

Recenzent: Prof. dr hab. Jan Konopacki

Miejsce wykonania recenzji: Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego,
Łódź 90-236, Pomorska 141/143

Recenzja sporządzona dnia: 10. 05. 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr Dominika Kanigowskiego pt.:

„Zmiany plastyczne wybranych klas korowych interneuronów hamujących zachodzące pod wpływem uczenia”

wykonanej w Pracowni Neurobiologii i Pracowni Elektrofizjologii Instytutu Biologii

Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem

dr hab. Joanny Urban-Ciećko, prof. Instytutu M. Nenckiego PAN

1. Uwagi ogólne

Kwas gamma-amino-masłowy (GABA) jest klasycznym i jedynym neuroprzekaznikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym. W warstwach kory mózgowej komórki GABAergiczne regulują przepływ impulsów nerwowych w lokalnych sieciach neuronalnych. Wpływają w ten sposób m. in. na pobudliwość komórek glutaminergicznych, co ułatwia filtrowanie sygnału na wejściu do lokalnej sieci neuronów oraz kontrolę informacji na wyjściu z tej sieci. Ze względu na występowanie odmiennych znaczników molekularnych, neurony GABAergiczne dzielimy na trzy klasy komórek: interneurony somatostatynowe (Int-SOM), parwalbuminowe (Int-PV) i posiadające jonotropowy receptor serotoninowy 5HT3a. Ostatnia klasa dzieli się dodatkowo na dwie podklasy: interneurony zawierające wazoaktywny polipeptyd jelitowy (Int-VIP) i komórki, które nie zawierają tego białka.

2. Charakterystyka rozprawy

Wcześniejsze badania przeprowadzone *in vivo* wykazały, że interneurony GABAergiczne odgrywają istotną rolę w procesach kognitywnych, jak również mechanizmach leżących u podstaw uczenia się i zapamiętywania. Jednak zmiany plastyczne w obrębie klas interneuronów wywołane uczeniem się nie są praktycznie znane. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska adresuje właśnie powyższy problem. Konkretniej, przeprowadzone przez mgr Dominika Kanigowskiego badania miały sprawdzić czy proces uczenia myszy prowadzi do plastycznych zmian aktywności elektrofizjologicznej trzech typów komórek GABAergicznych w IV warstwie pierwszorzędowej kory somatosensorycznej (barkowej): Int-SOM, Int-PV i Int-VIP.

Badania przeprowadzono metodą hybrydową w dwóch fazach. Pierwszą fazę badań stanowiły klasyczne eksperymenty *in vivo*. Jedną grupę eksperymentalną stanowiły zwierzęta poddane procedurze warunkowania, składającego się z jednoczesnego podawania bodźca warunkowanego, stymulacji dotykowej rzędu wibrys i bezwarunkowego szoku elektrycznego w ogon. Drugą grupę stanowiły myszy, które poddane zostały procedurze pseudowarunkowania, w której bodziec elektryczny nie był skojarzony w czasie ze stymulacją wibrys, lecz dostarczany losowo. Trzecią grupę stanowiły zwierzęta, które nie zostały poddane żadnej formie procedury doświadczalnej (tzw. grupa zwierząt naiwnych). Druga faza badań to klasyczne eksperymenty *in vitro* polegające na sekcjonowaniu i utrzymywaniu w warunkach pozaustrojowych skrawków mózgowych kory baryłkowej. W tej fazie badań, 24 h po ostatniej sesji procedur warunkowania, wykonywano rejestracje elektrofizjologiczne z pojedynczych neuronów techniką whole-cell patch-clamp. Rejestracje przeprowadzono w skrawkach mózgowych w IV warstwy reprezentacji czuciowych (baryłkach), odpowiadających stymulowanym rzędom wibrys.

Muszę przyznać, że jestem pełen uznania dla doktoranta. Praca w zespole naukowym wykorzystującym liczne i bardzo trudne techniki laboratoryjne wymagała od mgr Dominika Kanigowskiego znakomitego teoretycznego przygotowania i opanowania dużej liczby metod laboratoryjnych w ograniczonym czasie reżymu szkoły doktorskiej. W badaniach poza procedurami warunkowania zastosowano wiele technik elektrofizjologicznych i neuroobrazowania.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma standardową strukturę. Składa się z rozdziałów zasadniczych (wstęp, materiał i metody, dyskusja i wnioski) i wielu podrozdziałów bardzo ułatwiających czytanie i zrozumienie rozprawy. Autor umieścił również bardzo dobrze zredagowane streszczenia - w języku polskim i angielskim. W pracy znajdziemy wszelkie niezbędne informacje potrzebne dla zrozumienia logiki eksperymentów i uzyskanych wyników, w tym spis stosowanych skrótów, listę tabel, wykresów i znakomitych jakościowo wielu kolorowych rycin. Całość jest bardzo starannie wykonana pod względem edytorskim i dobrze zredagowana.

Wstęp, dość obszerny ale nie przegadany, jest ciekawie skonstruowany. Dwie trzecie wstępu poświęca autor omówieniu różnicowania morfologicznego oraz fizjologicznego interneuronów GABAergicznych. Pozostała część wstępu poświęcona jest modelowi doświadczalnemu - reprezentacji czuciowej wibrys w korze baryłkowej oraz plastyczności układu GABAergicznego wywołanego uczeniem.

