

Prof. dr hab. Jan Konopacki

Łódź, 26. 07. 2017 r.

Katedra Neurobiologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Tomasza Kaczora
pt.: Ocena wpływu metabolizmu komórkowego na transmisję
GABAergiczną w hodowli neuronów hipokampalnych szczura.

Procesy synchronizacyjne oraz oscylacyjne leżą u podstaw powstawania wszystkich wzorców elektroencefalograficznych mózgu. Ogromną rolę w tych zjawiskach odgrywa układ GABAergiczny. Odpowiedzialny jest on bowiem za rozwój procesów hamowania aktywności sieci neuronalnych, umożliwiając tym samym modulowanie ich funkcji. Układ GABAergiczny związany jest z dwoma odmiennie działającymi mechanizmami receptorowymi: receptorem GABA_A, mającym charakter jonotropowy oraz receptorem GABA_B, mającym profil metabotropowy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Przemysława Tomasza Kaczora poświęcona jest badaniom mechanizmów modulujących synaptyczne przekąźnictwo GABAergiczne. Pochodzi z zespołu naukowego Pana prof. dr hab. Jerzego Mozrzymasa, posiadającego mocną i dobrze utrwaloną światową pozycję w badaniu mechanizmów transmisji synaptycznej. Rozprawa doktorska ma charakter zbioru dwóch prac eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2015-2017 w renomowanym czasopiśmie *Frontiers in Cellular Neuroscience* (IF 4.609) oraz polskiego, syntetycznego opracowania. Rozprawa doktorska przeszła zatem wcześniej wnikliwą ocenę recenzentów co znacznie ułatwiło pracę recenzentowi.

Pierwszy człon tytułu w polskim opracowaniu rozprawy zaczynający się od słów „Ocena wpływu metabolizmu komórkowego na....” brzmi dość tajemniczo. Myślę, że lepiej byłoby wspomnieć od razu o astrocytach. Wtedy pierwszy część tytułu brzmiałaby „Ocena wpływu metabolizmu astrocytów na....”

Podstawowy problem, który adresowany jest w recenzowanej rozprawie to rola astrocytów, jako najliczniejszych komórek glejowych, w regulowaniu aktywności transmisji GABAergicznej. Już sam wybór problematyki badawczej dotyczącej wpływu astrocytów na aktywność synaptyczną w warunkach kompletnej deafferentacji (w hodowli komórkowej) uważam za bardzo istotny dla zrozumienia skomplikowanych mechanizmów regulujących przekąźnictwo synaptyczne. Autor wybrał sobie za przedmiot swojej rozprawy doktorskiej problem trudny, bowiem badanie przekąźnictwa synaptycznego kulturach komórkowych *in vitro* wymagało doskonałego przygotowania doświadczalnego. Jestem pełen uznania dla autora; w czasie studiów doktoranckich opanował bowiem wyjątkowo trudne techniki eksperymentalne, w tym między innymi technologię preparowania i utrzymywania w warunkach pozaastrojowych komórek nerwowych oraz techniki immunofluorescencyjne. Wszystkie badania zostały wykonane techniką patch-clamp w konfiguracji pełnej komórki. Opanowanie powyższych technik doświadczalnych wymagało ogromnego zaangażowania, dobrej organizacji i ciężkiej pracy.

Rozprawa doktorska opatrzona jest interesującym, choć momentami zbyt syntetycznie napisanym wstępem, w którym autor dokonuje przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat układu GABAergicznego, metabolizmu GABA, budowy receptorów GABAergicznych oraz roli astrocytów w plastyczności synaptycznej. Cel rozprawy doktorskiej naturalnie pojawia się zazwyczaj w końcu opracowania teoretycznego. W rozprawie pana mgr Przemysława Kaczora umieszczony jest przed wstępem. Jest to wynik dość specyficznej konstrukcji rozprawy doktorskiej, w której podstawowym elementem pracy jest opublikowany cykl publikacji. **O ile strona merytoryczna polskiego wstępu napisana jest poprawnie o tyle mam zastrzeżenia do strony redakcyjnej: liczne błędy interpunkcyjne, literówki, braki spacji wskazują, że tej stronie opracowania autor nie poświęcił dostatecznie dużo uwagi. W języku polskim istnieje określenie na LTP oraz LTD, podobnie jak istnieje określenie na termin „neurotransmitter” (neuroprekaźnik). Namawiam autora do unikania w przyszłości „naukowego slangu” w rodzaju: „inhibicja toniczna”, zamiast hamowanie toniczne (str 18) czy „bazalna transmisja GABAergiczna” (zamiast podstawowe przekąźnictwo GABAergiczne, str. 8). W opracowaniu polskim brakuje na początku informacji dotyczącej stosowanych skrótów.**

