



Dr hab. Anna Błasiak, prof. UJ
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 13.01.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Michała Wilczkowskiego

„Regulacja plastyczności synaptycznej przez kortykosteron: badanie mechanizmów w korykalnych i hipokampalnych hodowlach pierwotnych”

**wykonanej w Instytucie farmakologii im. Jerzego Maja
pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Nalepy - promotor
i dr Agnieszki Zelek-Molik - promotor pomocniczy**

Rozprawa doktorska mgr. Michała Wilczkowskiego dotyczy wpływu długotrwałej ekspozycji na kortykosteron na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korowych i hipokampalnych w hodowlach pierwotnych, oraz określenia roli kinazy płytek przylegania (FAK) w zastosowanym modelu doświadczalnym. Podjęty temat badawczy ma istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów komórkowych leżących u podstaw skutków przewlekłego stresu i działania glikokortykosteroidów na plastyczność synaptyczną. Mimo, że ten ważny temat jest intensywnie badany przez wiele zespołów na świecie, nadal nie jest w pełni poznany, a w literaturze tematu utrzymują się istotne luki dotyczące mechanizmów leżących u podstaw zależności między przebudową kolców dendrytycznych, a szlakami sygnałowymi wrażliwymi na kortykosteron.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 158 stron i ma klasyczny układ. Obejmuje m. in. wyczerpujący wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, jednoznacznie sformułowane cele oraz hipotezy badawcze, szczegółowy opis materiałów i metod, i następującą po tym prezentację wyników wraz z ich omówieniem w dyskusji.

Na uznanie zasługuje sposób opracowania tekstu: rozprawa została napisana językiem klarownym i precyzyjnym, z zachowaniem spójności terminologicznej i logicznej struktury wywodu. Autor konsekwentnie prowadzi czytelnika od przesłanek teoretycznych przez założenia badawcze i zastosowaną metodykę, co ułatwia ocenę celowości przeprowadzonych analiz oraz zasadności wyciągniętych później wniosków. Wysoka kultura edytorska, dbałość o styl naukowy i przejrzystość argumentacji sprawiają, że mimo specjalistycznego charakteru pracy jej lektura jest płynna, angażująca i satysfakcjonująca. Uwagę zwraca konsekwentne i trafne stosowanie polskich odpowiedników specjalistycznych terminów, które w praktyce publikacyjnej funkcjonują najczęściej w języku angielskim. Autor posługuje się terminologią z wyczuciem; unika niepoprawnych kalek językowych i sztucznych dosłownych przekładów, jednocześnie zachowując precyzję znaczeniową oraz zgodność z przyjętą w polskojęzycznej literaturze naukowej konwencją.

We *Wstępie* dysertacji Autor w sposób szczegółowy i uporządkowany przedstawia zagadnienia stanowiące bezpośrednie tło dla zaprezentowanych badań, ze szczególnym uwzględnieniem plastyczności synaptycznej oraz strukturalnych, molekularnych i funkcjonalnych mechanizmów leżących u podstaw zmian w obrębie kolców dendrytycznych. Istotnym elementem tej części jest omówienie czynników modulujących plastyczność strukturalną oraz przekonujące uzasadnienie wyboru pierwotnych hodowli neuronów korowych i hipokampalnych jako modelu badawczego. Następnie Autor syntetycznie prezentuje kluczowe informacje dotyczące kortykosteronu; jego charakterystyki, receptorów i mechanizmów działania, a także konsekwencji zaburzeń transmisji glikokortykoidowej dla neuronów i kolców dendrytycznych. Wprowadzenie teoretyczne zamyka omówienie roli oraz charakterystyki FAK w kontekście regulacji plastyczności synaptycznej. Wstęp kończy syntetyczne zestawienie przesłanek prowadzących do hipotez pracy, jasno wiążąc wcześniejsze dane dotyczące efektów przewlekłe podwyższonego poziomu kortykosteronu z przypuszczalną rolą FAK jako elementu mechanizmu pośredniczącego w obserwowanych zmianach morfologii kolców. Przedstawione wprowadzenie – zarówno pod względem doboru i zakresu omówionej wiedzy teoretycznej, jak i sposobu syntetycznego przedstawienia dostępnych danych literaturowych – świadczy o wysokim poziomie przygotowania merytorycznego Autora, które w mojej ocenie, spełnia wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

Cele pracy zostały jasno wskazane i precyzyjnie sformułowane. Autor, identyfikując obszary wciąż niewystarczająco zbadane w zakresie wpływu kortykosteronu na plastyczność strukturalną, wyodrębnia dwa cele główne: (1) ocenę wpływu długotrwałe podwyższonego poziomu kortykosteronu na morfologię kolców dendrytycznych w mysich, pierwotnych neuronach korowych i hipokampalnych oraz (2) zbadanie roli białka FAK w mechanizmach zmian indukowanych przez kortykosteron. Na tym tle Autor trafnie formułuje cele szczegółowe, logicznie podporządkowane celom głównym. W tej części pracy, zatytułowanej *Cele pracy i hipotezy badawcze* nie zostały jednak jednoznacznie wskazane hipotezy, których doszukać się można we wcześniejszych jej częściach (m. in. w *Streszczeniu*).

