Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Dr hab. Danuta Jantas
Zakład Biochemii Mózgu

Kraków, dnia 27.03.2025 r.

# RECENZJA
## rozprawy doktorskiej mgr Julii Masternak
## p.t. „Różnice w plastyczności synaptycznej w podregionach hipokampu zależne od receptora 5-HT7"

sporządzona dla Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Praca doktorska mgr Julii Masternak została wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod opieką naukową dr hab. Moniki Bijaty. Badania sfinansowano ze środków pozyskanych przez dr hab. Monika Bijatę w ramach grantu NCN SONATA 15 (NCN nr 2019/35/D/NZ4/02042, *„Lokalizacja ma znaczenie - Zależna od receptora 5-HT7 plastyczność strukturalna w podregionach hipokampa"* ) oraz grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej Homing (FNP Homing POIR.04.04.00-00-43BC/17-00, *„Serotonin-dependent trans-synaptic mechanism of extracellular matrix modifier release"*).

Rozprawa doktorska dotyczy pogłębienia badań nad molekularnymi mechanizmami działania szlaku zależnego od receptora serotoninowego podtypu 7 (5-HT7R) oraz jego wpływu na plastyczność strukturalną hipokampu. Tematyka badań została zapoczątkowana przez promotor rozprawy, która wraz ze współpracownikami w roku 2017 w hodowlach pierwotnych hipokampalnych komórek nerwowych oraz w hodowlach organotypowych hipokampu zaobserwowała po raz pierwszy, że stymulacja receptora 5-HT7 może regulować plastyczności synaptyczną poprzez aktywację metaloprotinazy-9 (MMP-9) i modulację macierzy zewnątrzkomórkowej, co funkcjonalnie może przejawiać się spadkiem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP). Wykazano wtedy, że niespecyficzny agonista 5-HT7R, 5-CT (*5-carboxamidotryptamine*) wpływa na wydłużenie kolców dendrytycznych i efekt ten jest zależny od receptora 5-HT7, co zostało zweryfikowane z użyciem specyficznego antagonisty 5-HT7R, SB269970 oraz hodowli komórek hipokampalnych pochodzących od zwierząt pozbawionych receptora 5-HT7 (5-HT7 KO). Pobudzenie 5-HT7R prowadziło do aktywacji MMP-9, proteolizy białka transbłonowego CD44 i aktywacji białka z rodziny Rho GTPaz, Cdc42 co w konsekwencji wywoływało zmiany w cytoszkielecie aktynowym kolców dendrytycznych skutkujących wydłużeniem kolców oraz spadkiem ich gęstości (Bijata i wsp., 2017). W ramach pracy doktorskiej zweryfikowano te wcześniejsze obserwacje tym razem w modelu *in vivo*, gdzie szczegółowo przebadano zmianę w morfologii kolców dendrytycznych w różnych podregionach hipokampu (CA1, CA3 i DG) po jednorazowym oraz chronicznym podaniu agonistów 5-HT7R (LP-211 i AGH-194), zbadano mechanizm aktywacji MMP-9 (weryfikacja udziału białek Gαs i Gα12), jak również zbadano profil aktywności małych białek G z rodziny GTPaz uczestniczących w modulacji kolców dendrytycznych (Cdc42 oraz RhoA). Badania poszerzono także o model *in vitro* hodowli komórek ziarnistych hipokampu, gdzie zaobserwowano podobny profil zmian po stymulacji agonistą

5-HT7, LP-211 co u zwierząt doświadczalnych w rejonie DG hipokampu. W końcowym etapie, sprawdzono także odpowiedź behawioralną zwierząt po jednorazowym oraz chronicznym podaniu AGH-194, mierząc ich wpływ na aktywność lokomotoryczną, a także odpowiedź w testach służących do oceny fenotypu pro-depresyjnego u zwierząt (test zawieszenia za ogon, test preferencji sacharozy). Wykazano, że aktywacja 5-HT7R jest istotna w regulacji plastyczności strukturalnej w hipokampie i jej efekt po jednorazowym podaniu agonistów tego receptora jest zależny nie tylko od podregionu hipokampu, ale także od rodzaju użytego agonisty 5-HT7R. Natomiast chroniczne podanie agonisty 5-HT7R, AGH-194 nie zmieniało morfologii ani gęstości kolców dendrytycznych, wskazując na przejściowy i adaptacyjny charakter wywoływanych przez 5-HT7R zmian. Potwierdzono w modelu *in vivo* aktywację MMP-9 w hipokampie po podaniach agonistów 5-HT7R, która była na podobnym poziomie w różnych jego podregionach i wykazano kluczowy udział Gαs w tym procesie. Ponadto wykazano zróżnicowaną aktywację białek RhoA oraz Cdc42 w zależności od badanego podregionu hipokampu, aczkolwiek wyniki te nie są konkluzywne, gdyż zaobserwowano rozbieżności w wynikach pomiędzy zastosowanymi dwoma metodami badawczymi (metody biochemiczne oraz metoda FLIM). Wykazano także odmienny wpływ agonisty 5-HT7R, AGH-194 na mierzone parametry behawioralne, w porównaniu do wcześniejszych badań przeprowadzonych z agonistą LP-211 który wykazał działanie prodepresyjne (Bijata i wsp., 2022).

## OCENA FORMALNA ROZRAWY

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim w formie monografii z podziałem na rozdziały: Wstęp (18 stron), Cele pracy (1 strona), Materiały i metody (20 stron), Wyniki (30 stron), Dyskusja (15 stron), Podsumowanie i wnioski (1,5 strony), Bibliografia (238 numerowanych pozycji piśmiennictwa w porządku alfabetycznym) oraz Spis publikacji własnych (5 pozycji). Poza tym praca zawiera stronę tytułową, stronę z podziękowaniami, stronę z informację o finansowaniu badań, dwustronicowy spis treści oraz jednostronicowe streszczenia w języku polskim oraz języku angielskim. Całościowo praca liczy 120 stron, z czego zasadniczy tekst rozprawy (od Wstępu do Podsumowań i wniosków) to 86 stron wliczając w ten zakres umieszczone w tekście ryciny (30 szt.) oraz tabele (3 szt.). Nie mam uwag jeżeli chodzi o stronę formalną rozprawy doktorskiej, została ona przygotowana bardzo starannie, tekst rozprawy jest opisany poprawną polszczyzną, ryciny i tabele są nie tylko przejrzyste i czytelne, ale zostały także przygotowane bardzo dobrze od strony wizualnej.

## OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

**WSTĘP** składa się z czterech podrozdziałów i wprowadza czytelnika w obszary zagadnień powiązanych pośrednio i bezpośrednio z podjętą w rozprawie tematyką badawczą. Rozdział ten rozpoczyna liczący 5 stron i zawierający 3 ryciny poglądowe podrozdział *„1.1. Neuronalna plastyczność synaptyczna"*. Autorka podaje w nim między innymi definicję plastyczności neuronalnej, jej znaczenie oraz rodzaje, a także nakreśla rys historyczny badań prowadzonych nad tym obszarem oraz udział w nich polskiego naukowca Jerzego Konorskiego. Kolejno, w sposób wyczerpujący przedstawia zagadnienie plastyczności synaptycznej, jej przejawy i składowe. Opisuje budowę komórki nerwowej, sposoby przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami nerwowymi, budowę i rodzaje synaps, różne rodzaje neuroprzekaźników i sposób ich działania poprzez receptory metabotropowe oraz jonotropowe. Opisuje także udział komórek glejowych (synapsa potrójna), a

także macierzy zewnątrzkomórkowej (synapsa poczwórna) w funkcjonowaniu synaps oraz kontroli mechanizmów plastyczności neuronalnej. W kolejnej części tego podrozdziału Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje budowę, rodzaje oraz funkcje kolców dendrytycznych, ich dynamiczny charakter i zmiany jakim podlegają zarówno w zjawiskach fizjologicznych, jak i patologicznych. W kolejnym podrozdziale Wstępu (*„1.2. Receptory serotoninowe"*) na prawie 7 stronach zilustrowanych 2 rycinami przedstawiona jest najpierw ogólna klasyfikacja receptorów serotoninowych, ich rozmieszczenie, rola w regulacji wielu procesów, ich udział w patomechanizmie niektórych chorób OUN (np. depresja, autyzm, schizofrenia), sposób aktywacji receptorów w zależności od podtypu i zaangażowanie różnego typu wtórnych przekaźników wewnątrzkomórkowych, a także opisuje modyfikacje potranslacyjne które mogą zmieniać aktywność receptorów serotoninowych. Kolejno w sposób bardzo szczegółowy zostaje opisany receptor 5-HT7 pod kątem jego budowy, istniejących izoform, aktywowanych ścieżek wewnątrzkomórkowych, sposobu regulacji jego funkcji, rozmieszczenia w OUN oraz na obwodzie, roli fizjologicznej i patologicznej. Dodatkowo, opisano mechanizm wpływu aktywacji receptora na morfologię kolców dendrytycznych w hipokampie i jego znaczenie w indukcji zachowań pro-depresyjnych u zwierząt. W końcowej części tego podrozdziału opisano także możliwość farmakologicznej blokady aktywności tego receptora w celu uzyskania efektu przeciwdepresyjnego (selektywni odwrotni agoniści) oraz wskazano na stosowane w klinice leki przeciwdepresyjne oraz przeciwpsychotyczne, które w swoim działaniu zawierają komponentę blokowania funkcji 5-HT7R. Na kolejnych 2,5 stronach Autorka w podrozdziale *„1.3. Rodzina małych Rho GTPaz"* dosyć szczegółowo zapoznaje czytelnika z rodziną małych białek Rho, ich budową, rodzajami, sposobem aktywacji, rolą w synaptogenezie i przebudowie kolców dendrytycznych, interakcjami z cytoszkieletem, wpływem na procesy fizjologiczne oraz udziałem w rozwoju różnego typu patologii OUN. Ostatnim podrozdziałem Wstępu jest część poświęcona budowie i roli hipokampu (*„1.4. Struktura i funkcja hipokampu"*), gdzie Autorka na 3 stronach i z pomocą jednej ryciny zapoznaje czytelnika z lokalizacją tej struktury w mózgu, jego kształtem, częściami, szczegółową budową komórkową poszczególnych jego części (CA1, CA2, CA3 i DG), jego kluczowymi funkcjami a także opisuje zmiany strukturalne w hipokampie jakie są powiązane z licznymi chorobami neurodegeneracyjnymi oraz neuropsychiatrycznymi (w tym z zaburzeniami depresyjnymi).

W mojej ocenie informacje przedstawione przez mgr Julię Masternak we Wstępie rozprawy doktorskiej, a podsumowane skrótowo powyżej, niewątpliwie **spełniają kryterium ustawowe rozpraw doktorskich dotyczące ogólnej prezentacji wiedzy teoretycznej osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie.** Wybrane zagadnienia zostały przedstawione w sposób optymalny, z zachowaniem rozsądnego stopnia ogólnego stopnia opisu zjawisk, a pogłębieniem opisu o szczegóły tylko dla zagadnień bezpośrednio powiązanych z podjętą tematyką badawczą rozprawy. Sprawia to, że rozdział ten czyta się dobrze, bez uczucia przeciążenia nadmiarowością informacji. Świadczy to nie tylko o szerokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki, ale także o umiejętności selekcji materiału i przejrzystego przedstawiania zagadnień naukowych. Ponadto opisy zostały uzupełnione bardzo dobrej jakości rycinami poglądowymi przygotowanymi przez Autorkę w programie BioRender.com. Odnośnie Wstępu mam tylko jedną uwagę – w mojej opinii na początku tego rozdziału zabrakło pewnego rodzaju wprowadzenia w rozprawę, w którym byłby podany także aspekt translacyjny podjętej tematyki badawczej (istotność dla poznania mechanizmów zaburzeń depresyjnych). Pomimo, że został on zasygnalizowany w Streszczeniu, to moim zdaniem można byłoby to poszerzyć dodając do Wstępu osobny podrozdział *„Wprowadzenie"*, gdzie można

byłoby przedstawić więcej szczegółów tego zagadnienia. Pozwoliłoby to czytającemu na zorientowanie się nie tylko w naukowej, ale także klinicznej istotności podjętych badań.

W rozdziale **CELE PRACY**, przed sformułowaniem ogólnego celu pracy oraz trzech celi szczegółowych, Autorka krótko uzasadnia podjętą tematykę badawczą w świetle istniejących danych z tego obszaru. Cel ogólny pracy doktorskiej został jasno sformułowany i dotyczył szczegółowego zbadania molekularnych mechanizmów działania szlaku zależnego od receptora 5-HT7 oraz jego wpływu na zmiany w morfologii i funkcji kolców dendrytycznych. W celach szczegółowych zostały doprecyzowane etapy tych badań w postaci: i) sprawdzenia, czy stymulacja 5-HT7R *in vivo* powoduje zmiany kształtu i gęstości kolców dendrytycznych w hipokampie; ii) zbadanie mechanizmu aktywacji MMP-9 i określenie, czy jest on zależny od białek $G\alpha_s$ lub $G\alpha_{12}$; iii) zbadanie profilu aktywności białek RhoA oraz Cdc42 w poszczególnych podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT7R. W mojej opinii cel ogólny i cele szczegółowe są wysoce zasadne i zostały sformułowane w sposób jasny i przejrzysty. Ponadto, posiadają wysoki aspekt nowości w podjętym obszarze badawczym.

Rozdział **MATERIAŁY I METODY** rozpoczyna podrozdział *„3.1. Stosowane roztwory i odczynniki chemiczne"* w którym Doktorantka umieszcza w dwóch tabelach wykorzystane w badaniach roztwory oraz odczynniki chemiczne. W kolejnym podrozdziale (*„3.2. Zwierzęta"*) opisuje zwierzęta wykorzystane do badań (dwumiesięczne samce szczepu C57BL/6J) z podaniem szczegółów ich bytowania, a także podaje numer zgody I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (927/2019) na przeprowadzenie badań. W kolejnych dwóch podrozdziałach są opisane szczegółowe procedury wykonane na zwierzętach w postaci dootrzewnowych iniekcji agonistów 5-HT7R (LP-211 oraz AGH-194) u myszy (*„3.3. Dootrzewnowe iniekcje u myszy"*) oraz wykonanych operacji stereotaktycznych (*„3.4. Operacje stereotaktyczne"*) w celu dohipokampalnego podania wektorów AAV niosących sekwencje shRNA (shRNA scramble, shRNA Gαs, shRNA Gα12) lub sekwencje kodujące biosensory aktywności RhoA lub Cdc42. W podrozdziale *„3.5. Testy behawioralne"* zostały szczegółowo opisane zastosowane metody badające zachowanie zwierząt w celu określenia fenotypu pro-depresyjnego (SPT - test preferencji sacharozy, TST – test zawieszenia za ogon) oraz potencjalnego wpływu badanych agonistów 5-HT7R na aktywność lokomotoryczną zwierząt. W kolejnym podrozdziale tj. *„3.6. Techniki biochemiczne"* opisano w sposób szczegółowy zastosowane metody biochemiczne w postaci osobnych części opisujących: oczyszczanie żelatynaz, elektroforezę białek w żelu denaturującym, zymografię żelową, metodę Western blot czy test aktywności RhoA/Cdc42. W podrozdziale *„3.7. Badanie struktury kolców dendrytycznych"* opisano dosyć dokładnie znakowanie neuronów, obrazowanie oraz analizę kolców dendrytycznych. W kolejnych dwóch podrozdziałach przedstawiono badania przeprowadzone w pierwotnych hodowlach neuronalnych komórek hipokampalnych (*„3.8. Pierwotna hodowla neuronalna"*) oraz przeprowadzone obrazowanie przyżyciowe tych komórek w celu szczegółowej analizy morfometrycznej kolców dendrytycznych (*„3.9. Obrazowanie przyżyciowe neuronów hipokampu in vitro"*). W przedostatnim rozdziale (*„3.10. Obrazowanie i pomiar zmian aktywności białek metodą FLIM"*) opisane zostały doświadczenia na zwierzętach, przygotowanie materiału oraz wykonanie zaawansowanego obrazowania (obrazowanie czasu życia fluorescencji - FLIM) w celu pomiaru aktywności białek RhoA oraz Cdc42. Ostatni podrozdział rozdziału Materiały i metody to opis zastosowanych analiz statystycznych do otrzymanych rezultatów z poszczególnych metod badawczych (*„3.11. Analiza statystyczna wyników"*).

