

Katowice / 23.07.2024

Centrum Medycyny
Doświadczalnej

40-752, Katowice
ul. Medyków 4

<http://cmd.sum.edu.pl/>

KIEROWNIK

prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski
tel.: (+48 32) 208 85 93
fax: (+48 32) 208 88 31

jbarski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 208 85 93
tel.: (+48 32) 208 88 32
fax: (+48 32) 208 88 31

cmd@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Idy Raciborskiej na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Recenzowana praca doktorska „**Plastyczność kory wzrokowej myszy wywołana uczeniem się i rola interneuronów hamujących zawierających somatostatynę badana metodą rejestracji optycznej**”, powstała w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN pod opieką promotora prof. dr hab. Małgorzaty Kossut. Rozprawa została zredagowana jako monografia w typowym dla tego rodzaju publikacji układzie. Obszerna dysertacja obejmuje 251 stron i została podzielona na 14 rozdziałów, podzielonych na dalsze podrozdziały. Główne rozdziały pracy zostały poprzedzone streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz rozdziałem wyjaśniającym znaczenie skrótów wykorzystanych w tekście rozprawy. „Wstęp” jest szóstym rozdziałem, który to wprowadza czytającego szczegółowo w funkcjonalne i morfologiczne meandry kory wzrokowej będącej przedmiotem eksperymentów leżących u podstaw przygotowanej rozprawy. W części tej znajduje się także wyjaśnienie dotyczące metodyki wykorzystanej w części eksperymentalnej. Rozdział ten liczy aż 44 strony, jest więc bardzo obszerny i stanowi ¼ pracy, wyjąwszy liczącą aż 573 pozycje bibliografię. Nie mniej jednak czytający otrzymuje kompendium wiedzy na temat meritum rozprawy. Jedynym niedoborem, nie mniej istotnym, na jaki natrafiłem podczas lektury wstępu jest brak informacji dotyczących systemu Cre-loxP, który jest integralną częścią eksperymentu chemogenetycznego. Po wstępie znajduje się rozdział 7 „Cel pracy”, wskazujący na założenia i zadania, na realizacji których będą się skupiały eksperymenty zaplanowane w części doświadczalnej. Rozdział 8 to „Materiały i metody”, zawierający opisy protokołów eksperymentalnych wykorzystanych przez doktorantkę w części badawczej rozprawy. Opisy części metodycznej zawierają liczne ryciny, które znacznie ułatwiają zrozumienie wyszukanej metodyki, na której opiera się część doświadczalna pracy.

W podrozdziale 8.1. opisującym zwierzęta eksperymentalne nie znalazłem niestety bliższych informacji dotyczących myszy szczepu SST-ires-Cre, właściwości tego szczepu i jego kluczowego znaczenia dla eksperymentu. Informacji tych nie znalazłem również w dalszej części rozdziału „Materiały i metody”. W mojej opinii błędnie też podano nazwę drugiego szczepu myszy laboratoryjnych, którego prawidłowa nazwa to „C57BL/6J” (<https://www.jax.org/strain/000664>).

Po rozdziale „Materiały i metody” następuje rozdział 9 – „Wyniki”, liczący 61 stron. Dane eksperymentalne uzyskane podczas realizacji rozprawy zostały przedstawione w kolejności odpowiadającej kolejnym etapom eksperymentalnym.

W pierwszy podrozdziale (9.1) Doktorantka przedstawiła dane eksperymentalne potwierdzające zasadność zastosowania metody spektrografii optycznej ISOI w mapowaniu wrażliwości orientacyjnej w korze V1 myszy, które to dane zostały już opublikowane przez Doktorantkę.

W podrozdziale 9.2 Doktorantka skupiła się na analizie plastyczności pierwszorzędowej kory wzrokowej w zależności od strategii treningowej, charakteryzując zmiany siły sygnału optycznego jak i obszar kory pobudzany podczas trzech rodzajów stymulacji: przez oko lewe, oko prawe i stymulacji obuocnej. Dodatkowo przeanalizowana została zależność efektów warunkowania od orientacji zastosowanego bodźca wzrokowego.

W następnym etapie (podrozdział 9.3) Doktorantka przeszła do analizy parametrów opisywanych w podrozdziale 9.2, jednakże po transgenicznej manipulacji aktywności somatostatynowych interneuronów hamujących (SST-IN). Również w tym miejscu brak jest informacji w jaki sposób działa system pozwalający na Cre-zależną manipulację ekspresji wektorów wirusowych wprowadzonych do tej populacji interneuronów. Po ocenie poziomu i lokalizacji ekspresji wektorów wirusowych na podstawie oceny sygnału fluorescencyjnego mCherry, Doktorantka dokonała analizy aktywności kory wzrokowej podczas hamowania interneuronów SST-IN, stosując stymulację wzrokową zastosowanej już w poprzednim podrozdziale. Otrzymane wyniki pokazały jednoznacznie zależność siły otrzymywanych sygnałów jak i obszaru aktywacji kory wzrokowej od aktywacji lub dezaktywacji interneuronów SST-IN we wszystkich zastosowanych układach eksperymentalnych.