Rozdział *Materiały i metody* stanowi dobrze opracowaną część dysertacji. Autor opisuje zastosowane techniki badawcze w sposób umożliwiający ocenę poprawności wykonania eksperymentów oraz powtórzenie procedur (zabrakło tu jednak **charakterystyki przeciwciał drugorzędowych**). Jednocześnie, przy opisie analizy sygnału fluorescencji, przydatne byłyby dodatkowe informacje dotyczące warunków akwizycji i standaryzacji pomiarów: **czy czas pomiędzy barwieniem a obrazowaniem był w poszczególnych grupach taki sam, czy wszystkie obrazy wykorzystywane do porównań intensywności rejestrowano przy identycznych ustawieniach mikroskopu oraz w zakresie liniowym detekcji, bez saturacji sygnału**. Doprecyzowania wymagałyby również **parametry analizy obrazów, w szczególności rozmiar ROI, kryteria doboru i długość analizowanych odcinków dendrytów (czy porównywane odcinki były podobne pomiędzy badanymi warunkami)**. Wreszcie,



istotnym uzupełnieniem metodyki byłaby **informacja o udziale komórek glejowych w hodowlach** (przybliżony stosunek astrocytów do neuronów i czy proporcje te nie różniły się pomiędzy warunkami eksperymentalnymi), ponieważ obecność astrocytów w sposób istotny wpływa na dojrzewanie neuronów, tworzenie funkcjonalnych połączeń synaptycznych oraz poziom aktywności neuronalnej.

Wyniki badań przedstawionych w pracy doktorskiej przeprowadzono w ramach realizacji projektu Preludium pt.: „*Badanie roli kinazy płytek przylegania i powiązanych z nią szlaków molekularnych w plastyczności neuronalnej indukowanej glikokortykoidami i przewlekłym stresem*”, którego kierownikiem jest Autor recenzowanej dysertacji. Warto ten fakt podkreślić, gdyż stanowi on, obok mojej pozytywnej opinii dotyczącej jakości zaplanowanych i przeprowadzonych badań, niezależne potwierdzenie kompetencji Autora w zakresie samodzielnego planowania i realizacji badań naukowych.

W toku przeprowadzonych eksperymentów Autor wykazał między innymi, że długotrwała (72 h) ekspozycja pierwotnych hodowli neuronów kory i hipokampa na kortykosteron aktywuje sygnalizację glikokortykoidową, a charakter i nasilenie obserwowanych efektów zależą od analizowanego genu, zastosowanego stężenia hormonu oraz typu hodowli. Autor identyfikuje 0,25 μM kortykosteronu jako stężenie niecytotoksyczne (brak spadku przeżywalności i brak zmian w ogólnej morfologii neuronów), które jest wystarczające do wywołania zmian na poziomie ultrastruktury kolców dendrytycznych, w tym zmniejszenia szerokości ich główek w obu modelach. Dla stężeń wyższych niż 0,25 μM opisano natomiast zubożenie drzewa dendrytycznego w hodowlach korowych i hipokampalnych, przy czym spadek przeżywalności ujawniał się w hodowlach hipokampalnych przy 1 μM . Pomimo modyfikacji fenotypu kolców, nie stwierdzono zmian poziomu PSD95, co przemawia za brakiem istotnego wpływu kortykosteronu na wskaźnik gęstości/stabilności synaps w zastosowanym modelu eksperymentalnym.

Wyniki opisane w kolejnych częściach dysertacji wskazują na udział szlaku zależnego od FAK w obserwowanych efektach działania kortykosteronu: farmakologiczna modulacja aktywności FAK w neuronach korowych prowadzi do podobnych zmian jak te obserwowany w wyniku długotrwałego działania kortykosteronu, a w hodowlach hipokampalnych zaobserwowano efekt protekcyjny aktywacji FAK (w odniesieniu do szerokości głowy kolca). Jednocześnie, w przypadku neuronów korowych, wykazano zależny od czasu inkubacji, wpływ kortykosteronu na poziom mRNA PTK2, genu kodującego białko FAK. Podobnych zmian nie zaobserwowano w przypadku komórek hipokampa. Ważną obserwacją było wskazanie, że kortykosteron nie zmienia poziomu całkowitego ani fosforylowanego FAK, co sugeruje, że kluczowe następstwa tej ekspozycji to wpływ na ekspresję genów, a nie poziom czy stopień aktywacji białka. Zgodnie z tym, Autor wykazuje, że 72-godzinna ekspozycja na kortykosteron modyfikuje ekspresję genów związanych z plastycznością synaptyczną i sygnalizacją FAK (wyraźniej w hodowlach kortykalnych niż hipokampalnych).



