

Dr hab. n. med. Piotr Maciejak
Instytut Psychiatrii i Neurologii
W Warszawie

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Ewy Sowy

pt. „*The involvement of chosen chemokines in neuronal properties and synaptic transmission in central and basolateral complex of the rat amygdala*”

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Tokarski

Rozprawa doktorska mgr Joanny Ewy Sowy dotyczy próby opisanie wpływu chemokin CXCL12 i CX3CL1 na transmisję synaptyczną oraz na właściwości elektrofizjologiczne neuronów jądra podstawno-bocznego (BLA) i środkowego (CeA) ciała migdałowatego. Dodatkowo, poprzez farmakologiczne hamowanie aktywności astrocytów oraz komórek mikrogleju, oceniano wpływ populacji tych komórek na elektrofizjologiczny fenotyp neuronów, indukowany interakcją CX3CL1/CX3CR1 oraz CXCL12/CXCR4. W odniesieniu do receptora CX3CR1 badano również znaczenie jego pobudzenia na procesy plastyczności synaptycznej oraz kolokalizację z markerami neuronalnymi MAP2 i CAMKII α . Przeprowadzone badania były możliwe dzięki zastosowaniu metody rejestracji elektrofizjologicznej *ex vivo* pojedynczych neuronów metodą *whole-cell patch-clamp*, którą wykorzystano do oceny spontanicznych i miniaturowych prądów postsynaptycznych (sEPSCs/mEPSCs/sIPSCs/mIPSCs) przed i po podaniu badanych chemokin.

Praca ma klasyczny układ, zawiera następujące części: *Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo* oraz *Suplement* (zawierający informacje dotyczące aktywności naukowej Doktorantki oraz dane uzupełniające, zawierające szczegółowe wyniki przeprowadzonych eksperymentów). Praca liczy 242 strony, 41 rycin, 12 tabel, 393 pozycje aktualnego piśmiennictwa.

Na wstępie chciałbym zaznaczyć, że cała praca jest koherentna, napisana językiem wskazującym na bardzo dobrą i szeroką znajomość przez Autorkę zagadnień z zakresu neuronauki, ze szczególnym uwzględnieniem elektrofizjologii. Wszystko to sprawia, że pomimo specjalistycznej tematyki, rozprawę czyta się bardzo dobrze, chętnie zagłębiając się w kolejne etapy opisu badań.

Wstęp formalnie podzielony jest na dwie części; w pierwszej Doktorantka precyzyjnie omawia klasyfikację, strukturę i sygnalizację układu chemokinowego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na funkcjonalne znaczenie kompleksów (chemokina/receptor) - CX3CL1/CX3CR1 oraz CXCL12/CXCR4/ACKR3. W drugiej części, Autorka pochyliła się nad anatomią czynnościową (także w ujęciu elektrofizjologicznym) ciała migdałowatego głównie w odniesieniu do kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowatego (BLA), jądra centralnego (CeA) oraz neuronów masy wtrąconej (ITCs). Należy pokreślić, że ta część rozprawy napisana jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym. Doktorantka wykazuje ponadstandardową biegłość w doborze i poruszaniu się pomiędzy danymi literaturowymi, ściśle trzymając się zagadnień będących przedmiotem badania. Jedyna uwaga jaką mam na tym etapie dotyczy faktu, że charakterystyka poszczególnych chemokin jest prowadzona w sposób rozdzielny, co może powodować przeświadczenie, że ich efekty biologiczne nie wynikają z ich łącznego oddziaływania z komórkami OUN. Przy czym, Doktorantka ma tego świadomość pisząc – „Odpowiednio, neuroanatomiczne rozmieszczenie chemokin i odpowiadających im receptorów, w tym opisanych powyżej CX3CL1/CX3CR1 i CXCL12/CXCR4/ACKR3 nakładają się na siebie w wielu regionach prawidłowo funkcjonującego OUN, co sugeruje ich udział w lokalnej komunikacji, zwłaszcza w komunikacji między neuronami a komórkami glejowymi”.

Cele pracy (opisane powyżej) zostały zdefiniowane w sposób precyzyjny, niebudzący wątpliwości co do zakresu stawianych pytań badawczych oraz oczekiwanych odpowiedzi.

W rozdziale **Materiał i metody** Doktorantka opisała, zgodnie z zasadami, przebieg i zakres prowadzonych eksperymentów w sposób pozwalający na ich replikację przez innych badaczy. Szczegółowo opisała między innymi: zagadnienia etyczne; populację zwierząt użytych w doświadczeniach oraz związki chemiczne wykorzystane w eksperymentach. Dodatkowo, bardzo precyzyjnie zaprezentowała metodologię rejestracji elektrofizjologicznej *whole-cell patch-clamp* pojedynczych neuronów, w tym: przygotowanie tkanek do eksperymentów, protokoły rejestracji, sposób analizy danych oraz elektrofizjologiczną identyfikację i klasyfikację neuronów w BLA i CeA. Ponadto, opisano protokoły badania LTP i oznaczeń immunocytochemicznych w BLA oraz zastosowane techniki statystyczne.

Przedstawiony opis metodologiczny daje pełne przekonanie o poprawności przeprowadzonych badań, w tym poprawnej identyfikacji badanych neuronów. Przykładowe zdjęcia cech morfologicznych w podczerwonym, różnicowym kontraście interferencyjnym (DIC) pozwalają na zobrazowanie skali trudności przedsięwzięcia. Zakres użytych technik badawczych wskazuje na bardzo zaawansowany warsztat badawczy Doktorantki już na tak wczesnym etapie rozwoju kariery naukowej.

Niemniej analiza tej części dysertacji rodzi pewne kwestie wymagające dopowiedzenia:

- Wydają się, że należy doprecyzować selektywność obserwowanych efektów podczas zastosowania antagonistów receptorów CX3CR1 i CXCR4 (AZD8797 i AMD3100), które były rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO), który sam może modyfikować właściwości elektrofizjologiczne błon komórkowych.
- Pewnego dopowiedzenia wymaga także opis statystyki - „Istotność statystyczna została ustalona na poziomie $p = 0,05$. „n” reprezentuje liczbę neuronów/plastrów użytych w każdej grupie, podczas gdy „N” reprezentuje liczbę szczurów w każdej grupie”. Opis taki sugeruje, że w eksperymentach, kiedy $n > N$, zmienność międzyosobnicza dla poszczególnych oznaczeń mogłaby być pozorna - ponieważ skrawki częściowo pochodzą od tego samego zwierzęcia, o określonym fenotypie elektrofizjologicznym.
- Uwzględniając fakt, że obserwowane efekty elektrofizjologiczne wywołane podaniem dwóch dawek zastosowanych chemokin były zróżnicowane i nieliniowe, np. „w zależności od stężenia (2nM vs. 5nM), CXCL12 powodował przeciwny trend w kierunku zmniejszenia lub zwiększenia częstotliwości pobudzających zdarzeń synaptycznych”, dlatego należy bardziej szczegółowo określić kryterium doboru badanych dawek. Można sobie wyobrazić, że przyjęcie innego zakresu dawek mogłoby prowadzić do odmiennych konkluzji badania.

Otrzymane **Wyniki** (zarówno w części zasadniczej jak i w suplemencie) Doktorantka przedstawiła w sposób bardzo czytelny, posługując się odpowiednio wykresami i tabelami, co znacznie ułatwia śledzenie i interpretację otrzymanych rezultatów. Dużym ułatwieniem dla czytającego jest prezentacja wyników w postaci boxplotów z wartościami dla wszystkich pomiarów oraz wykresy przedstawiające proporcje odpowiedzi neuronów po aplikacji określonej chemokiny. Pozwala to na stwierdzenie dużej heterogenności otrzymanych wartości parametrów pomiarowych co sugeruje, że być może, próba rozszerzenia populacji badanych zwierząt wspomagana statystycznym szacowaniem liczebności próby, ułatwiłaby interpretację otrzymanych wyników. Mam też przekonanie, że wzbogaceniem prowadzonych badań byłaby ocena statusu elektrofizjologicznego BLA, CeA i ITCs po jednoczasowym podaniu CXCL12 i CX3CL1, co byłoby bliższe rzeczywistym warunkom fizjologicznym.

Sumarycznie, otrzymane wyniki przedstawiają się następująco:

- **W BLA**, podanie chemokiny **CX3CL1** zwiększyło prąd progowy, prowadząc do zmniejszonej pobudliwości neuronów głównych
 - efektowi temu towarzyszyła osłabiona plastyczność synaptyczna w synapsach korowo-podstawnobocznych oraz zmniejszona częstotliwość spontanicznych hamujących prądów postsynaptycznych (sIPSCs).

- efekty te blokowane były w obecności antagonisty receptora CX3CR1, AZD8797.
 - zastosowanie inhibitora aktywności mikrogleju, minocykliny, blokowało efekty podania chemokiny CX3CL1.
- W **CeA**, chemokina **CX3CL1** zmniejszała oporność błony komórkowej neuronów regularnie wyładowujących się (RS), co skutkowało spadkiem ich pobudliwości.
 - Spadek aktywności tych neuronów spowodował zmniejszenie sIPSCs rejestrowanych w neuronach o późnym początku wyładowania (LF).
 - Efekty te były blokowane w obecności antagonisty receptorów CX3CR1 (AZD8797) lub po zahamowaniu aktywności komórek mikroglejowych minocykliną.
 - Fakt ten sugeruje, że aktywność sieciowa CeA jest przynajmniej w części modulowana przez aktywację receptorów CX3CR1.
 - Podanie **CXCL12** zwiększyło pobudliwość zarówno neuronów RS jak i LF w **CeA**.
 - podanie CXCL12 nasilało również częstotliwość spontanicznych pobudzających prądów synaptycznych rejestrowanych z neuronów RS.
 - efekty te blokowane były przez antagonistę receptora CXCR4, AMD3100.
 - aktywacja receptorów CXCR4 zwiększała także częstotliwość sIPSCs rejestrowanych z neuronów RS.
 - rejestracja z neuronów LF wykazała hamujące działanie CXCL12 na amplitudę prądów GABA-ergiczych.
 - Efekty te były blokowane przez antagonistę receptora CXCR4, jak i przez zablokowanie aktywności astrocytów podaniem fluorocytrynianu.
 - Efekty podania **CXCL12** w **BLA** nie uzyskały istotności statystycznej.

Przeważająca część **Dyskusji** robi bardzo dobre wrażenie, ponieważ w oparciu o bieżącą literaturę tematu, Doktorantka buduje spójną interpretację otrzymanych wyników. Dla przykładu, Doktorantka, z dużą sprawnością poradziła sobie z interpretacją nieintuicyjnego wyniku dotyczącego powodów, dla których upośledzenie LTP w BLA po podaniu CX3CL1 nie jest sprzeczne z tłumieniem hamowania aktywności GABA-ergicznej.

Fragmentami można jednak odnieść wrażenie, że sprawność interpretacyjna Doktorantki nie znajduje pełnego wsparcia we własnych wynikach. Przykładowo, rozbudowana analiza przyczyn braku wpływu CX3CL1 na pobudzającą transmisję synaptyczną w BLA, oparta m. in. o: zróżnicowane

oddziaływanie adenozyiny; dywersyfikację sygnałów pobudzeniowych i hamujących w obrębie samego BLA czy też postsynaptyczny charakter działania CX3CL1, wydaje się bardzo ciekawa, ale nadmierna, w stosunku do faktów wynikających wprost z otrzymanych wyników. Podobną uwagę można odnieść do sformułowań typu *„Dlatego też, biorąc pod uwagę dobrze udokumentowaną neuroprotektoryjną rolę CX3CL1 w innych strukturach mózgu, obniżona aktywność PCs wraz z upośledzoną LTP w BLA może sugerować anksjolityczne działanie CX3CL1.”* O ile uwaga taka wydaje się nieco przedwczesna, wskazuje natomiast na ciekawy kierunek badawczy, w którym najbardziej interesujące wyniki otrzymane w trakcie przeprowadzonych eksperymentów można byłoby powtórzyć z zastosowaniem zwierzęcych modeli zaburzeń lękowych i afektywnych.

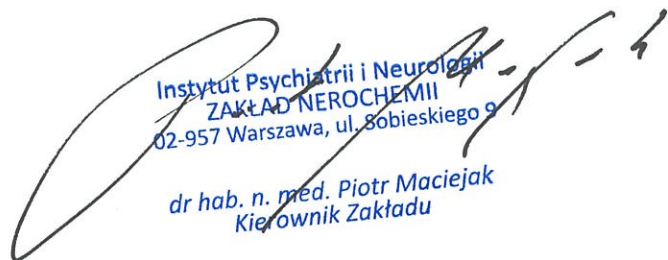
Podsumowanie

Uważam, że Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania polegającego na próbie określenia mechanizmów i efektów aktywacji receptorów CX3CR1 i CXCR4 na przekaźnictwo nerwowe oraz właściwości elektrofizjologiczne neuronów w dwóch jądrach ciała migdałowatego - BLA i CeA, przy zastosowaniu precyzyjnych protokołów elektrofizjologicznych, modyfikowanych oddziaływaniami farmakologicznymi oraz technik immunocytochemicznych. Działania podjęte przez Doktorantkę pozwalają na jasne stwierdzenie neuromodulacyjnej roli chemokin CXCL12 i CX3CL1 w procesie komunikacji pomiędzy neuronami a komórkami glejowymi ciała migdałowatego, co stwarza duży potencjał do dalszych badań aplikacyjnych w zakresie zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy skomplikowanego obszaru badań naukowych, wymagającego zastosowania zaawansowanych technik analitycznych, pomimo tego Pani mgr Joanna Ewa Sowa, zarówno w zakresie wiedzy teoretycznej jak i technik badawczych, porusza się w tym obszarze w sposób ponadprzeciętny. Chciałbym dodać, że wszystkie wymienione przeze mnie uwagi mają charakter wyłącznie polemiki naukowej i nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny całokształtu przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Wszystkie przedstawione argumenty w sposób bezsprzeczny wskazują, że Pani mgr Joanna Ewa Sowa wykazała się ponadstandardową wiedzą teoretyczną w dyscyplinie oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, tym samym, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (art. 219 ust. 1 pkt. 2), i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom promocyjnym na stopień doktora.

W związku z tym zwracam się z wnioskiem do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie o dopuszczenie magister Joanny Ewy Sowy do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz z powodów wymienionych powyżej proszę o wyróżnienie pracy.



Instytut Psychiatrii i Neurologii
ZAKŁAD NEROCHEMII
02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9
dr hab. n. med. Piotr Maciejak
Kierownik Zakładu