



**Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski**  
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
☎ (+48-12) 664-53-73  
E-mail: [marain.lewandowski@uj.edu.pl](mailto:marain.lewandowski@uj.edu.pl)

order  
MSB  
07.06.14

## O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister inżynier **Darii NOWAK** pt.

### ***„Rola metaloproteiny 3 w procesach neuroplastyczności na poziomie funkcjonalnym i strukturalnym hipokampa myszy”***

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), odkryte w roku 1962 przez Grossa i Lapię to enzymy z grupy endopeptydaz zależnych od  $Zn^{2+}$ . Powodują one degradację białek budujących błony podstawne i macierz zewnątrzkomórkową, uczestnicząc zarówno w wielu podstawowych, procesach fizjologicznych, jak i patologicznych organizmów żywych. Od momentu, kiedy Vaillant i współpracownicy w 2003, wykazali udział MMP-9 w rozwoju mózdzku, poprzez regulację wzrostu i migrację jego aksonów, stwierdzono, że metaloproteiny w tym na pewno MMP-9, mogą być zaangażowane w prawidłowy rozwój mózgowia, czyli proces neuroplastyczności.

Tym właśnie zagadnieniom poświęcona jest dysertacji Pani mgr inż. Nowak, która stawia ogólne pytanie, dotyczące udziału MMP-3 w procesach neuroplastyczności. Pytanie to z jednej strony jest kontynuacją konsekwentnie i z dużym sukcesem prowadzonych od kilku lat badań grupy Profesora Mozrzymsa – promotora doktoratu, z drugiej zaś istotną częścią aktualnie realizowanego projektu NCN. Podkreślam to, również dlatego, że część wyników recenzowanej pracy została już opublikowana w czasopiśmie o wysokim współczynniku przebiccia, a kolejne są w trakcie recenzji. **A zatem, sam pomysł realizowanych badań, jak i częściowe wyniki, poddane już zostały surowej ocenie niezależnych recenzentów, specjalistów badanych zagadnień.**

Praca doktorska mgr inż. Nowak, ma typowy układ, liczy 142 strony, podzielona jest na przyjęte w tego typu pracach rozdziały i podrozdziały, zawiera 189 pozycji dobrze dobranej literatury, **pośród której ponad 30% pochodzi z ostatnich 4 lat. Świadczy to o**

**bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu doktorantki do podjętego tematu i dyskusji otrzymanych wyników.** Moją uwagę zwrócił rozdział pracy, w którym autorka przedstawia swój dorobek naukowy. Wynika z niego, że nie kończyła studiów na klasycznym kierunku biologicznym, a raczej biotechnologii uczelni technicznej? **Fakt ten dodatkowo podkreśla odwagę podjęcia przez mgr inż. Nowak oryginalnego, trudnego tematu biologicznego (neurobiologicznego) i dyskusję otrzymanych wyników.** Być może też jest on powodem, bardzo obszernego, detalicznego wstępu dysertacji, który autorka zaczyna od omówienia budowy, działania i funkcji badanych białek w procesach fizjologicznych i patologicznych. Przedstawia budowę i funkcję hipokampa, synapsy, kolców dendrytycznych, plastyczność synaps pobudzających i hamujących, długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne. Kończy wstęp omówieniem roli MMPs w układzie nerwowym, szczególnie MMP-9 w jego plastyczności i nie do końca poznanej roli MMP-3 w tym procesie, cytuje przy tym liczne prace również macierzystej pracowni. **W oparciu o nie mgr Nowak, kończy wstęp trafnymi, jasno i logicznie sformułowanymi szczegółowymi celami pracy.** Po pierwsze, chce określić poziom MMP-3 w hipokampie myszy w różnych odstępach czasowych od wywołania LTP w synapsach pobudzających, jak i hamujących, po drugie sprawdzić, czy MMP-3 i MMP-9 w indukcji LTD wykorzystują szlak NMDA- zależny i po trzecie sprawdzić, czy MMP-3 zmienia strukturę neuronów hipokampa, podobnie jak to było obserwowane przez innych w korze wzrokowej myszy.

Procedura badawcza, w której autorka wykorzystuje trzy techniki: elektrofizjologiczną rejestrację aktywności neuronalnej *in vitro*, biochemiczne oznaczanie metodą Western blot i histochemię, jak i analiza otrzymanych wyników, nie budzą zastrzeżeń. Tu również, podobnie jak we wstępie, opisy są obszerne, miejscami zbyteczne, jak np. szczegółowy opis wszystkich najdrobniejszych odczynników, czy stosowanej aparatury. **Brakuje mi natomiast informacji o całkowitej liczbie użytych zwierząt, czy też wyjaśnienia, dlaczego zwierzęta były trzymane w dwu różnych fotoperiodach (LD 10/14 i LD 12/12)?**

Konsekwentna realizacja logicznie zaplanowanych zadań badawczych, przyniosła jasne wyniki, które mgr Nowak opisała w równie bardzo czytelny sposób, jak i poprzednie rozdziały dysertacji. Wyniki ilustrowane są przykładami immunodetekcji, wykresami słupkowymi poziomu badanego białka w określonych czasach pomiarowych, jak i krzywymi wejście-wyjście, wykresami zmiany amplitudy fEPSP, czy analizą stosunku nachylenia

fEPSP drugiej do pierwszej odpowiedzi przed i po generowaniu synaptycznych odpowiedzi w pomiarach elektrofizjologicznych. Odpowiednio dobrana analiza statystyczna, potwierdza bądź nie, istotność prezentowanych wyników, a zatem je uwiarygodnia. **Brakuje mi trochę przykładów oryginalnych rejestracji elektrofizjologicznych, które dla elektrofizjologa, są często czytelniejsze, niż zbiorcze wykresy słupkowe.**

Pani mgr Nowak, jednoznacznie stwierdziła, potwierdzając wcześniejsze badania behawioralne innych autorów, że zarówno poziom proenzymu, jak i formy aktywnej MMP-3 wzrasta po indukcji LTP w hipokampie myszy, w badanych przedziałach czasowych, co jest jednoznacznym dowodem jej udziału w procesach plastyczności na poziomie tej struktury. Również na synapsach hamujących nastąpił wzrost, jednak tylko formy nieaktywnej MMP-3 i dopiero po 15 minutach od wygenerowania iLTP. Mimo to, autorka tłumaczy i udowadnia, że jest to wystarczający dowód na potwierdzenie udziału MMP-3 również w kształtowaniu plastyczności hamującej (GABA-ergicznej). **Jest to pierwsze doniesienie, a zatem swego rodzaju odkrycie, udziału tej metaloproteiny w generowaniu iLTP. Jak jednak autorka rozumie tzw. „odmienność”, jak sam określa (str. 113), synaps hamujących od pobudzających w kontekście udziału MMP-3 w generowaniu LTP?** Jednoznacznie negatywny jest też wynik udziału MMP-3 i MMP-9 w generowaniu LTD przy udziale receptorów NMDA, jego zablokowanie nie ma wpływu na LTD, w przeciwieństwie do jednoznacznego zaangażowania w LTP. **Też nasuwa się pytanie dlaczego?** Wprawdzie nie ma na nie jednoznacznej odpowiedzi, to jednak można próbować pospekulować? Kolejny „negatywny” wynik, to brak udziału MMP-3 w zmianach morfologicznych, czyli plastyczności strukturalnej neuronów piramidowych hipokampa, na których stwierdzono udział MMP-3 w plastyczności synaptycznej. Doktorantka w przeciwieństwie do kory wzrokowej nie wykazała wpływu MMP-3 na morfologię badanych neuronów. Tu również ciśnie się podstawowe pytanie, które autorka również sobie zadaje – **dlaczego?** Jeśli metodycznie nie było żadnych różnic w obu barwieniach Golgiego, to jak fizjologicznie, można by tłumaczyć tzw. „obszarową specyficzność”, na którą zwraca uwagę doktorantka, wpływu MMP-3 na morfologiczne zmiany neuronów? **Czy ta „specyficzność” nie jest skutkiem, odmiennej (różnej) funkcji fizjologicznych tych dwu struktur mózgowych?**

**Podsumowując rozprawę doktorską Pani mgr inż. Darii Nowak, pragnę wyraźnie podkreślić, że doktorantka osiągnęła zamierzone cele, wnosząc nie tylko zupełnie nowe elementy do zrozumienia molekularnego mechanizmu**

neuroplastyczności rozwojowej mózgowia, szczególnie udziału w tym bardzo ważnym procesie MMP-3, ale także uzupełnia istniejące informacje dotyczące roli MMP-9. Wynikami swojej pracy przybliżyła nas do pełniejszego zrozumienia, tego fenomenu jakim jest neuroplastyczność, w przyszłości mogą przyczynić się one do większego wpływu na ten proces, szczególnie, że jest on ograniczony, tylko do pewnego „krytycznego” okresu naszego życia.

Chciałbym także podkreślić, że praca doktorska Pani mgr inż. Darii Nowak, mimo iż opisuje trudne zagadnienia, jest bardzo czytelnie, jasno i zrozumiale napisana. Dodatkowym pozytywnym uzupełnieniem, wzbogacającym pracę są załączone równie czytelne schematy. Czytając, natrafiłem na nieliczne literówki, interpunkcje, które nie mają żadnego znaczenia, podobnie jak anglojęzyczne określenia, takie jak np. w różnych przypadkach odmieniane: „ekspresjonowanie”, czy „akwizycja”, na wysoką ocenę merytoryczną dysertacji.

**Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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 we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Darii NOWAK do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



*Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski*

*Kraków dnia 01.czerwiec 2018.*