W wyniku przeprowadzonych badań autor wykazał, że w porównaniu ze zwierzętami pseudowarunkowanymi i naiwnymi w grupie zwierząt warunkowanych obserwowano wzrost pobudliwości własnej (wewnętrznej) Int-SOM. Analiza własności elektrofizjologicznych Int-VIP u myszy kontrolnych (naiwnych) pokazała znaczne różnicowanie tej klasy interneuronów pod względem wzorów wyładowań. Stwierdzono, że pobudliwość Int-VIP, które charakteryzowały się akomodacją wyładowań, zmniejszyła się jedynie u myszy pseudowarunkowanych. Analizy kształtu potencjałów czynnościowych wykazały, że zwiększenie pobudliwości interneuronów wiąże się ze skróceniem czasu trwania poszczególnych potencjałów czynnościowych. Co ciekawe, zmniejszenie pobudliwości oznaczało wydłużenie czasu trwania potencjałów. Jak

słusznie sugeruje mgr Dominik Kanigowski, zaobserwowane zmiany pobudliwości interneuronów mogą wiązać się ze zmianami przewodnictwa jonowego odpowiedzialnego za czas trwania potencjału czynnościowego.

Zastosowane w badaniach metody optogenetyczne pozwoliły dodatkowo wykazać, że proces warunkowania powoduje zwiększenie hamowania sąsiadujących neuronów pobudzających przez Int-SOM i Int-PV.

Bardzo mocną stroną rozprawy doktorskiej jest dyskusja. Doktorant omawia w tym rozdziale wszystkie uzyskane wyniki. Zebrane dane eksperymentalne pokazują, że uczenie asocjacyjne, i nieasocjacyjne wywołują zmiany aktywności wszystkich badanych interneuronów GABAergicznym. Wyjątkowo ciekawie napisany jest rozdział dyskusji poświęcony podstawom plastyczności pobudliwości własnej i plastyczności synaptycznej. Jak słusznie zauważa mgr Dominik Kanigowski, zmiany pobudliwości własnej można postrzegać jako powszechny mechanizm plastyczności interneuronów GABAergicznym zachodzący w następstwie warunkowania lub pseudowarunkowania. Zaobserwowane modyfikacje pobudliwości własnej mogą wpływać na sumowanie synaptyczne, przetwarzanie informacji sensorycznej, kontrolę precyzji wyładowań komórek pobudzających i regulację sygnałów przekazywanych do wyższych warstw kory baryłkowej.

3. Uwagi i pytania

1. Ryciny 4A i 4.14A obrazują parametry potencjału spoczynkowego testowanych neuronów w trzech badanych grupach doświadczalnych. Wartości potencjału spoczynkowego mieszczą się w zakresie od -60mV do ok. -40mV. W warunkach eksperymentalnych przyjmuje się, że zdrowy neuron powinien mieć potencjał spoczynkowy nie mniejszy niż -55 mV. Trudno potencjał -40 mV określić jako potencjał spoczynkowy. Neurony te są za bardzo zdepolaryzowane (?). Prosiłbym o komentarz doktoranta w tej sprawie.
2. Ryc. 4.6 obrazuje parametry potencjału progowego neuronów w trzech badanych grupach doświadczalnych. Zastanawia mnie rozrzut wartości potencjału progowego w komórkach badanych grup. Czy są one wynikiem odmiennych warunków eksperymentalnych, które wpływają na pobudliwość neuronów (np. składu płynu ACSF).
3. Na str. 120 w dyskusji definiując pobudliwość neuronu autor stwierdza, że... „*jest to zdolność neuronu do generowania AP w odpowiedzi na dochodzący do komórki impuls pobudzający...*”. Pragnę zwrócić uwagę, że w neurobiologii nie istnieje termin „*impuls pobudzający*”. Chodzi oczywiście o bodziec pobudzający. Termin impuls funkcjonuje jako „impuls nerwowy” czyli propagujący AP.
4. Bardzo ciekawe i subtelne rozważania autora dyskusji na temat specyficznych przestrzeni neuronu biorących udział w mechanizmie pobudzenia narzucają już w tym pierwszym zdaniu większą precyzję definicji pobudliwości (str. 120). W kontekście późniejszych rozważań autora zdanie to powinno raczej

brzmieć:..."*jest to zdolność neuronu do generowania AP we wzgórku aksonu w odpowiedzi na dochodzący do komórki bodziec pobudzający:...*". Innymi słowy nie cały neuron generuje AP a tylko jego strefa spustowa (ang. trigger zone) jako miejsce największego zagęszczenia napięciowych kanałów NA+.

4. Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dowodzi, że mgr Dominik Kanigowski jest doskonale przygotowany pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik laboratoryjnych do dalszej samodzielnej pracy naukowej. Duża erudycja autora sprawiła, że praca została napisana w sposób bardzo starannie przemyślany i dobrym językiem. Recenzowana rozprawa doktorska stanowi przemyślane koncepcyjnie, dobrze wykonane i opisane rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Całość składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autor wykazał się doskonałą znajomością literatury jednak cytowanie w pracy ponad 540 pozycji literatury uważam za przesadę.

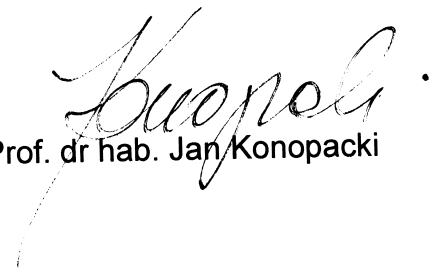
Należy odnotować, że cykl badań przedstawiony w rozprawie doktorskiej został sfinansowany w ramach środków Narodowego Centrum Nauki, Sonata Bis. Wyniki uzyskane przez mgr Dominika Kanigowskiego pokazują, że zarówno uczenie asocjacyjne, jak i pseudowarunkowanie prowadzą do plastycznych zmian aktywności wszystkich klas badanych interneuronów GABAergicznym. W ten sposób zmiany pobudliwości własnej można postrzegać jako powszechny mechanizm plastyczności interneuronów GABAergicznym zachodzący w skutek różnych form uczenia.

