



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Prof. dr hab. n med. Agnieszka Basta-Kaim
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
w Krakowie

Kraków, 15.03.2025

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Mielnickiej

pt. „*Mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach*”

**wykonanej w Pracowni Neurobiologii Centrum Badań Plastyczności Neuronalnej i
Chorób Mózgu BRAINCITY Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego**

**pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Leszka Kaczmarka oraz
promotora pomocniczego dr Piotra Michaluka.**

Postrzeganie roli komórek glijowych w mózgu ulega dynamicznym zmianom. Wykazanie wzajemnej komunikacji neuronalno-glejowej, a w kontekście niniejszej rozprawy pomiędzy neuronami, a astrocytami stało się bowiem podstawą do weryfikacji naszej wiedzy dotyczącej udziału tych ostatnich komórek w morfogenezie mózgu, procesach metabolicznych, utrzymaniu prawidłowej homeostazy oraz modulacji transmisji synaptycznej. Wprowadzone pod koniec XX wieku pojęcie „synapsy trójdzielnej” odzwierciedla udział w połączeniu nerwowym trzech kompartmentów: części pre- i post-synaptycznej oraz wypustek astrocytarnych. Zdolność do odbierania informacji z pobudliwych komórek nerwowych za pośrednictwem neuroprzekaźników oraz odpowiedniego oddziaływania na neurony poprzez uwalnianie gliotransmiterów z astrocytów na drodze egzocytozy wskazały na aktywny udział komórek neurogleju w pracy mózgu. W dalszym ciągu pozostaje jednak wiele pytań dotyczących dynamiki interakcji pomiędzy tymi komórkami, przetwarzania informacji w obrębie układów nerwowych, a także mechanizmów regulacji aktywności procesu egzocytozy astrocytów. W nurt badawczych poszukiwań w tym obszarze wpisują się badania przedstawione w rozprawie doktorskiej przez Panią mgr Aleksandrę Mielnicką.

Formalna i merytoryczna ocena rozprawy

Oceniana dysertacja napisana została w języku polskim w sposób tradycyjny. Zawarto w niej wstęp, cel badań, opis zastosowanych modeli badawczych oraz metodyki wykonywanych oznaczeń. Przedstawiono także wyniki uzyskane przez Doktorantkę wraz z ich dyskusją. Na końcowych stronach maszynopisu zawarto podsumowanie i wnioski oraz spis piśmiennictwa. Zgodnie z wymaganiami w rozprawie znalazły się także streszczenia w języku

polskim i angielskim oraz dodatkowo wykaz programów i zasobów internetowych wykorzystanych w trakcie przygotowywania pracy. Całość rozprawy napisana została bardzo starannie, wzbogacono ją dobrze dobranymi i ułatwiającymi odbiór tekstu rycinami, a zawarto na 91 stronach maszynopisu.

Jako wprowadzenie do tematyki badań w rozprawie posłużył rozdział **Wstęp** w którym uwagę poświęcono głównie komórkom glejowym - astrocytom, przedstawiając krótki opis ich budowy morfologicznej oraz roli tych komórek w mózgu, żeby wspomnieć procesy metaboliczne, formowania bariery krew-mózg, utrzymywania homeostazy jonów czy usuwania nadmiaru neuroprzekaźników z przestrzeni międzykomórkowej. Szczegółowo opisano mechanizmy zaangażowane w uwalnianie glioprzekaźników, które odzwierciedlają komunikację astrocytów z neuronami, w tym proces egzocytozy zależnej od jonów wapnia (Ca^{2+}). Autorka przedstawia w tej części dysertacji także informacje o typach pecherzyków sekrecyjnych uwalnianych w procesie egzocytozy, rodzajach tego procesu oraz jego etapach. Wśród szczegółowych opisów fuzji pecherzyków sekrecyjnych i uwalniania niesionego przez nie ładunku Doktorantka wspomina o białkach transbłonowych SNARE. Generalnie analiza funkcjonalna różnicuje te białka na dwie grupy: v-SNARE związane z pecherzykiem ale także i innymi formami transportu pośredniego oraz t-SNARE, które obejmują powierzchnie docelowe np. integralne białka błonowe. Białka te klasyfikuje się także w oparciu o ich budowę na R-SNARE oraz Q-SNARE w zależności od reszty aminokwasowej w centrum motywu SNARE. Ta ciekawa i różnorodna grupa białek nie wykazuje zmienności ewolucyjnej, czy w związku z tym można je nazywać konserwowanymi, jak napisano na str. 22, czy może raczej białkami konserwatywnymi we wspomnianym powyżej kontekście?

Intrygujące opracowanie stanowi podrozdział Wstępu w którym mgr Mielnicka podejmuje śmiałą próbę analizy rozbieżności wyników otrzymywanych w obszarze badań dotyczących mechanizmów regulacyjnych aktywności oraz funkcjonalności komórek astrocytarnych, identyfikując jako kluczową ich przyczynę - różnorodność i wybór modelu badawczego. Nie sposób nie zgodzić się w tym miejscu z wnioskami Doktorantki popartymi zresztą dobrze dobranymi pozycjami piśmiennictwa, a także obserwacjami własnymi poczynionymi na kolejnych stronach rozprawy. Prosiłabym jednak o nieco szersze przedstawienie uzasadnienia, (nie tylko w oparciu o cytowaną pozycję piśmiennictwa odnosząca się raczej do protokołu metodologicznego), dlaczego zdaniem Autorki „istotność komponentu neuronalnego” jest szczególnie ważna w badaniach reaktywności astrocytów w chorobach neurodegeneracyjnych. Można także polemizować czy użyte w tej części manuskryptu (str. 25) określenie „cząsteczki zapalne prowadzą do uwalniania glioprzekaźników przez astrocyty” nie warto zastąpić terminem „mediatory”, gdyż niektóre ze wspomnianych przez Autorkę chemokin mają także potencjał protekcyjny. Końcowe strony tego rozdziału poświęcono różnorodności astrocytów, ich podtypów oraz ekspresji w obszarach mózgu. Ostatnie lata i rozwój nowych nowoczesnych metod badawczych w tym możliwość prowadzenia badań pojedynczych komórek zmieniają naszą wiedzę w tym obszarze, podobnie jak w przypadku mikrogleju odchodząc od klasycznego podziału tych komórek na podtypy z wielu względów. Prosiłabym o komentarz w czasie publicznej obrony w tej kwestii. W tym miejscu z obowiązku recenzenta wspomnę jeszcze o powtórzeniu tego samego fragmentu tekstu w tej części dysertacji (str. 27), które traktuje jako pomyłkę edyorską. Po zapoznaniu się z tą częścią rozprawy nie mam wątpliwości,

że odzwierciedla dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki do realizacji celu rozprawy i jednocześnie dokumentuje, iż rozprawa prezentuje wiedzę teoretyczną mgr Mielnickiej, w dyscyplinie w której ubiega się o nadanie stopnia doktora.

