru tylnego podwzgórza do generowania aktywności oscylacyjnej theta. Rejestrowany z obszaru tylnego podwzgórza (jąder tylnego podwzgórza i jądra nasuteczkowego) rytm theta różni się jednak jakościowo od rytmu rejestrowanego w HPC. Po pierwsze, amplituda podwzgórzowego rytmu theta jest znacznie niższa niż rytmu rejestrowanego w HPC. Po drugie, rejestrowana z PHa aktywność theta pojawiała się zazwyczaj w krótkich epizodach obserwowanych w EEG stosunkowo rzadko (Kowalczyk

i wsp., 2014). Powyższe cechy sugerują, że spontanicznie rejestrowany rytm theta z PHa nie jest odpowiednim modelem do badania korelacji między aktywnością komórkową i lokalnie rejestrowanym rytmem. Zewnątrzkomórkowe rejestracje aktywności komórkowej wymagają ściśle określonych warunków doświadczalnych, pozwalających na rejestrację aktywności EEG, w której obserwowane są regularne cykle rytm theta-aktywność zdesynchronizowana.

Celem opisanych w pracy badań było opracowanie modelu eksperymentalnego umożliwiającego korelację aktywności komórkowej rejestrowanej w obszarze tylnego podwzgórza z lokalnie rejestrowaną aktywnością polową u anestetyzowanego szczura. W trzech seriach doświadczalnych badaliśmy wpływ iniekcji trzech związków farmakologicznych na aktywność EEG rejestrowaną w PHa. W pierwszej kolejności testowaliśmy wpływ dopodwzgórzowych iniekcji karbacholu podawanego w dawkach od 0.5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ do 2.0 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$. Karbachol w najniższej dawce (0.5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) nie miał wpływu na zapis EEG, natomiast najwyższa dawka tego związku (2.0 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) generowała aktywność epileptyczną w PHa. Okazało się, że karbachol podawany w dawce 1.0 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ w pierwszych minutach po iniekcji indukował bardzo dobrze zsynchronizowany rytm theta pojawiający się w postaci wielosekundowych epizodów, które w miarę upływu czasu przedzielone były aktywnością zdesynchronizowaną. Indukowane iniekcjami karbacholu epizody rytmu theta widoczne były w zapisie EEG do dwóch godzin po iniekcji zastosowanego związku. W drugiej serii doświadczeń sprawdzaliśmy wpływ dopodwzgórzowych iniekcji karbenoksolonu podawanego w dawce 25 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ oraz 50 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$. Iniekcje KARB w stężeniu 25 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ nie miały wpływu na lokalnie rejestrowany zapis EEG, podczas gdy dwukrotnie wyższa dawka tego związku w pierwszym minutach po iniekcji indukowała długie i dobrze zsynchronizowane epizody theta. Epizody theta przedzielone aktywnością nieregularną obserwowane były przez godzinę od chwili iniekcji. U zwierząt ostatniej grupy testowaliśmy z kolei wpływ iniekcji kwasu kainowego (agonisty receptorów glutaminergicznych typu kainowego - KA), podawanego w dwóch dawkach (0.1 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ i 0.25 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$), na rejestrowaną z PHa aktywność EEG. Iniekcje KA w niższej dawce nie miały wpływu na zapis EEG, natomiast KA podawany w dawce 0.25 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ indukował bezpośrednio po iniekcji aktywność epileptyczną, która utrzymywała się w zapisie przez około 20 min. Po tym czasie w EEG zaczęły się pojawiać epizody rytmu theta, które widoczne były do czasu działania związku, tj. około dwóch godzin. Co ciekawe, iniekcje wszystkich trzech związków nie tylko modulowały aktywność theta obserwowaną w warunkach kontrolnych, ale także indukowały rytm theta w sytuacji gdy w zapisie tylnopodwzgórzowego EEG nie było rytmu. Powyższa obserwacja jest niezwykle istotna w świetle informacji, że spontaniczny rytm theta rejestrowany jest w PHa niezwykle rzadko (Kowalczyk i wsp., 2014).

Podsumowując opisane w pracy doświadczenia można stwierdzić, że wszystkie zastosowane przez nas związki są zdolne do indukowania aktywności theta w obszarze tylnego podwzgórza. Niemniej jednak, ze względu na najdłuższy czas działania i brak właściwości epileptycznych model wywoływanego dopodwzgórzowymi iniekcjami karbacholu rytmu theta jest najlepszy do prowadzenia badań mających na celu korelację aktywności komórkowej z lokalnie rejestrowaną aktywnością polową. Dodatkowo w omawianej pracy wykazaliśmy, że wiek zwierząt może mieć wpływ na prawdopodobieństwo rejestracji spontanicznego rytmu theta w PHa. U zwierząt w wieku 50-65 dni szansa na zarejestrowanie spontanicznej aktywności theta wzrosła niemalże dwukrotnie w porównaniu z wynikiem uzyskanym przez Kowalczyka i wsp. (2014). Badania opisane w omawianej pracy finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (grant NCN nr 2013/11/B/NZ4/04872).

Bocian R., Kłos-Wojtczak P., Caban B., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J. (2016) Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm recorded in anesthetized rats and brain slices. *Hippocampus* 26(10): 1354-1369

Doświadczenia opisane w tej pracy stanowią kontynuację badań nad tylnopodwzgórzowym rytmem theta. W latach 80. ubiegłego wieku wykazano, że w tylnym podwzgórzu obecne są neurony, których aktywność skorelowana jest z aktywnością polową theta rejestrowaną w HPC (Bland i wsp., 1995). Wyniki tych badań pozwoliły przypuszczać, że w badanej przez nas strukturze istnieje populacja neuronów, których aktywność może być skorelowana nie tylko z hipokampalnym rytmem theta, ale także z lokalnie rejestrowaną aktywnością polową theta.

Celem omówionych w pracy badań było sprawdzenie czy w PHa występują neurony, których aktywność związana jest z lokalnie rejestrowanym rytmem theta. Zewnątrzkomórkowe rejestracje aktywności komórek prowadzone były u anestetyzowanego szczura oraz w tylnopodwzgórzowych skrawkach mózgowych. Wszystkie zarejestrowane przez nas neurony klasyfikowane były zgodnie z powszechnie przyjętymi kryteriami zaproponowanymi przez Coloma i Blanda (1987) oraz Konopackiego i wsp. (2006). W badaniach *in vivo* udało nam się zarejestrować w PHa neurony „theta-on” toniczne oraz „theta-off” toniczne, których aktywność odpowiednio wzrastała w czasie tylnopodwzgórzowego rytmu theta lub w czasie występowania aktywności o charakterze zdesynchronizowanym. Dodatkowo zarejestrowaliśmy tzw. neurony bramkujące typu B, które generowały potencjały czynnościowe ze wzmożoną częstotliwością tuż przed pojawieniem się rytmu. W prowadzonych przez nas badaniach *in vivo* udało nam się zarejestrować u anestetyzowanych szczurów nowy typ neuronów bramkujący, który nazwaliśmy neuronami bramkującymi typu D. Ten typ komórek wykazywał zwiększoną aktywność na początku każdego epizodu rytmu. Neurony bramkujące typu D nie były jedynym typem komórek, które zostały opisane przez nas po raz pierwszy

w omawianej pracy. U anestetyzowanych szczurów zarejestrowaliśmy także neurony, które charakteryzowały się bardzo regularnym wzorcem wyładowań pojawiającym się niezależnie od tego czy w zapisie podwzgórzowego EEG obecny był rytm theta, czy też aktywność zdesynchronizowana (tzw. komórki chronometryczne; ang. *timing cells*).

Wyniki badań *in vivo* uzupełnione zostały w pracy wynikami badań *in vitro*. Zarejestrowana w tylnopodwzgórzowych skrawkach populacja neuronów, których aktywność związana była z lokalnie rejestrowaną aktywnością polową, różniła się od populacji neuronów theta-zależnych obserwowanych w warunkach *in vivo*. Poza obserwowanymi u anestetyzowanych szczurów, neuronami „theta-on” tonicznymi, „theta-off” tonicznymi oraz neuronami chronometrycznymi w badaniach *in vitro* udało nam się zarejestrować neurony „theta-on” fazowe, które generowały potencjały czynnościowe zgodnie z fazą rejestrowanego w podwzgórzu rytmu theta. Co ciekawe, w badaniach *in vitro* nie zarejestrowaliśmy neuronów bramkujących.

Reasumując, przedstawione w pracy wyniki badań wykazały, że w PHa istnieje populacja neuronów, których aktywność ściśle związana jest z lokalnie rejestrowaną aktywnością EEG. Co więcej, w badanym przez nas obszarze mózgowia zarejestrowaliśmy neurony theta-zależne, które do tej pory nie były obserwowane w formacji hipokampa. Neurony bramkujące typu D, uzupełniły opisaną w HPC populację neuronów kontrolujących czas trwania epizodów rytmu theta, natomiast zarejestrowane w PHa neurony chronometryczne prawdopodobnie biorą udział w procesie zamiany ciągłej impulsacji płynącej z pnia mózgu na rytmiczny wzorec wyładowań rejestrowany w ściśle określonych obszarach kory limbicznej. Badania opisane w omawianej pracy finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (grant NCN nr 2013/11/B/NZ4/04872).

OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z OPISANEGO CYKLU PRAC

Za najważniejsze osiągnięcia, wynikające z badań zawartych w monotematycznym cyklu prac uważam wykazanie że:

- 1) obecne w formacji hipokampa synapsy elektryczne odgrywają kluczową rolę w mechanizmach synchronizacyjnych związanych z powstawaniem hipokampalnego rytmu theta. Co więcej, po raz pierwszy wykazaliśmy, że sprawne przekazywanie chemiczne jest niewystarczające do zapewnienia optymalnego poziomu synchronizacji w sieciach neuronalnych;
- 2) w tylnym podwzgórzu, w przeciwieństwie do formacji hipokampa, synapsy eklektyczne nie biorą udziału w powstawaniu rytmu theta, a pobudzający efekt zastosowania karbenoksolonu na aktywność EEG tylnego podwzgórza związany jest z oddziaływaniem tego związku na receptory mineralokortykoidowe;
- 3) transmisja oreksynowa bierze aktywny udział w powstawaniu aktywności rytmicznej theta w formacji hipokampa;

- 4) indukowany karbacholem tylnopodwzórzowy rytm theta (w przeciwieństwie do spontanicznego rytmu theta) jest odpowiednim modelem doświadczalnym do badania korelacji aktywności komórkowej z lokalnie rejestrowanym rytmem theta;
- 5) w obszarze tylnego podwzgórza istnieje populacja neuronów, których aktywność skorelowana jest z lokalnie rejestrowanym rytmem theta. Poza obecnymi w formacji hipokampa neuronami typu „theta-on”, „theta-off” i neuronami bramkującymi (typu A, B i C), udało nam się zidentyfikować w PHa nową grupę neuronów bramkujących (neurony typu D) oraz tzw. komórki chronometryczne.

BIBLIOGRAFIA

1. Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F (2010) Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides* 31: 1761-1766
2. Bao W, Wu JY (2003) Propagating wave and irregular dynamics: Spatiotemporal patterns of cholinergic theta oscillations in neocortex, *in vitro*. *J Neurophysiol* 90:333-341.
3. Bland BH (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54.
4. Bland BH, Bland CE, Colom LV, Roth SH, DeClerk S, Dypvik A, Bird J, Deliyannides A (2003) Effect of halothane on type 2 immobility-related hippocampal theta field activity and theta-on/theta-off cell discharges. *Hippocampus* 13:38-47
5. Bland BH, Colom LV (1993) Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol* 41:157-208.
6. Bland BH, Konopacki J, Kirk IJ, Oddie SD, Dickson CT (1995) Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 74:322-333.
7. Bland BH, Oddie SD (2001) Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Res* 127:119-136.
8. Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B (2003) Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 23:10897-10903.
9. Caplan JB, Madsen JR, Schulze-Bonhage A, Aschenbrenner-Scheibe R, Newman EL, Kahana MJ (2003) Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning. *J Neurosci* 23:4726-4736.
10. Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus C, Kushnir M, Perez-Velazquez JL (2000) The role of gap junctions in seizures. *Brain Res Rev* 32:235-241.

11. Colom LV (2006) Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96:609-623
12. Colom LV, Bland BH (1987) State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res* 422:277-286.
13. Draguhn A, Traub RD, Shmitz D, Jefferys GR (1998) Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:189-192.
14. Gerashchenko D, Salin-Pascual R, Shiromani PJ (2001) Effects of hypocretin-saporin injections into the medial septum on sleep and hippocampal theta. *Brain Res* 913:106-115.
15. Gołębiewski H, Eckersdorf B, Konopacki J (2006) Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur J Neurosci* 24:1759-1770.
16. Goutagny R, Manseau F, Jackson J, Danik M, Williams S (2008) 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* 18:531- 535.
17. Jahromi SS, Wentland K, Piran S, Carlen PL (2002) Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vivo seizure model. *J Neurophysiol* 88:1893-1902.
18. Konopacki J, Eckersdorf B, Kowalczyk T, Gołębiewski H (2006) Firing cell repertoire during carbachol-induced theta rhythm in rat hippocampal formation slices. *Eur J Neurosci* 23:1811-1818
19. Konopacki J, Kowalczyk T, Gołębiewski H (2004) Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res* 1019:270-274.
20. Konopacki J, MacIver MB, Bland BH, Roth SH (1987) Carbachol-induced EEG "theta" activity in hippocampal brain slices. *Brain Res* 405:196-198.
21. 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.
22. Kukkonen JP (2013) Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C2-32.
23. Meador KJ, Thompson JL, Loring DW, Murro AM, King DW, Gallagher BB, Lee GP, Smith JR, Flanigin HF (1991) Behavioral state-specific changes in human hippocampal theta activity. *Neurology* 41:869-872.
24. Mitchell DJ, McNaughton N, Flanagan D, Kirk IJ (2008) Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal "theta". *Prog Neurobiol* 86:156-185
25. Ross FM, Gwyn P, Spanswick D, Davies SN (2000) Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 100:789-796.

26. Selbach O, Bohla C, Barbara A, Doreulee N, Eriksson KS, Sergeeva OA, Haas HL (2010) Orexins/hypocretins control bistability of hippocampal long-term synaptic plasticity through co-activation of multiple kinases. *Acta Physiol (Oxf)* 198:277-285.
27. Smythe JW, Cristie BR, Colom LV, Lawson VH, Bland BH (1991) Hippocampal theta field activity and theta-on/theta-off cell discharges are controlled by an ascending hypothalamo-septal pathway. *J Neurosci* 11:2241-2248.
28. Traub RD, Draguhn A, Whittington MA, Baldeweg T, Bibbig A, Buhl EH, Schmitz D (2002) Axonal gap junctions between principal neurons: A novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev Neurosci* 13:1-30.
29. Traub RD, Kopell N, Bibbig A, Buhl EH, LeBeau FEN, Whittington MA (2001) Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J Neurosci* 21:9478-9486.
30. Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26: 407-418.
31. Vanderwolf CH (1975) Neocortical and hippocampal activation relation to behavior: effects of atropine, eserine, phenothiazines, and amphetamine. *J Comp Physiol Psychol* 88:300-323.
32. Vanderwolf CH, Baker GB (1986) Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non-cholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behavior. *Brain Res* 374:342-356.
33. Xu TR, Yang Y, Ward R, Gao L, Liu Y (2013) Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cell Signal* 25:2413-2423.

VI. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIAGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH

W 1993 roku podjęłam studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku biologia. Trzy lata później, w ramach pracowni magisterskiej rozpoczęłam badania w Katedrze Neurofizjologii nad rolą receptorów 5-HT_{1A} w regulacji napędu lękowego. Analiza badań behawioralnych i neurochemicznych wykazała, że związki selektywnie wiążące się z receptorami 5-HT_{1A}, takie jak 8-OH-DPAT, wykazują działania przeciw lękowe i mogą stanowić nową klasę związków anksjolitycznych stosowanych w farmakoterapii zaburzeń lękowych. Pracę magisterską, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Romaniuka, zatytułowaną „*Rola receptorów 5-HT_{1A} w regulacji napędu lękowego*” obroniłam w 1998 roku. W tym samym roku podjęłam studia w ramach Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego Wydziału Biologii i Nauk

o Ziemi Uł. W trakcie studiów doktoranckich rozpoczęłam, w Zakładzie Neurobiologii Uł, badania nad aktywnością theta rejestrowaną u swobodnie poruszających się kotów. Po roku pracy badawczej wzięłam aktywny udział w przygotowaniu pierwszego artykułu o charakterze przeglądowym, w którym opisane zostały badania nad rytmem theta rejestrowanym w warunkach *in vitro* (Konopacki i wsp., 2000).