Uzyskane wyniki tworzą spójny obraz zależności dynamiki przebudowy kolców dendrytycznych od dawki i czasu ekspozycji na kortykosteron. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwentne prowadzenie analiz w kilku komplementarnych płaszczyznach (wpływ na transkrypcję genów, ocena przeżywalności, morfologia drzew dendrytycznych i kolców, zmiany w poziomie PSD95 oraz w szlaku FAK), co wzmacnia wiarygodność wnioskowania i ogranicza ryzyko nadinterpretacji wyników pojedynczego testu. Wysoko oceniam zarówno jakość zaprojektowania i wykonania badań, jak i rzetelność ich przedstawienia w rozprawie: dane są prezentowane w sposób przejrzysty, z właściwym rozdzieleniem obserwacji zależnych od modelu hodowli i warunków stymulacji oraz z klarowną logiką wnioskowania.

Przedstawione wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu naukowego, wskazując, że niecytotoksyczne stężenie kortykosteronu może indukować istotne zmiany w obrębie strukturalnej plastyczności synaptycznej (na poziomie kolców dendrytycznych), a obserwowane efekty mogą być przynajmniej częściowo mediowane przez sygnalizację zależną od FAK.

Jednocześnie, lektura Wyników przedstawionych w pracy nasuwa parę pytań/komentarzy;

- Ocenę wyników przedstawionych na Ryc. 4.1 ułatwiłoby zamieszczenie fotografii w wyższej rozdzielczości (lub w większym powiększeniu; czy rzeczywiście podana długość skali (20 μm) jest prawidłowa?).
- Autor wskazuje, że w celu potwierdzenia uzyskania hodowli specyficznych dla kory i hipokampa oznaczono poziom mRNA genów SATB2 oraz PROX1. **Czy różnice w ekspresji tych markerów pomiędzy typami hodowli osiągnęły istotność statystyczną?**
- W pracy przeanalizowano wpływ kortykosteronu na ekspresję mRNA genu NR3C1 kodującego receptor glikokortykoidowy (GR). Zastanawia, **dlaczego nie rozszerzono tej analizy o gen kodujący receptor mineralokortykoidowy (MR; NR3C2)**, zwłaszcza że oba receptory (MR i GR) mogą być zlokalizowane w obrębie PSD oraz kolców dendrytycznych. Ponieważ MR pełni istotną rolę regulacyjną w utrzymaniu struktury kolców dendrytycznych, podczas gdy sygnalizacja zależna od GR wiązana bywa m.in. z modulacją wzrostu i przebudowy kolców, uwzględnienie MR mogłoby wzbogacić interpretację obserwowanych zmian morfologicznych.
- W eksperymentach mających na celu zbadanie mechanizmu zaangażowanego w indukowane przez kortykosteron zmiany w morfologii kolców dendrytycznych, wykorzystano wyłącznie stężenie 0.25 μM kortykosteronu, wskazując, że jest to stężenie wystarczające do indukcji zmian morfologicznych, pozostające bez wpływu na przeżywalność badanych komórek. Jednocześnie, Autor słusznie wskazuje, że jest to stężenie zbliżone do stężenia mierzonego w tkance mózgowej po zadziałaniu silnego stresora. Jednak warunek kontrolny, wynikający z procedury wymiany medium, wiązał się z obniżeniem stężenia kortykosteronu do 0,191 nM, a więc do poziomu wielokrotnie



niższego niż fizjologiczne stężenie w mózgu (około 16.7 nM, jak podaje literatura, do której odwołuje się Autor). Ponieważ obniżenie endogennej aktywności glikokortykoidowej może istotnie zredukować dynamikę przebudowy kolców dendrytycznych, należy rozważyć, **czy obniżenie stężenia kortykosteronu w warunkach kontrolnych nie stanowiło samo w sobie czynnika modulującego fenotyp kolców w grupie odniesienia?**

Rozprawę zamyka dojrzała, wyważona i konsekwentnie prowadzona Dyskusja, w której Autor nie tylko podsumowuje uzyskane wyniki, lecz także wskazuje szerokie spektrum potencjalnych mechanizmów leżących u podłoża obserwowanych efektów, tworząc tym samym punkt wyjścia do projektowania dalszych, ukierunkowanych eksperymentów. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętne i adekwatne operowanie bardzo bogatą literaturą tematu – Autor wykazuje biegłość w poruszaniu się w obrębie omawianej problematyki, przy jednoczesnym krytycznym podejściu do cytowanych doniesień i unikaniu nadinterpretacji. W tym kontekście warto wyróżnić zwłaszcza logiczną i przekonującą próbę wyjaśnienia pozornie nieintuicyjnego wyniku dotyczącego wzrostu poziomu mRNA PTK2, wraz ze wskazaniem możliwych mechanizmów homeostatycznej kompensacji. Całość rozważań prowadzi do trafnych, dobrze uzasadnionych wniosków przedstawionych w części „Podsumowanie i wnioski”, które domykają pracę w sposób spójny i merytorycznie satysfakcjonujący.

Podsumowując, wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr. Michała Wilczkowskiego, która stanowi oryginalne i merytorycznie wartościowe rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Praca ma charakter nowatorski; zgromadzone w niej wyniki w sposób istotny pogłębiają zrozumienie molekularnych mechanizmów wpływu kortykosteronu na plastyczność strukturalną, a jednocześnie tworzą solidne podstawy do projektowania kolejnych eksperymentów. Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2024, poz.1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, o dopuszczenie mgr. Michała Wilczkowskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.