

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: Michał Kiełbiński

Tytuł rozprawy doktorskiej: Zmiany strukturalne i funkcjonalne w zwierzęcym modelu niedorozwoju mózgu

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Janeczko

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): nd

Recenzent: prof. dr hab. Jacek Jaworski

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Rozprawa doktorska pana Michała Kiełbińskiego skupia się na opisanu wybranych aspektów anatomicznych, fizjologicznych i molekularnych dysplazji korowych, wywołanych u gryzoni w trakcie rozwoju płodowego promieniowaniem jonizującym. Tak wywołane zmiany struktury mózgu odpowiadają tym obserwowanym klinicznie u ludzi z ciężko objawową, często lekooporną padaczką. W związku z tym, że problem ten leży w centrum zainteresowań wielu badaczy ciężko jest znaleźć pole do nowatorskich i znaczących badań. Jednak w moim przekonaniu Doktorantowi się to udało. W mojej opinii o oryginalności podjętych badań przesądziły (i) skupienie się na porównaniu efektów anatomicznych, fizjologicznych i molekularnych napromieniowania (pierwotnego bodźca patogenego) w różnych dniach rozwoju mózgu (ii) skupienie się na dotychczas nie analizowanych aspektach elektrofizjologicznej charakterystyki aktywności mózgu pod wpływem tych zmian (iii) analiza efektów molekularnych połączenia bodźca pierwotnego i różnych bodźców wtórnych wywołujących epilepsję (iv) wykorzystanie do analizy technik powszechnie używanych w klinice takich jak MRI czy EEG. W konsekwencji opisane badania zaowocowały licznymi nowymi obserwacjami pogłębiającymi zrozumienie patogenezy dysplazji korowych o potencjalnym znaczeniu klinicznym.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Oceniana rozprawa w moim przekonaniu ma dużą wartość naukową w związku z nowatorskim podejściem do tematu. W niniejszym punkcie oceny odniosę się tylko do wartości naukowej uzyskanych wyników podczas gdy pozostałe rozdziały oceniam w pkt. 2. W moim przekonaniu do najbardziej wartościowych naukowo obserwacji Doktoranta należy zaliczyć:

1. Potwierdzenie hipotezy, iż wystąpienie pierwotnego bodźca (w tym wypadku napromienienia) na różnych etapach rozwoju prowadzi do zmian mózgu o różnej charakterystyce; przy czym wcześniejsze wystąpienie zmian ma największe konsekwencje. Pomimo, iż jest to hipoteza dość intuicyjna, jej potwierdzenie, np. w modelach dysplazji wywołanych genetycznie, było bardzo trudne do przeprowadzenia z użytą w niniejszej pracy rozdzielczością czasową.
2. Szczegółowe określenie charakterystyki spektralnej sygnału EEG, co może mieć wartość diagnostyczną w przyszłości u ludzi w okresie latentnym epileptogenezy.
3. Jednoznaczne wykazanie, iż anatomiczny profil dysplazji nie determinuje profili spektralnych EEG. Jest to bardzo ciekawa obserwacja w kontekście genetycznie uwarunkowanych dysplazji korowych u ludzi np. w przypadku TSC. Od wielu lat toczy się dyskusja pomiędzy eksperymentatorami i klinicystami czy zmiany anatomiczne (np. liczba guzków korowych) są konieczne dla wystąpienia epilepsji. Jednakże badania przeprowadzone przez Doktoranta nie odpowiadają na pytanie czy

lokalizacja zmian bardziej niż ich rozległość może mieć taki wpływ co postulowano w przypadku eksperymentalnych modeli TSC.

4. Opis zmian ekspresji genów wywołanych przez promieniowanie jonizujące na różnych etapach rozwoju mózgu i w kombinacji z różnymi metodami wywołania drgawek.

Naukowa oryginalność i wartość omawianych powyżej wyników przeszły niezależną ewaluację, gdyż zostały opublikowane w dwóch artykułach w czasopismach międzynarodowych.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej pana Michała Kiełbińskiego. Wstęp stanowi bardzo dobre kompendium wiedzy na temat różnych typów dysplazji korowych, ich klasyfikacji, obrazów klinicznych i hipotez dotyczących ich przyczyn. Autor umiejętnie i krytycznie przedstawił różne punkty widzenia co jasno pozwoliło mu zdefiniować obszary gdzie wiedza jest niewystarczająca i dalsze badania są konieczne. To zaowocowało jasnym określeniem celi badawczych i alternatywnych hipotez. Ich krytyczna dyskusja jest szczególnie widoczna w Dyskusji. Podsumowując, jako osoba, studiująca zagadnienie mechanizmów molekularnych stwardnienia guzowatego i dysplazji korowych, uważam Wstęp i Dyskusję, za wartościowe i bardzo inspirujące. Materiały i metody są dobrane adekwatnie do celów i opisane przeważnie dobrze i wyczerpująco, choć kilka uwag krytycznych zawarłem w pkt. 4. Jeśli chodzi o metody analizy wyników to Doktorant na pewno wykazał się dużą inwencją i oprócz analiz standardowych starał się posługiwać szerszą paletą podejść (np. analizy EEG czy automatyczna analiza obrazów mikroskopowych). Wyniki są przeanalizowane krytycznie. Wnioski przedstawione jasno a literatura, do której odniósł się Doktorant jest dobrze dobrana i wyczerpująca, przynajmniej w mojej ocenie.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Układ ocenianej rozprawy jest standardowy i poprawny. Wyniki są zilustrowane rycinami dobrej jakości, choć jak piszę w pkt. 4 można było przestawić w niektórych fragmentach przykłady danych pierwotnych a nie tylko wyniki automatycznych analiz. Rozprawa jest napisana poprawnym specjalistycznym językiem polskim co zasługuje niewątpliwie na pochwałę, choć w kilku miejscach autor nie unikną kalek językowych. Wstęp i Dyskusja są szczególnie dopracowane, przemyślane i niemalże pozbawione błędów interpunkcyjnych, gramatycznych, stylistycznych czy edytorskich. Dlatego ich lektura stanowi niewątpliwą przyjemność. Natomiast w rozdziałach Materiały i Metody oraz Wyniki błędów stylistycznych i edytorskich (brakujące spacje) znalazłem nieco więcej ale nie było to zjawisko nagminne.

4. **Uwagi krytyczne**

Na wstępie chciałbym zaznaczyć, iż nie mam zbyt wielu uwag krytycznych a te wymienione poniżej nie wpływają znacząco na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pana Michała Kiełbińskiego.

1. W mojej ocenie, Wstęp choć napisany w sposób bardzo sprawny i wciągający czytelnika jest zbyt długi i zawiera elementy, które dowodzą erudycji Doktoranta ale nie są bezpośrednio związane z badaniami przedstawionymi w niniejszej rozprawie. Zaliczyłbym do nich na przykład nadmiernie rozbudowany opis roli ścieżki kinazy mTOR w dysplazji korowej i epilepsji. W gruncie rzeczy poza wykazaniem w mikromacierzach, że zmienia się ekspresja kilku genów związanych z tą ścieżką praca doktorska pana Kiełbińskiego nie dotyczy tego zagadnienia.

2. Wstęp, str. 17. Doktorant wymienia trzy kategorie patogenezy dysplazji korowych związanych z neurogenezą, migracją neuronów i ich dojrzewaniem. Chciałbym zwrócić uwagę Doktorantowi, iż prawidłowa definicja neurogenezy zawiera w sobie zarówno proces generacji neuronów, ich migracji

jak i różnicowania a zatem proponowany podział o ile ma sens jeśli chodzi o etapy rozwoju neuronu zawęża nieprawidłowo, w moim przekonaniu, definicję neurogenezy.

3. Wstęp, str. 20. Autor pisze: " Powyżej mTOR znajdują się liczne szlaki sygnałowe z czynnikami transkrypcyjnymi, insuliną,". To zdanie wydaje mi się nieprawidłowe. Może Doktorant miał na myśli czynniki troficzne, gdyż regulacja transkrypcji mTOR jest bardzo słabo poznana.

4. Wstęp str. 21. Autor pisze, że "w przypadku stwardnienia guzowatego, zaangażowane są mutacje w TSC1 i 2, bezpośrednich i kluczowych regulatorach mTORC1". Mutacje są w genach które nie są regulatorami białek ale rozumiem, iż był to skrót myślowy. Jednak jest on nieprawidłowy o tyle, iż z biochemicznego punktu widzenia TSC1/TSC2 regulują GTPazę Rheb a nie mTOR. To Rheb jest bezpośrednim regulatorem mTORC1.

5. Metody: w opisie materiałów i metod zabrakło numerów katalogowych części przeciwciał (np. str. 48), składu części buforów (str. 48), informacji w jakich buforach rozcieńczano przeciwciała w trakcie barwień immunohistochemicznych (str. 48), informacji jak dokładnie określano spektrofotometrycznie stężenie białek (str. 51), informacji o numerach katalogowych i/lub sekwencjach wykorzystanych sond Tagman.

6. Wyniki: pkt. 4.1.3. i 4.1.4. W moim przekonaniu warto było zamieścić przykładowe zapisy EEG i mikrofotografie wybarwionych immunohistochemicznie skrawków a nie same wyniki analiz.

7. Wyniki: Na stronie 67 Doktorant stwierdza, że nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie ekspresji GFAP. Jednocześnie w analizach immunohistochemicznych Autor stwierdził spadek powierzchni znakowania GFAP. Jak to wytłumaczyć? Zastanawiam, się również nad adekwatnością akurat modelu zmian wywołanych napromienieniem do badania zmian astrocytów w dysplazjach. Badania np. w przypadku modeli TSC wykazują wzrost ekspresji GFAP.

6. Uwagi ogólne: nie jest dla mnie jasne dlaczego rejestracje EEG jak również traktowania środkami prokonwulsyjnymi dokonywano u dorosłych zwierząt podczas gdy zmiany EEG u ludzi jak równie napady drgawkowe pojawiają się często dużo wcześniej. Np. w przypadku TSC dzieci przyjmowane w ośrodkach klinicznych wykazują nieprawidłowości EEG przed 3 miesiącem życia a napady drgawkowe występują przed końcem 1 roku. Czy w przypadku zaproponowanego schematu doświadczalnego nie stracono wielu ważnych informacji na temat procesu epileptogenezy?

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Pomimo kilku uwag krytycznych przedstawioną mi do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Przeprowadzono ciekawe i szeroko zakrojone badania, przy użyciu metod adekwatnych do tych używanych w klinice. W efekcie uzyskano wiele nowych obserwacji jasno wskazujących odpowiedzi na najbardziej kontrowersyjne pytania w polu badań doktoranta. Uzyskane wyniki zostały opisane i przedyskutowane bardzo sprawnie i ze świadomością ograniczeń metodycznych.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pana **Michała Kiełbińskiego** spełnia warunki określone w art. 13.1 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 późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana **Michała Kiełbińskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

Jak wspomniałem powyżej zarówno problem badawczy jak i zaproponowane podejścia eksperymentalne oraz uzyskane wyniki są bardzo złożone i nowatorskie. Przeprowadzenie badań wymagało ogromnego nakładu pracy i połączenia metod z zakresu obrazowania mózgu technikami nieinwazyjnymi, technik mikroskopowych oraz biochemii i biologii molekularnej. Dodatkowo Doktorant wykazał się nieszablonowym podejściem do analizy danych. Warto podkreślić, iż uzyskane wyniki przynajmniej częściowo zostały opublikowane w dwóch pierwszoautorskich publikacjach w czasopiśmie międzynarodowych. Dlatego nie mam wątpliwości, iż niniejsza rozprawa zasługuje na wyróżnienie o co niniejszym wnioskuję.

8.05.2018

.....
data sporządzenia recenzji

.....
podpis recenzenta

INFORMACJE DLA RECENZENTA:

1. Informacja o wymogach Rady jednostki dotycząca konstrukcji rozprawy doktorskiej [link do strony:](http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty) <http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty>
2. Po obronie rozprawy doktorskiej Komisja doktorska przedstawia Radzie jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski ocenę publicznej obrony oraz projekt uchwały w sprawie nadania kandydatowi stopnia doktora.

3. Proszę o przesłanie elektronicznej wersji recenzji na adres:

wydzial.biologii@uj.edu.pl

Równocześnie proszę przesłać podpisany oryginał recenzji na adres:

**Dziekanat Wydziału Biologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków**