

Toruń, 09.05.2015

prof. dr hab. Maria Stankiewicz  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Toruń, ul. Lwowska 1

Opinia dotycząca rozprawy doktorskiej mgr Marty Czyżewskiej pt.:

**Analiza oddziaływania falkarinolu i  $\alpha$ -tujonu na receptory GABA<sub>A</sub> związane z fazową i toniczną formą inhibicji .**

Praca doktorska, której wyniki zostały zaprezentowane w ocenianej rozprawie wykonana została w Samodzielnej Pracowni Biofizyki Układu Nerwowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Jest to praca w dziedzinie elektrofizjologii a celem jej było określenie mechanizmów działania substancji izolowanych z roślin:  $\alpha$ -tujonu i falkarinolu na hamujące receptory GABA<sub>A</sub>. Wybór substancji nie był przypadkowy; substancje te występują w codziennej diecie człowieka a pogląd na ich działanie (pozytywne/negatywne) na organizm człowieka zmieniał się w ciągu dziesięcioleci. Istniały dane, wskazujące, że docelowym miejscem ich aktywności są receptory GABA<sub>A</sub>, jednak szczegóły dotyczące specyficzności i mechanizmów działania nie były znane. Nowe dane w tym zakresie przynosi recenzowana praca doktorska; rozszerzają one znacznie poziom wiedzy na temat modulującego wpływu  $\alpha$ -tujonu i falkarinolu na aktywność receptorów GABA<sub>A</sub>. Zaproponowane zostały mechanizmy wpływu badanych substancji na fazowy i toniczny rodzaj hamowania powodowany przez receptory GABA<sub>A</sub>, oraz określony został poziom specyficzności działania w zależności od rodzaju podjednostek, z których zbudowane są te receptory. Rozprawa jest bardzo elegancko przygotowanym raportem, poszczególne jego części są dobrze zrównoważone a treść stanowi prawidłowo zorganizowaną całość.

Przed przystąpieniem do analizy rozprawy pragnę zwrócić uwagę, że Doktorantka wyniki swojej pracy doktorskiej opublikowała już w 4 artykułach, gdzie w dwóch z nich jest pierwszym autorem. Prace ukazały się w wysoko punktowanych czasopismach: Journal of Natural Products and European Journal of Pharmacology. W związku z powyższym zarówno przeprowadzone doświadczenia, ich analiza i opis oraz znaczenie przeprowadzonych badań zostały już poddane specjalistycznej i niewątpliwie krytycznej

ocenie. W tej sytuacji uważam, że ocena pracy naukowej stanowiącej doktorat została już dokonana – z wynikiem zdecydowanie pozytywnym lecz, żeby spełnić wymagania formalne poniżej zostanie przeprowadzona analiza treści rozprawy.

**Wstęp** do rozprawy to opis na 40 stronach budowy i funkcji receptorów GABA – głównie jonotropowych receptorów GABA<sub>A</sub>. Opisane są również substancje pochodzenia naturalnego modyfikujące działanie tych receptorów. W większości są to najnowsze dane, dobrze dobrane. Tekst ilustrują ryciny, można je podzielić na dwie grupy – jedna to schematy ogólne, przygotowane bardzo estetycznie, i w jednym stylu, dobrze obrazujące przedstawiany problem. Źródłem ich jest głównie Nature Reviews –Neuroscience – co oznacza, że autorka sięgnęła do źródeł „z najwyższej półki”. Druga grupa rycin przedstawia dane z doświadczeń innych autorów – też prawidłowo przygotowane chociaż w niektórych przypadkach literactwo powinno być większe ponieważ jest na granicy czytelności, np. Rys 1.14 – stężenia GABA i opis skali, podobnie Rys. 1.15. We wszystkich podrozdziałach ilość informacji jest wyważona a zwraca uwagę fakt, że pomiędzy podrozdziałami występują zdania wiążące, które stanowią uzasadnienie dlaczego treść kolejnego podrozdziału jest istotna z punktu widzenia opracowywanego zagadnienia. Trochę dziwi umieszczenie opisu falkarinolu dopiero w części „wyniki” – główna część tego opisu powinna raczej być umieszczona we wstępie w podrozdziale „Alkohole poliacetylenowe”. Żadne błędy merytoryczne nie zostały stwierdzone a zawarty we wstępie materiał oprócz swojej podstawowej roli jako wprowadzenie do części doświadczalnej może służyć jako dobra praca przeglądowa. Cel pracy został prawidłowo przedstawiony chociaż trochę brakuje w nim informacji czego autorka oczekiwała przed wykonywaniem badań.

**Materiał i metody** to szczegółowy opis stosowanych metod. Główna z nich to technika patch-clamp służąca do rejestracji czynności bioelektrycznej- w tym przypadku prądów płynących przez aktywowane receptory GABA<sub>A</sub>. Jest to technika najpowszechniej stosowana w elektrofizjologii, co nie znaczy, że najłatwiejsza. Wymaga ona bardzo dużej precyzji działania a uzyskiwanie prawidłowych, stabilnych, porównywalnych zapisów jest możliwe tylko przy dużej praktyce. Znaczący to, że Doktorantka z pewnością spędziła wiele czasu realizując swoje badania. Oprócz techniki elektrofizjologicznej stosowane były inne metody, które można określić jako wspomagające, niemniej konieczne do samodzielnego prowadzenia badań. Było to pozyskiwanie materiału z mózgu szczurów i hodowla komórek neuronalnych, hodowla linii komórkowych HEK 293 oraz metoda transfekcji komórek HEK 293. Ważnym elementem w stosowanych metodach był system szybkiej perfuzji neuronów co zabezpieczało przed zjawiskiem desensytyzacji receptorów GABA<sub>A</sub> – zjawiskiem, które mogło bardzo zniekształcać uzyskiwane wyniki. Wszystkie stosowane metody zostały właściwie dobrane i prawidłowo opisane. Zwraca uwagę szczególne przedstawienie

metodologii uśredniania przebiegów pojedynczych pomiarów prądów, wyznaczania amplitudy prądu, określania czasu narostu prądu oraz jego ubytku w czasie aplikacji agonisty. Na koniec fragmentu poświęconego stosowanym metodom pragnę podkreślić, że uważam za bardzo cenne, że Doktorantka – czyli młoda osoba, która prawdopodobnie będzie kontynuować badania naukowe posiada umiejętność prowadzenia doświadczeń elektrofizjologicznych na „naturalnym materiale”- w tym przypadku na neuronach hipokampa szczura. Coraz więcej badań elektrofizjologicznych jest prowadzona wyłącznie np. na liniach komórkowych czy oocytach *Xenopus* i chociaż badania takie z pewnością przynoszą wiele cennych informacji na temat cech biofizycznych i farmakologicznych badanych receptorów lub kanałów jonowych to nie przynoszą one pełnej informacji na temat fizjologii tych białek w warunkach "normalnych".

**Wyniki** – jak już zostało na początku powiedziane jakoś wyniki zostały już wcześniej ocenione przez ekspertów wydawniczych. Ważnym faktem jest, że zawsze przedstawiane są oryginalne zapisy uzyskane w doświadczeniach elektrofizjologicznych a dopiero potem następuje ich analiza statystyczna. Czytelnik może się zorientować w jakości uzyskiwanych zapisów i pokusić się o próbę samodzielnej interpretacji wyników. Właśnie w związku z tym nasunął mi się pewien problem. Substancja  $\alpha$ -tujon wydłuża czas narostu prądów przewodzonych przez receptory GABA czyli spowalnia ich kinetykę. Następnie jest podane, że  $\alpha$ -tujon zmniejsza ubytek prądu w czasie aplikacji agonisty. Rzeczywiście patrząc na zapisy widzimy, że zmniejsza. Jednak czy mniejszy ubytek prądu nie wynika po prostu z wolniejszej kinetyki prądu zmodyfikowanego testowaną substancją? Czy gdybyśmy proporcjonalnie do stopnia spowolnienia kinetyki wydłużyli czas rejestracji prądu po podaniu testowanej substancji to czy by się nie okazało, że ubytek prądu jest podobny jak w kontroli? Z pewnością nie byłoby to idealne rozwiązanie bo dłuższa aplikacja GABA stanowiłaby zaburzenie warunków porównywalnych do kontroli ale myślę, że mimo wszystko pewnie dodatkowe informacje taki model doświadczenia mógłby przynieść. Odwrotna sytuacja miała miejsce po falkarinolu. Jak pisze sama Autorka „przyspieszenie czasu narostu prądu było związane ze zwiększeniem ubytku prądu w czasie koaplikacji agonisty i falkarinolu”. Czyli szybsza kinetyka – większy ubytek prądu. Interesuje mnie jeszcze pewien techniczny problem – jak dokonywano normalizacji przebiegu prądów – np. Ryc. 4.11 –F lub 4.12-E ? Część wyników pracy jest bogata. Co prawda zapisywane było tylko jedno zjawisko – prąd płynący przez receptory  $GABA_A$  aktywowane egzogennym GABA jednak zapisy te były robione w różnych konfiguracjach podjednostek receptora w warunkach kontrolnych i pod działaniem substancji testowanych. Każda wartość średnia wyliczana była na podstawie co najmniej 6 powtórzeń, a czasami było ich znacznie więcej. Biorąc pod uwagę, że doświadczenia elektrofizjologiczne do łatwych nie należą stwierdzić można, że ilość i jakość

uzyskanych wyników oraz jakość ich analizy i interpretacji z pewnością zasługują na wysoką ocenę.

W **dyskusji** ważnym zagadnieniem jest porównanie uzyskanych wyników w zakresie działania  $\alpha$ -tujonu do wyników doświadczeń w których obserwowano wpływ tej substancji na miniaturowe postsynaptyczne prądy hamujące. Pozwoliło to na zaproponowanie mechanizmów działania  $\alpha$ -tujonu. Podkreślono w dyskusji, że udowodniono, że falkarionol wywołuje różne efekty na receptory GABA zaangażowane w fazową i toniczną formę inhibicji oraz, że efekt wywierany na każdy z badanych typów receptorów był związany z innym (zaproponowanym) mechanizmem działania. Są to bardzo konkretne wnioski, w pełni uzasadnione, wynikające z przeprowadzonych badań. W dalszej części dyskusji wielokrotnie Autorka odwołuje się do doświadczeń w których stosowano niższe dawki falkarinolu. I tutaj powstaje pewna niejasność natury „technicznej” – Doktorantka odwołuje się do wyników doświadczeń „prowadzonych przez innych członków zespołu SPBUN” .... i cytuje pracę pod własnym nazwiskiem. Sprawa się wyjaśniła po dokładniejszej analizie – „pozostali członkowie zespołu” testowali działanie substancji przy niskich jej stężeniach a Autorka przy wyższych a wszystkie wyniki znalazły się w cytowanej publikacji. Problem więc przestał istnieć niemniej Autorka powinna podać w tekście pewien komentarz aby sprawa przedstawiała się w bardziej przejrzysty sposób. Ogólnie dyskusja jest napisana w sposób zwarty, przekonujący z wykorzystaniem odpowiednich danych z literatury.

Tekst całej rozprawy jest napisany poprawnym, naukowym językiem. Pewne sformułowania, z którymi się nie zgadzam jak np. „przyspiesza czas narostu prądu” zamiast po prostu przyspiesza narost prądu lub „spowalnia czas narostu prądu” zamiast spowalnia narost prądu lub „bieżąca praca” (może lepiej by było prezentowana praca) oraz zbyt często pojawiające się słowa „co ciekawe” nie obniżają bardzo dobrego wrażenia jakie się odnosi przy czytaniu tekstu.

**Bibliografia** jest bogata – jest to prawie 200 pozycji z czego 75% ukazało się po roku 2000 a 21% po roku 2010. Cytowane prace zostały dobrze dobrane i wykorzystane.

Praca zakończona jest **podsumowaniem**. Podsumowanie to ma raczej charakter obszernego streszczenia, którego w rozprawie zabrakło. Należałoby umieścić je na początku rozprawy gdyż jest bardzo dobrze napisane i wcześniejsze zapoznanie się z nim ułatwiłoby śledzenie całego tekstu.

Podsumowując – stwierdzam z pełnym przekonaniem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z

późniejszymi zmianami). Biorąc pod uwagę opublikowany dorobek naukowy (4 prace związane z doktoratem + 2 inne) oraz wysoki poziom rozprawy doktorskiej składam wniosek o przyznanie nagrody dla Doktorantki Pani mgr Marty Czyżewskiej.

*M. Stankiewicz*