Prowadzone przeze mnie badania w ramach pracy doktorskiej miały na celu sprawdzenie czy obszar tylnego podwzgórza u kota uczestniczy w procesie powstawania hipokampalnego rytmu theta. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że u swobodnie poruszających się kotów, podobnie jak u gryzoni, obszar tylnego podwzgórza stanowi ważne ogniwo wstępującego układu synchronizującego związanego z powstawaniem hipokampalnego rytmu theta. Z kolei, badania farmakologiczne dostarczały dowodów, że obszar tylnego podwzgórza u kotów (w przeciwieństwie do szczurów) zaangażowany jest w programowanie amplitudy badanego wzorca EEG, a nie jego częstotliwości. Dodatkowo, w podczas badań farmakologicznych wykazane zostało, że zlokalizowany w obszarze tylnego podwzgórza układ cholinergiczny (receptory typu M_1) oraz GABAergiczny (zarówno receptory $GABA_A$ jak i $GABA_B$) pełnią ważną rolę w powstawaniu hipokampalnej aktywności oscylacyjnej w paśmie theta u swobodnie poruszających się kotów. Opisane badania stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej zatytułowanej „*Udział tylnego podwzgórza w generowaniu hipokampalnego rytmu theta in vivo*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Konopackiego. Obrona pracy doktorskiej odbyła się w 2005 roku. Uzyskane w czasie przygotowania rozprawy doktorskiej wyniki zostały opublikowane w trzech artykułach z listy JCR. Dwie prace opublikowane zostały przed obroną pracy doktorskiej (Bocian i Konopacki, 2001; Bocian i Konopacki, 2004), a jedna dwa lata po uzyskaniu stopnia doktora (Bocian i Konopacki, 2007).

Wszystkie badania prowadzone w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu promotorskiego (grant KBN 3PO4 008 24).

PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, zostałam zatrudniona w Zakładzie Neurobiologii na etacie adiunkta (wcześniej od 2002 do 2005 roku zatrudniona byłam w Zakładzie Neurobiologii, obecnie Katedrze Neurobiologii, na etacie asystenta). W związku z coraz większymi trudnościami w uzyskiwaniu pozwoleń Komisji Etycznych na prowadzenie badań na kotach, zaprzestałam doświadczeń na swobodnie poruszających się kotach i rozpoczęłam badania na modelu anestetyzowanego szczura. Zmiana modelu doświadczalnego wymusiła konieczność stworzenia nowej pracowni elektrofizjologicznej umożliwiającej rejestrację aktywności bioelektrycznej u szczurów. Przez dwa lata (2005-2006) uczestniczyłam w organizacji nowej pracowni badań *in vivo*.

Pierwsze zagadnienie, nad którym pracowałam po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, dotyczyło udziału synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta. W badaniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach oraz skrawkach mózgowych uzyskanych z formacji hipokampa wykazaliśmy, że obecne na poziomie HPC połączenia szczelinowe pełnią istotną rolę w powstawaniu badanego wzorca EEG. Wyniki doświadczeń, w których stosowaliśmy związki modulujące aktywność GJs (blokujące synapsy elektryczne lub usprawniające elektryczną transmisję synaptyczną) opublikowane zostały w czterech pracach oryginalnych (dwóch z listy JCR; Bocian i wsp., 2009, 2011 i dwóch z poza bazy JCR; Bocian i wsp., 2008, 2009), dwóch artykułach przeglądowych (Bocian i Kowalczyk, 2012; Konopacki i wsp. 2014) oraz rozdziale w książce „Gap junctions in the brain” (Konopacki i wsp. 2013, Dere E. (Red.), Wydawnictwo Elsevier Inc.). Dwie prace oryginalne (Bocian i wsp., 2009; Bocian i wsp., 2011) i jedna praca przeglądowa (Konopacki i wsp., 2014) dotycząca omawianej tematyki badań stanowią część przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego. Badania dotyczące roli synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta finansowane były w z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant MNiSW nr N 401 2811 33).

Rejestracja rytmu theta w różnych obszarach mózgowia możliwa jest dzięki aktywności neuronów theta-zależnych, które wykazują zdolność do oscylacji potencjału błonowego. W oparciu o wzór wyładowań neuronów w stosunku do rejestrowanej równoległej połowej aktywności theta opisane zostały dwa podstawowe typy neuronów theta-zależnych: neurony „theta-on” i „theta-off”. W 2013 roku podczas badań, w których prowadziliśmy rejestracje hipokampalnej aktywności połowej theta i towarzyszącej jej aktywności komórkowej zaobserwowaliśmy nową grupę neuronów theta-zależnych, które nazwaliśmy komórkami bramkującymi (ang. *gating cells*, Kowalczyk i wsp., 2013). Aktywność zaobserwowanych przez nas neuronów związana była ściśle z pojawianiem się i zanikaniem rejestrowanych w warunkach *in vitro* i *in vivo* epizodów rytmu theta. W zależności od wzoru wyładowań neurony bramkujące klasyfikowane były jako neurony typu A, B lub C. 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. Ostatni typ komórek bramkujących, typ C, wyładowywał tylko na początku przerwy pomiędzy kolejnymi epizodami rytmu theta. Badania aktywności komórkowej hipokampalnych neuronów finansowane były z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant MNiSW nr N401 2811 33).