W związku z faktem, iż drugą najliczniejszą populacją korowych interneuronów hamujących są interneurony zawierające parwalbuminy (PV-IN), Doktorantka postanowiła zbadać nie tylko zależność ekspresji somatostatyny, ale też parwalbuminy w korze wzrokowej od warunkowania klasycznego. Wyniki tych badań zostały opisane w podrozdziale 9.4 i wykazały taką zależność jedynie w przypadku interneuronów somatostatynowych SST-IN.

Jako że jednym z efektów warunkowania klasycznego są zmiany akcji serca, w tym bradykardia, w ostatnim rozdziale wyników (9.5) Doktorantka przeanalizowała zachowanie się tego parametru

fizjologicznego. Otrzymane wyniki pokazały istotne statystycznie zmiany akcji serca o charakterze bradykardii warunkowej jedynie w grupie CS+CSU, natomiast manipulacje polegające na hamowaniu aktywności interneuronów SST-IN nie prowadziły do zmian istotnych statystycznie.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów i ich wstępna analiza zostały podsumowane w rozdziale 10 „Podsumowanie wyników”. Rozdział tego rodzaju nie jest standardem podczas redagowania rozpraw doktorskich, jednak ze względu na mnogość i różnorodność uzyskanych danych eksperymentalnych jest cennym uzupełnieniem treści dysertacji.

Po rozdziale 10 następuje „Dyskusja” licząca 20 stron, oparta na obszernej bibliografii. Doktorantka odnosi uzyskane dane eksperymentalne do wyników opisanych przez grupy badawcze zajmujące się badaniami w zbliżonych obszarach neuronauki. Interesującym aspektem dyskusji są także porównania uzyskanych wyników do badań klinicznych prowadzonych u człowieka. Cennym uzupełnieniem tego rozdziału są dwa schematy podsumowujące wyniki, także jako uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy na temat szlaków informacyjnych kory wzrokowej.

Rozdział 12 to „Podsumowanie i wnioski”, w którym doktorantka wskazuje na najważniejsze, jej zdaniem konkluzje, dotyczące aspektów plastyczności kory wzrokowej i roli interneuronów somatostatynowych. W mojej opinii w rozdziale tym powinny się też znaleźć wnioski zawarte we wstępie dyskusji na stronie 150, potwierdzające słuszny wybór metodyki, na której opierała się eksperymentalna część rozprawy. W rozdziale tym powinna się też pojawić informacja dotycząca ograniczeń metodycznych związanych np. z iniekcją wirusów, czy funkcjonowaniem systemu Cre-LoxP. Uzupełnieniem rozdziału 12 są 44 tabele, będące rodzajem suplementu, pozwalającego czytającemu na zapoznanie się ze szczegółami wyników oraz ich analizy statystycznej.

Dysertację kończy „Spis rycin, tabel i publikacji własnych” (rozdział 13) oraz bardzo obszerna bibliografia licząca aż 573 pozycje literaturowe (rozdział 14).

Szczegółowa analiza tekstu rozprawy pozwoliła znaleźć niedociągnięcia językowe i redakcyjne, co nie jest niczym zaskakującym, szczególnie w tak obszernym tekście – kilka przykładów:

- w mojej opinii termin „wyrażanie” zamiast „ekspresja” brzmi źle i jest niefortunnym tłumaczeniem z języka angielskiego,
- str. 48: „okresy krytyczne”, czego dotyczą?
- str. 48: „rozpuszczenie struktur zewnątrzkomórkowych”, co to znaczy?
- str. 48: „permisyjna rola”, co to znaczy?
- str. 56: drugie zdanie do góry jest niezrozumiałe
- str. 75 i dalej: powinno być „immunohistochemia” nie „imunohistochemia”
- str. 148: drugi akapit od góry, zdanie niezrozumiałe.

- w bibliografii brak pozycji Hübener & Bohnhoeffler 2014
- w pozycji 284 bibliografii brak tytułu czasopisma

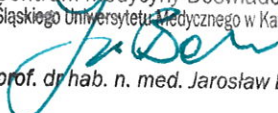
Chciałbym jednak podkreślić, iż powyższe uwagi nie mają wpływu na wartość naukową ocenianej przeze mnie dysertacji.