5. Wniosek końcowy

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478, 619, 1630). Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o dopuszczenie mgr Dominika Kanigowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoki poziom naukowy przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz fakt, że część przedstawionych wyników została wcześniej opublikowana lub jest w trakcie publikacji w bardzo dobrych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym upoważnia mnie do wystąpienia dodatkowo z wnioskiem o stosowne jej wyróżnienie.

Łódź, dnia 10. 05. 2023 r.


Prof. dr hab. Jan Konopacki



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii
Prof. dr hab. Jerzy Mozzymas – Kierownik jednostki

01.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominika Kanigowskiego pt. „Zmiany plastyczne wybranych klas korowych interneuronów hamujących zachodzące pod wpływem uczenia”.

Zjawiska kognitywne od dekad badane są już nie tylko przez psychologów ale również przez biologów. W mechanizmach uczenia się i pamięci ogromną rolę pełnią różnorakie zjawiska neuroplastyczności. W przeciągu ostatniego półwiecza najlepiej poznano mechanizmy plastyczności synaptycznej w synapsach pobudzających. Postęp w tych badaniach przez długi czas dokonywał się przy milczącym założeniu, że to właśnie plastyczność synaps pobudzających jest podstawowym substratem procesów kognitywnych zaś transmisja hamująca (w mózgu głównie GABAergiczna) nie jest plastyczna lub jej zmiany plastyczne są nieznaczące w kontekście procesów pamięciowych. W ostatnich dwóch dekadach pogląd ten ulegał stopniowej zmianie. Dziś wiemy, że transmisja GABAergiczna też jest plastyczna tylko mechanizmy tej plastyczności są inne i trudniejsze do zbadania niż w przypadku glutaminianergicznej ze względu na duże zróżnicowanie neuronów GABAergicznych. Co więcej, w mózgu zjawiska plastyczne nie dotyczą tylko synaps – zmianom ulegać może również struktura neuronu jak i mechanizmy endogennej pobudliwości. Dzisiaj wiemy, że w przypadku tzw. plastyczności homeostatycznej, przeskalowaniu pobudliwości komórki towarzyszą zmiany nie tylko synaps, ale też przewodnictwa jonowe napięciowo-zależne i przez to mechanizmy generacji potencjałów czynnościowych. Ten ostatni aspekt był jednak zdecydowanie mniej badany niż plastyczność synaptyczna. Dysponujemy mimo to dość szeroką wiedzą na temat plastyczności endogennej pobudliwości w komórkach pobudzających natomiast ten rodzaj plastyczności w neuronach hamujących w mózgu (GABAergicznych) jest poznany w stopniu znikomym. W tym świetle należy uznać, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej mgr Dominika Kanigowskiego, odnoszący się w dużym stopniu właśnie plastyczności endogennej pobudliwości w wybranych interneuronach GABAergicznych jest

bardzo ciekawy i nowatorski. Doktorant postawił sobie za cel zbadanie jak uczenie się w paradygmacie warunkowania klasycznego (dotyk wibrys i szok elektryczne w ogon myszy) wpływa na zmiany plastyczne w układzie GABAergicznym w neuronach IV warstwy kory baryłkowej. Zjawiska plastyczne zbadano w trzech typach interneuronów ekspresjonujących somatostatynę, parwalbuminę i wazoaktywny polipeptyd jelitowy: Int-SOM, Int-PV i Int-VIP) pod kątem endogennej pobudliwości, ale również zbadano spontaniczne prądy pobudzające sEPSC (w interneuronach) oraz optogenetycznie wywoływane prądy hamujące eIPSC na komórkach pobudzających w IV warstwie.

Rozprawę otwiera obszerny wstęp, który generalnie jest napisany dobrze i zawiera niezbędne informacje by zorientować czytelnika w aktualnym stanie wiedzy dotyczącej podjętego tematu. Na początku Autor omawia system GABAergiczny w mózgu ssaczym, skupiając się głównie na opisie typów komórek GABAergicznym i ich roli w ośrodkowym układzie nerwowym. Co zrozumiałe, zważywszy na cel pracy, bardzo szczegółowo omówione są typy interneuronów GABAergicznym i podstawowe zjawiska zachodzące z ich udziałem. Dużo uwagi poświęcono morfologii licznych interneuronów lecz opis ten byłby czytelniejszy gdyby charakteryzowaniu budowy i schematu połączeń danego interneuronu towarzyszyły grafiki ilustrujące te informacje. Bardzo ważnym aspektem tej części wstępu jest zwrócenie uwagi, że za każdą grupą w szeroko stosowanym podziale na interneurony Int-SOM, Int-PV i Int-VIP stoi nie jeden typ lecz wiele podtypów interneuronów często o różnych właściwościach. Trochę szkoda, że do tych informacji Autor nawiązał tylko w niewielkim stopniu prezentując i dyskutując wyniki dotyczące Int-SOM, Int-PV i Int-VIP. Do podrozdziału 1.1. mam tylko niewielkie zastrzeżenia: (str. 14) Receptory GABAA nie przewodzą tylko anionów chlorkowych lecz są anionoselektywne i przewodzą również aniony węglanowe); (str. 16) Raczej po polsku mówi się o ośrodkowym układzie nerwowym a nie o centralnym ...; (str. 25) zdanie „Co ciekawe, neurony kandelabrowe mogą wykazywać działanie depolaryzujące na postsynaptyczne neurony piramidowe, w przypadku gdy potencjał błonowy komórek piramidowych jest równy potencjałowi spoczynkowemu” jest dla mnie niezrozumiałe. Potencjał spoczynkowy to jest potencjał błonowy. Zgaduję, że mogło chodzić o relację pomiędzy potencjałem odwrócenia dla prądów GABAergicznym a potencjałem spoczynkowym w segmencie początkowym aksonu. Kolejny rozdział dotyczy kory baryłkowej i w mojej ocenie jest on napisany bardzo dobrze, zawierając bardzo szerokie kompendium wiedzy o tej strukturze mózgowej i jej roli w fizjologii gryzoni. Kolejny podrozdział wstępu dotyczy zjawisk plastyczności neuronalnej, w którym Autor opisuje przykłady zjawisk plastycznych u różnych zwierząt sporo uwagi poświęcając zjawiskom plastycznym w