Głównym **Celem** przedłożonej do oceny rozprawy było zbadanie mechanizmów uczestniczących w regulacji procesu egzocytozy w astrocytach. Jego realizację oparto o siedem szczegółowych zadań badawczych obejmujących między innymi ocenę potencjalnych różnic w poziomie egzocytozy w hodowlach astrocytarnych i neuronalno-astrocytarnych, określenie wpływu aktywności neuronalnej na wydajność tego procesu w astrocytach, określenie źródła i roli jonów wapnia (Ca^{2+}) w modulacji i wydajności egzocytozy uwzględniając dwa obszary mózgu służące jako źródło komórek do badań *in vitro*. W badaniach zaplanowano także pomiar poziomu ekspresji genu *Unc13* w hodowlach uzyskanych z kory nowej i hipokampa w celu potencjalnej korelacji jego poziom mRNA jako markera do oceny efektywności i specyfiki procesu egzocytozy w warunkach *in vitro*.

Dobór i realizacja celi rozprawy w oparciu o metodykę zaprezentowaną przez Autorkę w rozdziale **Material i metody** nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Podkreślić należy staranność i szczegółowość opisu zastosowanej metodyki oraz procedur badawczych. Tym niemniej nie mogę pominąć moich wątpliwości, które pojawiły się po lekturze podrozdziału 5.2.2. Wydaje mi się że chociaż zgodnie z regulaminem właściwej Lokalnej Komisji Etycznej procedura izolacji struktur mózgowych „na tzw. tkanki” nie wymaga zgody, to zamieszczone przez Doktorantkę w dysertacji informacje że „oseski umieszczano na lodzie aby stały się mniej ruchliwe i ospale” oraz używanie (na stronie 40) określeń „odcięta głowa” oraz „czaszkę oderwano od mózgu pęsetą” aczkolwiek zgodne z metodologią i procedurą w mojej ocenie mogły zostać pominięte. Przeciwnie określenie „kawałki” kory nowej w podrozdziale 5.2.3 ze względu na opisywaną w rozdziale Wstęp zależną od struktury i warstwy kory różnorodność fenotypową i funkcjonalną astrocytów (opisywaną także w najnowszym piśmiennictwie) należałoby nieco uściślić. Może nasunąć się pytanie czy czynnik ten nie modulował i determinował wyników opisanych w rozdziale kolejnym, proszę o stosowny komentarz. Chciałabym także prosić o przybliżenie sposobu weryfikacji procentowego udziału poszczególnych komórek w hodowli mieszanej przed i po transfekcji z użyciem Lipofekaminy?

Kluczowe znaczenie dla oceny rozprawy ma niewątpliwie wartość merytoryczna uzyskanych **Wyników** przez mgr Mielnicką. Zostały one zaprezentowane w formie opisowej oraz ośmiu rycin. Wśród najważniejszych znalezisk wymienić należy wykazanie:

- zróżnicowanej morfologii oraz częstotliwości spontanicznej egzocytozy astrocytarnej w zależności od typu hodowli komórkowej;

- wpływu aktywności komórek nerwowych wywołanej stymulacją elektryczną na wzrost wydajności egzocytozy astrocytów, a jednocześnie istotnej roli jej hamowania (w hodowlach hipokampalnych);

- kluczowego znaczenia zewnątrzkomórkowego źródła jonów wapnia (Ca^{2+}) w regulacji częstotliwości egzocytozy w hodowlach korowych i hipokampalnych, a w przypadku tych ostatnich także roli aktywacji receptorów AMPA w przebiegu egzocytozy;

- wzrostu częstotliwości egzocytozy w warunkach stymulacji elektrycznej w astrocytach hodowli korowej, także w warunkach hamowania potencjału czynnościowego w neuronach;

- zależnych od struktury mózgu (będącej źródłem komórek do hodowli) zmian w poziomie ekspresji genu markerowego *Unc13c* w astrocytach.

Uzyskane wyniki wskazują na złożony obraz przebiegu i modulacji procesu egzocytozy, którą determinują zarówno interakcje międzykomórkowe, status aktywacji komórek je tworzących, jak i warunki hodowlane/środowiskowe. Pojawia się pytanie, czy zatem zmiany w profilu gliotransmisji obserwowane w warunkach patologicznych np. podczas stanu zapalnego mogą wynikać ze zmian i modulacji częstotliwości egzocytozy? Czy eliminacja mikrogleju i oligodendrocytów z hodowli przeprowadzona przez Doktorantkę mogła wpłynąć na uzyskane przez Nią wyniki? Czy wreszcie prowadzono podobny profil badań w modelu hodowli organotypowych, w których wspomniane populacje komórek są obecne? Wiadomo bowiem, że nie tylko interakcje neuron-glej, ale także astrocyt-mikroglej istotnie modulują neuroprzebieżność, a wzrost zależnej od wapnia egzocytozy glutaminianu z astrocytów, istotnie wpływa na reaktywność komórek mikrogleju i w konsekwencji na panel uwalnianych mediatorów.

W zamieszczonej w końcowej części rozprawy **Dyskusji** mgr Mielnicka w sposób merytoryczny i obiektywny analizuje uzyskane wyniki, starając się odnieść je do obecnego stanu wiedzy. Autorka dostrzega, że niektóre z wyników zaprezentowanych w dysertacji (i/lub częściowo opublikowanych w wieloautorskich pracach z Jej udziałem) są nieco odmienne od uzyskanych przez innych badaczy. Obserwacja ta implikuje konkluzję, iż uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią wartościowe podłoże do dalszego studiowania modulowanego wielotorowego obrazu zależnych od struktury mózgu interakcji neuronalno-astrocytarnych uczestniczących w regulacji transmisji synaptycznej. Jednocześnie ich wartość jest istotna dla przyszłych analiz dynamiki uwalniania glioprzebieżników w odpowiedzi na różne rodzaje stymulacji jak i do oceny sprzężenia lokalnych wzrostów wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) z przebiegiem wzmożonej egzocytozy, o czym wspomina Doktorantka w podrozdziale 7.8. Rozprawę kończy podsumowanie i wnioski końcowe oraz zestawienie pięciu prac w których mgr Mielnicka jest współautorem.

Podsumowanie i wnioski

Przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam wysoko i stwierdzam, że odpowiada ona wymogom ustawowym. Jest ona oryginalnym i ciekawym opracowaniem zagadnienia naukowego dotyczącego poznania regulacji i mechanizmów egzocytozy w astrocytach w modelach doświadczalnych *in vitro*. Jak wspomniałam już powyżej w swojej recenzji, rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie w której ubiega się o nadanie stopnia doktora. Przedstawione w niej wyniki świadczą o umiejętności samodzielnego logicznego planowania i prowadzenia pracy naukowej przez Autorkę, a umiejętność korzystania z dostępnego piśmiennictwa do dyskusji swoich wyników i formułowania trafnych podsumowań, dają podstawy do wnioskowania o dojrzałości naukowej

Autorki tej dysertacji, potwierdzając predyspozycje oraz gotowość do uzyskania stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniana przeze mnie dysertacja pt. „*Mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach*” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r.poz.742 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Mielnickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Grupa Badawcza Neurobiologii Komórkowej
Dr hab. Anna Malik



Warszawa, 26/03/2025

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej „Mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach” autorstwa Pani mgr Aleksandry Mielnickiej

Praca doktorska Pani Aleksandry Mielnickiej powstała w Pracowni Neurobiologii Centrum Badań Plastyczności Neuronalnej i Chorób Mózgu BRAINCITY Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Promotorem był prof. dr hab. Leszek Kaczmarek, a promotorem pomocniczym dr Piotr Michaluk. Praca powstała w ramach realizacji grantu SONATA NCN.

Celem pracy było zbadanie mechanizmów regulujących egzocytozę w astrocytach. Astrocyty to typ komórek glijowych występujących w ośrodkowym układzie nerwowym. Do ich funkcji należy m.in. formowanie bariery krew-mózg, utrzymanie homeostazy jonowej oraz zapewnienie wsparcia metabolicznego neuronom. Dodatkowo, mogą one uczestniczyć w reakcji zapalnej. W kontekście recenzowanej pracy, istotną rolą astrocytów jest ich udział w formowaniu tzw. synapsy trójdzielnej, a więc układu, w którym uczestniczą presynaptyczna i postsynaptyczna część neuronu oraz wypustki astrocytu, uczestniczące w regulacji przekaźnictwa. W reakcji na neuroprzekaźniki, astrocyty mogą usuwać je z przestrzeni synaptycznej, ale także uwalniać tzw. glioprzekaźniki. Proces uwalniania glioprzekaźników na drodze egzocytozy regulowanej nie jest dobrze poznany i stał się tematem badań prowadzonych przez doktorantkę. Dodatkowo, doktorantka skupiła się na zbadaniu potencjalnych różnic w tym procesie pomiędzy astrocytami izolowanymi z różnych struktur mózgu, bazując na dostępnych danych literaturowych wskazujących na taką możliwość.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 108 stron, z czego Wstęp stanowi 13 stron, Materiały i metody 25 stron, Wyniki 22 strony, a Dyskusja wyników 12 stron. Praca zawiera też Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Cel pracy, Podsumowanie i wnioski końcowe, Wykaz wykorzystanych programów i zasobów internetowych, Spis literatury (197 pozycji) i Zestawienie własnych publikacji (5, w tym jeden „preprint”).

Ocena merytoryczna

Wstęp w sposób zadowalający nakreśla tło dla prowadzonych badań i wskazuje zasadność analizy mechanizmów regulowanej egzocytozy w astrocytach, choć jest dość skrótowy. Doktorantka omawia w nim funkcje astrocytów, skupiając się m.in. na roli wypustek astrocytów

w funkcjonowaniu synapsy trójdzielnej. Następnie omówione są dane literaturowe na temat uwalniania glioprzekazników przez astrocyty w procesie regulowanej egzocytozy. W ostatniej części wstępu omówiono występowanie podtypów astrocytów w różnych obszarach mózgu. W moim odczuciu zabrakło odniesienia do funkcji astrocytów w sytuacji ich aktywacji prozapalnej. Choć nie jest to tematyka bezpośrednio badana przez doktorantkę, aktywowane astrocyty także wydzielają szereg cząsteczek sygnałowych i wydaje się zasadne chociaż pobieżne omówienie tej funkcji w rozdziale „Podstawowe funkcje astrocytów w mózgu”. Zabrakło mi także szerszego omówienia samych glioprzekazników. Są one jedynie wymienione w Tabeli 1, a wydaje się, że bardzo ciekawe byłoby przybliżenie ich funkcji biologicznych w kontekście udziału astrocytów w neuroprzekaznictwie.

Cele rozprawy. Za główny cel mgr Mielnicka postawiła sobie zbadanie mechanizmów regulujących egzocytozę w astrocytach. W ramach realizacji tego celu, doktorantka zaplanowała 7 zadań, które obejmowały badanie przebiegu egzocytozy w hodowlach pierwotnych astrocytów w różnych układach doświadczalnych oraz ocenę poziomu ekspresji genu *Unc13c* (potencjalnie istotnego dla przebiegu tego procesu) w hodowlach astrocytów pozyskanych z różnych struktur mózgu.

Materiały i Metody zostały opisane w sposób rzetelny i dość detaliczny, umożliwiając odtworzenie opisanych procedur. Główną techniką stosowaną przez doktorantkę było przyżyciowe obrazowanie hodowanych *in vitro* komórek przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF, ang. *total internal reflection fluorescence*). Technika ta była stosowana w celu oceny intensywności egzocytozy w astrocytach. Doktorantka wykorzystwała w swoich badaniach hodowle pierwotne astrocytów oraz hodowle neuronalno-glejowe, które pozyskiwała ze szczurzych osesków. Zastosowała szereg manipulacji, badając ich wpływ na proces egzocytozy. Do manipulacji tych należało m.in. zastosowanie środków farmakologicznych wpływających na aktywność receptorów dla glutaminy, usunięcie jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego, buforowanie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia oraz stymulacja elektryczna. Ponadto, w pracy zastosowano techniki klonowania, transfekcje hodowli komórkowych, barwienia immunofluorescencyjne, RT-qPCR oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*. Są to zaawansowane techniki badawcze, spośród których zwłaszcza zastosowanie TIRF wymaga specjalistycznych umiejętności oraz doświadczenia.

Pewnym mankamentem sekcji **Materiały i Metody** jest w moim odczuciu brak spisu najważniejszych materiałów. Są one wymienione w opisie konkretnych procedur, jednak łatwiej byłoby je odszukać, gdyby zostały dodatkowo wypisane w formie list/tabel. Powiązany problemem jest brak informacji o niektórych materiałach, w szczególności plazmidach. Z opisów wyników oraz rycin można wywnioskować, że stosowano przynajmniej kilka plazmidów poza opisanym w **Materiałach i Metodach** pZac2.1gfaABC1D_Lck-GFP, na przykład p β -Actin_eGFP (opis ryciny 9), pZac_gfa_Lck-GFP (strona 76), czy 317_pGEM-7Zf+ (strona 46). Ich źródło oraz charakterystyka są niejasne. Podobnie, przydałby się osobny spis stosowanych środków farmakologicznych.