Podsumowanie:

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską, przygotowaną przez Panią mgr Idę Raciborską, zatytułowaną **„Plastyczność kory wzrokowej myszy wywołana uczeniem się i rola interneuronów hamujących zawierających somatostatynę badana metodą rejestracji optycznej”** oceniam ją bardzo wysoko dostrzegając jednocześnie ogromny nakład pracy związany z jej realizacją. Opierając się na treści rozprawy i zamieszczonych w niej wynikach należy wskazać, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną doktorantki w tej dziedzinie i dyscyplinie, umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenie badań naukowych, a zastosowana metodyka badawcza stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Na tej podstawie stwierdzam, iż spełnia ona wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Pani mgr Idy Raciborskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Mając na uwadze nowatorski charakter ocenianej przeze mnie dysertacji wnioskuję do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Centrum Medycyny Doświadczalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Jarosław Barski

Recenzent: Prof. dr hab. Jan Konopacki

Recenzja sporządzona dnia: 05. 08. 2024 r.

SEKRETARIAT RADY NAUKOWEJ
WPŁYNEŁO 12.08.2024

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Idy Teresy Raciborskiej pt.:

„Plastyczność kory wzrokowej myszy wywołana uczeniem się i rola interneuronów hamujących zawierających somatostatynę badana metodą rejestracji optycznej”

wykonanej w Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

PAN pod kierunkiem

prof. dr hab. Małgorzaty Kossut

1. Uwagi ogólne

Plastyczność to jedna z najważniejszych, immanentnych właściwość systemu nerwowego. W ostatnich kilkudziesięciu latach doszło do istotnego poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów neuroplastyczności. Było to możliwe dzięki pojawieniu się nowych narzędzi badawczych, w tym technik obrazowania mózgu i metod biologii molekularnej. Pozwalają one na śledzenie zmian zachodzących na różnych poziomach, m.in. zachowania, anatomii i fizjologii, a także na poziomie komórkowym i sub-komórkowym. Część badań potwierdza ważną rolę neuroplastyczności nie tylko w dzieciństwie, kiedy ośrodkowy układ nerwowy wykazuje największy potencjał plastyczny, lecz także w późniejszych latach. Poznanie mechanizmów plastyczności pozwala na opracowanie nowych technik terapeutycznych. Kierunki najnowszych badań naukowych nad neuroplastycznością wskazują na potencjał wykorzystania nowoczesnych technik terapeutycznych w celu wspierania naturalnych zdolności regeneracyjnych czy kompensacyjnych mózgu, tak istotnych w procesie rekonwalescencji np. po przebytych udarach.

2. Charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pochodzi z kierowanego przez prof. dr hab. Małgorzatę Kossut zespołu, mającego duże doświadczenie w badaniu zjawiska plastyczności. Adresuje mechanizmy plastyczności obecne w pierwszorzędowej korze wzrokowej podczas procesu warunkowania strachu u dorosłych myszy. Dobór modelu

eksperymentalnego uważam za nadzwyczaj trafny: mysz stała się bowiem w ostatnich latach najczęściej stosowanym modelem do badania funkcji układu wzrokowego. Co więcej, pierwszorzędowa kora wzrokowa, aktywna podczas specyficznego pobudzenia zmysłowego, ulega zmianom plastycznym w celu tworzenia pamięci długotrwałej.

Rozprawa doktorska ma klasyczny 4-rozdz. układ. Opatrzona jest dodatkowo streszczeniami w j. polskim i angielskim, podsumowaniem wyników, wieloma tabelami i kolorowymi rycinami oraz spisem zastosowanych w pracy skrótów. Przedrostek „peri” w j. greckim oznacza „wokół”. Tak więc perineuronal nets można przetłumaczyć jako sieci około-neuronalne. Z kolei „shrub neurones” (ang.) to „komórki krzewiaste”.

W ciekawie napisanym, bogato ilustrowanym i liczącym prawie 60 str. wstępie doktorantka dokonuje charakterystyki układu wzrokowego i pierwszorzędowej kory wzrokowej (V1). W kolejnych rozdziałach charakteryzuje szeroko interneurony kory wzrokowej. Osobne podrozdziały poświęcone są mechanizmom plastyczności i roli interneuronów w tych procesach. Rozdział ten kończy opis i zastosowanie techniki spektrometrii optycznej oraz techniki DREADD, pozwalającej na odwracalną i selektywną kontrolę populacji neuronów lub całych szlaków neuronalnych.

Cel pracy stanowi odrębny podrozdział wstępu. Został on bardzo dobrze uzasadniony. Autorka w trzech punktach przedstawia główne założenia pracy.

Na str. 41 wstępu mgr Ida Teresa Raciborska charakteryzuje mechanizmy plastyczności synaptycznej. W osobnym akapicie porusza kwestię odkrytej w połowie lat 90. plastyczności określanej jako spike-time-dependent plasticity, STDP. Odkryte przez Markrama and Sakmanna (1995) zjawisko plastyczności rzuca nowe światło na sposób komunikowania się neuronów. W akapicie opisującym STDP pojawia się skrót myślowy doktorantki, którego nie rozumiem. Autorka stwierdza, że (cyt.): *„Presynaptyczny potencjał czynnościowy postsynaptycznym potencjałem czynnościowym wzmacnia synapsę, a im krótszy odstęp czasowy między nimi tym większa zmiana masy synaptycznej”*. Prosiłbym doktorantkę o rozszerzenie wyżej wspomnianej myśli.