Opisane powyżej wyniki badań *in vitro* zawarte zostały także w dwóch pracach przeglądowych (Kowalczyk i wsp. 2013, Eur. J. Neurosci; Kowalczyk i wsp. 2013, Postepy Hig. Med. Dosw.) poświęconych mechanizmom związanym z generowaniem aktywności rytmicznej theta w skrawkach

formacji hipokampa. W obu artykułach przedstawione zostały dodatkowo dane dotyczące profilu farmakologicznego badanego wzorca EEG, rozmieszczenia wewnątrzhipokampalnych generatorów aktywności theta, roli temperatury oraz synaps elektrycznych w generowaniu rytmu theta w warunkach pozaustrojowych. Ponadto, w pracach dokonane zostało porównanie badań *in vitro* z dostępnymi w literaturze wynikami badań prowadzonych na anestetyzowanych szczurach. Zestawienie danych wskazało jednoznacznie, że rytm theta rejestrowany w warunkach pozaustrojowych stanowi odpowiednik aktywności rytmicznej theta obserwowanej w warunkach *in vivo*.

W 2014 roku rozpoczęliśmy nowy cykl badań, których celem było sprawdzenie czy obszar tylnego podwzgórza jest zdolny do generowania rytmu theta. Badania elektrofizjologiczne prowadzone na anestetyzowanych szczurach wykazały, że badany przez nasz obszar mózgowia stanowi nie tylko stację przekaźnikową dla impulsów płynących z pnia mózgu do formacji hipokampa, ale jest także zdolny do samodzielnego generowania lokalnej aktywności rytmicznej theta. Co więcej, doświadczenia w których prowadzono równoległe rejestracje aktywności EEG z tylnego podwzgórza i formacji hipokampa wykazały, że pojawiający się w HPa theta generowany był niezależnie od rytmu obserwowanego w formacji hipokampa. Dodatkowo, badania farmakologiczne w których zwierzętom podawano obwodowo atropinę (antagonistę receptorów cholinergicznym muskarynowych) wskazały na cholinergiczny charakter tylnopodwzgórzowego rytmu theta. Iniekcje blokera receptorów muskarynowych znosiły z zapisu EEG zarówno hipokampalny jak i tylnopodwzgórzowy rytm theta **(Kowalczyk i wsp., 2014)**.

Model anestetyzowanego szczura nie pozwala jednak na udzielenie ostatecznej odpowiedzi na pytanie, czy tylne podwzgórze zdolne jest do samodzielnego generowania aktywności oscylacyjnej. Możliwość taką dają badania *in vitro* prowadzone na podwzgórzowych skrawkach mózgowych. Wyniki prowadzonych przez nas badań *in vitro* potwierdziły, że aktywność rytmiczna theta może być generowana w obszarze tylnego podwzgórza również w warunkach pełnego odnerwienia. Co więcej, rytm rejestrowany w warunkach *in vitro* generowany był w identycznych obszarach preparatów tylnego podwzgórza, jak miało to miejsce w badaniach *in vivo*, czyli w jądrach tylnego podwzgórza oraz jądrze nadsuteczki. Opisane powyżej badania finansowane były z funduszy Narodowego Centrum Nauki (NCN nr UMO-2011/01/B/NZ4/00373).

W 2015 r. nawiązaliśmy współpracę z funduszem inwestycyjnym Poland Ventures Sp. z o.o. zajmującym się tworzeniem i wdrażaniem nowych produktów oraz technologii o charakterze medycznym. Współpraca realizowana jest w ramach projektu „Opracowanie i ocena kliniczna urządzenia do przezskórnej stymulacji nerwu błędnego w leczeniu zaburzeń poznawczych - Cogniguard”. Celem kooperacji jest zbadanie wpływu drażnienia nerwu błędnego (ang. *vagus nerve* - VN) na aktywność elektroencefalograficzną formacji hipokampa. Badania nad tym zagadnieniem są zasadne, ponieważ wieloletnie badania wskazują na istotne powiązanie badanego przez nas wzorca

EEG z procesami poznawczymi. W doświadczeniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach wykazaliśmy, że elektryczna stymulacja VN wywołuje w HPC aktywność rytmiczną w paśmie theta. Co ciekawe, zmiany hipokampalnego EEG były ściśle związane z siłą zastosowanego bodźca oraz schematem protokołu doświadczalnego.