kontekście uczenia się. Dużo uwagi Doktorant poświęcił też różnym mechanizmom molekularnym omawianych przez siebie zmian plastycznych. Generalnie rozdział jest napisany dobrze i zawiera niezbędne informacje by w kolejnych częściach rozprawy móc szczegółowo opisać otrzymane wyniki dotyczące zjawisk plastycznych. Ostatnie dwa podrozdziały wstępu dotyczą aktualnego stanu wiedzy odnośnie udziału korowych interneuronów GABAergicznym w plastyczności wywołanej uczeniem oraz plastyczności układu GABAergicznego wywołanej warunkowaniem klasycznym. Bardzo wysoko oceniam te rozdziały. Rozdział dotyczący udziału interneuronów GABAergicznym w plastyczności związanej z uczeniem to obszerny i bardzo bogaty w treść opis, który rekomendowałbym każdemu, kto zajmuje się tematyką roli interneuronów w uczeniu się i pamięci. Również podrozdział o warunkowaniu klasycznym oceniam wysoko – jest on ciekawie i dobrze napisany i stanowi doskonały wstęp do opisu wyników otrzymanych właśnie przy zastosowaniu tego paradygmatu.

Model eksperymentalny i procedury doświadczalne zostały opisane w rozdziale 3 pt. „Materiały i Metody”. Zostały tu zawarte wszystkie niezbędne informacje w sposób wyczerpujący i zrozumiały. Badania nad wspomnianym modelem warunkowania klasycznego w Instytucie im. M.Nenckiego mają długą tradycję i można być pewnym, że zarówno zastosowanie modelu jak i późniejsze doświadczenia były wykonywane bardzo dobrze. Warto podkreślić, że pomiary elektrofizjologiczne oraz analiza zarejestrowanych przebiegów były wykonane na najwyższym poziomie. Model eksperymentalny jest godny uznania: nie tylko zastosowano zwierzęta transgeniczne by rozróżnić typy interneuronów, ale zastosowano również nieocenioną przy tego typu badaniach optogenetykę. Niech mi będzie wolno powiedzieć, że bardzo dobrze świadczy o wykonawcach tego projektu fakt opisanie zaobserwowanej niespecyficznej ekspresji rekombinazy Cre u myszy PV-Cre x Ai14 oraz PV-Cre x Ai32, czego, jak przypuszczam, niejeden inny autor by niechętnie ujawniał. Po lekturze tego rozdziału pozostałem jednak z jedną wątpliwością: jaki typ komórek pobudzających wybierano do rejestracji eIPSC wywołanych optogenetycznie ?

Najobszerniejszym rozdziałem rozprawy są „Wyniki” (rozdz. 4). Przedstawiono tu dla trzech grup zwierząt (naiwne, pseudowarunkowane i CS+UCS) wyniki pomiarów dotyczących pobudliwości (current clamp) oraz sEPSC (na interneuronach) oraz eIPSC na neuronach pobudzających (voltage clamp). Na tej podstawie wyciągano wnioski odnośnie wpływu warunkowania na endogenną pobudliwość (pomiar current clamp) oraz na transmisję pobudzającą i hamującą (pomiar voltage-clamp). Ponadto zbadano podstawowe parametry elektrofizjologiczne dla badanych typów neuronów oraz aktywność spontaniczną. W związku

z zaobserwowaną heterogennością wzorów wyładowań sporządzono statystykę typów tych wzorców i skupiono się na grupach najczęściej występujących.

Pierwszą zaprezentowaną grupą były INT-SOM-LTS. Nie stwierdzono dla niej zmian w podstawowych parametrach elektrofizjologicznych pomiędzy grupami naiwne, CS+UCS i Pseudo. W przypadku wzorów wyładowań stwierdzono, że dla silnych bodźców prądowych w grupie CS+UCS częstotliwości potencjałów czynnościowych (AP) osiągają wyższe wartości niż w pozostałych grupach (ryc. 4.4). Na tej podstawie Autor wnioskuje, że pobudliwość własna Int-SOM jest większa u myszy warunkowanych w porównaniu z myszami kontrolnymi (naiwnymi) i pseudowarunkowanymi. Nie jest to wniosek bardzo precyzyjny, gdyż przy niższych wartościach prądów stymulacji (0 do ok. 130 pA) zależność częstotliwości AP dla CS+UCS jest przesunięta w prawo względem przede wszystkim grupy naiwnej, wskazując, że w tym zakresie stymulacji zachodzi zmniejszenie częstotliwości AP. Ponadto, jak widzimy na ryc. 4.6 amplituda AP dla CS+UCS się zmniejsza względem grupy Naiwnej.