Str. 52. Przedostatni akapit: chodzi oczywiście o jądro podstawne Meynerta a nie Meyerta.

Na 30 str. autorka opisuje nadzwyczaj szczegółowo zastosowane metody. Rozdział ma bardzo dobrą i klarowną konstrukcję. Tekst ilustrowany jest wieloma kolorowymi i doskonale zaprojektowanymi rycinami. W tym miejscu drobna uwaga: (str. 67, 74): 0.9% NaCl to fizjologiczny roztwór soli a nie sól fizjologiczna.

Muszę przyznać, że jestem pełen uznania dla doktorantki. Praca w zespole naukowym wykorzystującym liczne i bardzo trudne techniki laboratoryjne wymagała od mgr Teresy Raciborskiej znakomitego teoretycznego przygotowania i opanowania dużej liczby metod laboratoryjnych w ograniczonym przecież czasie szkoły doktorskiej. W ramach niniejszej rozprawy zastosowano model warunkowania strachu. Aby zbadać mechanizmy plastyczności w korze wzrokowej dorosłych myszy, mgr Ida Teresa Raciborska skoncentrowała się na roli interneuronów zawierających somatostatynę (SST-IN) oraz parwalbuminę (PV-IN) w neuroplastycznych zmianach wywołanych uczeniem się.

Wykorzystując technikę obrazowania przy pomocy spektrometrii optycznej (ISOI) w pierwszej fazie badań zbadano wrażliwość na orientację bodźca w korze wzrokowej myszy *in vivo*, rejestrując odpowiedzi na poruszające się czarno-białe paski w prawej i lewej korze V1. Technika ta umożliwiła stworzenie map aktywacji oraz zarejestrowanie sygnałów optycznych.

Drugi etap poświęcony jest badaniu wpływu klasycznego warunkowania, gdzie bodźce wzrokowe o określonej orientacji (CS) były skojarzone z doogonową aplikacją prądu (UCS). Eksperymenty przeprowadzono w czterech grupach: warunkowanej klasycznie, pseudo warunkowanej, eksponowanej na bodziec wzrokowy oraz kontrolnej, bez stymulacji wzrokowej. Wskaźnikiem uczenia się była warunkowana bradykardia.

Trzeci etap badań dotyczył roli SST-IN w plastycznych zmianach wywołanych przez warunkowanie, a także ich udziału w aktywacji kory wzrokowej V1. Zbadano jak procedury eksperymentalne wpłynęły na liczebność SST-IN i PV-IN w różnych warstwach kory wzrokowej.

Wyniki eksperymentów przedstawionych w niniejszej dysertacji zostały bardzo dokładnie przedstawione na 70 str. rozprawy. Rozdział ten jest ciekawie ilustrowany wieloma starannie opisanymi kolorowymi rycinami.

Zastosowanie przyjętego w badaniach schematu treningu polegającego na uczeniu asocjacyjnym w paradygmacie warunkowania klasycznego z awersyjnym bodźcem bezwarunkowym, gdzie bodźcem warunkowym były ruchome paski o specyficznej orientacji spowodowało wzrost aktywności kory wzrokowej na bodźce wzrokowe co zbadano przy zastosowaniu spektrometrii optycznej ISOI. Doktorantka potwierdziła tym samym, że obrazowanie optyczne sygnału wewnętrznego (ISOI) może być cenną metodą badania aktywności w pierwotnej korze wzrokowej myszy wywołanej przez bodźce orientacyjne.

Otrzymane przez doktorantkę wyniki są wyjątkowo wartościowe. Wskazują one, że funkcjonalna plastyczność pierwszorzędowej kory wzrokowej u dorosłych zwierząt,

wywołana warunkowaniem klasycznym, zależy od aktywności interneuronów SST, a nie od interneuronów PV. Selektywna, chemogenetyczna blokada aktywności SST spowodowała zahamowanie powstawania zmian plastycznych oraz zaburzyła reakcję warunkowaną, nabywaną w trakcie warunkowania klasycznego. Na str. 92 autorka nadmienia, że wzrost rozproszenia światła poprzedzony był wzrostem tzw. initial dip (ang.) czyli wstępnego spadku rozproszenia światła. Ciekawy jestem czy istnieje jakieś wyjaśnienie tego wstępnego spadku rozproszenia?

Uzyskane wyniki sugerują również bezpośredni wpływ kory wzrokowej na kształtowanie się śladu pamięciowego oraz udział w przetwarzaniu informacji na szlaku kontrolującym pracę serca.