Mam także następujące wątpliwości dotyczące opisu analiz i przedstawiania wyników:

- Analiza wyników qPCR (str. 46). Doktorantka pisze: „W tym celu posłużono się względną analizą porównawczą, określaną mianem $\Delta\Delta Ct$. Najpierw obliczono ΔCt dla każdej próbki (średnia arytmetyczna wartości Ct próbka - średnia arytmetyczna Ct kontrola)”. Wkradł się tu chyba błąd,

ΔCt to różnica między Ct dla genu badanego a Ct dla genu kontrolnego zmierzonymi dla tej samej próbki.

- Opis analiz statystycznych (str. 53). Mowa o prezentacji danych jako „średnia arytmetyczna \pm standardowy błąd pomiaru, SEM - ang. *standard error of measurements*”. Mam tu wątpliwość, czy faktycznie chodzi o tak rozumiany SEM, czy jednak o *standard error of the mean*, czyli błąd standardowy średniej. Jest to dużo częściej stosowana miara błędu. Na przykład popularny program GraphPad Prism standardowo przypisuje skrót SEM do *standard error of the mean*.

Wyniki rozpoczyna opis porównania poziomu egzocytozy w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych hipokampa. Doktorantka stwierdza, że astrocyty hodowane w obecności neuronów wykazują bardziej złożoną morfologię oraz niższy współczynnik egzocytozy. Kolejno wykazuje, że częstotliwość egzocytozy w astrocytach hodowanych wraz z neuronami wzrasta pod wpływem stymulacji elektrycznej, a efekt ten jest zablokowany w obecności TTX, hamującego rozprzestrzenianie się potencjałów czynnościowych. Jest to doświadczenie bardzo elegancko pokazujące, że aktywność neuronalna wzmagają egzocytozę w astrocytach pozostających w bezpośrednim kontakcie.

Następnie doktorantka opisuje wyniki badań skupiających się na roli jonów wapnia w regulacji egzocytozy w astrocytach. Początkowo stosuje (S)-3,5-DHPG – agonistę receptora mGluR5, którego aktywacja powinna powodować uwolnienie wapnia zmagazynowanego w ER. Zastosowanie DHPG powodowało wzrost egzocytozy w hodowli astrocytarnej, ale efekt ten nie był widoczny w hodowli „hipokampalnej”. Z kolei blokowanie uwalniania Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej z zastosowaniem 2-APB i rianodyny nie niwelowało wywołanego stymulacją elektryczną wzrostu częstotliwości egzocytozy. Wyciągnięto wniosek, że jony Ca^{2+} pochodzące z siateczki śródplazmatycznej nie regulują egzocytozy w hodowli hipokampalnej. Ostatecznie zastosowano BAPTA, który buforuje wewnątrzkomórkowe jony Ca^{2+} , co całkowicie blokowało egzocytozę – zarówno w warunkach podstawowych, jak i po stymulacji elektrycznej. Kolejno stwierdzono, że brak jonów wapnia w środowisku zewnątrzkomórkowym hamuje nieco egzocytozę, ale nie blokuje jej nasilenia pod wpływem elektrostymulacji. W dalszych doświadczeniach stosowano bloker receptorów AMPA - NBQX, który znosił wpływ elektrostymulacji na egzocytozę w astrocytach.

W ostatniej części badań doktorantka skupiła się na zróżnicowaniu astrocytów hipokampa i kory nowej ze względu na częstotliwość egzocytozy. Stwierdza, że częstotliwość egzocytozy nie różni się istotnie pomiędzy astrocytami z hodowli hipokampalnej a astrocytami z hodowli korowej – również jeśli chodzi o wpływ elektrostymulacji. Usunięcie jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego nie skutkowało całkowitym zablokowaniem egzocytozy, natomiast chelatacja Ca^{2+} całkowicie blokowała egzocytozę. W przeciwieństwie do hodowli hipokampalnej, w hodowlach korowych TTX nie blokował wpływu elektrostymulacji na egzocytozę w astrocytach, co jest bardzo frapującą obserwacją. Jako uzupełnienie porównań hodowli hipokampalnych i korowych, zbadano także poziom transkryptu genu *Unc13c* wybranego na podstawie danych literaturowych. Wykazano, że jego poziom w astrocytach w hodowlach korowych jest istotnie niższy niż hipokampalnych, co jest sprzeczne z postawioną hipotezą.

Opisane doświadczenia zostały starannie zaplanowane (np. uwzględniono przeprowadzenie eksperymentów kontrolnych sprawdzających, czy długotrwała obserwacja mikroskopowa ma istotny wpływ na proces egzocytozy). Zostały także skrupulatnie przeanalizowane i opisane. Byłoby jednak lepiej stosować jednolitą terminologię określającą rodzaj hodowli. W tekście pojawiają się hodowle

astrocytarne, hodowle hipokampalne (rozumiane jako neuronalno-glejowe?), hodowle neuronalno-astrocytarne hipokampa, hodowle neuronalno-astrocytarne.

Dyskusja przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej odnosi uzyskane wyniki do istniejącego stanu wiedzy i porusza większość zagadnień nasuwających się podczas lektury rozprawy. Doktorantka posiada szeroką wiedzę w zakresie badanej tematyki, w tym dotyczącą zalet i ograniczeń stosowanych metod. Mgr Mielnicka nie ustrzegła się w Dyskusji skrótów myślowych i stwierdzeń, które nie są dla mnie zrozumiałe. Przykładowo, pisząc o coraz częstszej krytyce koncepcji regulowanej egzocytozy jako głównego mechanizmu glioprzeżywania pisze „Wydaje się więc, że obniżony poziom spontanicznej egzocytozy w astrocytach, który tutaj opisano wpisuje się w trend krytyki tego zjawiska jako mechanizmu glioprzeżywania”. Jakie jest właściwie zdanie doktorantki na ten temat? Niektóre z poruszonych wątków nie odnoszą się do zawartości pracy lub wydają się niedokończone. Przykładowo, autorka pisze o mechanizmie działania tapsygarginy oraz o stosowaniu myszy pozbawionych receptora IP3R2 – nie odnosi jednak tych informacji do swoich eksperymentów i uzyskanych wyników.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana starannie. W pracy pojawiają się pojedyncze błędy językowe lub niezbyt fortunate sformułowania. Pewnym mankamentem jest brak odwołań do rycin w tekście w sekcji Wstęp. Ryciny w tej sekcji pozbawione są graficznych legend, co utrudnia nieco ich odbiór ze względu na konieczność doczytania w opisie, czym są np. „czerwone trójkąty”. Zdarza się, że w opisie rycin nie podano liczby *n* dla niektórych wykresów (np. Rycina 11 C i D). Niestety w wersji papierowej rozprawy, którą otrzymałam, część stron (11-26) jest ‘do góry nogami’. Niektóre niefortunne sformułowania skutkują niejasnym lub błędnym przekazem, na przykład:

- Opis ryciny 1: mowa o uwolnieniu glioprzeżywników, „które uczestniczą w regulacji pobudliwości pobliskich neuronów poprzez aktywację ich receptorów NMDARs” – czy wszystkie glioprzeżywniki działają poprzez aktywację NMDARs?

