

**PRACOWNIA PATONEUROCHEMII
ZAKŁAD NEUROCHEMII**

02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5
tel./fax: (0-22)-608-66-23

Warszawa, 26.01.2026r.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska
Tel: 22-608 65 76
e-mail: lidkas@imdik.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

**Pana mgr Michała Wilczkowskiego
p.t. „Regulacja plastyczności synaptycznej przez kortykosteron: badanie mechanizmów
w korykalnych i hipokampalnych hodowlach pierwotnych”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. Ireny Nalepy i Promotora pomocniczego, Pani dr Agnieszki Zelek-Molik

Układ hormonalny pełni istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy organizmu człowieka, oddziałując m.in. znacząco na mózg. Skutki endokrynopatii w zakresie funkcji poznawczych i emocjonalnych obejmują m.in. pacjentów z zaburzeniami pracy nadnerczy prowadzącymi do hiperkortyzolemii, pacjentów poddawanych przewlekłej sterydoterapii stosowanej w leczeniu wielu chorób, zwłaszcza chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym, jak również osoby funkcjonujące w przewlekłym stresie, których liczba niepokojąco wzrasta w społeczeństwach współczesnego świata. Chroniczny stres skutkuje nadmiernym wydzielaniem kortyzolu, który przez plejotropowe działanie na ośrodkowy układ nerwowy, wywołuje zespół psychoendokryny obejmujący deficyty poznawcze i zaburzenia emocjonalne. Mózg pełni w organizmie zintegrowaną, potrójną rolę w procesie reakcji na stres: jest jednocześnie głównym detektorem stresu, jego centralnym regulatorem i efektem. Ta unikalna pozycja sprawia, że mózg nie tylko zarządza odpowiedzią na stres, ale również podlega ciągłej przebudowie pod jego wpływem, co może prowadzić zarówno do adaptacji, jak i do zmian patologicznych przy stresie przewlekłym. W związku z coraz większym ryzykiem zdrowotnym związanym z wszechobecnym chronicznym stresem, wyniki badań nad wpływem glikokortykoidów na mózg są kluczowe. Na przestrzeni ostatnich lat rośnie liczba badań wskazujących na istotny udział chronicznego stresu jako czynnika ryzyka wielu zaburzeń i chorób psychicznych, takich jak zaburzenia depresyjne, lękowe, schizofrenia czy zespół stresu pourazowego (PTSD), jak również udziału komponentu stresu w patologii chorób neurologicznych, w tym chorób neurodegeneracyjnych. Zatem, przedłożona do recenzji rozprawa dotyczy bardzo aktualnego i ważnego tematu badawczego.

Ocena formalna

Dysertacja liczy 158 stron i ma klasyczną konstrukcję, ogólnie przyjętą dla oryginalnej rozprawy doktorskiej. Praca zawiera następujące rozdziały: Wstęp, Cele pracy i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Piśmiennictwo. Wnioski stanowią podrozdział rozdziału Dyskusja. Streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów użytych w pracy oraz spis tabel i rycin uzupełniają całość. Dodatkowo zawarta jest informacja o źródle finansowania badań wykonanych w ramach doktoratu, którym był kierowany przez Pana mgr Wilczkowskiego grant NCN PRELUDIUM zatytułowany „Badanie roli kinazy płytek przylegania o powiązanych z nią szlaków molekularnych w plastyczności neuronalnej indukowanej glikokortykoidami i przewlekłym stresem”.

Praca zawiera 25 schematów i rycin oraz 10 tabel. Dokumentację wyników przedstawiono w postaci wykresów, zdjęć otrzymanych metodami obrazowania oraz immunoblotów. Obszerna bibliografia liczy 263 pozycje aktualnej literatury (ich ponumerowanie byłoby dużym ułatwieniem dla recenzenta). Praca jest napisana ładną polszczyzną i starannie przygotowana pod względem redakcyjnym i graficznym, choć Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów gramatycznych (określenie „ilość” zamiast „liczba” dla rzeczowników policzalnych – np. str. 19, 21, 22, 90, 101, 107) i interpunkcyjnych (nadreprezentacja przecinków); często powtarzające się słowo „replikaty” można by zastąpić polskim odpowiednikiem: „powtórzenia”.

Nie znalazłam natomiast wzmianki czy wyniki zawarte w pracy zostały już częściowo/całkowicie opublikowane ani też listy wszystkich publikacji Doktoranta. Informacje te, choć nieobowiązkowe, są często umieszczane w rozprawach doktorskich, gdyż dają wgląd w aktywność naukową Doktoranta i potwierdzają wartość naukową uzyskanych wyników.

Ocena merytoryczna

We wstępie, liczącym 21 stron i wzbogaconym przejrzystymi schematami, Autor omawia zagadnienia neurostrukturalnych zmian na poziomie dendrytów i synaps związane ze zjawiskiem plastyczności synaptycznej oraz ich molekularne podstawy. Opisuje podstawowe aspekty związane z korelacją struktury i funkcji kolców dendrytycznych, podkreślając znaczenie ich niepożądanych modyfikacji pod wpływem różnych czynników, w tym hormonalnych. Następnie, Autor przechodzi do charakterystyki hormonu glikokortykoidowego, kortykosteronu (CORT), jego funkcji i receptorowych efektów działania na mózg, w tym na strukturę kolców dendrytycznych. W ostatniej części skupia się na omawianiu molekularnych mechanizmów tych procesów, a w szczególności funkcji kinazy płytek przylegania, białka adaptorowego FAK, które odpowiadając na sygnał pochodzący od czynnika neurotroficznego BDNF i receptora TrkB, moduluje morfologię kolców dendrytycznych. Omawiając te zagadnienia, Autor słusznie podkreśla, że mechanizmy molekularne (w tym rola białka FAK) związane z wpływem chronicznie podwyższonego stężenia CORT na morfologię kolców dendrytycznych są słabo poznane.

Ta część pracy potwierdza dużą wiedzę teoretyczną Autora, a sposób jej opracowania wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu i zdolność do syntetycznej selekcji informacji, co świadczy o dojrzałości naukowej. Umieszczenie przejrzystych schematów ułatwia śledzenie toku narracji. Mnie, jako czytelnikowi, zabrakło tu jedynie wyrazistego

podkreślenia znaczenia badań nad mechanizmami wpływu chronicznego stresu na mózg. Choć Autor wzmiankuje to zagadnienie, umieszczenie krótkiego rozdziału o roli przewlekłego stresu w rozwoju wielu zaburzeń psychicznych i przebiegu wielu chorób neurologicznych, uwypukliłoby znaczenie kliniczne podjętej tematyki badań.

Ostatni podrozdział Wstępu, syntetycznie omawiający przesłanki do hipotez badawczych, jest świetnym podsumowaniem i stanowi płynne przejście do kolejnego rozdziału „Cele pracy i hipotezy badawcze” (który powinien raczej brzmieć: Hipotezy badawcze i cele pracy, gdyż cele formułowane są na bazie hipotez).

Bazując na opisanych przesłankach, sformułowano dwa główne, oryginalne i w pełni uzasadnione w świetle dotychczasowej wiedzy, cele badawcze zakładające: i) zbadanie wpływu długotrwałe podwyższonego poziomu CORT na morfologię kolców dendrytycznych mysich pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych; ii) zbadanie roli białka FAK w tym procesie.

Obydwa cele są ze sobą logicznie powiązane a każdy z nich zawiera trzy cele szczegółowe, które doprecyzowują szeroki zakres planowanych badań obejmujących analizy morfologiczne, biochemiczne i molekularne.

Rozdział „Materiały i metody” dobrze i szczegółowo opisuje warsztat badawczy. Do badań zastosowano model *in vitro* wykorzystujący hodowle pierwotne mysich neuronów korykalnych i hipokampalnych, stosowany z powodzeniem w tego typu badaniach przez innych autorów. Wśród wielu zastosowanych technik badawczych znajdują się transfekcja komórek plazmidem GFP, barwienia i obrazowanie komórek, izolacja RNA i reakcja qRT-PCR, oznaczanie stężenia białka metodą kapilarnej immunodetekcji SimpleJess oraz metody kolorymetryczne i statystyczne metody analizy danych.

Do strony metodologicznej pracy mam następujące pytania i uwagi:

- na str. 39 użyto stwierdzenia „izolacja obszaru korowego”. Proszę o uściślenie czy chodzi o konkretny obszar kory czy też o całą korę.
- Czy stopniowe usuwanie suplementu B-27 z pożywki hodowlanej poprzez zastępowanie jej medium MEM, wpływało w zauważalny sposób na wzrost i kondycję komórek?
- Czy obecność **funkcjonalnych** receptorów GR dla CORT w zastosowanym modelu komórkowym była wcześniej weryfikowana przez innych badaczy i czy występują różnice w gęstości tych receptorów pomiędzy neuronami korykalnymi a hipokampalnymi w hodowli? Czy ekspresja tych receptorów w komórkach otrzymanych z mózgow embrionów różni się od ekspresji *in vivo* u zwierząt dorosłych?
- wyjaśnienie celu transfekcji komórek plazmidem GFR znajduje się dopiero w rozdziale 3.3.1., podczas gdy dla porządku powinien się on znaleźć w opisie metody w rozdziale 3.2.1.

Realizacja zaplanowanych badań, w tym skrupulatnie przeprowadzonych analiz morfologicznych, pozwoliła na uzyskanie ciekawych wyników. Wykazano m.in., że długotrwały wpływ CORT na strukturę kolców dendrytycznych jest różny w hodowlach korykalnych i hipokampalnych a białko FAK nie jest zaangażowane w te zmiany w przypadku neuronów hipokampalnych. Określono równolegle max stężenia CORT, które nie są cytotoksyczne i nie wywołują zmian morfologicznych w neuronach.

Kolejne wyniki wykazały zmiany ekspresji szeregu genów kodujących białka zaangażowane w procesy zmian morfologicznych kolców dendrytycznych na skutek długotrwałego (72 h) działania CORT, szczególnie w neuronach korykalnych.

Czytelność przedstawionych na rycinach wyników doskonale uzupełniają schematy, będące graficzną syntezą metodologicznej koncepcji pracy.

Uwagi do prezentacji wyników:

- w opisie zmian przedstawionych na Ryc. 4.10 H (str. 80/81) błędnie podano parametr „przeciętna **długość głów** kolców dendrytycznych”, podczas gdy na wykresie jest „długość kolców dendrytycznych” i to ta wielkość była w rzeczywistości badana.
- Ryc. 4.11, 4.13 i 4.15 – logiczniej byłoby uporządkować wykresy według osi czasowej rosnącej (t.j. najpierw 48h a potem 72h).
- czy nie próbowano wydłużyć czasu obserwacji zmian w ekspresji FAK? Być może zwiększona synteza transkryptu widoczna po 72 h przekłada się na poziom białka dopiero w późniejszym czasie?

Rozdział Dyskusja to, w mojej opinii, bardzo dobrze napisana część dysertacji, świadcząca o umiejętności analitycznego podejścia oraz krytycyzmie wobec wyników własnych badań. Świetnie sprawdzają się tu syntetyczne podsumowania dyskutowanych zagadnień, wskazujące najważniejsze spostrzeżenia.

Analiza otrzymanych wyników doprowadziła m.in. do istotnego wniosku, że pierwotne neurony korykalne i hipokampalne odmiennie reagują na zastosowane manipulacje. Autor dyskutuje możliwe przyczyny tych różnic. Włączając się do tej dyskusji, chciałam zapytać czy zdaniem Autora może tu mieć znaczenie np. odmienny profil ekspresji receptorów glutaminianergicznych AMPA/NMDA w rejonie kory i hipokampa? Jaka jest opinia Doktoranta na temat pośredniego, zależnego od glutaminianu, wpływu CORT na przebudowę synaps w jego układzie eksperymentalnym (szczególnie w AMPAR-zależnym mechanizmie długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD), który może zachodzić bez dynamicznej regulacji poziomu białka PSD-95 – Sci. Rep. 2020, 10:2054)?

W ostatnim rozdziale, Podsumowanie i wnioski, Doktorant formułuje 5 głównych wniosków odnoszących się do postawionych wcześniej celów, jasno wykazując, że wszystkie one zostały zrealizowane w wyniku przeprowadzonych badań.

Podsumowując, uzyskane wyniki wypełniają lukę w dotychczasowej wiedzy dotyczącej chronicznego wpływu podwyższonego stężenia CORT na morfologię kolców dendrytycznych oraz molekularne uwarunkowania tych zmian. Stanowią one oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, spełniając tym samym wymóg stawiany kandydatom do stopnia doktora.

Zamieszczone w recenzji drobne uwagi nie wpływają w istotny, merytoryczny sposób na ogólną ocenę pracy a postawione pytania mają charakter inspiracji do dyskusji.

Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do oceny rozprawa 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 w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr Michała

Wilczkowskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Biorąc pod uwagę względy merytoryczne, warsztat metodyczny, jak również sposób prezentacji wyników, ich interpretacji oraz dyskusji, wnoszę jednocześnie o wyróżnienie rozprawy.

W uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie chcę ponadto podkreślić wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników, które są istotne nie tylko w wąskim rozumieniu neurostrukturalnych skutków chronicznego działania CORT oraz leżących u podstaw mechanizmów molekularnych. Ich znaczenie należy postrzegać również szerzej, jako solidną podstawę do dalszych badań farmakologicznych nakierowanych na nowe terapie zaburzeń i chorób mających swoje podłoże w dysregulacji stresu, jak również jako podstawową wiedzę pomocną w ocenie ryzyka zaburzeń neurologicznych związanych z przewlekłym stosowaniem sterydów.

Wysoką wartość naukową podjętej w rozprawie tematyki badań podkreśla dodatkowo fakt, że Doktorant jest beneficjentem grantu NCN PRELUDIUM, z którego środków badania te zrealizowano.

Prof. dr hab. Lidia Strużyńska