Dyskusja jest trudna i wielowątkowa. Jednak znakomite jej zredagowanie pozwala czytelnikowi zrozumieć złożoność naukowych rozważań autorki. Za doskonały zabieg redakcyjny doktorantki uważam wprowadzenie podsumowania każdego podrozdziału dyskusji. Analiza uzyskanych wyników skłania doktorantkę do sformułowania bardziej ogólnych refleksji, które zresztą w pełni podzielam. Uzyskane wyniki wskazują na znaczący udział kory w kształtowaniu się śladów pamięciowych oraz przetwarzaniu informacji kontrolujących pracę serca. Jest to bez wątpienia znaczące uzupełnienie wiedzy na temat roli interneuronów SST w plastyczności kory wzrokowej. Rozszerza to nasze dotychczasowe rozumienie plastyczności wskazując na aktywną rolę uczenia się w kształtowaniu właściwości sensorycznych dojrzałej kory. Odkrycie to podważa tradycyjny pogląd o ograniczonej plastyczności w dorosłych mózgach i stwarza nowe możliwości terapeutyczne.

3. Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Idy Teresy Raciborskiej wskazuje, że doktorantka jest znakomicie przygotowana zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym do samodzielnej pracy naukowej. Duża erudycja autorki sprawiły, że bardzo obszerne, wielowątkowe i trudne badania zostały opisane w sposób klarowny merytorycznie i poprawnym językiem.

Recenzowana praca stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Jest starannie przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną i opisaną, co składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autorka wykazała się doskonałą znajomością literatury. Jednak cytowanie w pracy ponad 500 pozycji piśmiennictwa uważam za przesadę. Doktorantka mogła jednak dokonać bardziej wnikliwej selekcji piśmiennictwa.

Uważam, że recenzowana rozprawa w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego PAN w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Idy Teresy Raciborskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Nadzwyczaj szerokie spektrum badanych i analizowanych zagadnień, duża wartość naukowa i aplikacyjna rozprawy oraz fakt, że niektóre fragmenty rozprawy doktorskiej mgr Idy Teresy Raciborskiej, zwłaszcza te dotyczące sposobu akwizycji danych monitorowania sygnału EOG i sygnału z fotodiody, zostały opublikowane upoważnia mnie dodatkowo do wystąpienia z wnioskiem o stosowne jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Jan Konopacki

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Uniwersytet Jagielloński

Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

☎: (+12) 664-53-73

E-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister **Idy, Teresy RACIBORSKIEJ** pt.

"Plastyczność kory wzrokowej myszy wywołana uczeniem się i rola interneuronów hamujących zawierających somatostatynę badana metodą rejestracji optycznej"

Przedstawiona do oceny dysertacja to solidne, bardzo obszerne opracowanie (251 stron, 573 pozycji literatury, 36 rycin, 44 tabele), niezwykle ważnego w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu mózgowia, a zatem całego organizmu, procesu neuroplastyczności. Jego odkrycie, na które po raz pierwszy zwrócił uwagę Profesor Jerzy Konorski w połowie ubiegłego stulecia, nagrodzono Nagrodą Nobla w roku 1981. W początkowym okresie badań uwaga skupiona była na tzw. plastyczności rozwojowej kory wzrokowej, szczególnie jej mechanizmie neuronalnym, którego czas ograniczano do tzw. „okresu krytycznego”. Sądzone, że po tym okresie kora wzrokowa jest w pełni przygotowana do procesu widzenia i żadne dalsze zmiany w dominacji ocznej nie zachodzą. Wyniki badań ostatnich lat pokazują jednak, że okres krytyczny nie musi ograniczać się do ściśle określonego, czasu, ale może zamykać się powoli i stopniowo, a często w pewnym zakresie utrzymuje się przez całe życie, jak w przypadku kory ruchowej i przedczołowej. Praca doktorska Pani Idy Raciborskiej dotyczy neuroplastyczności w dojrzałym układzie wzrokowym myszy. Autorka postanowiła innymi metodami, niż klasyczny pomiar aktywności elektrofizjologicznej, potwierdzić obecność zmian w dominacji ocznej u dorosłych myszy, przede wszystkim jednak sprawdzić udział w tym procesie somatostatynowych i parwalbuminowych interneuronów hamujących. **Biorąc pod uwagę, oprócz ważnego waloru poznawczego, ewentualne przyszłościowe znaczenie otrzymanych wyników w neurorehabilitacji, wybór tematu badawczego, uważam za mocną stroną dysertacji.** Potwierdza to także fakt, że praca ta wykonana została w ramach

prestżowego projektu Symfonia, a zatem już wcześniej uzyskała pozytywną ocenę niezależnych recenzentów.