W badaniach zaproponowano dwa modele hodowli komórkowych. W modelu pierwszym (NC) w hodowli neuronów hipokampalnych znacznie obniżono liczbę astrocytów, natomiast w modelu drugim (ANCC) poziom astrocytów był znacznie podwyższony. **W tym miejscu chciałbym spytać autora dlaczego w badaniach nie wprowadzono trzeciej, kontrolnej grupy doświadczalnej, w której zachowano by naturalny poziom astrocytów.**

Bardzo ciekawe i cenne są opublikowane wyniki dotyczące wpływu metabolizmu astrocytów na przekąźnictwo GABAergiczne. Wpływ ten polega głównie na podwyższeniu częstotliwości miniaturowych, hamujących potencjałów postsynaptycznych (mIPSP) co sugeruje zwiększenie liczby synaps GABAergicznych. Należy odnotować, że zastosowanie gliotoksyny w przypadku ANCC powoduje znaczne obniżenie częstotliwości mIPSC. Z innych ciekawych wyników uzyskanych przez doktoranta jest obserwacja dotycząca syntetazy glutaminy. Otóż okazało się, że zablokowanie tego enzymu sulfotlenkiem L-metioniny (MSO) wywołało obniżenie częstotliwości mIPSP.

W kolejnym cyklu badań podanie w grupie ANCC glutaminy do roztworu Ringera, po uprzedniej inkubacji w MSO, nie spowodowało powrotu częstotliwości mIPSP do wartości wyjściowych. Jak słusznie sugeruje autor, wynik ten wskazuje, że transport glutaminy pomiędzy astrocytami i neuronami hipokampa zależny jest od transportu glutaminy.

W osobnych badaniach, przeprowadzonych w innej serii doświadczalnej, autor zaadresował rolę tzw. czółenka mleczanowego w interakcji astrocyt-neuron. Jego wpływ na przekąźnictwo GABAergiczne oraz plastyczność synaptyczną badany był poprzez hamowanie fosforylasy glikogenu i transporterów monokarboksyłanowych (MCT). LTP w synapsach hamujących (iLTP) indukowany był chemicznie nieco zmodyfikowaną metodą Petriniego i wsp., (2014). W przypadku zastosowania inhibitora MCT, kwasu 4-hydroksy-cynamonowego (4CIN), amplituda rejestrowanych mIPSC obniżała się. Podobny wynik uzyskano po podaniu inhibitora fosforylasy (BAY U 6751). Rola astrocytów w regulowaniu plastyczności GABAergicznej polegała głównie na wzmocnieniu efektów, które były wynikiem wywoływania iLTP: podwyższenia amplitudy mIPSC oraz zwiększenia powierzchni punktów gefirynowych. Zahamowanie wzrostu punktów gefirynowych w grupie ANCC, gdy proces wywołania iLTP poprzedzony był podaniem BAY U6751 oraz 4CIN wskazuje,

jak słusznie uważa autor, że związki monokarboksyłanowe w procesie plastyczności GABAergicznego mogą być wykorzystywane jako cząsteczki sygnałowe.

Przedstawione powyżej wyniki uzyskane w toku przeprowadzonych badań wskazują na znaczący udział astrocytów w powstawaniu podstawowego przekazywania GABAergicznego jak i jego plastyczności

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pana mgr Przemysława Tomasza Kaczora dowodzi, że doktorant jest bardzo dobrze przygotowany pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik fizjologicznych do dalszej, samodzielnej pracy naukowej. Rozprawa doktorska została przygotowana poprawnie, stanowi przemyślaną koncepcyjnie, poprawnie wykonaną i opisaną całość, co składa się na bardzo dobrą pracę naukową. Fakt opublikowania w całości wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej upoważnia recenzenta do dokonania oceny parametrycznej. Cykl prezentowanych prac ma łączny IF ponad 9.2 a punktacja MNiSW wynosi 70. Parametry te nie wymagają dalszego komentarza. Wyniki uzyskane przez doktoranta w sposób znaczący przyczyniają się do poznania roli skomplikowanych mechanizmów synaptycznych w układzie GABAergicznym.

Uważam, że recenzowana rozprawa odpowiada wszystkim wymagom stawianym rozprawom doktorskim w art. 13 Ustawy z dnia 14. 03. 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Przemysława Tomasza Kaczora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jan Konopacki