W pracy doktorskiej zastosowano imponujący zestaw różnych modeli i metod badawczych w których Doktorantka niewątpliwie miała dominujący udział. Zastosowane podejście eksperymentalne jest wielokierunkowe, zawiera doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach, ale także badania przeprowadzone w modelach komórkowych. Ponadto, zastosowano różne metody badawcze pozwalające na ocenę zachowań zwierząt (trzy testy behawioralne), pomiar aktywności metaloproteinaz oraz ekspresji niektórych białek (testy biochemiczne), weryfikację zaangażowania niektórych ścieżek sygnalizacyjnych (wyciszenie genów z użyciem metody shRNA), analizę morfometryczną kolców dendrytycznych *ex vivo* i *in vitro*, a także zastosowanie zaawansowanej techniki do badania aktywności *ex vivo* niektórych białek (metoda FLIM). Wszystkie te metody zostały opisane przez Doktorantkę w sposób logiczny i dosyć szczegółowy, co może zostać wykorzystane przez inne zespoły badawcze zajmujące się podobną tematyką badawczą, a także może być bardzo pomocne dla osób rozpoczynających pracę naukową i chcących zapoznać się z metodami stosowanymi w obszarze badań działania farmakologicznego związków na plastyczność synaptyczną. **Na podstawie wyżej wymienionych argumentów należy uznać ze warunek ustawowy rozpraw doktorskich dotyczący wykazania umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr Julię Masternak został spełniony.**

Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na kilka szczegółów, które moim zdaniem powinny się znaleźć w opisie zastosowanego warsztatu metodycznego oraz na elementy wymagające dodatkowych wyjaśnień:

- w Tabeli 2, ale także w wykazie skrótów dobrze by było podać nazwy chemiczne dla LP-211 oraz AGH-194; ponadto w Tabeli 2 powinien być wylistowany AGH-194, z podaniem źródła jego pochodzenia (informację na ten temat możemy dopiero znaleźć w rozdziale Dyskusja);

- w podrozdziale 3.3 byłoby warto uzasadnić dobór dawki 10 mg/kg do dootrzewnowych podań LP-211 oraz AGH-194, w tym miejscu moim zdaniem powinny być także opisane eksperymenty z chronicznym podaniem AGH-194, a które zostały przedstawione w podrozdziale 3.5.1;

- w podrozdziale 3.3. przy opisie dootrzewnowych podań podano informacją: „Przed wykonaniem iniekcji dootrzewnowych myszy zostały wprowadzone w narkozę za *pomocą izofluranu*" - proszę o wyjaśnienie co było powodem zastosowania tego niestandardowego podejścia? Czy przy podaniach chronicznych AGH-194 także zastosowano tę procedurę?

- podrozdział 3.4. powinien mieć raczej nazwę *„Operacje stereotaktyczne i domózgowe podania wektorów AAV"* co bardziej odzwierciedla zawartość tej części rozprawy, ponadto w tym podrozdziale powinno zostać podane źródło lub szczegóły dotrzymania poszczególnych wektorów wirusowych AAV oraz ilość podanych wektorów;

- w podrozdziale 3.5.1 brakuje informacji o zastosowanej dawce AGH-194 do podań chronicznych;

- z opisu metodyki nie jest jasne czy do części behawioralnej używano osobnych kohort zwierząt niż do części biochemicznej lub tej dotyczącej obrazowania;

- w podrozdziałach 3.6.4, 3.6.5 oraz 3.6.5 brakuje informacji o ilości białka nakładanego do studzienek w żelu poliakrylamidowym;

- w podrozdziale 3.6.4 nie podano w jaki sposób było oznaczane białko kontrolne (GAPDH) na membranach i w jaki sposób analizowano i przedstawiono wyniki z metody Western blot;

- w podrozdziale 3.6.5 brak szczegółów dotyczących zastosowanego przeciwciała monoklonalnego do aktywnej formy RhoA (RhoA-GTP) oraz białka fuzyjnego GST-PAK-PBD (producent, rozcieńczenie, bufor blokujący);

- w podrozdziale 3.8 nie podano w jaki sposób liczono komórki, w jakiej gęstości były one wysiewane na szalki hodowlane i jaki sposób i jak często wymieniono pożywkę hodowlaną w trakcie trwania hodowli;

- w podrozdziale 3.9 podano informację, że do stymulacji 5-HT7R wykorzystano 10 mM LP-211 - wątpliwość budzi zastosowane bardzo wysokie stężenie tego agonisty, które z pewnością nie można uznać za specyficznie działające na receptor 5-HT7R;

- w podrozdziale 3.11 zaznaczono, że do analiz danych w których było więcej niż 2 grupy eksperymentalne zastosowano analizę ANOVA, natomiast w zaprezentowanych wynikach nie znalazłam takich analiz; wszystkie wykresy prezentujące dane miały wykonane analizy testem *t* (porównanie dwóch grup eksperymentalnych).

**WYNIKI** rozprawy doktorskiej to wykonane obrazowania i analiza zdjęć, oznaczenia biochemiczne oraz rezultaty testów behawioralnych. Zostały one zaprezentowane na 30 stronach, na których znalazło się 20 rycin z wynikami analiz ilościowych w postaci histogramów oraz reprezentatywnych zdjęć z obrazowań oraz pomiaru ekspresji białek, a także 2 ryciny poglądowe, obrazujące zastosowane metody badawcze. Wyniki zostały opisane wyczerpująco, a ryciny są czytelne i zawierają szczegółowy opis ich zawartości. Do najważniejszych wyników rozprawy można zaliczyć:

- zaobserwowanie w modelu *in vivo* spadku gęstości kolców dendrytycznych globalnie w całym hipokampie (Ryc. 9D), ale także w poszczególnych badanych jego podregionach (CA1, CA3 oraz DG) (Ryc. 11D) po jednorazowym podaniu agonisty 5-HT7R, LP-211;

- wykazanie zróżnicowanych zmian w kształcie kolców dendrytycznych w modelu *in vivo* po podaniu LP-211 w zależności od badanego podregionu hipokampa: wydłużenie kolców w CA1 oraz CA3 (co potwierdza wcześniejsze wyniki z modelu *in vitro* (Bijata et al., 2017)) oraz zmniejszenie stosunku długości do szerokości kolca, świadczące o jego dojrzewaniu kolców dendrytycznych w DG (Ryc. 10 oraz 11A-C);

- potwierdzenie w modelu *in vitro* hodowli komórek ziarnistych hipokampa wzrostu dojrzewania kolców dendrytycznych po 10 min stymulacji LP-211 (Ryc. 14) oraz wykazanie, że efekt ten jest przejściowy (po 20 min zanika) co wskazuje na dynamiczny charakter zmian w kształcie kolców w modelu *in vitro*;

- weryfikacja mechanizmu odpowiedzialnego za aktywację MMP-9 po stymulacji 5-HT7R (po podaniu LP-211 oraz AGH-194) w hipokampie z użyciem metody wycieszenia genów dla białek Gαs oraz Gα12 (shRNA) i wykazanie roli Gαs w tym procesie (Ryc. 20 i Ryc. 21);

DJ

- zbadanie *ex vivo* aktywności MMP-9 w podregionach CA1 oraz DG hipokampu po podaniu LP-211 i wykazanie w obydwu przypadkach aktywacji MMP-9 (Ryc. 22), co sugeruje jej udział zarówno wydłużaniu jak i dojrzewaniu kolców dendrytycznych;

- wykazanie metodą Western blot, że stymulacja 5-HT7R selektywnie wpływa na aktywność białek Cdc42 i RhoA w podregionie CA1 hipokampu, powodując jej znaczący wzrost, podczas gdy w podregionie DG nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności obu GTPaz (Ryc. 23 i 24);

- wykazanie metodą FLIM, że stymulacja 5-HT7R nie indukuje istotnych statystycznie zmian w aktywności Cdc42 oraz RhoA w rejonie CA1, natomiast w DG zaobserwowano aktywację Cdc42 po LP-211 (Ryc. 26);