Dla tej grupy interneuronów zaobserwowano bardzo interesujący efekt. Otóż warunkowanie w przypadku INT-SOM-LTS skutkowało bardzo wyraźną zmianą kinetyki sEPSC mierzonych na tych interneuronach (ryc. 4.10) przy czym istotnemu skróceniu uległ zarówno czas narastania i zaniku sEPSC. To bardzo ciekawy wynik mogący nieść ważne konsekwencje w funkcjonowaniu sieci neuronalnych. Muszę podkreślić, że szkoda, że Autorzy nie zdecydowali się na zbadanie mechanizmu tego efektu (np. czy za tą obserwacją stoi zamiana podjednostek receptora AMPA w tych komórkach – Autor tylko krótko wspomina o takich badaniach w dyskusji jako o potencjalnie ważnych). Podobny problem napotykam w odniesieniu do zaobserwowanych zmian w pobudliwości tych interneuronów. Zmiana pobudliwości wiąże się najczęściej ze zmianą ekspresji kanałów napięciowo zależnych. Szkoda, że nie zbadano tej możliwości. W dyskusji Autor, na podstawie informacji literaturowych wysuwa jedną z hipotez, że za częścią obserwowanych zmian w pobudliwości mogła odpowiadać zmieniona ekspresja kanałów potasowych zależnych od napięcia typu A. Zweryfikowanie tej hipotezy byłoby relatywnie łatwe, szczególnie biorąc pod uwagę doskonałe opanowanie warsztatu badawczego przez Doktoranta. Szkoda więc, że tych badań nie przeprowadzono choćby pilotażowo.

Analogiczny schemat badań zastosowano dla pozostałych interneuronów (INT-PV i INT-VIP) lecz w przypadku tych neuronów zaobserwowano mniejszy wpływ warunkowania na pobudliwość i prądy synaptyczne w grupie CS+UCS. Co ciekawe, dla INT-PV największe zmiany w pobudliwości zaobserwowano dla grupy PSEUDO (ryc. 4.16). Również w przypadku INT-PV największa zmiana we właściwościach sEPSC dotyczyła grupy PSEUDO i

manifestowała się wydłużeniem zaniku tego prądu, co Autor wiąże z bliżej nie sprecyzowanym efektem „pogorszenia precyzji” transmisji synaptycznej. Jak już wspomniałem, efekty zmian kinetyki sEPSC są w mojej ocenie bardzo powierzchownie przedyskutowane nie mówiąc o przeprowadzeniu dalszych badań nad mechanizmami tych obserwacji. Na str. 97 i 98 znajduje się zdanie, którego nie do końca rozumiem: „Pomimo znaczącego spadku pobudliwości własnej Int-PV po pseudowarunkowaniu nie zanotowano zmian w hamowaniu komórek glutaminianergicznych pochodzących od Int-PV tej grupy myszy” - w szczególności co to są komórki glutaminianergiczne pochodzące od INT-PV ?.

Również w przypadku grupy INT-VIP zaobserwowano pewne zmiany w pobudliwości pod wpływem zastosowania procedur warunkowania, przy czym podobnie jak w INT-PV najbardziej zmieniona była grupa PSEUDO. Nie zaobserwowano natomiast zmian w kinetyce sEPSC a eIPSC były tak małe, że trudno było ocenić wpływ treningu na te prądy. Nie zaobserwowano w tej grupie istotnych zmian w pobudliwości endogennej pod wpływem treningu.

Reasumując w bardzo obszernym rozdziale „wyniki” Autor zaprezentował ogromny materiał badawczy, który wskazuje na zmiany zachodzące pod wpływem warunkowania w zarówno endogennej pobudliwości jak i we właściwościach kinetycznych sEPSC i eIPSC i efekty te wykazują różnice dla różnych typów interneuronów. Wyniki te są interesujące, otwierają niewątpliwie nowe perspektywy badań jednakże uważam, że zabrakło tutaj trochę dążenia do dogłębności podjętych badań. W mojej ocenie lepiej by było gdyby Doktorant skupił się np. na jednej grupie interneuronów np. INT-SOM, ale wykonał dalsze badania mające na celu stwierdzenie mechanizmu molekularnego obserwowanych zmian w pobudliwości endogennej i kinetyce sEPSC i eIPSC weryfikując hipotezę np. wspomnianej już zmiany ekspresji kanałów napięciowo-zależnych lub zmiany stechiometrii receptorów AMPA.

Ostatnim rozdziałem dysertacji jest Dyskusja (rozdz. 5). W mojej ocenie jest to najsłabiej napisany rozdział w tej rozprawie. Doktorant powinien wiedzieć, że najważniejszym i pierwszoplanowym celem Dyskusji jest komentarz dotyczący OTRZYMANYCH w pracy wyników na tle piśmiennictwa z tej tematyki. Tak rozumianej dyskusji jest jednak w tym rozdziale niewiele natomiast jest mnóstwo komentarzy, które dyskusją w ogóle nie są lub wątków luźno związanych z własnymi badaniami i które równie dobrze mogły się znaleźć we wprowadzeniu, gdzie charakteryzowano aktualny stan dokonań w podjętej tematyce. Przykładowo, Dyskusja zaczyna się od 3 akapitów tekstu, który jest powtórzeniem informacji, która została obszernie wyjaśniona w „Metodach” i „Wynikach”. Również cały kilkustronicowy podrozdział 5.1 jest bardzo luźno związany z otrzymanymi wynikami i duża

