

Prof. dr hab. Jan Konopacki
Katedra Neurobiologii
Uniwersytetu Łódzkiego
Łódź, Pomorska 141/143

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Braszki pt.:
**Wpływ farmakologicznej aktywacji i inaktywacji brzuszego pola nakrywki
śródmózgowia na wzorzec zapisu hipokampalnego EEG u swobodnie
poruszających się szczurów.**

I. Uwagi ogólne

Procesy oscylacyjne i synchronizacyjne pojawiające się w różnych obszarach mózgu ssaków od lat są przedmiotem zainteresowania wielu laboratoriów na świecie. Z jednej strony leżą one bowiem u podstaw powstawania wszystkich wzorców EEG, a z drugiej reprezentują podstawową formę funkcjonowania i współdziałania sieci neuronalnych. Dzięki zjawiskom oscylacyjnym możliwe jest pełne przetwarzanie informacji czuciowych, determinujących różne wzorce zachowania oraz powstawanie krótko- i długotrwałych zmian w przewodnictwie synaptycznym.

Generowany w obszarach kory limbicznej rytm theta stanowi przykład najlepiej zsynchronizowanej aktywności oscylacyjnej występującej w mózgu ssaków. Zainteresowanie rytmem theta należy wiązać nie tylko z jego rolą w procesie modyfikowania tzw. plastyczności synaptycznej ale również z faktem, że obecny jest jako swoisty elektrofizjologiczny marker w kilku chorobach zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego u ludzi. Wszystkie badania rytmu theta mają zatem również istotne znaczenie aplikacyjne. Idą one obecnie w dwóch głównych kierunkach:

1. poznania komórkowych oraz jonowych mechanizmów powstawania oscylacji theta,
2. określenia neuronalnego oraz neurochemicznego substratu dla tych oscylacji.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Braszki utrzymuje się w drugim nurcie badań. Pochodzi z laboratorium mającego długie, bo prawie 25 letnie, tradycje w badaniu fizjologii rytmu theta. Doktorant postawił sobie za główny cel swoich badań określenie roli brzuszego pola nakrywki śródmózgowia (VTA) w modulowaniu szerokiego spektrum potencjału polowego formacji hipokampa u czuwających szczurów w sytuacji warunkowania awersyjnego. Należy podkreślić, że autor podjął się bardzo trudnego

technicznie zadania. Trudność problemu polega m.in. na tym, że VTA jest jednym z wielu obszarów tworzącego siatkowatego pnia mózgu, bardzo heterogennego oraz wrażliwego na wszelakie ingerencje. Badania pnia mózgu zawsze wiążą się z dużym ryzykiem np. nagłej śmierci zwierząt laboratoryjnych w trakcie wielogodzinnego doświadczenia. Jestem pełen uznania dla autora - pomimo wielu trudności technicznych, (o których autor co prawda nie wspomina), zrealizował w pełni postawione zadania.

W celu scharakteryzowania roli brzusznej pola nakrywki śródmózgowia w regulacji szerokiego spektrum potencjału polowego hipokampa mgr Łukasz Braszka zastosował szereg standardowych technik elektrofizjologicznych, technikę odwracalnych lezji przy użyciu lokalnych, domózgowych iniekcji prokainy, jak również technikę domózgowych iniekcji amfetaminy, agonistów i antagonistów receptorów układu GABAergicznego. Aby w miarę powtarzalnie rejestrować oba rytmy theta (typ 1 oraz typ 2) w tych samych warunkach doświadczalnych, doktorant słusznie wprowadził metodologię wytwarzania odruchów warunkowych. Uzyskane przez autora wyniki wypełniają lukę we współczesnej wiedzy o roli VTA w regulacji rytmu delta, aktywności rytmicznej w szerokim paśmie częstotliwości theta ale również pasmach powyżej 12 Hz. Fakt, że mgr Łukasz Braszka skoncentrował się na badaniu roli układu GABA-ergicznego z jednej strony znakomicie uzupełnia wcześniejsze badania przeprowadzone przed laty w tym samym laboratorium przez dr Anitę Nowacką a z drugiej dostarcza nowej wiedzy dotyczącej udziału pnia mózgu w regulacji rytmu theta.

II. Uwagi szczegółowe

Wstęp pracy jest dość obszerny (36 str.). Autor dokonuje w tym rozdziale przeglądu piśmiennictwa dotyczącego substratu neuronalnego dla rytmu theta a następnie zgrabnie opisuje rolę struktur pnia mózgu w generowaniu tego rytmu eksponując brzuszne pole nakrywki śródmózgowia. W ostatniej części wstępu mgr Łukasz Braszka przedstawia w jasny sposób podstawowe założenia i cele pracy. Rozpoczynając badania doktorant postawił dwie klarowne hipotezy robocze, a mianowicie, że:

1. Aktywacja VTA wywołuje wzrost mocy hipokampalnego rytmu theta oraz skrócenie latencji reakcji ucieczki od bodźca awersyjnego.
2. Aktywacja receptorów GABA-ergicznym VTA spowoduje efekty przeciwne.

Innymi słowy, chociaż w pracy rejestrowano aktywność polową hipokampa w zakresie od 0 - 15 Hz, to podstawowym celem rozprawy było zweryfikowanie hipotezy, że całościowa modulacja aktywności układu GABAergicznego brzusznej pola nakrywki śródmózgowia będzie miała wpływ na behavior oraz moc hipokampalnego rytmu theta u zwierząt czuwających.

W rozdziale "Materiał i Metoda" mgr Łukasz Braszka w sposób przejrzysty omawia zastosowane techniki doświadczalne oraz grupy zwierząt, w których szczurom utrzymywanym w narkozie uretanowej podawano domózgowo odpowiednio: roztwór prokainy, amfetaminy, wodę destylowaną oraz wodne roztwory wybranych antagonistów i antagonistów receptorów GABAergiczných. Plan badań został bardzo dobrze zaprojektowany i pomysłowo przedstawiony na ryc. 2.1. W trakcie czytania tej części pracy nasunęły mi się pewne wątpliwości.

1. **Autor zdecydował się na podawanie wodnych roztworów związków a jako kontrolę podawał wodę destylowaną. Jak słusznie zauważa w dyskusji, woda destylowana może jednak wypłukiwać neuroprzekaźniki z przestrzeni synaptycznej. Co więcej może wywoływać tzw. efekty miejscowe, m.in. przez nagłe zaburzenie ciśnienia osmotycznego co mogło mieć wpływ np. na moc rejestrowanego sygnału EEG.**
2. **Ryc. 4.1.7 pokazuje, że amplituda rytmicznego sygnału EEG rejestrowanego z hipokampa (theta) przekracza 1 mV. To duża wartość. Standardowo amplituda 0.5 mV jest powszechnie akceptowana jako bardzo dobra. Uwaga powyższa jest o tyle istotna, że na str. 42 mgr Łukasz Braszka informuje, że elektrody implantowano na głębokość 3.1 mm. Ryc. 4.1 wskazuje, że był to głównie obszar warstwy komórek piramidowych CA1. Z warstwy komórkowej z reguły sygnał połowy jest słaby, najlepszy jest z obszaru powyżej warstwy komórkowej co jest wynikiem lokalizacji źródła prądu.**

Wart podkreślenia jest fakt, że autor nie ograniczył się w swoich badaniach do analizy samego rytmu theta. Poza pasmem częstotliwości 3 -12 Hz, analizował również pasma częstotliwości 0-3 Hz oraz 12-15 Hz. Co więcej, analizie widmowej poddano zarówno aktywność EEG hipokampa ipsi- jak i kontrlateralnego w stosunku do iniekcji. Taka procedura pozwoliła autorowi traktować formację hipokampa jako sieć neuronalną generującą aktywność oscylacyjną w różnych pasmach częstotliwości oraz różnym stopniu zsynchronizowania.

3. **Górny zapis z ryc. 4.1.7 pokazuje długie fragmenty rytmu theta. Fragmenty te poprzedzielane są nieregularnymi falami i dużej amplitudzie. Podobnego zapisu analogowego nie znajduję na dwóch pozostałych ryc. (4.2.7 i 4.3.7). Nie są to artefakty oddechowe. Nieregularność tych fal może być wynikiem interferencji z sygnałem zewnętrznym (?).**

Bardzo mocną stroną rozprawy doktorskiej jest dyskusja. Mgr Łukasz Braszka omawia w tym rozdziale wpływ iniekcji prokainy oraz zastosowanych agonistów i antagonistów receptora GABAergicznego na powstawanie hipokampalnych oscylacji w szerokim paśmie częstotliwości bo od 0-16 Hz. Uzyskane przez doktoranta wyniki dobitnie wskazują, że obniżenie aktywności neuronów dopaminergicznych VTA obniża moc hipokampalnego rytmu theta typu 2. Jest to bardzo cenna informacja, która może mieć znaczenie Kliniczne. Nie jest bowiem wykluczone, że podobne następstwa, to jest obniżenie aktywności neuronów dopaminergicznych VTA występuje u pacjentów z chorobą Alzheimerera

III. Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Braszki wskazuje, że doktorant jest dobrze przygotowany pod względem teoretycznym jak również znajomości trudnych technik neuroelektrofizjologicznych do dalszej pracy naukowej. Duża erudycja autora sprawiła, że praca została napisana w sposób bardzo starannie przemyślany i dobrym językiem. Jak każda praca naukowa, również rozprawa doktorska mgr Łukasza Braszki nie jest wolna od pewnych nieścisłości. Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania pracy, mają głównie charakter techniczny bądź redakcyjny i w niczym nie ujmują mojej bardzo wysokiej jej oceny. Recenzowana rozprawa doktorska stanowi przemyślaną koncepcyjnie, dobrze wykonaną i opisaną całość co składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Autor wykazał się doskonałą znajomością literatury a cytowane w pracy ponad 320 pozycji piśmiennictwa to prace bardzo starannie przez doktoranta wyselekcjonowane. Wyniki uzyskane przez mgr Łukasza Braszki w sposób znaczący przyczyniają się do poznania roli VTA w generowaniu rytmu theta w korze limbicznej.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Łukasza Braszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Jan Konopacki

Łódź, 28. 07. 2021.