W pierwszym etapie badań stosując pojedyncze bodźce elektryczne o natężeniu 1, 2, 4, 6, 8 i 10 mA wykazaliśmy, że efekt bezpośredni, tzn. pojawienie się w zapisie EEG rytmu theta w czasie stymulacji, obserwowany był jedynie po zastosowaniu bodźców o najwyższym natężeniu (10 mA). Warto jednak podkreślić, że efekt bezpośredni drażnienia VN widoczny był jedynie po wykonaniu pojedynczej stymulacji. Ponowne drażnienie VN nie skutkowało pojawieniem się theta w zapisie hipokampalnego EEG. Prawdopodobnie zastosowania bodźca o zbyt wysokim natężeniu podczas pierwszej stymulacji doprowadziło do uszkodzenia nerwu błędnego. Wyniki kolejnej serii doświadczeń sugerują, że drażnienia VN może wywołać nie tylko efekt bezpośredni, ale także odroczone, tzn. ujawniać się z pewnym opóźnieniem. Okazało się bowiem, że wielokrotne stymulacje VN bodźcem o natężeniu 4 mA (który we wcześniejszych doświadczeniach nie wywoływał efektu bezpośredniego), prowadziły do pojawienia się w HPC rytmu o wyższej amplitudzie i mocy sygnału w stosunku do rytmu rejestrowanego w warunkach kontrolnych (przed stymulacją VN). W dalszej części przeprowadzonych badań nerw błędny stymulowany był bodźcami elektrycznymi, których parametry były zbliżone do tych, które stosuje się w terapii lekoopornej padaczki lub zaburzeń o charakterze depresyjnym. Bodźce o natężeniu 0.2 mA, podawane z częstotliwością 10 Hz, indukowały długie epizody rytmu theta o podwyższonej amplitudzie i mocy oraz zwiększały częstotliwość występowania i długość trwania epizodów badanego wzorca EEG.

Na zakończenie omawianych badań postanowiliśmy sprawdzić czy efekt odroczone drażnienia VN charakterystyczny jest jedynie dla wielokrotnych stymulacji, czy możliwy jest również do zaobserwowania po pojedynczej stymulacji. Okazało się, że drażnienie VN pojedynczymi bodźcami o stosunkowo niskim natężeniu (1, 2 i 3 mA) nie ma wpływu na zapis hipokampalnego EEG. Jednak stopniowy wzrost siły zastosowanego bodźca skutkował zmianami w hipokampalnym EEG. Stymulacja nerwu błędnego 4 mA bodźcem nie miała wpływu na podstawowe parametry rytmu theta (tj. amplitudę, moc i częstotliwość), ale zwiększała częstotliwość występowania oraz długość trwania epizodów rytmu theta. Dopiero po drażnieniu VN pojedynczym bodźcem o natężeniu 5 mA zaobserwowaliśmy rytm, którego amplituda i moc była wyższa niż epizodów rejestrowanych przed drażnieniem. Także częstotliwość i długość rejestrowanych w tej serii doświadczeń epizodów theta była wyższa niż w kontroli. Dane dotyczące wpływu drażnienia VN na aktywność formacji hipokampa stały się podstawą przygotowania manuskryptu.

VII. OMÓWIENIE DZIAŁALNOŚCI DYDAKTYCZNEJ, ORGANIZACYJNEJ I POPULARYZATORSKIEJ

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Od 1998 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych kierunków: biologia (specjalność: biologia eksperymentalna oraz biochemia i biologia molekularna), mikrobiologia, psychologia oraz słuchaczy studiów podyplomowych z zakresu biologii. Aktualnie prowadzę trzy wykłady kursowe dla studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ („Zarys histologii ogólnej”, „Histologia zwierząt” oraz „Histologia”). Ponadto, prowadzę zajęcia laboratoryjne z: „Neurobiologicznych mechanizmów zachowania człowieka”, „Fizjologii zwierząt”, „Anatomii i fizjologii człowieka”, „Zarysu histologii ogólnej”, „Histologii zwierząt”, „Histologii”, „Metod neurochemicznych i elektrofizjologicznych w neurobiologii”, a także pracownię specjalistyczną i magisterską oraz seminarium licencjackie. **W trakcie pracy dydaktycznej byłem promotorem 11 prac licencjackich i sprawowałam opiekę nad przygotowaniem 14 prac magisterskich. Aktualnie jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Pauliny Kłós-Wojtczak.**

W latach 2014-2016 byłem 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 projektu było opracowanie, a następnie wdrożenie nowoczesnego modelu kształcenia przedmiotu „Fizjologia zwierząt” dla studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska oraz studentów Nauk o Wychowaniu Uniwersytetu Łódzkiego. W ramach projektu powstały trzy skrypty dla studentów biologii i psychologii. W przygotowaniu dwóch opublikowanych w 2015 r skryptów („Fizjologia zwierząt. Skrypt dla studentów biologii. Część II” i „Neurobiologiczne mechanizmy zachowania człowieka. Skrypt dla studentów psychologii”) brałam udział jako współautorka i współredaktorka. **Za działalność dydaktyczną otrzymałam Nagrodę Zespołową II^o Rektora Uniwersytetu Łódzkiego (2001) oraz nagrodę Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2016).**

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

W trakcie pracy zawodowej angażowałam się również w działalność organizacyjną. Byłam udział w zorganizowaniu trzech konferencji naukowych: jednej konferencji o zasięgu międzynarodowym (10th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Łódź, 2011) oraz dwóch konferencji krajowych (Techniki elektrofizjologiczne w badaniach zjawisk bioelektrycznych – od kanałów jonowych po sieci neuronalne; Łódź, 2002 i 2006). W czasie wszystkich trzech konferencji

naukowych pełniłam funkcję sekretarza. W 2016 roku, jako członek komitetu organizacyjnego, uczestniczyłam także w zorganizowaniu międzynarodowej konferencji dydaktycznej (Using Technology to Innovate Teaching, Łódź, 2016). W 2013 roku zostałam wybrana na członka Komisji Rewizyjnej Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (2013-2015). Natomiast w 2016 roku w Winnicy (Ukraina) uczestniczyłam w rekrutacji kandydatów na studia w Polsce. Na stanowisko egzaminatora międzynarodowego z zakresu biologii powołana zostałam przez Biuro Uznawalności Wykształcenia i Wymiany Międzynarodowej (jednostkę podległą ministrowi do spraw szkolnictwa wyższego).

DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA

Od lat biorę aktywny udział w programach popularyzujących naukę, takich jak: „Uniwersytet Zawsze Otwarty” (2012, 2016), „Wykłady otwarte dla licealistów” (2011-2012) oraz „Piknik Nauki i Wiedzy Uniwersytetu Łódzkiego” (2012-2013). Od 2013 roku, współuczestniczę w prowadzeniu zajęć laboratoryjnych i pokazów w ramach „Ogólnopolskiej Nocy Biologów” (2013-2017). W 2016 roku rozpoczęłam także zajęcia z gimnazjalistami i licealistami w ramach „Instytutu Kreatywnej Biologii” utworzonego przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

VIII. DANE BIBLIOMETRYCZNE

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w formie monotematycznego cyklu publikacji	IF*	Punkty MNiSW*
7 publikacji	22.217	204

Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) wchodzących w skład dorobku naukowo-badawczego	IF*	Punkty MNiSW*	
A. Przed uzyskaniem stopnia doktora	3 publikacje	3.827	27
B. Po uzyskaniu stopnia doktora	6 publikacji	15.261	150

Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	IF*	Punkty MNiSW*	
A. Przed uzyskaniem stopnia doktora	brak	0	0
B. Po uzyskaniu stopnia doktora	7 publikacji	0	20
▪ publikacje naukowe w czasopismach krajowych	2 publikacje	0	4

▪ monografie w języku polskim	4 publikacje	0	12
▪ monografia w języku angielskim	1 publikacja	0	4
RAZEM		41.305	401

**IF i punkty MNiSW podane zgodnie z rokiem ukazania się publikacji*

Liczba cytowań publikacji (wg. Web of Science z dnia 07.02.2017):	106
Index Hirscha (wg. Web of Science z dnia 07.02.2017):	7
Liczba projektów badawczych (funkcja – wykonawca/główny wykonawca):	4
Liczba projektów dydaktycznych (funkcja – główny wykonawca):	1
Liczba komunikatów zjazdowych (prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych)	65
Liczba wygłoszonych referatów	6

Renata Bocian

Łódź, 07.02.2017