- Tabela 1: czy enzymy proteolityczne można uznać za glioprzeżywniki?

- Strona 23: „całkowity zanik egzocytozy po odwrotnej delecji *Munc18-1*”. Co oznacza termin „odwrotna delecja”?

- strona 27: „geny utrzymujące porządek (*ang. housekeeping genes*)” – nie jestem przekonana, czy ten termin jest używany w polskim piśmiennictwie.

- fraza „analiza transkryptomu” (opis metod) wywołuje skojarzenie z technikami wysokoprzepustowymi typu RNAseq; jeśli chodzi o analizę poziomu ekspresji jednego genu (i genu kontrolnego), użycie tego określenia jest w moim odczuciu mylące.

W odniesieniu do opisu wyników i dyskusji nasuwają mi się następujące pytania:

1. Który typ pęcherzyków opisanych we wstępie obserwowano w badaniach? Czy na podstawie ich wielkości lub innych właściwości można wnioskować na ten temat? Czy podjęto próbę oceny wielkości pęcherzyków uwalnianych w różnych warunkach?

2. W hodowlach mieszanych środki farmakologiczne działają i na neurony i na astrocyty – jakie byłyby możliwe lepsze alternatywy? W związku z powyższym:

- a) Czy chelatacja Ca^{2+} nie będzie wpływać na neuroprzeżywalność i w efekcie na skutki elektrostymulacji hodowli?
- b) Doktorantka pisze, że NBQX zastosowano w celu „zablokowania AMPA na powierzchni astrocytów” – nie należy jednak zapominać, że te receptory na powierzchni neuronów także będą blokowane.
- c) Jak DHPG będzie działać na neurony? Czy mogłoby to (pośrednio) tłumaczyć brak wpływu DHPG na egzocytozę astrocytarną w hodowli mieszanej?
3. Dot. przedstawionych na rycinie 9 różnic w morfologii astrocytów w „hodowli astrocytarnej” oraz „hodowli hipokampalnej”. Doktorantka zakłada, że wynikają one z obecności neuronów. Astrocyty hodowane w obecności surowicy mają ‘poligonalną’ morfologię, a hodowane bez surowicy (a np. w obecności czynnika HB-EGF) mają morfologię bardziej ‘gwiazdzistą’. Czy obecność/brak surowicy w pożywce może tłumaczyć obserwowane różnice w morfologii?
4. Dot. doświadczeń porównujących hodowle hipokampalne i korowe. Czy proporcje neuronów i astrocytów w tych dwóch typach hodowli są podobne? Jakież? Z moich doświadczeń (choć z użyciem innego protokołu hodowli) wynika, że w hodowlach korowych udział astrocytów jest większy. Jak mogłoby to wpływać na wyniki doświadczeń i obserwowane różnice?
5. Batiuk i wsp. opisali 4 typy astrocytów występujących w mózgu, badając dorosłe mózgi. W jaki sposób te dane można odnieść do hodowli stosowanych w pracy, pozyskiwanych z osesków? Na ile własności wynikające z lokalizacji w mózgu zachowane są w hodowli *in vitro*?

Wniosek końcowy

Podsumowując, pomimo powyższych uwag oraz nasuwających się pytań, stwierdzam, że przedstawiona do oceny 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 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Aleksandry Mielnickiej **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Anne Malik

dr hab. Anna Malik

Rada Naukowa

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Aleksandry Mielnickiej

pt. „Mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach.”

OCENA FORMALNA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Mielnickiej została wykonana w Pracowni Neurobiologii Centrum Badań Plastyczności Neuronalnej i Chorób Mózgu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Funkcję promotora rozprawy powierzono Panu prof. dr hab. Leszkowi Kaczmarkowi, zaś funkcję promotora pomocniczego pełnił Pan dr Piotr Michaluk.

Rozprawa doktorska posiada klasyczny układ, typowy dla prac składanych w postaci tradycyjnej monografii; poszczególne części tj.: strona tytułowa, spis treści, informacja o źródle finansowania badań, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, opis stosowanych metod, omówienie wyników, dyskusja, podsumowanie i wnioski końcowe, wykaz wykorzystanych programów i zasobów literackich, spis literatury oraz zestawienie publikacji autorki publikacji, tworzą 108 stronicową całość. Tytuł pracy odnosi się do prezentowanej treści, zaś poszczególne części rozprawy zostały przygotowane poprawnie. Piśmiennictwo oparto na 197 pozycjach, i biorąc pod uwagę kilkudziesięcioletnią eksplorację tematu, zasadniczo opiera się na istotnych i przełomowych dla tego obszaru neurobiologii pracach, również z uwzględnieniem aktualnych pozycji literaturowych.

Wyniki badań będących podstawą recenzowanej pracy doktorskiej mgr Mielnickiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach realizacji projektu nr 2017/26/D/NZ3/01017 pozyskanego przez promotora pomocniczego w konkursie SONATA 13.

PROBLEM NAUKOWY ROZPRAWY

Astrocyty umiejętnie i precyzyjnie dostrajają transmisję synaptyczną poprzez swój udział w neuronalnej gospodarce energetycznej, metabolicznej, antyoksydacyjnej, neurotransmisyjnej, jak również w procesach synaptogenezy. Regulowana egzocytoza stanowi ewolucyjnie zachowany proces o zasadniczym znaczeniu dla wielu form komunikacji międzykomórkowej, szczególnie wykorzystywany w transmisji synaptycznej. Dowodzenie procesu egzocytozy w astrocytach opierało się na danych wskazujących, że astrocyty uwalniają glioprzebieżniki poprzez mechanizm pęcherzykowy, zależny od ewolucyjnie konserwatywnej rodziny białek SNARE, związanych z procesem egzocytozy. Wyniki innych badań przedstawiały dane dokumentujące, że astrocyty uwalniają przebieżniki w sposób nieregulowany, angażujący między innymi lizosomy, transportery

lub zlokalizowane w błonie plazmatycznej kanały (Hamilton i Attwell, 2010; Savtchouk i Volterra, 2018). Zarówno potwierdzenie obecności pęcherzyków wydzielniczych w astrocytach na poziomie ultrastruktury przy użyciu mikroskopii elektronowej, jak i dowody oparte na wykorzystaniu sygnalizacji wapniowej jako wskaźnika zastępczego do badania dynamiki uwalniania pęcherzyków w hodowli, czy dowody wskazujące na brak wpływu astrocytarnej sygnalizacji wapniowej na aktywność synaptyczną, nie dokonały przełomu w poznaniu, i w zrozumieniu szczegółów procesu, dlatego też pełne wyjaśnienie procesu angażującego pęcherzyki wydzielnicze w astrocytach, to trwający przedmiot badań. Problem można traktować niemal jako kwestię religijną, gdzie wierzący nie potrzebują dalszych dowodów, i odwrotnie, żadne dodatkowe dowody nie będą wystarczające dla przekonania nieprzekonanych.

Pani mgr Aleksandra Mielnicka prowadziła badania dotyczące procesu egzocytozy w astrocytach. W tym miejscu można uznać podjęcie tematu za równie odważne, co ryzykowne. Kandydatka zdefiniowała cel nadrzędny swojej pracy jako cyt. „*zbadaanie mechanizmów regulujących egzocytozę w astrocytach*”, który zapewne z zamiarem uszczegółowienia, niestety w efekcie - nadmiernie uproszczonego - rozwinęła w formie siedmiu zadań badawczych. Tutaj pozostaną przy wskazaniu, że zakres czynności kolejnych 2-6 punktów zawiera się w punkcie pierwszym; jednocześnie, usterkami natury semantycznej są w tej części: cyt. „*zbadaanie konieczności udziału jonów Ca^{2+} ...*” w punkcie 3 oraz cyt. „*ewaluacja wpływu aktywności neuronalnej i lokalizacji sygnałów Ca^{2+}* ”, w punkcie 6, co jest jednocześnie powtórzeniem treści punktu 2. Dobrym i oczekiwanym uzupełnieniem byłoby sformułowanie hipotezy badawczej, której niestety zabrakło w przedstawionej do recenzji pracy.

Proces egzocytozy mgr Mielnicka obrazowała wykorzystując mikroskopię fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia, zaś kwantyfikacji procesu dokonywała posługując się wartością określoną jako względny współczynnik egzocytozy, definiujący liczbę uwolnionych w ciągu 1 minuty pęcherzyków przypadających na $1\mu m^2$ powierzchni komórki; wartość była w dalszym etapie normalizowana względem poziomu bazowego dla danych warunków doświadczalnych.

Badania Doktorantki prowadzone były z wykorzystaniem materiału biologicznego, który stanowiły pierwotne hodowle jednorodne astrocytów i hodowle mieszane astrocytów i neuronów pozyskane z hipokampów oraz kory nowej szczurzych osesków P0 Wistar. Wariant białka zielonej fluorescencji podatny na zmiany pH (pHlouryna) tworzący białko fuzyjne z synaptobrewiną 2 (VAMP2) wykorzystano jako fluorescencyjny znacznik procesu egzocytozy. Autorka wykorzystując ilościową łańcuchową reakcję polimerazy (RT-qPCR) określiła poziom ekspresji genu *Unc13c*, jednocześnie identyfikując sekwencje RNA metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska jest opatrzona teoretycznym wstępem, którego założeniem jest prezentacja ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki z danego obszaru nauki. Tekst nie jest pozbawiony usterek, jednak zasadniczo przybliżyła, i w uproszczonej formie wprowadza czytającego w dany obszar neurobiologii. W tej części dysertacji odnajdujemy istotny dla kontekstu pracy opis zidentyfikowanych dotychczas mechanizmów gliotransmisji, a w dalszej części, dość szczegółowo scharakteryzowany mechanizm regulowanej egzocytozy. Tekst został wzbogacony czterema zapożyczonymi ilustracjami; typy pęcherzyków uwalnianych przez astrocyty, z ich

charakterystyką, przedstawiono w formie tabelarycznej. Tytuł rozdziału 3.3 niefortunnie zawęża opisywany proces do egzocytozy regulowanej, podczas gdy zawiera informacje również o egzocytozie konstytutywnej.

W kolejnym podrozdziale wstępu zatytułowanym „*Egzocytoza w astrocytach: identyfikacja niejasności w obszarze badań*” Doktorantka podjęła karkołomną w realizacji próbę przedstawienia czytającemu „czarnych dziur” eksplorowanego w doktoracie obszaru neurobiologii. Pani mgr Mielnicka trafnie podkreśla, że cyt. „*komórki nerwowe są odpowiedzialne za indukcję wielu genów specyficznych dla astrocytów obecnych in vivo*” (praca Hasel i wsp. 2017; Cahoy i wsp. 2008; i in. porównująca profile ekspresji genów wyizolowanych astrocytów mózgu z mieszanymi hodowlami komórkowymi astrocytarno-nauralnymi), jakkolwiek znaczenia powyższych spostrzeżeń dla własnych badań, poza zdawkowym potwierdzeniem ich wagi, nie wyjaśnia. W tym miejscu nasuwa się pytanie konkretnie odnoszące się do badanego w dysertacji genu *Unc13c* kodującego białko Munc 13-3. Czy w cytowanych pracach, porównujących profile ekspresji genów w różnych układach, Doktorantka znalazła informacje o warunkach determinujących ekspresję genu *Unc13c*?

W ostatnim akapicie tego zdawałoby się kluczowego dla zrozumienia celu wykonywanych w dysertacji badań rozdziału, Kandydatka wzmiankuje o znaczeniu dla regulacji przekazywania synaptycznego metabotropowych receptorów dla glutaminianu, zlokalizowanych w błonie komórkowej astrocytów, których aktywacja prowadzi do uwolnienia glioprzekazników, jednak ponownie, znaczenie tej informacji dla własnych badań pozostaje niesprecyzowane. W mojej ocenie, odbiegając od napotkanych usterek, rozdział ten powinien zamykać cały wstęp, i znajdować się bezpośrednio przed celami pracy.

Ostatni podrozdział wstępu podkreśla zidentyfikowaną różnorodność astrocytów, zależną i charakterystyczną dla danego obszaru mózgu. W tej części Kandydatka przytacza informacje dotyczące identyfikacji w mózgu myszy kilku typów astrocytów, charakteryzujących się specyficznym profilem ekspresji genów (m.in. *Agt* i *Unc13c*) i ich określoną lokalizacją w mózgu. Dosyć ogólne znaczenie tego tekstu nabierze znaczenia po lekturze kolejno prezentowanych celów rozprawy. Analizując całościowo, jednoznaczne wskazanie istoty prowadzonych badań powinno zostać precyzyjnie wyrażone, zaś płynność przekazu niektórych wątków podjętych we wstępie wymagałyby rozwinięcia i „wygładzenia”.

Konkretyzując założenia rozprawy przedstawione na kolejnej stronie, Doktorantka postanowiła scharakteryzować proces egzocytozy w astrocytach, skupiając się na ocenie procesu w zależności od typu hodowli (monokultura vs. hodowla mieszana), pochodzenia tkanki (kora nowa vs. hipokamp), z uwzględnieniem stymulacji elektrycznej komórek (egzocytoza stymulowana), czy jej zależności od zdefiniowanego pochodzenia jonów wapnia [Ca^{2+}], poza tym, Doktorantka określiła poziom ekspresji mRNA genu kodującego *Unc13c* w astrocytach w danych warunkach doświadczalnych.

Sekcja Materiały i Metody zawiera konkretne informacje, które umożliwiają zapoznanie się z zastosowanymi technikami, oraz powtórzenie doświadczeń. W tej części rozprawy tekst, który zamieściła Doktorantka, jest niezwykle dosłowny w przekazie i wybrzmiewa nazbyt często kolokwialny język, którego stosowanie w tego typu pracach nie jest rekomendowane (cyt. *pstrykając w stożkowe dno palcem; sprokurowane ze szczurzych hipokampów; przedsięwzięty okres hodowli; szczątki komórkowe*; itd.). Niektóre informacje wydają się zbędne (np. montaż szkiełka nakrywkowego w komorze), niektóre zaś powinny zostać opisane dokładniej. Dotyczy to m. in. ustalenia i stosowania w doświadczeniach danych warunków stymulacji elektrycznej

komórek, o sprecyzowanie czego proszę Doktorantkę w trakcie obrony; nie zamieszczono informacji o liczbie użytych osesków, ani danych na podstawie których oszacowano i przyjęto daną liczbę analizowanych komórek. Proszę o odniesienie się całościowo do liczby analizowanych astrocytów odnosząc się do wykonanych doświadczeń w całej pracy. W formie tabelarycznej Doktorantka przedstawiła bufory i ich skład, stosowane odczynniki, itp.

Rozdział wyniki Kandydatka podzieliła na osiem podrozdziałów. Jest to dokumentacja badań, oparta na ośmiu złożonych rycinach. Zamieszczone ryciny i zdjęcia są odpowiedniej jakości i rozdzielczości niebudzącej zastrzeżeń. Autorka stosuje w tej sekcji język opisowy, wyjaśniając założenia przeprowadzonego eksperymentu, wprowadza ponownie długie fragmenty teoretyczne, powtarzając informacje z innych rozdziałów pracy. Uwaga nadrzędna do rozdziału: nomenklatura używanych w analizach hodowli komórkowych w zależności od przyjętych wariantów powinna zostać zdefiniowana i zamieszczona na początku rozdziału, a potem konsekwentnie stosowana. Dużym uproszczeniem jest nazywanie mieszanej hodowli astrocytarno-neuronalnej - „hodowlą hipokampalną” a „hodowli astrocytów” – zarówno astrocytami hipokampa jak i kory nowej. Wybrana przez Doktorantkę forma i styl prezentowania wyników nie ułatwia ich zrozumienia, dlatego całościowo efekt badań przedstawię na końcu, zaś komentarze do poszczególnych podrozdziałów zamieszczam zgodnie z planem przyjętym przez mgr Mielnicką.

Rozdział 6.1 odnosi się do doświadczeń wykonanych na hodowli astrocytów hipokampa i hodowli astrocytarno-neuronalnej hipokampa; Doktorantka potwierdziła zależność między bardziej złożoną morfologią astrocytów, a obecnością neuronów w hodowli, co korelowało z poziomem intensywności fluorescencji, odniesionym do wartości względnego współczynnika egzocytozy; tu rozumianym jako spontaniczna egzocytoza.

W rozdziale 6.2 Doktorantka potwierdziła zależność częstotliwości egzocytozy od pobudzenia w hodowli astrocytarno-neuronalnej hipokampa; w pracy zastosowano stymulację elektryczną opierając się na zdefiniowanych parametrach z cytowanej pracy Tagliatti i wsp., 2020, w której badano hodowle mysich neuronów korowych. Czy i w jaki sposób Doktorantka optymalizowała warunki stymulacji?

W kolejnym podrozdziale Doktorantka potwierdziła i) związek egzocytozy w hodowli astrocytów hipokampa z aktywacją metabotropowych receptorów dla glutaminianu grupy I; ii) brak powyższej zależności w hipokampalnej hodowli mieszanej; iii) wpływ modulowania uwalniania jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej na mierzony współczynnik egzocytozy po stymulacji elektrycznej w hodowli mieszanej hipokampa; iv) zależność stymulowanej egzocytozy astrocytów od zewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} w hodowli mieszanej hipokampa. Proszę o komentarz, czy rycina 11D oparta jest na pomiarze wykonanym w jednej komórce? W dalszej części wykazano brak wpływu blokowania receptorów AMPA na proces stymulowanej egzocytozy w astrocytach w hodowli mieszanej hipokampa. Proszę o wyjaśnienie rozbieżności między wynikami przedstawionymi na Rycinie 11D i 12C.

W rozdziale 6.5 Doktorantka wykazała, że rodzaj hodowli uwzględniający różnice regionalne mózgu szczura (hipokamp vs. kora nowa) nie miał wpływu na wartość względnego współczynnika egzocytozy w astrocytach. Dobrze byłoby skonfrontować wartości przedstawione na rycinach 10 i 14; czy 10E i 14C (hodowla mieszana z hipokampa) prezentują te same dane? Wydaje mi się, że Doktorantka nie zamieściła ryciny 14B; proszę o wyjaśnienie. Pani mgr Mielnicka w tej części pracy pisze cyt. *”o potwierdzeniu hipotezy, że zastosowanie elektrycznej stymulacji wpływa na aktywność neuronalną, regulując częstotliwość egzocytozy w astrocytach hipokampa”*; nie

znalazłam w odpowiedniej sekcji tak postawionej hipotezy. Wyniki badania zależności od jonów Ca^{2+} stymulowanej egzocytozy w astrocytach w hodowli mieszanej pochodzącej tym razem z kory nowej, Doktorantka przedstawiła w kolejnym rozdziale 6.7. Uważam, że z powodzeniem można było wkomponować wykresy 15A i 15B do wcześniejszych rozdziałów, chociaż rozumiem zamierzenie, w istocie, nie wszystkie mierzone parametry w każdym z badanych wariantów hodowli są identyczne. Proszę o wyjaśnienie informacji umieszczonej w rozdziale 6.8. cyt. *”Najpierw przeprowadzono serię eksperymentów mających na celu porównanie poziomu mRNA Unc13c zarówno w hodowlach astrocytarnych jak i w hodowli hipokampalnej i korowej... (rycina 16A).”* Zakładając, że rycina 16.A przedstawia wynik dokumentujący brak zmian między astrocytami hipokampa i kory nowej w poziomie ekspresji mRNA genu *Unc13c*, podpis pod ryciną implikujący wynik odmienny - wyższy poziom ekspresji w hodowli pochodzącej z hipokampa (cyt. *„Dysocjowane pierwotne hodowle hipokampalne charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji genu niż w przypadku neuronalno-astrocytarnych hodowli pozyskanych z kory nowej”*) jest co najmniej nieprecyzyjny. Czy wykres 16A uwzględnia różnice regionu mózgu jednorodnych hodowli astrocytarnych, zaś 16C astrocytarno-neuronalnych? Jak wobec cytowanej treści zinterpretować rycinę 14C dokumentującą różnicę - wyższy względny współczynnik egzocytozy po stymulacji hodowli mieszanej kory nowej?

Dla przejrzystości przekazu i klarownego podsumowania wyników pracy, pomocna byłaby tabelaryczna prezentacja wyników, ewentualnie inna forma stosowana w rozprawach.

Podsumowując, wykonane przez Kandydatkę badania pozwoliły jednocześnie scharakteryzować i ocenić na podstawie zdefiniowanej wartości, proces egzocytozy w astrocytach, w zależności od typu hodowli (monokultura vs. hodowla mieszana), pochodzenia tkanki (kora nowa vs. hipokamp), z uwzględnieniem stymulacji elektrycznej komórek (egzocytoza stymulowana), i zależności od zdefiniowanego pochodzenia jonów wapnia; identyfikacja astrocytarnej egzocytozy została poszerzona o analizę poziomu ekspresji genu *Unc13c* kodującego białko należące do rodziny białek Munc13 zaangażowanych w etap cumowania pęcherzyków w procesie egzocytozy, co stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W dyskusji, objętościowo skromniejszej, Autorka na dwóch pierwszych stronach prezentuje teoretyczne wprowadzenie, po którym wymienia w punktach obserwacje, będące rezultatem wykonanych doświadczeń. W mojej ocenie zabieg nie jest potrzebny, zwłaszcza, że w dalszej części dysertacji jest temu dedykowany rozdział „Podsumowanie i wnioski”. Mam pytanie do informacji zamieszczonej na str. 79 cyt. *„Wyniki przedstawione w tej pracy odnoszą się do najnowszych doniesień o molekularnej różnorodności astrocytów, determinowanej przez region mózgu, w którym występują. Ukazują one różnice w przebiegu egzocytozy pomiędzy astrocytami z hodowli neuronalno-astrocytarnych pozyskanych odpowiednio z hipokampów i kory nowej.”* Prosiłabym o wskazanie wyniku własnego, którego dotyczy to stwierdzenie. Dalej, prosiłabym o sprecyzowanie w jaki sposób cyt. *”wyniki te zwracają uwagę na transkryptom hodowli neuronalno-astrocytarnych hipokampa oraz kory nowej w kontekście przebiegu procesu egzocytozy i określają różnice w poziomie mRNA Unc13c.”* Wydaje mi się, że uproszczenie i komplikacja tych stwierdzeń jest zbyt duża.

Dyskusja jest nierówna merytorycznie, chociaż Autorka stara się odnosić i konfrontować wyniki swoich badań z wiedzą literaturową, w niektórych miejscach treść jest z wynikami dość luźno powiązana, czasem stanowiąc powtórzenia treści innych rozdziałów; niektóre przykłady: str. 83, str. 84, str. 87. W dyskusji (str. 85) Doktorantka łączy brak procesu egzocytozy astrocytarnej po

stymulacji elektrycznej w środowisku pozbawionym jonów Ca^{2+} z brakiem uszkodzeń błon astrocytarnych. Na podstawie jakich analiz (mikroskopia TEM? Inne?) wysunięto to twierdzenie? Czy jest to niewyrażona wprost implikacja, że egzocytoza jest wynikiem uszkodzeń błony komórkowej astrocytów?

Dobłą praktyką jest konkretne wskazanie wyników stanowiących oryginalne, autorskie osiągnięcie, i wyników, które są częściowym odtworzeniem i/lub potwierdzeniem obecnego stanu wiedzy. Poprawnego metodycznie przeprowadzenia skomplikowanych analiz i zastosowania mikroskopii TIRF do własnych badań również nie można uznać za nowatorskie, o ile nie są jasno zdefiniowane zastosowane nowe rozwiązania. Jak słusznie zauważa Autorka, tego typu badania były, i są prowadzone w innych ośrodkach naukowych, przytoczę prace grupy prof. Zoreca (Zorec i wsp. 2012; Pangrsic i wsp. 2007) czy Malarkey i Parpura, 2011; Bezzi i wsp. 2004. Proszę o komentarz i próbę wyjaśnienia dyskrepancji między wynikami poziomu ekspresji genu *Unc13c*, a pracą Batiuk i wsp. 2020. Proszę również o uzasadnienie i odniesienie się do wyboru jednego genu do analizy.

Mam komentarz do rozdziału 7.8 (Przyszłe kierunki badań), który pod obiecującym tytułem nie zawiera konkretnych wskazań. Chętnie usłyszę w trakcie obrony jakie przyszłe kierunki i cele stawia przed sobą, lub widzi w tym obszarze badań Kandydatka.

W rozdziale 8 (Podsumowanie i wnioski końcowe) po raz kolejny zostały przedstawione poszczególne jednostkowe wyniki; Doktorantka nie przedstawia również, chociaż zapowiada, końcowych wniosków płynących z własnych badań, dlatego proszę o uwzględnienie tego elementu w trakcie obrony.

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Mielnickiej dowodzi realizacji założonych celów pracy, a uzyskane wyniki wpisują się w znany, równocześnie w dalszym ciągu eksplorowany obszar neurobiologii o dużym znaczeniu poznawczym.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr Aleksandry Mielnickiej w dyscyplinie nauki biologiczne i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych z zastosowaniem wybranego warsztatu metodycznego.

Doktorantka sprawnie posługuje się technikami optycznymi, które wykorzystwała do rozwiązania postawionych pytań badawczych z obszaru neurobiologii. Potrafi przedstawić wyniki badań i podejmuje się interpretacji ich znaczenia w odniesieniu do istniejącej literatury.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone 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.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Aleksandry Mielnickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Prof. Magdalena Zielińska