część tego tekstu raczej powinna znaleźć się we wstępie, uczulając czytelnika jaką ważną i zależną od wielu czynników jest regulacja endogennej pobudliwości. Podobnie pierwszy akapit rozdziału 5.2 trudno określić jako dyskusję sensu stricto. Kolejny akapit – również wiele interesujących informacji o tym jakie zjawiska i choroby mogą wpływać na pobudliwość, ale ciągle brak bezpośredniego nawiązania do własnych wyników. Na kolejnych stronach zaczynają się pojawiać nawiązania do otrzymanych wyników. Zwracam jednak uwagę, że np. zdanie „Zmiany w parametrach elektrofizjologicznych APs sugerują molekularne podłoże rejestrowanych zmian pobudliwości własnej.” jest stwierdzeniem dość oczywistym nic nie wnosząc do dyskusji podjętego problemu. Podobnie, zdanie „Zwiększona amplituda świadczy o tym, że komórki te są silniej pobudzane przez lokalne neurony glutaminianergiczne” wydaje się, że stwierdza rzecz dość oczywistą. Niejasne jest co Autor ma na myśli pod pojęciem „dokładność pobudzenia” – stwierdzenie to, jak wspominałem, pojawia się jako komentarz do obserwacji, że warunkowanie wpływa na kinetykę sEPSC. Mam problem też ze zdaniem: „Wzrost amplitudy i szybsza kinetyka sEPSCs mogą wynikać ze zmian w przewodnictwie receptorów AMPA i/lub NMDA oraz ich składzie podjednostkowym.” Mierzone w tej rozprawie prądy sEPSC charakteryzują się czasem zaniku rzędu kilku milisekund (dla INT-SOM najdłuższe do 8 ms). Ponadto prądy te były mierzone w obecności milimolarnego stężenia jonów magnezu przy napięciu błonowym -70 mV. Czy w tych warunkach można się spodziewać istotnej komponenty prądów przepływających przez receptory NMDA ? Czy ta komponenta może być aż tak szybka ?

Bardzo ciekawą częścią dyskusji jest podrozdział dotyczący pseudowarunkowania (część 5.3), który jest szczególnie ważny jako, że część wyników wskazała na największe zmiany nie pod wpływem CS+UCS ale właśnie w grupie pseudowarunkowania. Interesujące są tu sugestie, że zmiany wywołane pseudowarunkowaniem mogą odzwierciedlać zmiany plastyczne związane z uczeniem nieasocjacyjnym. Niestety również ten rozdział zawiera mnóstwo informacji, które raczej powinny się znaleźć we wstępie.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska jest wartościowym osiągnięciem naukowym, opartym o bardzo obszerny materiał badawczy, otrzymany z zastosowaniem zaawansowanej metodologii badawczej. Autor niewątpliwie dysponuje szeroką wiedzą z podjętej tematyki, czemu dał wyraz w obszernym wstępie do rozprawy. Wydaje mi się jednak, że wybranie nieco innej strategii, ograniczając liczbę typów badanych interneuronów np. do jednego można było tym samym nakładem pracy uzyskać wyniki bardziej dogłębnie wyjaśniające mechanizmy obserwowanych procesów plastyczności. Prawdopodobnie wyniki takie dałyby szansę na ich opublikowanie w bardziej prestiżowych periodykach. Jak już stwierdziłem wyżej dyskusja

zawiera szereg mankamentów, ale wiąże to nie z niedostatkami erudycji naukowej ale raczej z brakiem doświadczenia, które Doktorant na pewno w przyszłości nabędzie.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Dominika Kanigowskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. z 2021 r. poz.478, 619, 1630) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego o dopuszczenie mgr Dominika Kanigowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Z wyrażeniem szacunku
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII
kierownik

prof. dr hab. Jerzy Mozrzyński
Prof. Jerzy Mozrzyński

Kraków, 12 czerwca, 2023



Prof. dr hab. Elżbieta Pyza
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Dominika Kanigowskiego
pt. „Zmiany plastyczne wybranych klas korowych interneuronów
hamujących zachodzące pod wpływem uczenia”**

Plastyczność neuronalna, w tym plastyczność synaptyczna, jest kluczowym procesem zachodzącym w mózgu pod wpływem bodźców zewnętrznych i wewnętrznych, o fundamentalnym znaczeniu w rozwoju mózgu, uczeniu się, zapamiętywaniu i regeneracji mózgu po urazach. Plastyczność neuronalna badana jest różnymi metodami z wykorzystaniem obrazowania na poziomie mikroskopii świetlnej i elektronowej, a także technik elektrofizjologicznych. Doktorant Dominik Kanigowski podjął się scharakteryzowania pod względem parametrów elektrofizjologicznych trzech typów interneuronów GABA-ergicznych; somatostatynowych (Int-SOM), parwalbuminowych (Int-PV) i zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy (Int-VIP) w IV warstwie kory somatosensorycznej myszy po warunkowaniu (CS+UCS), pseudowarunkowaniu (Pseudo) i u myszy naiwnych (Naiwne). Badania układu GABA-ergicznego w plastyczności są kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych przez prof. dr hab. Małgorzatę Kossut i współpracowników. Jest to bardzo interesujące zagadnienie wskazujące, jak ważne są neurony hamujące w plastyczności neuronalnej kory mózgowej. Podobnie jak we wcześniejszych pracach, hamujące interneurony korowe zbadano w IV warstwie kory

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

somatosensorycznej myszy, w tzw. korze baryłkowej, która jest dogodnym i często wykorzystywanym modelem w badaniach plastyczności.

Celem rozprawy doktorskiej mgr. Dominika Kanigowskiego było zarejestrowanie zmian parametrów elektrofizjologicznych pojedynczych interneuronów z trzech typów interneuronów GABA-ergicznych kory baryłkowej metodą whole-cell patch-clamp pod wpływem uczenia się.

Pan mgr Dominik Kanigowski wykazał, że uczenie się u myszy (warunkowanie i pseudowarunkowanie) wywołuje zmiany plastyczne pobudliwości własnej interneuronów GABA-ergicznych, synaps pobudzających te interneurony i hamowania neuronów pobudzających przez interneurony GABA-ergiczne. Zmiany te są specyficzne dla danego typu neuronów GABA-ergicznych IV warstwy kory somatosensorycznej.

Rozprawa jest dobrze napisana, w sposób jasny i zrozumiały oraz dobrze zilustrowana 67 starannymi rycinami. Praca liczy 202 strony, ma typowy układ dla rozpraw doktorskich i zawiera kolejno: spis treści, streszczenie, abstract, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję. Na końcu pracy znalazło się podsumowanie, bibliografia licząca aż 542 pozycje oraz spis publikacji Autora.

Wstęp (33 stron) jest dobrym, pod względem merytorycznym, wprowadzeniem do pracy, zawiera istotne informacje dotyczące układu interneuronów GABA-ergicznych w korze mózgowej, ich charakterystyki oraz chorób będących wynikiem zaburzeń działania tych neuronów. Doktorant szczegółowo opisał trzy typy interneuronów: Int-SOM, Int-PV i Int-VIP. Opisana została też kora baryłkowa z reprezentacjami korowymi wibrys na pyszczku myszy oraz droga informacji sensorycznych z wibrys do kory oraz sieć neuronów w korze baryłkowej. W kolejnych rozdziałach Doktorant opisał zjawisko plastyczności neuronalnej oraz udział neuronów GABA-ergicznych kory w plastyczności wywołanej uczeniem się, zwłaszcza uczeniem się asocjacyjnym (warunkowanie klasyczne). We wstępie brakuje informacji o plastyczności dobowej, która zachodzi pod wpływem dobowych zmian w środowisku zewnętrznym, zwłaszcza zmian oświetlenia oraz pod wpływem sygnałów z zegara okołodobowego zlokalizowanego w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza. Poza tym, wstęp świadczy o dobrym

Wydział Biologii

I Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

I Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

I Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

teoretycznym przygotowaniu Doktoranta i znajomości literatury naukowej dotyczącej przedmiotu rozprawy.

W rozdziale Materiały i metody (20 stron) Doktorant opisał szczegółowo zwierzęta doświadczalne użyte do badań – myszy transgeniczne z systemem Cre-LoxP, w celu znakowania fluorescencyjnego wybranych interneuronów w korze baryłkowej oraz myszy z ekspresją ChR2 w celu generowania IPSPs optogenetycznie w neuronach pobudzających, wzbudzając wybraną grupę interneuronów GABA-ergicznymi z ChR2 światłem niebieskim.

Zastosowana w badaniach metoda warunkowania polegała na sparowaniu bodźca bezwarunkowego awersyjnego – szoku elektrycznego w ogon z bodźcem warunkowym, czyli stymulacją (odginanie) wybranego rzędu wibrys (rzęd B wibrys lewej strony pyszczka). Po 3 dniach habituacji, myszy poddawano przez 3 kolejne dni warunkowaniu, łącznie przeprowadzono 120 sesji sparowania CS z UCS. U myszy pseudowarunkowanych stymulowany był ten sam rząd wibrys, w podobny sposób jak u myszy warunkowanych, ale szok elektryczny w ogon dostarczany był losowo. Grupa myszy naiwnych nie była poddawana żadnej stymulacji. Po ok. 24 godz. przeprowadzano anestezję zwierząt, a następnie pobierano prawą półkulę, przygotowywano skrawki kory baryłkowej, które utrzymywane były w specjalnej komorze wypełnionej roztworem ACSF, mACSF lub D-glukonianu potasu w celu przeprowadzenia rejestracji elektrofizjologicznej whole-cell patch-clamp neuronów baryłek rzędu B. U zwierząt naiwnych rejestrowano nie tylko z rzędu B, ale także A, C i D.

Typy neuronów GABA-ergicznymi rozpoznawane były dzięki obecności czerwonego barwnika fluorescencyjnego – td Tomato. Rejestrowano potencjał spoczynkowy, opór dostępowy i opór wejściowy, pobudliwość własną interneuronów, aktywność spoczynkową i sEPSCs (spontaniczne postsynaptyczne prądy pobudzające). Badano również dynamikę pobudliwości komórek w odpowiedzi na puls prądowy o wzrastającym natężeniu. Przeprowadzono analizę kształtów APs (potencjałów czynnościowych) i adaptacji wyładowań. Oprócz interneuronów GABA-ergicznymi rejestrowano również aktywność neuronów pobudzających, eIPSCs (postsynaptyczne prądy hamujące) i analizowano frakcje unerwianych neuronów pobudzających przez Int-VIP. Wszystkie zastosowane metody są prawidłowe, chociaż trudno mi ocenić prawidłowość przeprowadzonych rejestracji, gdyż nie jestem



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

elektrofizjologiem. Analizowane parametry elektrofizjologiczne zilustrowano dobrymi rycinami, na których zaznaczono, jakie parametry były analizowane.

Ponieważ podczas rejestracji stosowano różne płyny zewnątrzkomórkowe i opisano, dlaczego zastosowano taki a nie inny skład płynów (podany w tabelach), to prosiłabym o wyjaśnienie, czy we wcześniejszych (wstępnych) badaniach Autora testowano, w przypadku roztworu wewnątrzkomórkowego (k-glukonian) i mACSF inne stężenia jonów, np. inne stężenie K^+ . Zastosowane metody wymagały od Doktoranta dużych umiejętności w przygotowaniu skrawków mózgu i samych rejestracji elektrofizjologicznych.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Wyniki zostały przedstawione na 72 stronach i zilustrowane 45 rycinami. Wyniki podzielono na trzy główne podrozdziały, a w każdym opisano jeden z trzech typów analizowanych interneuronów GABA-ergicznymi u myszy naiwnych, pseudowarunkowanych i warunkowanych. W grupie Int-SOM zarejestrowano 4 typy pod względem wzoru wyładowań: LTS (low-threshold spiking) (77%), FS (fast-spiking) (13%), AC (accomodating) (6,5%) i IR (irregular spiking) (3,5%). W przypadku Int-SOM-LTS nie zarejestrowano różnic w podstawowych parametrach elektrofizjologicznych oraz aktywności spontanicznej u badanych grup zwierząt, natomiast wykryto, że pobudliwość własna Int-SOM oraz pobudzające połączenia synaptyczne unerwiające te interneurony są większe u myszy warunkowanych w porównaniu z pozostałymi grupami zwierząt. Ponadto stwierdzono różnice w parametrach kształtu APs oraz że, Int-SOM u myszy warunkowanych zwiększają hamowanie neuronów pobudzających w korze baryłkowej.

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

W grupie neuronów Int-PV zidentyfikowano 64% FS-reb (bez rebound spikes), 26% FS+reb. i 10% częściowych FS. W przypadku tych neuronów warunkowanie nie miało wpływu na podstawowe parametry fizjologiczne i aktywność spontaniczną. Pobudliwość własna była podobna w grupie myszy naiwnych i warunkowanych, a obniżyła się w grupie pseudowarunkowanej. Natomiast transfer ładunku hamowania (eIPSCs) z Int-PV był największy w grupie CS+UCS.

W grupie Int-VIP wykryto 51,6% neuronów AC, 27,4% LTS, 17,8% IR i 3,2% FS. W przypadku Int-VIP-AC stwierdzono niewielkie zmiany potencjału spoczynkowego (wzrost w grupie Pseudo a obniżenie w CS+UCS) i pobudliwości własnej w porównaniu z grupą myszy naiwnych.

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
Jagielloński
w Krakowie

W Dyskusji (31 stron) Autor wykazał się dużą znajomością literatury oraz umiejętnością i ostrożnością w interpretacji wyników. Podkreślił znaczenie osiągniętych wyników i starał się też wyjaśnić, dlaczego wiele z zarejestrowanych parametrów elektrofizjologicznych nie różniło się statystycznie istotnie pomiędzy grupą zwierząt warunkowanych, pseudowarunkowanych i naiwnych. Moim zdaniem przyczyną tego może być wybór pory doby, w której przeprowadzano doświadczenia. Moje badania i moich współpracowników wykazały, że najwięcej synaps hamujących w baryłce B2 u myszy naiwnych jest na początku nocy, kiedy zwierzęta są aktywne motorycznie. Wtedy jest też więcej dwusynaptycznych kolców dendrytycznych, z jedną synapsą pobudzającą i drugą hamującą. Te cykliczne zmiany utrzymują się również u zwierząt trzymanych w stałej ciemności, co oznacza, że zmiany w liczbie synaps hamujących oraz morfologia kolców dendrytycznych regulowana jest przez sygnały z zegara okołodobowego zlokalizowanego w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza mózgu.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

O ile liczba synaps pobudzających również zmienia się w ciągu doby i jest ich najwięcej na początku dnia, w fazie snu u myszy, to ich endogenna czasowa regulacja jest słabsza niż w przypadku synaps hamujących. Warunkowanie i pseudowarunkowanie przeprowadzone przez Doktoranta przypadało więc na fazę snu u myszy. Wprawdzie bodziec UCS, jakim jest szok elektryczny, jest na tyle silnym bodźcem awersyjnym, że zmiany w korze baryłkowej i prawdopodobnie we wzgórzu i ciele migdałowatym pojawiają się u zwierząt warunkowanych i pseudowarunkowanych, ale jak wiadomo z innych naszych badań, proces uczenia się jest bardziej skuteczny, gdy przypada na porę najwyższej aktywności zwierzęcia. Rozumiem, że wybrana pora badań, była zgodna z porą wcześniej prowadzonych badań, ale biorąc pod uwagę najwyższą liczbę synaps hamujących na początku nocy, dobrze byłoby przeprowadzić badania uczenia się o tej porze doby, kiedy zwierzęta są najbardziej aktywne.

Pomimo, że rozprawa jest dobrze napisana, to Autor nie ustrzegł się pewnych błędów stylistycznych, nielicznych literowych i ortograficznych, niezgrabnych sformułowań (np. wyniki, jakie otrzymano na mysiej I-rzędowej korze wzrokowej) czy spolszczonych wyrażen z języka angielskiego (w sposób zrandomizowany). Z kolei zamiast „szybkiej i wolnej częstotliwości” powinno

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
Jagielloński
w Krakowie

być: „wyższa i niższa częstotliwość”; zamiast „dziennych rytmów aktywności komórkowej” powinno być: „dobowe/okołodobowe rytmy aktywności neuronów”. Również stwierdzenie, że „uczenie jest immanentną cechą wszystkich wyższych kręgowców” nie jest właściwe, bo uczenie się, w tym warunkowanie, jest procesem, który obserwowany jest u kręgowców i bezkręgowców i nie jest to wyłącznie cecha ssaków.

Podsumowanie

Wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej mgr. Dominika Kanigowskiego, pomimo moich powyższych uwag, są istotnym wkładem w poznanie właściwości i roli neuronów GABA-ergicznych w korze baryłkowej myszy w procesie uczenia się, jakim jest warunkowanie i pseudowarunkowanie przy zastosowaniu awersyjnego bodźca bezwarunkowego.

W mojej opinii rozprawa doktorska mgr. Dominika Kanigowskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr. Dominika Kanigowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Pyza

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99