Praca ma typowy układ. Rozpoczyna ją obszerny, logicznie zaplanowany i bardzo dobrze napisany wstęp, w którym autorka wprowadza czytającego w badane zagadnienia. Detalicznie opisuje układ wzrokowy, zwraca szczególną uwagę na siatkówkę, struktury podkorowe, pierwszorzędową korę wzrokową, jej budowę i połączenia z innymi obszarami mózgowia. W opisach tych dokonuje porównania układu wzrokowego myszy i naczelnych, wskazuje cechy odróżniające i wspólne, czym tłumaczy zasadność wyboru myszy do swoich badań. W warstwie zwojowej siatkówki brakuje mi większego zwrócenia uwagi na komórki melanopsynowe, które oprócz synchronizacji świetlnej zegara biologicznego, biorą także udział w procesie widzenia, wysyłając swoje aksony do wzrokowych struktur podkorowych, w tym listka ciała kolankowatego bocznego wzgórza, któremu autorka poświęca sporo uwagi. Tu drobna uwaga, IGL nie generuje rytmów biologicznych, tylko je synchronizuje, integrując z sobą dwa główne synchronizatory zegara biologicznego, świetlny i nieświetlny. Tą część wstępu kończy funkcjonalny opis pierwszorzędowej kory wzrokowej myszy, z podkreśleniem braku w jej ukształtowaniu struktury kolumnowej, choć przy zachowaniu podobnej zdolności orientacyjnej kory wzrokowej, jaka jest u zwierząt z korą kolumnową. Kolejny bardzo obszerny rozdział wstępu dotyczy udziału interneuronów hamujących (GABAergiczych) w procesie plastyczności kory wzrokowej. Autorka przedstawia ich charakterystykę, klasyfikację morfologiczną z podziałem na te z ekspresją parwalbuminy, somatostatyny, czy peptydu naczyniowo-jelitowego. Opisuje ich znaczenie w aktywności komórek piramidowych, a także powszechnie udowodniony udział w neuroplastyczności rozwojowej kory wzrokowej w okresie krytycznym. Szczególna uwaga doktorantki zwrócona jest na interneurony somatostatynowe. Stanowią one istotny element w przetwarzaniu informacji wzrokowej i procesach pamięciowych podczas uczenia się asocjacyjnego (warunkowania klasycznego), które doktorantka wykorzystuje w swoim modelu badawczym. Tym zagadnieniom, szczególnie plastyczności zależnej od czasu wyładowania, które wg wyników wcześniejszych badań bierze udział w poprawie selektywności orientacji u dorosłych myszy, autorka poświęca kolejne rozdziały wstępu. Jasno opisuje wzajemne fizjologiczne powiązanie klasycznego warunkowania z aktywnością hamujących interneuronów somatostatynowych i częstotliwością pracy serca (bradykardią), tłumaczy tym samym, dlaczego także parametry tych procesów fizjologicznych rejestrowała

i analizowała w pracy doktorskiej. Takie „holistyczne” podejście doktorantki do realizacji postawionych celów badawczych, pięknie pokazuje, „wzmacniając” otrzymane wyniki, jak można, a nie jest to częste, łączyć badanie aktywności układów autonomicznych z ważnymi procesami ośrodkowego układu nerwowego (mózgowia). **Wszystkie rozważania autorki, poparte są bogato cytowaną literaturą i dodatkowo ilustrowane czytelnymi schematami. To dowód bardzo szerokiej, ugruntowanej wiedzy teoretycznej i dobrego przygotowanie autorki do realizacji planowanych badań.** Merytoryczne wprowadzenie kończy jedno zdanie pytające, będące jednocześnie nadrzędnym celem pracy cyt. *„czy dorosła kora wzrokowa wykazuje plastyczność selektywności orientacyjnej w kontekście plastyczności zależnej od uczenia się”*, koniec cyt., a także czy i w jakim stopniu w ten proces zaangażowane są interneurony GABAergiczne somatostatynowe i parwalbuminowe. Kluczowe, godne wyraźnego podkreślenia są techniki i metody pomiarowe stosowane przez doktorantkę. Na szczególną uwagę zasługuje technika spektrometrii optycznej (ISOI), czyli rejestracja optyczna własnego sygnału kory, a także chemogenetyczna metoda DREADD pozwalająca na wprowadzanie do neuronów „sztucznych” receptorów, których kontrolowana aktywacja umożliwi rejestrację wzajemnych funkcjonalnych połączeń nerwowych. Autorka w detalach i słusznie opisuje te nowe techniki, są one bowiem, a szczególnie ta pierwsza nowatorskie w badanych przez doktorantkę procesach korowych. **Pani mgr Ida Raciborska po raz pierwszy podjęła próbę sprawdzenia, czy techniką spektrometrii optycznej, można analizować funkcje korowe u myszy, których kora nie ma klasycznej orientacji kolumnowej.** Moim zdaniem jest to kolejny, niesłychanie ważny cel dysertacji, który biorąc pod uwagę jego nowatorstwo, małą w stosunku do klasycznych technik elektrofizjologicznych inwazyjność, jest również bardzo mocną stroną doktoratu. Pozostałe procedury eksperymentalne (rejestracja EKG, EOG, immunohistochemia, akwizycja i analiza danych), a także wcześniej, przygotowanie i podział zwierząt na grupy (naiwna, kontrolna, trenowana, warunkowana i PSEUDO) w poszczególnych etapach badań, nie budzą zastrzeżeń, a raczej podziw. Podobnie jak wcześniej, doktorantka bardzo szczegółowo je opisała, uzupełniając czytelnymi rycinami. Zwracam uwagę na ten element graficzny, gdyż jest on bardzo pomocny w śledzeniu i rozumieniu poszczególnych etapów badań, szczególnie, gdy są tak metodycznie bogate.

Bardzo precyzyjnie i logicznie zaplanowane przez doktorantkę badania oraz ich konsekwentna realizacja, przyniosły jasne i czytelne rezultaty. Przede wszystkim po raz

pierwszy udowodniły, że zastosowana technika spektrometrii optycznej, pozwala na czytelną wizualizację (mapowanie) obszarów kory wzrokowej poprzez rejestrację zmiany sygnału optycznego i jego rozmiaru przestrzennego w odpowiedzi na bodźce o określonej orientacji, także u mszy ze strukturą kory typu „sól-i-pieprz”. Zaobserwowano podobieństwa w przebiegu sygnału dla pewnych orientacji z wyraźnie silniejszą aktywnością przy bodźcowaniu przeciwnym o orientacji kardynalnej poziomej. Te obserwacje potwierdziły wcześniejsze doniesienia, pokazujące przewagę unerwienia przeciwnego nad tożstwowym. Ciekawym spostrzeżeniem była oscylacyjna aktywność rejestrowanego sygnału optycznego, nieskorelowana z aktywnością EOG, (choć był to pomiar tylko na jednym osobniku?). Jest to raczej, jak sugeruje autorka, wpływ aktywności innych zespołów neuronalnych. Czy tylko korowych, jak sugeruje autorka? A zatem technika ISOI pozwala, i jest to cenna konkluzja tego etapu badań, na jednoczesną rejestrację aktywności dużych populacji neuronów. Warto dodać, że wyniki tej części badań zostały już opublikowane w czasopiśmie z listy JCR. Otrzymane wyniki pokazują także, że warunkowanie klasyczne, jako forma treningu wzrokowego, istotnie wpływa na ogólną aktywność kory wzrokowej, poprzez zwiększenie siły i koncentrację aktywacji w określonych obszarach dla wszystkich orientacji bodźców wzrokowych. Rejestrowana wyraźna bradykardia podczas warunkowania klasycznego i jej brak w grupie PSEUDO, a także tylko przy bodźcu warunkowym, była dowodem procesu uczenia się (powstawania śladu pamięciowego). Bodziec wzrokowy w warunkowaniu klasycznym, jako sygnał bólu, powoduje w konsekwencji większą wrażliwość kory wzrokowej na inne bodźce wzrokowe, marginalizując ten pierwotny warunkowy. Kolejne eksperymenty z wykorzystaniem techniki DREADD pokazały, że w warunkowaniu klasycznym, torującym proces plastyczności pierwszorzędowej kory wzrokowej myszy, udział biorą tylko somatostatynowe interneurony hamujące GABAergiczne, nie zaś parwalbuminowe. We wszystkich warstwach pierwszorzędowej kory wzrokowej, liczba tych pierwszych w przeciwieństwie do parwalbuminowych, znacznie wzrastała po procedurze warunkowania klasycznego. Udział komórek somatostatynowych jest charakterystyczny dla warunkowania strachu, co nie wyklucza udziału, jak sądzi autorka, również parwalbuminowych, ale nie w procedurze stosowanej w tej pracy. Podanie N-tlenku klozapiny, blokera aktywności neuronów somatostatynowych, hamuje aktywność pierwszorzędowej kory wzrokowej w odpowiedzi na bodziec wzrokowy. Zwiększona aktywność somatostatynowych interneuronów

obserwowana była tylko w obszarach monokularnych pierwszorzędowej kory wzrokowej obu półkul mózgowych. Brak jej natomiast w obszarach binokularnych, w których warunkowanie klasyczne nie powodowało wzrostu liczby neuronów somatostatynowych. **Prezentacja otrzymanych wyników w formie opisowej i graficznej, a także ich analiza porównawcza i statystyczna są dowodem posiadania przez doktorantkę umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

