

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: **Łukasz Chrobok**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Electrophysiological studies on the rat lateral geniculate nucleus in physiology and pathophysiology**

Promotor: **prof. dr hab. Marian H. Lewandowski**

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): **nie dotyczy**

Recenzent: **prof. dr hab. Wioletta J. Waleszczyk**

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Rozprawa doktorska pana Łukasza Chroboka została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, w skład którego wchodzi cztery publikacje oryginalne z listy A „ministerialnego” wykazu czasopism naukowych. W rozprawie przedstawione zostały wyniki badań fizjologii i patofizjologii ciała kolankowatego bocznego (LGN), jednej z podkorowych struktur drogi wzrokowej, a zarazem układu regulacji rytmu okołodobowego. Podjęty temat wpisuje się w nurt badań realizowanych w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kierowanym przez prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego, promotora pracy. Artykuły wchodzące w skład rozprawy zawierają nieopublikowane wcześniej wyniki elektrofizjologicznych badań *in vitro* dotyczące modulacji aktywności elektrofizjologicznej neuronów ciała kolankowatego bocznego przez układ oreksynowy bocznego podwzgórza oraz przepuszczalnych zaburzeń w pracy struktur neuronalnych zegara biologicznego w przebiegu napadów nieświadomości u szczura. Przedstawione w rozprawie wyniki badań stanowią oryginalny wkład w poznanie struktury i funkcji układu regulacji rytmu okołodobowego, a także w wyjaśnienie różnorodnych aspektów fizjologii i patofizjologii układu wzrokowego.

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

Cztery oryginalne publikacje wchodzące w skład rozprawy stanowią rezultat badań w dwóch równoległych ścieżkach badawczych. *Ścieżka fizjologiczna* dotyczy tematu oreksynergicznej modulacji pracy neuronów dwóch jąder ciała kolankowatego bocznego: brzuszego oraz grzbietowego. Wpływ oreksyn na neurony trzeciego jądra - listka ciała kolankowatego bocznego, został wcześniej szczegółowo opisany, jednak modulacja pozostałych części ciała kolankowatego przez oreksyny nie była dotychczas poznana. Pierwsza z prac dotycząca tego tematu, pt. „Orexins excite ventrolateral geniculate nucleus neurons predominantly via OX2 receptors”, została opublikowana w *Neuropharmacology* 103: 236-246, w 2016 r., druga, pt. „Multiple excitatory actions of orexins upon thalamo-cortical neurons in dorsal lateral geniculate nucleus - implications for vision modulation by

arousal”, ukazała się w *Scientific Reports* 7: 7713, w 2017 r. W publikacjach tych wykazano depolaryzujący wpływ oreksyn na neurony brzuszego i grzbietowego jądra LGN oraz dominującą rolę receptora OX2 w tej depolaryzacji. W przypadku jądra grzbietowego LGN pokazano zależny od oreksyny A wzrost pobudliwości wzgórzowo-korowych neuronów tego jądra oraz wzmocnienie ich odpowiedzi na dwa najważniejsze neuroprzekaźniki GABA i glutaminian. Zaproponowano także mechanizm komórkowy leżący u podłoża depolaryzującego działania tej oreksyny. Wyniki tych badań wskazują na torujący wpływ oreksyn na transmisję informacji w kolankowatej drodze wzrokowej.

Drugi nurt badań Autora dysertacji, *ścieżka patofizjologiczna*, dotyczy elektrofizjologicznych zaburzeń aktywności neuronów LGN w szczurzym modelu napadów nieświadomości i skupia się przede wszystkim na listku ciała kolankowatego bocznego. Badania dotyczące tego tematu przedstawiono w dwóch publikacjach, pierwsza, pt. “Two distinct subpopulations of neurons in the thalamic intergeniculate leaflet identified by subthreshold currents”, ukazała się w *Neuroscience* 329: 306–317, w 2016 r., druga, pt. “Disinhibition of the intergeniculate leaflet network in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy”, została opublikowana w *Experimental Neurology* 289: 103-116, w 2017 r. W pracach wykazano anomalie funkcjonowania listka i oraz jądra brzuszego LGN u szczurów epileptycznych: obniżenie amplitudy przewodnictwa wapniowego przez kanały typu-T oraz zmniejszenie fazowego synaptycznego hamowania GABAergicznego powodującego odhamowanie sieci listka LGN i upośledzenie jej reakcji na zmiany oświetlenia. Dodatkowo, u szczurzym modelu napadów nieświadomości wykazano astrogliozę w obszarze listka LGN.

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):

Merytoryczną wartość rozprawy oceniam bardzo wysoko. We wstępie Autor przedstawił wyczerpujący opis tła badań wprowadzający czytelnika w zagadnienia będące tematem rozprawy, pozwalając mu na zrozumienie przedstawionego w publikacjach materiału. Cele prowadzonych badań zostały jasno sformułowane.

Doświadczenia zostały starannie zaplanowane pozwalając na realizację zamierzeń, w czym niewątpliwą rolę odegrał właściwy dobór metod badawczych. Dane elektrofizjologiczne zebrane z zastosowaniem szerokiego spektrum metod rejestracji *in vitro* ze skrawków mózgu szczura oraz *in vivo* zostały uzupełnione o barwienia histo- i immunohistochemiczne, stosowane w celu weryfikacji lokalizacji rejestrowanych neuronów w określonych strukturach ciała kolankowatego bocznego bądź ujawnienia astrogliozy lub wzoru unerwienia tego kompleksu jąder przez neurony oreksynowe.

Na podkreślenie zasługuje przejrzyste graficzne przedstawienie wyników w publikacjach. Doskonałe ryciny, z których większość prezentuje kompletne wyniki uzyskane w określonym zadaniu badawczym, pokazują zarówno przykładowe rejestracje aktywności uzyskane dla pojedynczych neuronów, jak i sumaryczne podsumowanie wyników dla grupy komórek badanej struktury.

Warte odnotowania jest także użycie trafnie dobranych wyrafinowanych metod obliczeniowych, algorytmu szybkiej transformaty Fouriera i metody autokorelacji do ujawnienia preferowanego rytmu oscylacji i pokazania zmian aktywności oscylacyjnej w czasie oraz zastosowanie dużego wachlarza metod statystycznych.

Umiejętność interpretacji uzyskanych wyników na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków nie budzą zastrzeżeń.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**
(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim w formie spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów. Na początku rozprawy załączono spis publikacji wchodzących w skład rozprawy, spis innych opublikowanych artykułów Autora oraz spis opublikowanych w formie abstraktów doniesień konferencyjnych. Po wstępie poprzedzonym spisem treści oraz wykazem skrótów, Autor przedstawił ogólny cel badań oraz w szczegółach wypunktował cele i zakres badań opisanych w każdym z artykułów wchodzących w skład rozprawy. Kolejne cztery rozdziały stanowią załączone publikacje, tworzące rozprawę, o układzie typowym dla czasopisma, w którym się ukazały. Następny rozdział zawiera podsumowanie wyników i omówienie wniosków badań w postaci dyskusji. Rozprawę kończy graficzne podsumowanie, bibliografia oraz informacja na temat udziału Autora rozprawy i współautorów w przygotowaniu publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Rozprawa zawiera 127 stron. We wstępie pracy zamieszczono 3 ryciny, w każdej z publikacji znalazły się liczne ryciny (od 6 do 11), które posłużyły Autorowi do przedstawienia wyników, w podsumowaniu zamieszczono schematyczną rycinę przedstawiającą w graficznej formie najważniejsze wyniki badań. Spis literatury obejmuje 241 pozycji. Wyjątkowo bogate piśmiennictwo dokumentuje czytanie Autora. Pozycje literaturowe zostały właściwie dobrane. Na podkreślenie zasługuje znaczny udział pozycji z ostatnich lat, w tym także z lat 2016 i 2017, wskazujące na śledzenie przez Doktoranta najnowszych osiągnięć badań.

Pod względem edytorskim przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana. Została napisana poprawnym językiem, w sposób klarowny i treściwy, bez błędów gramatycznych utrudniających jej zrozumienie. Używane w pracy skróty zostały prawidłowo zdefiniowane i zmieszczone w wykazie skrótów.

4. **Uwagi krytyczne**

1. Jednym z istotnych wyników badań wpływu oreksyn na aktywność neuronów jądra grzbietowego LGN było wykazanie różnic w czułości na oreksynę A wzdłuż przednio-tylnej osi tej struktury. W dyskusji dysertacji zabrakło mi jednak wyjaśnienia tego zjawiska lub chociaż podjęcia próby poszukania takiego wyjaśnienia.

2. Z obowiązku recenzenta muszę wypomnieć drobne nieścisłości, takie jak 1) pominięcie informacji, że przedstawiony w streszczeniu w wersji polskiej i angielskiej anatomiczny podział ciała kolankowatego bocznego dotyczy gryzoni. Muszę jednak odnotować, że informacje podane we wstępie rozprawy, świadczą o tym, że Autor jest świadomy różnic anatomicznych w obrębie tej struktury pomiędzy różnymi gatunkami ssaków; 2) pominięcie istotnego wpływu projekcji zwrotnej z kory wzrokowej na neurony jądra kolankowatego bocznego w opisie tej struktury; 3) kolejnej drobnej nieścisłości można doszukać się w zdaniu: "This functional multiplicity is covered by the number of neuronal sites in the pretectum, hypothalamus and the thalamus which create a sophisticated system that includes structures such as the olivary pretectal nucleus (OPN), the posterior limitans nucleus, the superior colliculus, the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN), the ventral lateral preoptic area (VLPO) or the LGN." (str. 18, wstęp dysertacji).

3. Nieliczne błędy typograficzne i niezręczne sformułowania nie są warte wspomnienia. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wspomnieć o błędach o charakterze redakcyjnym, których wymienienie, mam nadzieję, pomoże Autorowi ustrzec się ich w przyszłości:

1) Wykaz użytych skrótów, w szczególności nazw anatomicznych, jest ze wszech miar pożądany i pozwala łatwiej czytać tekst, gdyż liczba użytych skrótów stawia wyzwanie pamięci czytelnika. Pomimo załączenia do pracy wykazu skrótów, każdy ze skrótów powinien zostać wprowadzony w tekście pracy poprzez napisanie go w nawiasie po pełnej nazwie przy jej pierwszym użyciu, a następnie powinien być konsekwentnie używany dokładnie tak, jak został wprowadzony. Autor w zasadzie stosował się do tej reguły. Wyjątkiem był jednak skrót ISO zdefiniowany we wstępie i objaśniony w wykazie skrótów jako *infra-slow oscillatory*, czasem jednak stosowany był w znaczeniu *infra-slow oscillatory pattern of activity*, np. w zdaniu: „ISO can be found not only in the IGL but also in the retina...” (str. 314, w publikacji 3, pt. “Two distinct subpopulations of neurons in the thalamic intergeniculate leaflet identified by subthreshold currents” *Neuroscience* 329: 306–317 (2016), *nota bene* w publikacji tej ISO zdefiniowano inaczej w wykazie skrótów i w tekście) lub w zdaniu “However, it was shown that ISO is expressed by putatively enkephalinergic neurons (str.102, dyskusja dysertacji).

2) W wykazie skrótów zabrakło skrótu ENK użytego wielokrotnie w publikacjach.

4. Polecam także Autorowi większą pieczołowitość w stosowaniu jednorodnego zapisu złożonych wyrazów; przykłady to: inter-geniculate leaflet / intergeniulate leaflet, visuo-motor / visuomotor, time-keeping / time keeping, ventral lateral geniculate nucleus / ventrolateral geniculate nucleus, dorsal lateral geniculate nucleus / dorsolateral geniculate nucleus.

Te drobne uchybienia o charakterze edytorskim w niczym jednak nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej.

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

Przedstawione w rozprawie doktorskiej p. Łukasza Chroboka wyniki badań stanowią oryginalny wkład w wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania zegara biologicznego, a zarazem funkcjonowania układu wzrokowego w normie i patologii.

Moje szczególne uznanie budzi opis pobudzającego wpływu oreksyn na jądro brzuszne i grzbietowe ciała kolankowatego bocznego wraz z wyjaśnieniem mechanizmu komórkowego leżącego u podłoża depolaryzującego działania tych neuropeptydów, choć badania dotyczące patologii w funkcjonowaniu układu okołodobowego stanowią także ważki problem, i przyniosły ciekawe wyniki.

Wart odnotowania jest również fakt udziału Autora rozprawy w badaniach dotyczących wpływu oreksyn na neurony trzeciej struktury - listka ciała kolankowatego bocznego. Temat ten został wcześniej szczegółowo opisany przez grupę, kierowaną przez prof. Lewandowskiego i przedstawiony w publikacji stanowiącej dorobek doktoranta, ale nie wchodzącej w skład przedstawionej mi do oceny rozprawy.

Szerokie spektrum stosowanych metod oraz ogrom materiału przedstawionego w publikacjach budzi podziw. Prezentowane na rycinach zapisy sygnału elektrofizjologicznego świadczą o wysokiej jakości używanych w laboratorium technik i dobrym opanowaniu przez Doktoranta trudnego warsztatu badań elektrofizjologicznych pojedynczych komórek nerwowych *in vitro* i *in vivo*. Warto podkreślić, że Autor rozprawy, nie ograniczył się jedynie

do metod elektrofizjologicznych wykonując także barwienia immunohistochemiczne i analizy statystyczne.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam wartość naukową i merytoryczną oraz poprawność redakcyjną rozprawy, a także umiejętności i wkład pracy doktoranta.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pana Łukasza Chroboka 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 i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana Łukasza Chroboka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisana wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK/NIE

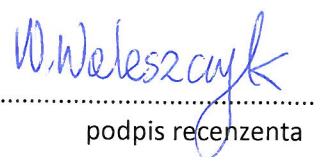
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

Przedstawione w rozprawie doktorskiej p. Łukasza Chroboka wyniki badań stanowią oryginalny wkład w wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania zegara biologicznego i poznanie strukturalnych elementów układu regulacji rytmu okołodobowego, a także w wyjaśnienie różnorodnych aspektów funkcjonowania układu wzrokowego. W skład rozprawy wchodzi cztery publikacje, w których p. Łukasz Chrobok jest pierwszym autorem, a jego wkład w każdą z nich przekracza 50%. Co więcej, doktorant miał nie tylko dominujący udział w przeprowadzeniu badań z zastosowaniem różnorodnych technik eksperymentalnych i analizę ich wyników, uczestniczył także w opracowaniu koncepcji badań, planował ich wykonanie, miał również znaczący udział w przygotowaniu manuskryptów. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie mają wysoką wartość naukową i zostały opublikowane w wiodących czasopismach z dziedziny *neuroscience* z wysokimi współczynnikami wpływu. Przedstawione publikacje dotyczą dwóch nurtów badań, określonych przez Autora jako *ścieżka fizjologiczna* i *patofizjologiczna*. Materiał publikacyjny obejmujący badania w ramach każdej z tych ścieżek mógłby, w mojej opinii, samodzielnie stanowić podstawę rozprawy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy, ponad przeciętny zakres zastosowanych metod badawczych i zebranego materiału, oryginalność uzyskanych wyników, oraz dominujący udział Doktoranta w powstaniu publikacji wchodzących w skład rozprawy składam wniosek o jej wyróżnienie.

2.11.2017

.....
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta