

**Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski**

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Zoologii  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
☎: (+12) 664-53-73  
E-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

## O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister **Marty M. CZYŻEWSKIEJ** pt.

### ***"Analiza oddziaływania falkarinolu i $\alpha$ -tujonu na receptory $GABA_A$ związane z fazową i toniczną formą inhibicji"***

Charakterystyczną właściwością ośrodkowego układu nerwowego, szczególnie mózgowia, jest jego dychotomiczny podział. Objawia się on zarówno w strukturze, jak i jego aktywności. Z jednej strony mamy bowiem układy (projekcje, drogi) specyficzne i niespecyficzne, z drugiej zaś pobudzenie i hamowanie, które realizowane jest głównie poprzez aktywację układu wykorzystującego kwas  $\gamma$  – aminomasłowy (GABA), jako neuroprzekaźnik (neurotransmitter) hamujący. O znaczeniu tej projekcji w prawidłowym funkcjonowaniu mózgowia, niech świadczy fakt, że aż przeszło 30%, a w niektórych strukturach nawet 50% to neurony hamujące. Hamowanie realizowane jest poprzez aktywację dwu typów receptorów: jonotropowych  $GABA_A$  i metabotropowych  $GABA_B$ . Ze względu na specyfikę swojej budowy i bezpośrednią aktywację kanałów jonowych, receptory  $GABA_A$  są niesłychanie ważne i wrażliwe na wiele substancji modulujących ich aktywność. Jednak, mimo ponad 60 lat badań neurotransmisji GABA-ergicznej, w tym budowy receptora  $GABA_A$ , ciągle nie do końca wiemy z ilu podjednostek jest zbudowany i jak oddziałuje z różnymi związkami czy substancjami. Warto dodać, że do tej pory zidentyfikowano, aż 19 różnych podjednostek, co dają teoretyczną możliwość ponad 74 tys. różnych kombinacji receptora  $GABA_A$ . Nie dziwi zatem fakt, iż grupa tych receptorów jest przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani Marty Czyżewskiej.

Autorka swoją pracą doskonale wpisuje się w prowadzoną od wielu lat tematykę badań Samodzielnej Pracowni Biofizyki Układu Nerwowego, Katedry Biofizyki

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, kierowanej przez Profesora Jerzego Mozrzymsa. Pani Czyżewska wykorzystując bardzo duże doświadczenie zespołu, głównie promotora, stawia jasny cel swojej pracy. Zbadać wpływ dwu związków pochodzenia naturalnego:  $\alpha$ -tujonu i falkarinolu na aktywność receptorów GABA<sub>A</sub>.

**Przedmiot podjętych badań jest zatem ważny i aktualny szczególnie z punktu widzenia farmakologii receptorów GABA<sub>A</sub>, a postawiony cele jest jasny ambitny i bardzo trudny.**

W tym miejscu pragnę wyraźnie podkreślić, że wyniki przedstawione w pracy doktorskiej Pani Czyżewskiej, zostały już wcześniej opublikowane w kilku bardzo dobrych czasopismach naukowych z Listy Filadelfijskiej o wysokim współczynniku przebiccia. **Dwie prace, w których doktorantka jest pierwszym autorem stanowią główny trzon dysertacji.** Ocena doktoratu jest zatem w zasadzie oceną publikacji na nią się składających, **a one same są jej najlepszą recenzją.** Jest to bowiem opinia wielu, niezależnych, najwyższej klasy fachowców w tej dziedzinie. Chciałbym, zatem zwrócić uwagę, tylko na pewne istotne jej elementy.

Dysertacja Pani Czyżewskiej ma typowy układ rozprawy doktorskiej, liczy 106 stron maszynopisu, 207 pozycji cytowanej literatury, wśród których prawie 50% pochodzi z ostatnich 10 lat. Brakuje jednak na początku streszczenia, choć jest na końcu obszernie podsumowanie, które mogłoby je zastąpić, a wyniki można by podsumować w kilku punktach. Pracę rozpoczyna bardzo dobrze napisany wstęp, będący solidną, obszerną (41 stron) i dobrze napisaną częścią dysertacji. Precyzyjnie wprowadza czytającego w tematykę badań. Autorka opisuje syntezę i hydrolizę GABA, szczegółowo badane receptory, ich budowę i miejsca wiązania różnych związków modulujących ich aktywność. Udział i mechanizm jonowy GABA w hamowaniu, a także pobudzeniu, wymienia struktury mózgowia w których ten pobudzający proces zachodzi. Szkoda, że nie znalazła się w tym miejscu jeszcze jedna bardzo ważna dla fizjologii organizmu struktura mózgowia (jaka?), w której GABA spełnia dwoistą rolę, pobudzającą i hamującą? Następnie autorka opisuje dwa rodzaje hamowania GABA-ergicznego (fazowe i toniczne), które są jej przedmiotem badań. Ten podrozdział jest niesłychanie ważny, bowiem te dwie formy transmisji biorą udział w kontroli sieci neuronalnej, a nie były do tej pory szczegółowo analizowane. Na kolejnych stronach wstępu opisywana jest budowa molekularna receptorów GABA<sub>A</sub>, ich funkcjonalne zróżnicowanie, rozmieszczenie w mózgowiu, mechanizm aktywacji i zmian ich kinetyki.

Tym zagadnieniom doktorantka poświęca sporo miejsca, szeroko dyskutując wyniki prac macierzystej Pracowni (będąc niektórych współautorką) z pracami innych autorów. Dobrze napisany wstęp kończy rozdział opisujący egzogenne modulatory i inne związki oddziałujące z badanymi receptorami, w tym badany  $\alpha$ - tujonem, należącym do grupy terpenoidów. Szkoda, że w tym miejscu doktorantka nie przedstawiła także drugiego badanego związku – falkarinolu. Na opis, którego czytający musi czekać, aż do rozdziału wyniki badań. **Niemniej jednak, czytając wstęp nie miałem żadnej wątpliwości, że autorka poruszyła wszystkie istotne zagadnienia, będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Robi to w sposób merytoryczny i zrozumiały w oparciu o dobrze dobraną, bogato cytowaną literaturę, dodatkowo uzupełniając bardzo czytelnymi, kolorowymi schematami i rycinami.**

Szczegółowy cel pracy doktorskiej Pani Czyżewskiej polegał na zbadaniu wpływu dwu wcześniej wymienionych związków na dwie formy hamowania GABA-ergicznego (fazową i toniczną) na 4 typach receptorów GABA<sub>A</sub>, różniących się składem podjednostkowym. Jeden model związany jest z hamowaniem fazowym, a pozostałe 3 z tonicznym. Modele rekombinowanych receptorów ekspresjonowano na linii komórkowej HEK 293. Pomiar prądów rejestrowano metodą elektrofizjologiczną *patch-clamp*, w konfiguracji „whole-cell”, w przypadku  $\alpha$ - tujonu, również na pierwotnych hodowlach neuronalnych z hipokampa szczura, stosując aparaturę do szybkiej wymiany płynów wokół badanej komórki, co w tego typu badaniach, zważywszy szybkość transmisji synaptycznej jest niesłychanie istotne.

**Cała procedura zarówno, jeśli chodzi o hodowle komórkowe, jak i rejestracje elektrofizjologiczne, a także analiza otrzymanych wyników, w której porównywano zmiany amplitudy, czas narostu prądu oraz ubytek prądu w czasie podań agonisty nie budzą żadnych zastrzeżeń.**

Logicznie zaplanowane i konsekwentnie przeprowadzone eksperymenty, przyniosły rezultaty, które doktorantka opisała w jasny i powtarzalny sposób w stosunku do wszystkich badanych modeli receptora GABA<sub>A</sub>. Taka forma przedstawienia wyników, pozwala na bardzo łatwe, co w tego rodzaju badaniach jest niesłychanie istotne, porównanie poszczególnych serii doświadczalnych. Wyniki oprócz formy opisowej uzupełnione zostały oryginalnymi zapisami analogowych przebiegów rejestrowanych prądów oraz histogramami zmian amplitudy prądu, czasu jego narostu i ubytku przy różnych stężeniach badanych

związków. Ta bogata i szczegółowa dokumentacja otrzymanych wyników w połączeniu z dobrze dobraną analizą statystyczną podnosi wartość pracy. Wydaje mi się jednak, że przedstawienie w formie tabel wartości mierzonych parametrów elektrofizjologicznych w stosunku do stosowanych stężeń, dodatkowo poprawiłoby ich czytelność.

Pani mgr Marta Czyżewska w swojej pracy doktorskiej potwierdziła epileptogenny wpływ  $\alpha$ -tujonu, obserwując po jego podaniu zmniejszenie amplitudy odpowiedzi i zmianę przebiegów czasowych prądu we wszystkich badanych typach receptorów. Po raz pierwszy jednoznacznie wykazała, że badany związek ma największy wpływ na receptory GABA<sub>A</sub> o stechiometrii  $\alpha_1\beta_2\delta$ , które zaangażowane są w hamowanie o charakterze tonicznym. Stwierdziła, że wszystkie receptory z podjednostką  $\delta$ , są zdecydowanie bardziej podatne na działanie  $\alpha$ -tujonu, niż te z podjednostką  $\gamma_{2L}$ , co nie wyklucza również udziału tych receptorów w hamowaniu fazowym. Sugerują to wyniki wcześniejszych badań, a Pani Czyżewska próbuje tłumaczyć mechanizm ich działania poprzez wpływ pre- i postsynaptyczny. Rejestrowana dwufazowość narostu prądu w reakcji na  $\alpha$ -tujon, doktorantka tłumaczy potencjalną obecnością dwu miejsc wiązania tego związku przez receptor. Ciekaw jestem czy autorka ma jakiś pomysł, jak można by to doświadczalnie sprawdzić? Podanie  $\alpha$ -tujonu zmniejszyło również amplitudę i częstotliwość miniaturowych postsynaptycznych prądów hamujących, co wskazuje, że mechanizm jego działania związany jest raczej z procesami wiązania agonisty i brakowaniem receptora, niż występowaniem bloku otwartego kanału, co jasno podkreśla doktorantka w dyskusji pracy. Interesując i bardzo ważne z punktu widzenia toksyczności jest wykluczenie przez doktorantkę  $\alpha$ -tujonu w tzw. zjawisku absyntyizmu, a także jego gatunkowa specyficzność. Jak można ją wytłumaczyć i jakie może być tego biologiczne znaczenie?

Pani mgr Czyżewska w swojej pracy, jako pierwsza przeprowadziła szczegółową analizę modulującego wpływu na transmisję GABA-ergiczną drugiego z badanych związków (falkarinolu). Stwierdziła w receptorach GABA<sub>A</sub> o budowie  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  dwoistość reakcji generowanych prądów, zależną od stężenia falkarinolu. Niskie wzmacniało, a wysokie osłabiało przebieg wyzwalanych prądów. Takie zachowanie receptora po podaniu falkarinolu, autorka tłumaczy mechanizmem związanym z blokiem otwartego kanału. Czy na podstawie podobnej reakcji przedstawicieli innych alkoholi polietylenowych, do których należy falkarinol, można powiedzieć, że mechanizm ten jest wspólny dla nich? W przypadku receptorów GABA<sub>A</sub>  $\alpha_1\beta_2$  autorka po podaniu falkarinolu, rejestrowała znaczną

redukcję amplitudy prądowej, która pogłębiała się ze wzrostem stężenia podawanej substancji. Natomiast czas narostu prądu ulegał wydłużeniu, a ubytek prądu w okresie podawania związku zmniejszeniu. Taka reakcja wyklucza udział mechanizmu bloku otwartego kanału, a sugeruje raczej wpływ badanego związku na mechanizm wiązania agonisty i bramkowanie badanego receptora. Ciekawy wynik zaobserwowała doktorantka w przypadku podań falkarinolu na prądy hamujące generowane przez receptory GABA<sub>A</sub> o budowie  $\alpha_1\beta_2\delta$ . Tylko stężenia powyżej 1  $\mu$ M powodowały istotne zmiany w amplitudzie generowanych prądów i jego ubytku w czasie podania. Jaka może być przyczyna (mechanizm), takiej stężeniowo zależnej reakcji badanego receptora, czy to jest przykład hormezy jego działania?

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że doktorantka wynikami swojej pracy osiągnęła zamierzone cele. Pokazała większą lub mniejszą wrażliwość badanych podtypów receptorów GABA<sub>A</sub> na podawane związki, zależną od rodzaju budujących go podjednostek, czym udowodniła ich modulujący wpływ na projekcje GABA-ergiczną. Na podkreślenie zasługuje ostatnie zdanie podsumowujące rozprawę, w którym autorka wyraźnie podkreśla, iż otrzymane wyniki są dobrym „zaczynem” „...*dalszych poszukiwań związków, lub chemicznej modyfikacji tych badanych, które selektywnie będą oddziaływać z określonym typem receptora lub podjednostki...*” To dowód dojrzałości i rzadko spotykanej „pokory naukowej”.

Czytając pracę nie spotkałem rażących błędów, czy niezręczności językowych. Podkreślam gdyż, rzadko się to zdarza. Może tylko zbyt często autorka używa słowo „inhibicja”, „aplikacja”, „koaplikacja” zamiast polskiego „hamowanie”, „podanie”. Nie znalazłem w Bibliografii pozycji Katz i Thesleff (1957), która autorka cytuje na str. 17. Raczej badania prowadzi się na myszach, a nie „nad myszami” str. 26. Nie ma „kopalikacji”, tylko jest „aplikacja” str. 31. Raczej mówimy o badaniu neuronalnych mechanizmów snu i czuwania, a nie „snu i pobudzenia”. Jest także kilka literówek.

**Te drobne uwagi w żaden sposób nie wpływają, co z całą mocą podkreślam, na bardzo wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy. Moim zdaniem uzyskane przez doktorantkę wyniki, będące efektem solidnie i logicznie zaplanowanych badań oraz konsekwentnie, systematycznie przeprowadzonych doświadczeń, w istotny sposób uzupełniają i poszerzają istniejącą wiedzę na temat farmakologii receptorów**

GABA<sub>A</sub>. Wnoszą do niej zupełnie nowe elementy, dotyczące modulującego wpływu powszechnie występujących w naszym życiu codziennym związków, które w znaczący sposób wpływają na aktywność mózgowia, w pracy którego badana przez doktorantką projekcja GABA-ergiczna jest dominująca i bardzo ważna.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Marty M. Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę duży zakres przeprowadzonych badań, ich niesłychane skomplikowanie, pod względem metodycznym, a także dyskusji otrzymanych wyników oraz fakt, że znaczna część wyników została już opublikowana w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach, jak również to, że badania te były realizowane między innymi w ramach projektu NCN, uważam, że praca doktorska Pani mgr Marty M. Czyżewskiej zasługuje na wyróżnienie.

  
Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Kraków dnia 07. maja 2015.