Dyskusja otrzymanych wyników jest ostrożna, precyzyjna i bardzo dojrzała. Autorka szczegółowo omawia wyniki poszczególnych etapów badań, cytując inne. Pojawiają się elementy krytyczne, polemiczne i wątpliwe, będące podstawą kolejnych pytań, jak np. czy sama prezentacja bodźca warunkowego, może także wpływać na plastyczność; jakie jest znaczenie w badanym procesie innych struktur mózgowia, np. jąder migdałowatych, wzgórza, czy wzgórek czworaczego górnego? Rodzi się także generalne pytanie dotyczące znaczenia (wpływu) na plastyczność dorosłej kory wzrokowej innych procesów, niż tylko ten badany przez doktorantkę, czyli warunkowanie klasyczne? A jeśli tak, to jaką pozycję (znaczenie) w procesie plastyczności ma warunkowanie klasyczne – dominującą, podstawową? Czy ogólne wzbudzenie (arousal) mózgowia, będące efektem aktywności układów niespecyficznych mózgowia, które notabene są podstawą tworzenia warunkowania klasycznego i dyskutowana przez autorkę transmisja cholinergiczna, kluczowa zarówno we wzbudzeniu mózgowia, jak i torowaniu procesu widzenia, też są ważne? Czy zatem możemy powiedzieć, że udowodniony przez autorkę udział warunkowania klasycznego w procesie plastyczności dorosłej kory wzrokowej, to tylko jeden z wielu elementów torowania tego zjawiska, czy jego podstawa?

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że założony cel (cele) pracy doktorskiej Pani mgr Idy Raciborskiej zostały osiągnięte. Autorka udowodniła, że uczenie asocjacyjne w zastosowanym przez autorkę paradygmacie warunkowania klasycznego z awersyjnym bodźcem bezwarunkowym (szokiem elektrycznym) i warunkowym (bodźce wzrokowe o określonej orientacji), powoduje wzrost aktywności w pierwszorzędowej korze wzrokowej dorosłych myszy, a zatem sprzyja powstawaniu zmian plastycznych. W mechanizmie tych zmian udział biorą somatostatynowe interneurony hamujące. Metoda obrazowania optycznego sygnału wewnętrznego, może być (jest) użyteczna w rejestracji zmian plastycznych aktywności neuronalnej na dużych obszarach korowych.

Z obowiązku recenzenta zwracam jednak uwagę na pewne błędy i nieścisłości edytorskie (literowe, gramatyczne i stylistyczne), a także pomyłki w numeracji cytowanych rycin, które zauważyłem czytając pracę. Dla przykładu podaję kilka.

str. 17. podrozdz. 6.1.2 linia 9, powinno być „stosownie”; str. 17. ostatnie zdanie jest niegramatyczne; str. 18. linia 8, trzeba zdecydować, czy „przy”, czy „w” detekcji; str. 21. linia 20, powinno być „białek”; str. 41. ostatnie zdanie jest niegramatyczne; str. 45. linia 5, brakuje „za”; str. 46. linia 5, powinno być „układów”; str. 48. linia 4, wyrzucić „nad”; str. 48. akapit 3, pierwsze zdanie, zdecydować, czy „przez”, czy „poprzez” i dalej ma być „wskazujące”; str. 50. linia 4 i 6, zdania powtórzone; str. 52. podrozdz. 6.5.4, akapit 3, ostatnie zdanie jest niegramatyczne; str. 53. linia 7, zdanie niegramatyczne; str. 63. linia 8, brakuje „na”; str. 78, powinno być „po treningu behawioralnym”; str. 79. linia 10, powinno być „w korze”; str. 103. linia druga od dołu, jest Rycina 22, a powinna być Rycina 20; str. 108. linia 4 i 7 od dołu, lepiej mówić „w każdej grupie”; str. 122. linia 5, jedną „orientację” wyrzucić; str. 124. podrozdz. A -....., pierwsze zdanie, jedno słowo „wykazała” wyrzucić; str. 132. linia 5, brakuje „na”; str. 142. linia 2, ma być „wpłynęło”; str. 151. linia 3, nie ma Ryciny 14 C, ma być Rycina 15 C; str. 159. podrozdz. 11.2.1, linia 7, powinno być Rycina 31 A, i dalej Rycina 31 C, i dalej linia 11, powinno być Rycina 32; str. 165. na końcu w drugiej części zdania brakuje orzeczenia.

Uwagi te mają wyłącznie charakter porządkujący manuskrypt i oczywiście w żaden sposób nie wpływają, co z całą mocą podkreślam, na wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy. **Moim zdaniem rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego. Uzyskane przez doktorantkę wyniki, będące efektem solidnie i logicznie zaplanowanych badań oraz konsekwentnie, systematycznie przeprowadzonych doświadczeń, których wyniki zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i wielowątkowo przedyskutowane, w istotny sposób uzupełniają i poszerzają istniejącą wiedzę, na temat plastyczności kory wzrokowej u dorosłych zwierząt na przykładzie myszy, wprowadzając do niej zupełnie nowe elementy, także nowe, precyzyjne techniki obrazowa aktywności korowej.**

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Idy Raciborskiej **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Kraków dnia 26. sierpień 2024.

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski