

Prof. dr hab. Jan Konopacki
Katedra Neurobiologii
Uniwersytetu Łódzkiego
90-236 Łódź,
ul. Pomorska 141/143

Łódź, 12. 10. 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Łukasza Chroboka

**pt.: Electrophysiological studies on the rat lateral geniculate nucleus in
physiology and pathophysiology**

**(Badania elektrofizjologiczne bocznego ciała kolankowatego szczura w fizjologii i
patofizjologii)**

Procesy synchronizacyjne oraz oscylacyjne leżą u podstaw powstawania ośrodkowych rytmów biologicznych określanych jako zegar biologiczny. Funkcjonowanie zegara biologicznego stanowi bez wątpienia jeden z podstawowych mechanizmów adaptacyjnych zwierząt. Wyznacza nie tylko tak oczywiste wzorce zachowania jak sen i czuwanie, zachowanie seksualne czy pokarmowe, ale jednocześnie tak subtelne wzorce jak sposoby komunikowania się zwierząt. Zaburzenia funkcjonowania zegara biologicznego leżą u podstaw etiologii niektórych dysfunkcji ośrodkowego układu nerwowego. Dzięki badaniom zegara biologicznego mamy możliwość poznawania podstawowych procesów biologicznych, które zarządzają wszystkimi zjawiskami o charakterze rytmicznym.

Strukturą międzymózgowia, która w ostatnich latach jest przedmiotem dużego zainteresowania chronobiologów jest ciało kolankowate boczne (LGN). To właśnie dzięki wieloletnim, bardzo cennym badaniom zespołu prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego rola LGN jest coraz lepiej rozpoznana. LGN ma charakter heterogenny: struktura ta jest podzielona na trzy niezależne jądra: grzbietowe ciało kolankowate boczne (DLG),

brzuszne ciało kolankowate boczne (VLG) i leżący między nimi listek ciała kolankowatego bocznego (IGL).

Wcześniejsze badania zespołu prof. Lewandowskiego dotyczyły charakterystyki aktywności neuronalnej komórek listka ciała kolankowatego bocznego (IGL), będącego częścią substratu neuronalnego modulującego rytmiczną pracę endogennego zegara biologicznego.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pana Łukasza Chroboka stanowi logiczną kontynuację wcześniejszych badań. Jest to bardzo rozbudowany cykl doświadczeń dotyczący charakterystyki aktywności neuronalnej głównie dwóch pozostałych elementów strukturalnych ciała kolankowatego bocznego: części grzbietowej oraz bocznej. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach dotyczących IGL, w obecnych wyeksponowano rolę oreksyn w modulowaniu aktywności komórkowej. Dane elektrofizjologiczne zostały wzbogacone o barwienia immunohistochemiczne, ukazujące wzór unerwienia LGN przez neurony oreksynowe. Badania fizjologiczne zostały uzupełnione o bardzo interesujący, obszerny cykl eksperymentów poświęconych anomaliiom funkcjonowania IGL i VLG u szczurów będących w stanie małego napadu epileptycznego typu petit mal, polegającego wyłącznie na krótkiej utracie świadomości. Tak więc poza walorami merytorycznymi, czytelny jest również aspekt aplikacyjny przeprowadzonych przez doktoranta badań.

Jako czytelnik bardzo interesującego cyklu publikacji ale przede wszystkim jako recenzent stwierdzam z przyjemnością, że po raz pierwszy spotykam się z tak wartościowym i obszernym cyklem publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Praca doktorska pana Łukasza Chroboka to cykl 4 znakomicie napisanych i zilustrowanych artykułów opublikowanych w najlepszych czasopismach z listy JCR w latach 2016-2017, posiadających IF od 3.28 do 5.01. Łączny IF wszystkich publikacji wynosi aż 17.27 (!). Wyniki uzyskane przez doktoranta były poza tym wielokrotnie (18 x) prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach. Badania finansowane były w ramach dwóch projektów NCN oraz bardzo prestiżowego projektu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Diamantowy grant) przyznanego autorowi. Powyższe informacje są najlepszą rekomendacją naukową i oceną merytoryczną rozprawy doktorskiej. Uwzględniając fakt, że cztery prace oceniane były wcześniej przez co najmniej 8 anonimowych recenzentów, piszący te słowa ma zadanie ułatwione.

Już sam wybór problematyki badawczej dotyczącej wpływu oreksyn na aktywność neuronalną w warunkach kompletnej deafferentacji (w preparatach skrawków DGL oraz

VGL) uważam za bardzo trafny i nadzwyczaj istotny dla zrozumienia skomplikowanych mechanizmów funkcjonowania ośrodkowych struktur zegara biologicznego. Autor wybrał sobie za przedmiot swojej rozprawy doktorskiej trudny problem, bowiem kompleksowe zbadanie wzorców aktywności komórkowej w warunkach kompletnego odnerwienia (in vitro) wymagało doskonałego przygotowania doświadczalnego. Jestem pełen uznania dla autora- opanował bowiem wyjątkowo trudne techniki eksperymentalne, w tym m.in. technologię preparowania i utrzymywania w warunkach pozaustrojowych skrawków mózgowych, techniki elektrofizjologiczne w tym m.in. technikę rejestracji aktywności pojedynczych neuronów metodą patch-clamp. Badania elektrofizjologiczne zostały uzupełnione o barwienia immunohistochemiczne ukazujące wzór unerwienia LGN przez neurony oreksynowe.

Bardzo interesujące i cenne są wyniki dotyczące aktywności neuronów VLG. Rejestrując tę aktywność w obecności oreksyny A i B autor wykazał, że komórki te ulegają depolaryzacji niezależnie od ich lokalizacji. Stosując selektywne związki antagonistyczne autor stwierdził, że receptor OX2 ma dominującą funkcję w obserwowanym wpływie oreksyn. Czytając pierwszą pracę przedstawionego cyklu chciałbym podzielić się z autorem pewną refleksją. Na str. 239 artykułu opublikowanego w piśmie *Neuropharmacology* doktorant przedstawia trzy wzorce wyładowań komórkowych rejestrowanych z VLG (ryc. 2). Stosując kryteria Younga i wsp. z 1988 r. autor sugeruje, że w punkcie C zobrazowane są wyładowania regularne. Gdyby jednak przeprowadzić test autokorelacji wybranego fragmentu wyładowań komórkowych przedstawionych w punkcie C to mogłoby się okazać, że i w tym przypadku wyładowania nie są regularne. Bazując na wyniku testu autokorelacji moglibyśmy wyciągnąć inny wniosek a mianowicie ten, że trzy przedstawione wzorce wyładowań komórkowych charakteryzują się różnymi stopniem nieregularności. Chciałbym usłyszeć komentarz doktoranta w tej sprawie.

Ciekawe są również obserwacje pana Łukasza Chroboka dotyczące neuronów DLG. W obecności oreksyny A większość neuronów tego obszaru ulegała również depolaryzacji a wpływ ten zachodził przez receptor OX2. Co ciekawe, oreksyna A podwyższała pobudliwość i wzmacniała odpowiedź neuronów na kwas glutaminowy oraz GABA. W innych doświadczeniach wykazano ponadto, że zarejestrowany wpływ depolaryzacyjny OXA zachodzi przy udziale napięciowo zależnych kanałów wapniowych oraz zależnych od białka G kanałów potasowych (GIRK).

W osobnych doświadczeniach, które zostały określone przez autora jak *ścieżka patofizjologiczna* prowadzonych badań, doktorant adresuje elektrofizjologiczne zaburzenia dwóch typów neuronów IGL utrzymywanych w skrawkach mózgowych in vitro: syntetyzujących enkefalinę oraz neuropeptyd Y. W doświadczeniach, w których wykorzystano technikę patch-clamp oraz barwienie immunohistochemiczne wykazano, że u podstaw elektrofizjologicznych dwóch typów neuronów IGL leżą odmienne podprogowe prądy jonowe. Prąd wapniowy typu T został zidentyfikowany w neuronach, które nie syntetyzują neuropeptydu Y a prąd potasowy typu A w neuronach, które syntetyzują neuropeptyd Y. Za niezwykle interesujące i wartościowe uważam odkrycie autora, że amplituda prądu wapniowego typu T była wyraźnie mniejsza w preparatach pobranych ze skrawków zmienionych genetycznie zwierząt wykazujących napady epileptyczne typu petit mal oraz pewne symptomy depresji (WAG/Rij).

Idiopatyczny model zwierząt z epilepsją typu petit mal został wykorzystany również w ostatnim bardzo ciekawym cyklu badań przeprowadzonych na pozaustrojowych preparatach IGL. Testowano hipotezę, że zaburzenia snu oraz inne symptomy towarzyszące małemu napadowi epileptycznemu są następstwem zaburzonej funkcji zegara biologicznego. Doktorant wykazał, że neurony IGL ulegają wyraźnemu rozhamowaniu w badanym modelu epilepsji co potwierdza przypuszczenie, że fenotyp epileptyczny wiąże się z dysfunkcją substratu neuronalnego odpowiedzialnego za rytmy okołodobowe.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pana Łukasza Chroboka dowodzi, że doktorant jest znakomicie przygotowany pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik fizjologicznych do dalszej pracy naukowej. Recenzowany cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską stanowi przemyślaną koncepcyjnie, poprawnie wykonaną i opisaną całość, co składa się na wybitny cykl publikacji naukowych. Wyniki uzyskane przez doktoranta w sposób znaczący przyczyniają się do poznania roli skomplikowanych mechanizmów neuronalnych ciała kolankowatego bocznego biorących udział w programowaniu zegara biologicznego u ssaków.

Uważam, że recenzowany cykl publikacji oraz teoretyczny wstęp przygotowany w języku angielskim odpowiada wszystkim wymogom stawianym rozprawom doktorskim

określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie pana Łukasza Chroboka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Fakt, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały już wcześniej opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych upoważnia mnie do złożenia również wniosku o wyróżnienie ocenionej rozprawy.

Prof. dr hab. Jan Konopacki

prof. dr hab. Jan Konopacki