- wykazanie podobnego efektu w rejonie CA1 dla innego agonisty 5-HT7R (AGH-194) po jednorazowym podaniu tj. wydłużenie kolców dendrytycznych jak to miało miejsce także po podaniu LP-211, natomiast w rejonie DG wykazano różnice w działaniu AGH-194 w porównaniu do LP-211, gdzie ten pierwszy indukował wydłużanie się kolców, natomiast ten drugi zwiększał dojrzewanie kolców (Ryc. 27 A-C);

- wykazanie braku efektu AGH-194 na gęstość kolców w CA1, natomiast w DG zwiększenie gęstości koców po tym agoniście 5HT7 – efekty te są przeciwstawne do zmian obserwowanych dla LP-211;

- brak efektu chronicznego podania AGH-194 na parametry morfologii, a także gęstość kolców w hipokampie, co wskazuje na przejściowy charakter zmian indukowanych jednorazowym podaniem agonisty 5-HT7R;

- wykazano efekt hamowania aktywności lokomotorycznej po jednorazowym podaniu AGH-194, natomiast podanie agonisty nie miało wpływu na zachowanie zwierząt w teście TST (Ryc. 29);

- w teście preferencji sacharozy dla jednorazowego podania AGH-194 wykazano wzrost preferencji spożycia sacharozy w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt, natomiast przy chronicznym podaniu nie wykazano różnic pomiędzy badanymi grupami zwierząt (Ryc. 30).

Biorąc pod uwagę mnogość uzyskanych rezultatów i wykazanie nowych molekularnych mechanizmów zaangażowanych w regulacji przez 5-HT7R plastyczności strukturalnej hipokampu, które mają wysokie znaczenie naukowe, ale także posiadają potencjał translacyjny stwierdzam, że **trzeci warunek ustawowy dotyczący oryginalności rozwiązania problemu naukowego został spełniony w rozprawie doktorskiej mgr Julii Masternak**.

Z obowiązku recenzenckiego wymienię kilka drobnych uwag do części WYNIKI:

- w rozdziale 4.2 według mnie można było przedstawić zdjęcie hodowli komórek ziarnistych hipokampu w celu zobrazowania opisanej morfologii tych komórek, odróżniające je od komórek piramidowych rejonu CA1 czy CA3, a także wykazania składu komórkowego hodowli (komórki neuronalne vs. komórki glejowe);

- w podrozdziale 4.2 dobrze byłoby podać informację o wydajności transfekcji komórek plazmidem GFP z użyciem odczynnika Lipofectamine 2000;

- proszę o wytłumaczenie różnego sposobu prezentowania zmian w morfologii kolców w modelu *in vivo* (długość/szerokość, długość i szerokość) w porównaniu do modelu in vitro (logarytm zmiany

względnej poszczególnych parametrów), co utrudnia czytelnikowi możliwość bezpośredniego porównania wielkości zmian pomiędzy modelem *in vivo* a *in vitro*;

- liczba zwierząt użyta do zweryfikowania udziału białka Gαs w efektach AGH-194 na MMP-9 jest niewielka (n=3), co było powodem zastosowania tak małej liczebności grupy? Podobna sytuacja wystąpiła przy pomiarze aktywności Cdc42 dla grupy kontrolnej oraz po podaniu LP-211 dla podregionu DG (Ryc. 23);

- czy różnice w liczebności grup zwierząt użytych w metodzie FILM, a Western blot do oceny aktywności Cdc42 oraz RhoA po stymulacji LP-211 mogą tłumaczyć rozbieżność uzyskanych wyników?

- czy analiza morfometryczna kolców dendrytycznych była robiona przez jednego eksperymentatora? Ponieważ metoda analizy kolców jest półautomatyczna, można zakładać możliwość wystąpienia różnic w sposobie analizy pomiędzy różnymi eksperymentatorami, a które mogą utrudniać badania porównawcze np. pomiędzy działaniem LP-211 a AGH-194 - proszę o wyjaśnienie czy taki scenariusz jest możliwy;

- zaobserwowany na Ryc. 30 wzrostowy trend w preferencji sacharozy po jednorazowym podaniu AGH-194 opisano na str. 81 jako „....wpływ agonisty na mechanizmy związane ze wzrostem zachowań anhedonicznych", według mnie jest to raczej efekt przeciwny, wzrost anhedonii (symptomu depresji) jest powiązany ze spadkiem preferencji sacharozy.

W rozdziale **DYSKUSJA** Doktorantka na 15 stronach dyskutuje w sposób logiczny i konsekwentny otrzymane wyniki w na tle istniejącego piśmiennictwa z badanego obszaru, podkreśla znaczenie nowo odkrytych mechanizmów, a także bardzo szczegółowo przedstawia ograniczenia niektórych zastosowanych metod (np. metoda FLIM i biochemiczne do oznaczania aktywności Rho GTPaz), które mogą wpływać na interpretacje wyników. Co więcej, bardzo dobrze przedyskutowane są „trudne" do interpretacji wyniki, takie jak na przykład różne rezultaty uzyskane dla aktywności Cdc42 oraz RhoA w zależności od zastosowanej metody, czy też różne wyniki obserwowane dla zastosowanych agonistów LP-211 oraz AGH-194. Potwierdza to dojrzałość naukową Doktorantki, z jednej strony w odważnej interpretacji uzyskanych wyników, ale także z zachowaniem ostrożności interpretacyjnej w przypadku wyników niespójnych. W mojej opinii Dyskusja jest napisana wyczerpująco, jej poszczególne elementy są płynnie połączone, co pozwala na zachowanie ciągłości opowiadanej historii o receptorze 5-HT7 i jego wpływie na plastyczność strukturalną. Wszystko to ponownie potwierdza rozległą wiedzę teoretyczną Doktorantki w badanym obszarze, umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a także osiągnięte oryginalne wyniki.

Do części Dyskusja mam dwa dodatkowe pytania:

- jak przedstawia się działanie badanych w rozprawie agonistów 5-HT7, LP-211 oraz AGH-194 na tle efektów wywołanych przez 5-CT i opisanych w pracy Bijata i wsp., 2017 – zabrakło mi tego elementu odniesienia w przeprowadzone dyskusji wyników, np. czy we wcześniejszych badaniach *in vitro* z komórkami piramidowymi, charakter zmian w kolcach po 5-CT był także dynamiczny i zmieniał się w czasie? Czy raczej jest to specyficzne dla komórek ziarnistych hipokampu?

- w pracy na podstawie danych znajdujących się w *Hippocampus RNA-seq Atlas* przedstawiono, że względna ekspresja białka Gαs różni się pomiędzy podregionami hipokampu (CA1 oraz DG), natomiast ekspresja Gα12 pozostaje na podobnym poziomie pomiędzy CA1 oraz DG. A czy ekspresja 5-HT7R (i jego izoform) jest zróżnicowana w obrębie podregionów hipokampu i czy to mogłoby mieć znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników z agonistami 5-HT7R?

W rozdziale **PODSUMOWANIE i WNIOSKI** najpierw w sposób uogólniony przedstawiono uzyskane wyniki a potem sformułowano wnioski w formie pięciu punktów odnoszących się do zmian morfologicznych, aktywności MMP-9, aktywności małych Rho GTPaz, behawioru oraz różnic między agonistami. W mojej opinii tylko ostatni punkt można uznać za wniosek, natomiast wcześniejsze cztery są według mnie nadal posumowaniem wyników.

INNE UWAGI

Z obowiązku redaktorskiego wymieniam poniżej zauważone podczas lektury monografii drobne błędy edytorskie, które w żadnym względzie nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, nie mają również wpływu na otrzymane wyniki oraz ich interpretację:

- Spis treści (str. 2) oraz rozdział Materiały i metody (strona 41) – błąd w numeracji podrozdziałów dla testów behawioralnych, Test zawieszenia za ogon powinien mieć numer 3.5.2;

- Wykaz skrótów (str. 11) – błąd w zapisie nazwy testu TST w języku angielskim, zamiast „test suspension test" powinno być „tail suspension test";

- strona 74 w opisie Ryc. 26 w podpunkcie B zamiast „C1" powinno być „CA1";

- na wykresach na Ryc. 26 dla lepszej czytelności należałoby zaznaczyć które panele dotyczą sensora Cdc42, a które RhoA.

## PODSUMOWANIE

Stwierdzam, ze uzyskane przez mgr Julię Masternak wyniki spełniają kryteria oryginalności i znacząco poszerzają dotychczasowa wiedzę w obszarze mechanizmów molekularnych zaangażowanych w regulację przez 5-HT7R plastyczności strukturalnej hipokampu, co może w przyszłości przynieść także przełożenie kliniczne dla zakresie poszukiwań nowych terapii leczenia zaburzeń depresyjnych. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną oraz praktycznymi zdolnościami w zakresie różnych standardowych, jak i bardzo zaawanasowanych metod badawczych. Przejrzysta prezentacja wyników oraz bardzo dobrze prowadzona dyskusja dodatkowo potwierdza umiejętności Doktorantki w samodzielnym prowadzeniu badań naukowych. Należy podkreślić, że część wyników wchodzących w skald rozprawy doktorskiej została opublikowana w 2022 roku w prestiżowym czasopiśmie *Cell Reports*, co potwierdza wysoką jakość badań i istotność uzyskanych wyników. Niewątpliwe, pozostałe dane pracy doktorskiej będą stanowić zawartość kolejnego lub kolejnych raportów naukowych o równie wysokim poziomie naukowym. Zgodnie z informacjami przedstawionymi na końcu rozprawy, Doktorantka jest współautorką 5 prac naukowych, w tym czterech oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej, wszystkich opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych, co należy uznać za solidny dorobek, biorąc pod uwagę wczesny etap rozwoju kariery naukowej.

**Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Julii Masternak 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 poź. zm). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Julii Masternak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Jednocześnie z uwagi na niezmiernie ciekawą i istotną tematykę badawczą, rzetelnie wykonaną pracę eksperymentalną i uzyskanie wyników o bardzo wysokich walorach naukowych zgłaszam do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Julii Masternak.

Dr hab. Danuta Jantas

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 27.03.2025 r.

prof. dr hab. Karolina Pytka
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

**Ocena**

**rozprawy doktorskiej mgr Julii Masternak**

**pt.: „Różnice w plastyczności synaptycznej w podregionach hipokampu zależne od receptora 5-HT$_7$"**

Zaburzenia depresyjne należą do najczęstszych i zarazem najbardziej obciążających chorób o podłożu neuropsychiatrycznym. Szacuje się, że nawet co dziesiąta osoba na świecie może doświadczyć epizodu depresji, który znacząco obniża jakość życia pacjentów, prowadząc do obniżenia nastroju, anhedonii, zaburzeń funkcji poznawczych, a w skrajnych przypadkach również do myśli i prób samobójczych. Mimo postępu w farmakoterapii, obecnie stosowane leki przeciwdepresyjne nadal wykazują ograniczoną skuteczność, często charakteryzują się opóźnionym początkiem działania oraz są obarczone licznymi działaniami niepożądanymi. Co więcej, ich wpływ na podstawowe mechanizmy plastyczności neuronalnej, które są kluczowe dla procesów uczenia się, pamięci oraz regulacji emocji, wciąż nie został w pełni wyjaśniony.

W ostatnich latach coraz większą uwagę przyciąga receptor 5-HT$_7$, którego ligandy wykazują potencjał jako nowe strategie terapeutyczne w leczeniu depresji. W badaniach przedklinicznych i wstępnych badaniach klinicznych wykazano, że receptor ten odgrywa istotną rolę w regulacji plastyczności synaptycznej. Jego modulacja wpływa zarówno na morfologię kolców dendrytycznych, jak i aktywność kluczowych szlaków sygnałowych w

obrębie hipokampa - struktury odpowiadającej m.in. za funkcje poznawcze i regulację nastroju. Zrozumienie mechanizmów, za pośrednictwem których receptor 5-$HT_7$ wpływa na strukturę i funkcję neuronów, może mieć kluczowe znaczenie w opracowywaniu nowych metod leczenia depresji oraz innych zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Biorąc powyższe pod uwagę, postawiony w rozprawie cel pracy, czyli szczegółowe zbadanie molekularnych mechanizmów działania szlaku zależnego od receptora 5-$HT_7$ oraz jego wpływu na zmiany w morfologii i funkcji kolców dendrytycznych, uważam za w pełni uzasadniony. Poruszony temat badawczy jest niezwykle aktualny, a uzyskane przez Autorkę wyniki dostarczają cennych danych, które mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju nowych, skuteczniejszych metod leczenia zaburzeń depresyjnych.

Przedstawiona do oceny praca liczy 120 stron i ma typowy dla prac eksperymentalnych układ edytorski: Spis treści, Lista skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia (238 pozycji, odpowiednio dobranych i cytowanych) oraz Spis publikacji własnych. Zachowane zostały odpowiednie proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami pracy.

Pracę otwierają streszczenia w języku polskim i angielskim, które w zwięzły i klarowny sposób wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy oraz przedstawiają najważniejsze wyniki. Następujący po nich, 17-stronicowy Wstęp, podzielony na cztery podrozdziały, stanowi przejrzysty przegląd aktualnej wiedzy na temat neurobiologicznych podstaw plastyczności synaptycznej. W pierwszym z podrozdziałów Autorka omawia podstawowe mechanizmy plastyczności neuronalnej, ze szczególnym uwzględnieniem roli kolców dendrytycznych jako struktur odpowiedzialnych za tworzenie i modyfikację połączeń synaptycznych.

Następnie szczegółowo charakteryzuje receptory serotoninowe, koncentrując się na budowie, szlakach sygnałowych i funkcjach receptora 5-$HT_7$. Podkreśla złożoność sygnalizacji zależnej od tego receptora (m.in. sprzężenie z białkami $G\alpha_s$ i $G\alpha_{12}$) oraz jego rosnące znaczenie jako potencjalnego celu terapeutycznego w leczeniu zaburzeń neuropsychiatrycznych, w tym depresji.

W kolejnym podrozdziale omawia rodzinę małych GTPaz Rho jako istotnych regulatorów reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, a tym samym kształtu i stabilności kolców dendrytycznych. Autorka przystępnie przedstawia mechanizmy ich aktywacji oraz znaczenie dla funkcjonowania neuronów i plastyczności synaptycznej.

Ostatnia część wstępu poświęcona jest budowie i funkcji hipokampa, z uwzględnieniem jego podregionów: CA1, CA3 oraz zakrętu zębatego. Autorka akcentuje znaczenie tej struktury w regulacji emocji i procesach poznawczych oraz wskazuje na jej rolę w patofizjologii depresji.

Wstęp kończy się logicznym i przekonującym uzasadnieniem potrzeby badań nad rolą receptora 5-$HT_7$ w modulowaniu plastyczności synaptycznej w hipokampie. Przytoczone dane literaturowe wskazują, że dysfunkcja tej struktury może prowadzić do zmian w plastyczności synaptycznej, co potencjalnie przyczynia się do deficytów poznawczych i objawów depresyjnych. Ta część pracy stanowi solidne i dobrze udokumentowane merytoryczne wprowadzenie do podjętych badań eksperymentalnych

Cele badawcze sformułowane zostały w sposób czytelny i jasny. Główne założenia badawcze obejmowały ocenę wpływu stymulacji receptora 5-$HT_7$ *in vivo* na kształt i gęstość kolców dendrytycznych w hipokampie. Kolejnym celem była analiza mechanizmu aktywacji metaloproteinazy MMP-9 oraz określenie, czy proces ten zależy od udziału białek $G\alpha_s$ lub $G\alpha_{12}$, pełniących kluczową rolę w sygnalizacji związanej z receptorem 5-$HT_7$. Autorka zaplanowała również ocenę aktywności białek RhoA i Cdc42 po stymulacji receptora 5-$HT_7$, aby wyjaśnić ich potencjalny udział w regulacji plastyczności synaptycznej w hipokampie.

Rozdział „Materiał i metody" został opracowany rzetelnie i zawiera klarowny opis technik zastosowanych w badaniach. Autorka przedstawia użyte odczynniki, charakterystykę zwierząt (samce myszy szczepu C57BL/6J), sposób podawania agonistów receptora 5-$HT_7$ oraz procedury operacyjne, w tym stereotaktyczne iniekcje wektorów wirusowych. Opisano także test preferencji sacharozy, test zawieszenia za ogon i test otwartego pola. W części biochemicznej wykorzystano m.in. zymografię, Western blot, testy aktywności białek RhoA i Cdc42 oraz technikę FLIM. Dokładnie przedstawiono także analizę kolców dendrytycznych w materiale tkankowym i w hodowlach neuronów. Metody są dobrze dobrane do celów pracy, a eksperymenty przeprowadzono starannie, zgodnie z wymogami etycznymi i po uzyskaniu stosownych zgód.

Otrzymane wyniki przedstawiono na 30 stronach w sposób dokładny i przejrzysty, z wykorzystaniem 21 rycin. W pierwszej części rozdziału wyników Autorka wykazała, że stymulacja receptora 5-$HT_7$ przez związek LP-211 prowadzi do zróżnicowanych zmian morfologii kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampa – wydłużania kolców w obszarze CA1 oraz dojrzewania kolców w zakręcie zębatym (DG).

W kolejnych podrozdziałach szczegółowo omówiono wyniki analiz aktywności metaloproteinazy MMP-9 oraz białek sygnałowych RhoA i Cdc42, wskazując na różnice w ich aktywacji zależne od badanych obszarów hipokampa oraz od udziału poszczególnych szlaków sygnałowych. Autorka zaprezentowała również dane wskazujące na kluczową rolę białka $G\alpha_s$ w aktywacji MMP-9 po stymulacji receptora 5-$HT_7$.

Wynikiem eksperymentów jest także charakterystyka wpływu stymulacji receptora 5-$HT_7$ na zachowanie zwierząt w testach behawioralnych, obejmujących ocenę czasu bezruchu

w teście zawieszania za ogon, anhedonii w teście preferencji sacharozy i aktywności lokomotorycznej, co stanowi istotne uzupełnienie badań na poziomie molekularnym i morfologicznym.

Dyskusja, obejmująca 15 stron, została przeprowadzona w sposób poprawny, spójny i klarowny. W tej części pracy mgr Julia Masternak szczegółowo omówiła oraz zinterpretowała uzyskane wyniki badań, zestawiając je z aktualnym stanem wiedzy i dostępnymi danymi literaturowymi z zakresu neurobiologii plastyczności synaptycznej i roli receptorów serotoninowych. Autorka trafnie wskazała podobieństwa i różnice pomiędzy własnymi obserwacjami a wynikami innych autorów, podkreślając nowatorski charakter prowadzonych badań oraz możliwe mechanizmy leżące u podstaw zaobserwowanych zjawisk.

W szczególności zwróciła uwagę na znaczenie zróżnicowanej aktywacji MMP-9 oraz białek RhoA i Cdc42 w poszczególnych podregionach hipokampa, co może wyjaśniać różnice w odpowiedzi morfologicznej neuronów na stymulację receptora 5-$HT_7$. Autorka podkreśliła także znaczenie uzyskanych wyników dla dalszych badań nad rolą receptora 5-$HT_7$ w regulacji plastyczności synaptycznej, zwłaszcza w kontekście zaburzeń depresyjnych i potencjalnych strategii terapeutycznych.

Z przeprowadzonych badań Autorka wyciągnęła wnioski, które są logiczne, spójne i jednoznacznie wynikają z uzyskanych wyników eksperymentalnych.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Założone cele zostały w pełni zrealizowane, a otrzymane wyniki są nowatorskie i stanowią punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami regulującymi plastyczność synaptyczną i ich znaczeniem w zaburzeniach depresyjnych. Pracę oceniam pozytywnie, jednak podczas jej lektury nasunęło mi się kilka uwag i pytań:

1. Wstęp pracy zawiera wiele wartościowych informacji, jednak można odnieść wrażenie, że brakuje w nim spójnego, syntetyzującego wprowadzenia osadzającego cel pracy w kontekście depresji. Informacje dotyczące roli hipokampa i receptora 5-$HT_7$ w patofizjologii zaburzeń depresyjnych pojawiają się w różnych miejscach, ale nie są wprost połączone w jedno spójne uzasadnienie badawcze.
2. W opisie podawania agonistów receptora 5-$HT_7$ podano, że przed każdą iniekcją dootrzewnową zwierzęta były wprowadzane w narkozę izofluranową. Wydaje się to nietypowe, ponieważ dootrzewnowe iniekcje u myszy zwykle nie wymagają znieczulenia ogólnego, a izofluran wykazuje znany wpływ na neuroprzekaźnictwo i zachowanie, również po krótkotrwałej ekspozycji. W związku z tym warto byłoby wyjaśnić powód zastosowania znieczulenia oraz wskazać, czy wszystkie grupy (w tym

kontrolne) były poddane identycznej procedurze. Ma to szczególne znaczenie w kontekście interpretacji wyników behawioralnych.

3. W pracy zabrakło opisu metody izolacji poszczególnych podregionów hipokampa wykorzystywanych do analiz biochemicznych. Informacja ta jest istotna dla oceny precyzji izolacji.
4. W pracy opisano wykorzystanie wirusów AAV niosących sekwencje shRNA oraz biosensory FRET, jednak nie podano, czy wektory zostały przygotowane samodzielnie, czy pozyskane z zewnętrznego źródła.
5. Nie podano szczegółów dotyczących informacji na temat procedur randomizacji i zaślepienia w badaniach behawioralnych. Jeśli eksperymenty były randomizowane i zaślepiane, warto doprecyzować, jakiego rodzaju randomizację zastosowano oraz czy osoba analizująca dane znała przynależność grupową zwierząt.
6. W opisie testu zawieszenia za ogon pojawia się stwierdzenie, że służy on ocenie zachowań anhedonicznych. Warto doprecyzować, że test ten klasycznie interpretuje się jako miernik bezradności behawioralnej, natomiast anhedonia - rozumiana jako utrata zdolności odczuwania przyjemności - oceniana jest zazwyczaj testem preferencji sacharozy.
7. Opis analizy statystycznej wymaga kilku doprecyzowań. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM, co może prowadzić do zaniżonej percepcji zmienności biologicznej w grupach. W badaniach przedklinicznych częściej zaleca się prezentację danych jako średnie ± SD, które lepiej oddają rzeczywiste rozproszenie wyników w badanej populacji. Dla analiz nieparametrycznych (np. test Manna-Whitneya) bardziej odpowiednią formą prezentacji byłaby mediana i rozstęp międzykwartylowy. W opisie metod wspomniano o zastosowaniu „testu Fishera" do oceny jednorodności wariancji - warto doprecyzować, czy odnosi się to do porównania wariancji dwóch grup, czy też do większej liczby grup. W tym drugim przypadku warto rozważyć zastosowanie alternatywnych testów, takich jak test Browna-Forsytha. Nie wskazano również, czy ANOVA była jedno- czy dwuczynnikowa ani jaki test post hoc zastosowano. Dodatkowo, nie zawarto informacji, czy i według jakich kryteriów wykluczano wartości odstające z analiz. Doprecyzowanie tych kwestii z pewnością ułatwiłoby ocenę przejrzystości i poprawności zastosowanej analizy statystycznej.
8. Niejasności budzi opis analizy próbek w zymografii (Ryc. 22). W opisie wyników wskazano, że do analizy łączono próbki z trzech zwierząt, natomiast w legendzie figury podano $n_{myszy}=5$ dla każdej grupy. Czy liczba n odnosi się do pięciu zbiorczych próbek (każda z trzech zwierząt), czy do próbek od pięciu pojedynczych zwierząt?

9. Warto rozważyć, czy zastosowanie testu preferencji sacharozy u zwierząt bez uprzedniej indukcji anhedonii pozwala na rzetelną ocenę potencjalnego działania antyanhedonicznego badanej substancji. Przy wysokim poziomie preferencji w grupie kontrolnej (np. powyżej 80%) trudno oczekiwać istotnego wzrostu w grupie badanej, co może ograniczać interpretację uzyskanego efektu. W przyszłości celowe byłoby rozważenie zastosowania odpowiedniego modelu depresji, w którym preferencja sacharozy ulega obniżeniu, co pozwoliłoby trafniej ocenić działanie związku w kontekście anhedonii.
10. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na samcach myszy, jednak kwestia ta nie została omówiona. Zważywszy na częstsze występowanie depresji u kobiet oraz możliwe różnice płciowe w działaniu receptorów serotoninowych, warto byłoby krótko odnieść się do tego ograniczenia w interpretacji wyników.

Wymienione wyżej uwagi nie wpływają na moją ogólnie bardzo pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy. Przedłożona do recenzji praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny, a uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów regulujących plastyczność synaptyczną w hipokampie, zależnych od aktywacji receptora $5\text{-HT}_7$. Wyniki te mogą w przyszłości przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w leczeniu depresji i innych zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Podsumowując, stwierdzam, 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 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Julii Masternak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, nowatorski charakter postawionych hipotez oraz interdyscyplinarność i nowoczesność zastosowanych metod, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Karolina Pękala

Łódź, dnia 31.03.2025 r.

Dr hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Julii Masternak zatytułowanej

***Różnice w plastyczności synaptycznej w podregionach hipokampu zależne od receptora 5-HT$_7$***

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Moniki Bijaty
w Pracowni Biofizyki Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska skupia się na analizie różnic w zachowaniu zwierząt oraz zmian morfologii i gęstości kolców dendrytycznych komórek piramidowych pola CA1 oraz komórek ziarnistych zakrętu zębatego w odpowiedzi na stymulację receptorów 5-HT$_7$. Będąca przedmiotem badań niniejszej rozprawy formacja hipokampa wiązana jest od lat z szeregiem kluczowych funkcji ośrodkowego układu nerwowego, jak integracja czuciowo-ruchowa, nawigacja przestrzenna, procesy uczenia się i zapamiętywania, a nawet funkcje językowe. Z drugiej strony zmiany morfologiczne i funkcjonalne w obrębie tej struktury obserwowane są podczas wielu stanów patologicznych OUN, na przykład u pacjentów cierpiących na padaczki, migreny, chorobę Alzheimera, depresję czy zespół stresu pourazowego. Uważam zatem, że podjęte przez Doktorantkę badania zmian plastyczności synaptycznej w obrębie formacji hipokampa w odpowiedzi na specyficzną aktywację układu serotoninergicznego mają duże znaczenie naukowe i mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia odpowiedzi organizmu na bodźce stresowe i związane z tym mechanizmy adaptacyjne.

Recenzowana praca doktorska posiada typowy układ monografii, język manuskryptu oceniam jako bardzo dobry, wypowiedź prowadzona jest w sposób jasny, bez powtórzeń

i zauważalnych błędów. Wstęp pracy jest rzeczowy i w sposób logiczny prowadzi do przedstawienia zasadniczych celów badawczych, które postawiła Doktorantka. Rozdział metodyczny jest klarowny, opis zastosowanych technik i analiz nie budzi większych zastrzeżeń. Wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych badań przedstawione zostały w sposób jasny a ich szeroka i krytyczna dyskusja w świetle najnowszej literatury tematu przeprowadzona została w sposób kompetentny i rzeczowy. O szerokiej wiedzy i dobrym przygotowaniu merytorycznym Pani mgr Julii Masternak świadczy liczba 238 pozycji, trafnie wyselekcjonowanego i aktualnego piśmiennictwa. Szata graficzna pracy stoi na dobrym poziomie. Zamieszczone w odpowiednich miejscach manuskryptu ryciny są czytelne i w jasny sposób ilustrują otrzymane przez Doktorantkę wyniki. Dysertacja poprzedzona jest spisem treści, wykazem użytych skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, a zakończona spisem literatury oraz zestawieniem publikacji Autorki. Struktura manuskryptu jest czytelna, a podział na poszczególne części prawidłowy i logiczny. W trakcie czytania pracy zauważyłem kilka drobnych błędów literowych oraz „podwójnych spacji", co nie wpłynęło jednak na ogólną ocenę, że pod względem redakcyjnym recenzowany manuskrypt spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Wprowadzenie teoretyczne do badań prowadzonych przez Doktorantkę zaprezentowane zostało w liczącym 18 stron wstępie. Ta część manuskryptu, podobnie jak pozostałe jego rozdziały, została dobrze przemyślana, a przedstawione w niej informacje oparte są na najnowszych danych literaturowych. Dzięki temu wstęp rozprawy w jasny sposób prowadzi czytelnika do przyjętych przez Doktorantkę celów badawczych. W pierwszej części rozdziału Pani mgr Masternak charakteryzuje zjawisko plastyczności synaptycznej, opisuje i klasyfikuje receptory serotoninergiczne ze szczególnym uwzględnieniem receptorów $5HT_7$, a następnie przedstawia szczegółowy opis funkcji białek należących do grupy małych Rho GTPaz. Ostatnie fragmenty tego rozdziału pracy poświęcone zostały przedstawieniu struktury oraz podstawowych funkcji formacji hipokampa. Mam kilka uwag do zaprezentowanych we wstępie rozprawy doktorskiej informacji. Uważam, że przedstawiony przez Panią Magister na str. 15 opis podstaw budowy neuronu jest zbędny w pracy tego typu, a dane w nim zawarte są na poziomie rozprawy doktorskiej oczywiste. Ponadto, informacja o dwóch rodzajach neurytów (aksonach i dendrytach) jest wg mnie błędna, gdyż „neuryt" to pojęcie tożsame z „aksonem". Błąd ten jest istotny w kontekście informacji zawartej na str. 23, gdzie czytając

Katedra Neurobiologii UŁ
ul. Pomorska 141/143; 90-236 Łódź
e-mail: tomasz.kowalczyk1@biol.uni.lodz.pl
tel. (48 42) 66 55 681

że *„aktywacja szlaku 5-HT$_7$R prowadzi do wzrostu neurytów"* nie wiemy czy chodzi o wzrost aksonów czy dendrytów. Dodatkowo, stwierdzenie, iż *"Informacja w postaci impulsu nerwowego jest przesyłana między neuronami za pomocą synaps"* jest według mnie zbyt daleko idącym uogólnieniem, mogącym wskazywać, że to nie potencjały postsynaptyczne a czynnościowe są generowane i przekazywane w synapsach. Mam również zastrzeżenia do dwóch rycin umieszczonych we wstępie. Na dolnej części ryciny 3 przedstawione zostały kolce dendrytyczne (2., 4. i 5. od lewej) o kształcie nieujętym w opisie A-F, natomiast dendryty szczytowe komórek piramidowych pola CA1 na rycinie 6 kończą się w połowie warstwy promienistej, a powinny chyba sięgać aż do bruzdy hipokampalnej. Pomimo przedstawionych uwag, należy stwierdzić, że wstęp recenzowanej rozprawy potwierdza obszerną wiedzę Doktorantki i znajomość piśmiennictwa związanego z podejmowanymi badaniami, informacje w nim zawarte są przejrzyste, a całość dobrze wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych przez Panią Magister badań.

Za główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie zbadanie mechanizmów molekularnych aktywacji hipokampalnego szlaku zależnego od 5-HT$_7$R oraz jego wpływu na zmiany w morfologii i funkcji kolców dendrytycznych. W ramach tak określonego celu głównego wyszczególnione zostały trzy cele szczegółowe, które mają głębokie uzasadnienie merytoryczne, a ich realizacja może doprowadzić do znaczącego poszerzenia wiedzy o funkcjonowaniu formacji hipokampa, w szczególności w kontekście zaburzeń nastoju. Biorąc pod uwagę dane prezentowane w dalszych częściach rozprawy sądzę, że Doktorantka mogła pokusić się o sformułowanie czwartego, szczegółowego celu, adresującego analizę zmian zachowania zwierząt po pobudzeniu 5-HT$_7$R, co było istotnym elementem prowadzonych badań.

Materiałem biologicznym wykorzystywanym przez Doktorantkę w badaniach były samce myszy szczepu C57BL/6J o fenotypie dzikim. W kolejnych podrozdziałach części metodycznej rozprawy Pani mgr Masternak szczegółowo opisała stosowane w prowadzonych badaniach techniki i procedury eksperymentalne, przedstawiła również tabelaryczny wykaz użytych w badaniach odczynników i roztworów. Na szczególną uwagę zasługuje szeroki wachlarz metod opanowanych i z powodzeniem wykorzystywanych przez Doktorantkę, od operacji stereotaktycznych, poprzez testy behawioralne, techniki biochemiczne, hodowle neuronalne, aż po techniki obrazowania kolców dendrytycznych. Mam kilka uwag do tej części

Katedra Neurobiologii UŁ
ul. Pomorska 141/143; 90-236 Łódź
e-mail: tomasz.kowalczyk1@biol.uni.lodz.pl
tel. (48 42) 66 55 681

rozprawy. W rozdziale metodycznym nie przedstawiono ogólnej liczby zwierząt wykorzystanych do przeprowadzonych badań, nie podano również liczebności zwierząt w poszczególnych grupach eksperymentalnych. Część tych informacji pojawia się w rozdziale poświęconym wynikom, w podpisach do rycin. Uważam jednak, że najwłaściwszym miejscem do przedstawienia takich danych jest rozdział metodyczny. Co więcej, liczba zwierząt wykorzystanych do założenia hodowli neuronów piramidowych i ziarnistych nie została przedstawiona z żadnym miejscu rozprawy. Rozumiem, że na procedurę pobrania tkanek nie jest wymagana odrębna zgoda właściwej Lokalnej Komisji Etycznej, jednak sądzę że sama liczba użytych zwierząt w pracy doktorskiej powinna zostać przedstawiona. Rycina 7A wydaje się być myląca, gdyż miejsca iniekcji dohipokampalnych wyznaczane były na czaszce operowanego zwierzęcia a nie na powierzchni mózgu. Podobnie, jak w przypadku wstępu i podstawowego opisu neuronu, sadzę że na tym poziomie pracy naukowej zbędny dokładny opis charakteryzujący czym są punkty bregma i lambda. Pomimo przedstawionych uwag uważam, że opis metodyki prowadzonych przez Doktorantkę badań oraz zastosowanej analizy statystycznej otrzymanych wyników jest klarowny i nie budzi większych zastrzeżeń. Podsumowując, moja ocena części metodycznej rozprawy jest jednoznacznie pozytywna, a na szczególną uwagę zasługuje fakt znakomitego przygotowania Pani mgr Masternak do samodzielnego prowadzenia nowoczesnych badań neurofizjologicznych.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę opisane zostały w syntetyczny i klarowny sposób, dodatkowo zilustrowane one zostały dwudziestoma dwoma czytelnymi rycinami. Przeprowadzane badania pozwoliły na wykazanie, że aktywacja receptorów 5-$HT_7$ prowadzi do zmian plastycznych zależnych od regionu formacji hipokampa. W komórkach piramidowych pola CA1 zaobserwowany został wzrost kolców dendrytycznych, natomiast w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego – dojrzewanie kolców. Co ciekawe, dalsze wyniki wskazały, że zaobserwowane zmiany mają charakter zależny od czasu, a chroniczne pobudzenie 5-$HT_7$R nie wywołuje podobnych efektów. Chciałbym w tym miejscu poprosić Doktorantkę o dodatkowy komentarz przejściowego charakteru obserwowanych zmian w kontekście ewentualnego potencjału aplikacyjnego prowadzonych przez nią badań. W kolejnych etapach pracy Pani mgr Masternak wykazała, że opisane wcześniej zmiany plastyczne związane są z zależnym od białka $G\alpha_S$ wzrostem aktywności metaloproteinazy 9 w obu badanych podregionach hipokampalnych. Z kolei dalsze badania Doktorantki

Katedra Neurobiologii UŁ
ul. Pomorska 141/143; 90-236 Łódź
e-mail: tomasz.kowalczyk1@biol.uni.lodz.pl
tel. (48 42) 66 55 681

nakierowane były na określenie roli regulatorowych białek cytoszkieletu - Cdc42 oraz RhoA na obserwowane zmiany morfologii i gęstości koców dendrytycznych. Uzyskane w tym etapie badań wyniki nie były jednorodne i różniły się w zależności od zastosowanej techniki i badanego regionu formacji hipokampa, ale mogą wskazywać na wzrost aktywności obu tych białek w procesie plastyczności wywołanej stymulacją receptorów 5-$HT_7$. Wreszcie seria badań behawioralnych przeprowadzonych przez Panią Magister pozwoliła stwierdzić, iż podanie agonisty 5-$HT_7$R nie wpływa w istotny statystycznie sposób na występowanie zachowań depresyjnych, natomiast ma wyraźny hamujący wpływ na aktywność lokomotoryczną badanych zwierząt. Przedstawione przez Doktorantkę wyniki wskazują na pełną realizację założonych wcześniej celów badawczych, mają nowatorski charakter i poszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący genezy zjawisk plastycznych zachodzących w sieciach neuronalnych formacji hipokampa pod wpływem wybiórczej aktywacji układu serotoninergicznego. Mam kilka uwag dotyczących przedstawionych wyników, są to w większości kwestie techniczne. Przedstawiona w wynikach liczebność grup eksperymentalnych wynosi w większości przypadków 5 zwierząt. Dlaczego zatem w niektórych przypadkach została ona zwiększona do 10 i 14 (*Wyciszanie ekspresji genów*, str. 64); 16, 18, 14, 12 (*Obrazowanie czasu życia fluorescencji*, str. 74)? Z kolei w badaniach behawioralnych dotyczących preferencji sacharozy rozbieżność liczebności w obrębie jednego eksperymentu była jeszcze większa i wynosiła od 10 do 25. Chciałbym również zapytać o test zawieszenia z ogon oraz test lokomotoryczny. Doktorantka opisuje, że: „... *przeprowadzono test zawieszenia za ogon.* [...] *Następnie przeprowadzono test lokomotoryczny...*". Czy testy te zostały przeprowadzone na tej samej grupie zwierząt, jeden po drugim tak jak to wynika z przytoczonego opisu, czy na różnych grupach, jak to wynika z liczebności podanej w podpisie do ryciny 28?

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały szczegółowo i krytycznie omówione w obszernym rozdziale dyskusyjnym, w którym Pani Magister zestawiła je z najnowszymi danymi literaturowymi. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne mgr Masternak. W mojej opinii, na szczególną uwagę zasługują fragmenty dyskusji, w których Doktorantka omawia wyniki nie w pełni jednoznaczne i w wyczerpujący sposób przedstawia możliwe przyczyny obserwowanych różnic oraz dostrzega konieczność przeprowadzenia kolejnych badań dotyczących uzyskanych przez nią

Katedra Neurobiologii UŁ
ul. Pomorska 141/143; 90-236 Łódź
e-mail: tomasz.kowalczyk1@biol.uni.lodz.pl
tel. (48 42) 66 55 681

wyników. Takie podejście do efektów własnej pracy doświadczalnej świadczy o wysokiej dojrzałości naukowej i bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia samodzielnych badań na wysokim poziomie. W tym miejscu chciałbym zadać Doktorantce pytanie. Omawiając różnice pomiędzy badaniami prowadzonymi in vivo oraz in vitro, Pani Magister wskazuje, słusznie z resztą, na różnice w interakcjach pomiędzy neuronami a astrocytami czy na dostępność neurotrofin w preparatach utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych, jednak nie odnosi się do faktu, iż podstawową różnicą pomiędzy tymi dwoma modelami jest odnerwienie struktury i brak połączeń zarówno aferentnych jak i eferentnych w warunkach in vitro. Czy to właśnie nie może być jedną z istotnych przyczyn obserwowanych przez Doktorantkę różnic?

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że praca doktorska Pani mgr Julii Masternak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Autorka postawiła jasne i logiczne cele pracy, które konsekwentnie zrealizowała. W rozdziale wstępnym Doktorantka udokumentowała swoją szeroką wiedzę teoretyczną dotyczącą badanego tematu, a przeprowadzone przez nią kompleksowe badania i krytyczna dyskusja otrzymanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej i wskazują na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę powyższe fakty należy uznać, że przedstawiona do recenzji praca zatytułowana *„Różnice w plastyczności synaptycznej w podregionach hipokampu zależne od receptora 5-HT$_7$"* spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Konkludując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Julii Masternak spełnia warunki określone w artykule 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 im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Julii Masternak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ

Katedra Neurobiologii UŁ
ul. Pomorska 141/143; 90-236 Łódź
e-mail: tomasz.kowalczyk1@biol.uni.lodz.pl
tel. (48 42) 66 55 681