



Kraków, 05.08.2022

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek. Andrzeja Królika

Pt. „Udział niespecyficycznych kanałów jonowych typu TRP (z ang. transient receptor potential) przepuszczalnych dla jonów wapnia w procesach konsolidacji i rekonsolidacji pamięci”.
wykonanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Elżbiety Salińskiej

Formalna charakterystyka pracy

Przedłożona do oceny praca doktorska lek. Andrzeja Królika składa się z typowych dla tego typu dzieł części tj. streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, opisu założeń i celów pracy, metodyki, opisu rezultatów, dyskusji oraz krótkiego podsumowania. Ponad 15 stron maszynopisu to pozycje literaturowe, na podstawie których Autor napisał wstęp i przedyskutował wyniki swoich badań. Pozycje literaturowe są dobrane właściwie.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu 2014/15/B/NZ4/04487, co dowodzi nowatorskiego charakteru badań. Część wyników będących podstawą rozprawy doktorskiej została opublikowana w 1 publikacji, w której Doktorant jest pierwszym autorem. Na podstawie danych wskazanych w publikacji, udział Doktoranta w powstawaniu zarówno publikacji, jak i doktoratu polegał na zdefiniowaniu problemu badawczego, wykonaniu badań, zanalizowaniu danych oraz napisaniu manuskryptu. Poza tą jedną publikacją Doktorant jest współautorem jeszcze jednej publikacji, znacznie odbiegającej od tematu doktoratu, związanej z badaniami klinicznymi.



Merytoryczna ocena rozprawy

Celem pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji było sprawdzenie, czy aktywacja kanałów TRP jest kluczowym etapem w procesie formowania się pamięci. Swoje badania Doktorant wykonał z wykorzystaniem modelu jednodniowych piskląt kurzych. Realizacja prac badawczych przebiegała wieloetapowo. W pierwszym etapie badań Doktorant wykazał obecność wybranych kanałów TRP w mózgu kurczęcia, w rejonach związanych z formowaniem się pamięci. Następnie sprawdzał, czy zablokowanie wybranych kanałów TRP wpływało na procesy konsolidacji i rekonsolidacji pamięci w modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców u jednodniowych kurcząt, a także na ekspresję wybranych białek związanych z formowaniem się pamięci. W kolejnych krokach ustalał rolę sygnału wapniowego generowanego poprzez pobudzenie kanałów TRP, a także rolę glutamatergicznych receptorów metabotropowych grupy I w tym procesie.

Eksperymenty wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały wykonane na modelu jednodniowych piskląt kurzych, co stanowi pewną odmiennność w kontekście innych eksperymentów. Większości badań w tym zakresie jest przeprowadzana na gryzoniach, myszach lub szczurach. Wprowadza to też pewien rodzaj trudności w dyskusji wyników, szczególnie w kontekście odniesienia się do zaburzeń ludzkich a także powiązania wyników z innymi danymi. Modele mysie lub szczurze posiadają i tak już sporo ograniczeń, tutaj dodatkowo należy wziąć pod uwagę różnice pomiędzy ptakami a gryzoniem. Doktorant ponadto w niektórych miejscach manuskryptu cytuje badania wykonane np. na nicieniach lub muszkach owocowych, co przyczynia się do zwiększenia zawłości analizy całego problemu w dysertacji.

W obszernym wstępie Doktorant opisuje czym jest pamięć, definiuje procesy konsolidacji i rekonsolidacji pamięci, a także molekularne mechanizmy leżące u podstaw procesów zapamiętywania. Wymienia rodzaje jonowych kanałów TRP oraz pokrótce opisuje ich znaczenie. W kolejnych częściach opisuje modulatory kanałów TRP, a także wybrane białka związane z procesami formowania się pamięci (neuralną cząsteczkę adhezji komórkowej, NCAM, oraz zależną od kalmoduliny kinazę II). W końcowej części wstępu Doktorant pokrótce opisuje model pasywnego unikania bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt oraz przedstawia znaczenie projektu.

W ocenie recenzenta wstęp napisany jest w sposób dość zawły i niejednorodny, co sprawia że jest trudny w odbiorze dla Czytelnika.



Eksperymenty wykonywano na modelu jednodniowych kurcząt, ze szczególnym uwzględnieniem rejonu przyśrodkowego nadprążkowania brzuszego. Natomiast informacje zawarte we wstępie dotyczą hipokampa czy też jądra migdałowego u ssaków (gryzoni lub człowieka), są wymieszane, i brak jednoznacznego powiązania pomiędzy informacjami dotyczącymi hipokampa u myszy a IMM u ptaków (wskazanie np. podobieństw i różnic). Zdarza się iż w jednym akapicie doktorant miesza informacje dotyczące gryzoni, ludzi i ptaków. Lepsze wyjaśnienie podobieństw pomiędzy modelem ptasim i mysim znajduje się co prawda na początku dyskusji, ale do tego momentu czytelnik pozostaje w niepełnej wiedzy. Ewentualnie można było pokusić się o zebranie podobieństw i różnic pomiędzy modelem ptasim, szczurzym a ludźmi w tabeli.

Opis rekonsolidacji pamięci jest nie do końca zrozumiały dla Czytelnika. Nie jest jasno wyjaśniona biologiczna rola tego procesu, i dlaczego akurat tym aspektem formowania pamięci zajął się Doktorant w swoich badaniach.

Rola neuroprzekazników w procesach pamięci mogłaby być opisana staranniej. Rola glutaminianu, który jest rzeczywiście kluczowy w procesach pamięci, jest opisana pobieżnie, ponadto poszczególne informacje są rozrzucone w różnych miejscach wstępu, zamiast zostać zebrane w jednym miejscu. Brakuje lepszego opisu fundamentalnych procesów w pamięci, takich jak długotrwałe wzmocnienie synaptyczne lub też długotrwałe osłabienie synaptyczne oraz rola receptorów glutamatergicznych w tych procesach.

Opis białek związanych z formowaniem się pamięci-NCAM i zależna od kalmoduliny kinaza II znowu dotyczy roli tych białek przede wszystkim u gryzoni i człowieka, natomiast informacja na temat tego, czy podobnie to funkcjonuje u kurcząt jest niepełna.

W opisie znaczenie projektu troszkę brakuje lepszego uzasadnienia, w jaki sposób wiedza zdobyta umożliwi poszukiwanie skutecznych leków w licznych zaburzeniach neurologicznych i psychiatrycznych.

W rozdziale Materiały i Metody znajdujemy opis modelu pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u jednodniowych kurcząt. W opisie metody podawania domózgowego związków Doktorant nadmienia, iż substancje wstrzykiwano metodą „free hand” z pomocą ogranicznika umożliwiającego wkłucie się na głębokość 3.5 mm, oraz iż rejon iniekcji określano kierując się charakterystycznym ukształtowaniem czaszki przez wyczcucie go opuszką palca. Czy taki sposób podań rzeczywiście gwarantował precyzyjne wkłucie się eksperymentatora w docelowy rejon mózgu oraz czy poprawność wkłucia była w jakikolwiek sposób weryfikowana post-mortem ?



Podano, iż jednodniowe kurczęta usypiano vetbutalem, nie podano jednakże ani drogi podania ani dawki.

W dalszej części opisu materiałów i metod znajdujemy opis immunohistochemii fluorescencyjnej oraz western blotu, jak również opis ekspresji białek na poziomie mRNA.

Analiza statystyczna-nie podano, jaki rodzaj analizy ANOVA został zastosowany do przeprowadzenia porównań statystycznych.

Wyniki. Doktorant wykazał ekspresję kanałów TRPC3, TRPV1 oraz TRPV3 w mózgu kurcząt.

W opisie wyników powinny się znaleźć szczegółowe opisy analiz statystycznych, w szczególności wartości F. A także, jak już było wspomniane, jaki rodzaj ANOVY był przeprowadzany.

Dyskusja. W pierwszym rozdziale dyskusji Doktorant opisuje sam model pasywnego unikania negatywnych bodźców smakowych u kurcząt, wskazując na podobieństwa tego modelu to powszechnie stosowanych modeli na gryzoniach. Brakuje jednakże najważniejszego porównania-to znaczy, jak się te badania mają w odniesieniu do ludzi. Następnie opisuje w sposób dość szczegółowy obecność kanałów TRP w mózgu kurcząt, przedstawiając znaczenie i nowatorskość wyników własnych na tym tle. Następnie opisuje wpływ blokowania kanałów TRP na procesy formowania się pamięci, dyskutując wyniki własne z danymi literaturowymi. Udowadnia istotną rolę receptorów mGlu grupy I oraz generowanego za ich pośrednictwem sygnału wapniowego w procesach pamięci, a także kluczową rolę sygnału wapniowego generowanego przez kanały TRP w tych procesach, szczególnie w przypominaniu, czyli przywoływaniu śladów pamięciowych, co wykazał w ramach pracy doktorskiej. Porównuje swoje badania do myszy, do szczurów i do ptaków, co powoduje lekką dezorientację czytelnika, jak również nie do końca jasność, czy rzeczywiście takie same mechanizmy są właściwe dla ssaków, w tym dla człowieka. Być może dla Doktoranta jest to oczywiste, gdyż zajmuje się modelem kurzym, jednakże dla innych Czytelników może nie do końca być do jasne. Ciut łatwiej byłoby poruszać się czytelnikowi, gdyby te informacje zostały zebrane w tabelce, opis wyników wraz z informacją na jakim gatunku eksperymenty zostały przeprowadzone.

W moim odczuciu opis roli receptorów mGlu grupy I zarówno w procesach związanych z pamięcią, jak i w procesie aktywacji/dezaktywacji kanałów TRP mógłby być lepszy. Poszczególne fragmenty dotyczące tego zagadnienia są rozstrzelone w całym tekście manuskryptu, trudno więc się w prosty sposób zorientować, jak rzeczywiście działają ligandy badanych receptorów w



zwierzęcych modelach pamięci oraz jaka jest rola receptora NMDA w tych procesach, która jest przecież fundamentalna.

W końcowej części dyskusji Doktorant przedyskutowuje zmiany w ekspresji dwóch wybranych białek oraz ich mRNA. Wykazuje on iż prawidłowa ekspresja białek NCAM oraz CaMKII jest niezbędna do prawidłowego formowania się śladu pamięciowego, a pobudzenie kanałów TRP i napływ przez nie jonów wapnia warunkują z kolei prawidłową aktywację syntezy tych białek, co znajduje potwierdzenie w wynikach uzyskanych przez Doktoranta. Jednocześnie brak zmian w ekspresji mRNA dla badanych białek sugeruje, iż obserwowane zmiany w poziomie białek zachodzą na poziomie translacji, a nie transkrypcji.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Andrzeja Królika pt. „Udział niespecyficznych kanałów jonowych typu TRP (z ang. transient receptor potential) przepuszczalnych dla jonów wapnia w procesach konsolidacji i rekonsolidacji pamięci”. spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim, zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z późn. zm. W związku z powyższym zwracam się do Komisji ds. Studiów Doktoranckich i Doktoratów Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o dopuszczenie lek. Andrzeja Królika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Joanna Wierońska

Kierownik Pracowni Neurobiologii Zaburzeń Psychiczych

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk