

Prof. dr hab. Jan Konopacki

Łódź, 14. 02. 2017 r.

Katedra Neurobiologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Palus

pt.: Pharmacology and physiology of intergeniculate leaflet neuronal
network of the rat

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 typy zachowania jak sposoby komunikowania się zwierząt. Dzięki badaniom zegara biologicznego mamy zatem możliwość poznawania podstawowych procesów biologicznych, które zarządzają wszystkimi zjawiskami o charakterze rytmicznym. W latach 70. uznano jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (SCN) za jeden z ważniejszych obszarów mózgowych odpowiedzialnych za generowanie rytmów biologicznych. Drugą strukturą międzymózgowia, która w ostatnich latach jest przedmiotem dużego zainteresowania chronobiologów jest tzw. listek ciała kolankowatego bocznego (IGL). Obie te struktury z dużym sukcesem badane są od wielu lat przez zespół naukowy Pana prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego z Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zespół ten ma mocną i utrwaloną pozycję w literaturze światowej dotyczącej chronobiologii.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Palus pochodzi właśnie z tego zespołu. Jest to cykl czterech prac naukowych opublikowanych w latach 2013-2017 w pismach z listy JCR, opatrzone, liczącym prawie 40 str., bardzo ciekawie przygotowanym omówieniem. Prezentowany cykl

prac naukowych uwzględnia również wcześniej wygłoszone w kraju i za granicą trzy prezentacje ustne oraz 10 komunikatów konferencyjnych przedstawionych w postaci plakatu. Dokumentacja publikacyjna rozprawy doktorskiej jest zatem imponująca. Wykracza ona, moim zdaniem, znacznie poza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Całość dostarczonego mi materiału przygotowana jest w j. angielskim. Jest to bardzo starannie przemyślane i klarowne opracowanie co sprawia, że rozprawę czyta się jako znakomicie przygotowany naukowy esej. Bez wątpienia piszący te słowa miał ułatwione zadanie. Cztery prace tworzące cykl rozprawy zostały już bowiem wcześniej poddane wnikliwej ocenie recenzentów.

Bardzo interesująco napisany wstęp, w którym autorka dokonuje przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat funkcjonowania substratu neuronalnego zegara biologicznego. Rozdział ten kończy klarownie zdefiniowany cel pracy. Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Palus było określenie wpływu endogennych i egzogennych neuroprzekazników ciała kolankowatego bocznego na aktywność neuronalną pojedynczych komórek nerwowych IGL.

Już sam wybór problematyki badawczej dotyczącej wpływu wybranych neuroprzekazników na aktywność neuronalną IGL w warunkach kompletnej deafferentacji (w preparatach skrawków IGL *in vitro*) uważam za bardzo trafny i nadzwyczaj istotny dla zrozumienia skomplikowanych mechanizmów funkcjonowania substratu neuronalnego zegara biologicznego. Autorka wybrała sobie za przedmiot swojej rozprawy doktorskiej problem trudny, bowiem kompleksowe zbadanie wzorców aktywności komórkowej IGL w warunkach kompletnego odnerwienia (*in vitro*) wymagało doskonałego przygotowania doświadczalnego. Jestem pełen uznania dla autorki; w czasie studiów doktoranckich opanowała bowiem wyjątkowo trudne techniki eksperymentalne, w tym między innymi technologię preparowania i utrzymywania w warunkach pozaustrojowych skrawków mózgowych. Jako neuroprzekazniki endogenne autorka zastosowała GABA, enkefalinę, neuropeptyd Y. Oreksyna oraz serotonina zostały użyte jako neuroprzekazniki egzogenne. Wszystkie badania zostały wykonane techniką patch-clamp w warunkach *in vitro*. W celu określenia profilu biochemicznego badanych neuronów autorka przeprowadziła dodatkowo barwienia immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał. Doktorantka wykonała ogromne zadanie. Opanowanie powyższych technik doświadczalnych wymagało bowiem ogromnego zaangażowania i ciężkiej pracy.

Bardzo ciekawe i cenne są wyniki dotyczące aktywności neuronów IGL, rejestrowanej w obecności jednego z ważniejszych neuroprzekaźników zegara biologicznego, GABA. Zastosowano GABA i baklofen jako agonistów receptora GABA-B, bicucullinę jako antagonistę receptora GABA-A. Technikę path-clamp zastosowano w trybie whole-cell. Wykazano, że GABA ma w ponad 70% hamujący wpływ na częstotliwość wyładowań komórkowych, którym towarzyszy zmniejszenie oporności wejściowej błony. Jak słusznie sugeruje autorka powyższe efekty mogą być wynikiem działania GABA przez receptor jonotropowy GABA-A.

Na str. 28, w części metodycznej autorka wspomina, że przyjętym kryterium akceptacji potencjału błonowego neuronów był potencjał -35 mV. Rozumiem, że przed rejestracją zapewne aktywność neuronu stabilizowano i gdy błona ulegała głębszej depolaryzacji niż -35 mV, komórkę eliminowano. Jaki, szacunkowo, procent komórek eliminowano?

Kolejny cykl badań poświęcony został roli neuropeptydu Y (NPY) i met-enkefaliny (met-ENK) w modulowaniu aktywności neuronalnej i synaptycznej. Testowano dwie grupy neuronów: z ekspresją prądu potasowego typu A oraz prądu wapniowego T. W pierwszym etapie badań badano pre- i postsynaptyczny wpływ obu peptydów. W przypadku met-enkefaliny większość neuronów obu badanych grup ulegała postsynaptycznej hyperpolaryzacji. Wpływ ten zachodził przy udziale receptorów opioidowych. Odmienny wpływ na aktywność neuronalną zaobserwowano w przypadku NPY. Około 1/3 badanych neuronów była hamowana przez NPY przy czym obserwowano zarówno odpowiedzi pre- i postsynaptyczne.

W osobnych badaniach, przeprowadzonych w innej serii doświadczalnej, autorka zaadresowała udział receptorów oreksynergicznych w modulowaniu aktywności wcześniej zdefiniowanych dwóch grup neuronów IGL (NPY-pozytywnych i NPY-negatywnych). Oreksyna A i B depolaryzowały neurony IGL. Zastosowanie selektywnych blokerów receptorów oreksynergicznych oraz techniki znakowania immunofluorescencyjnego pozwoliło autorce wykazać, że oba receptory: OX1R oraz OX2R stanowią substrat farmakologiczny dla obserwowanego efektu.

W przypadku aplikacji serotoniny wykazano zarówno pre- jak i postsynaptyczne działanie tej aminy. Wpływowi depolaryzującemu serotoniny towarzyszyło wyraźne zwiększenie częstotliwości wyładowań komórkowych.

Przedstawione powyżej wyniki uzyskane w toku przeprowadzonych badań posłużyły do przedstawienia bardzo plastycznie ciekawie zaprojektowanego hipotetycznego modelu interakcji pomiędzy siatkówką, siecią neuronalną listka ciała kolankowatego bocznego oraz jądra nadskrzyżowaniowego.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Palus dowodzi, że doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana pod względem teoretycznym jak również znajomości wielu trudnych technik fizjologicznych do samodzielnej pracy naukowej. Rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie, stanowi przemyślaną koncepcyjnie, poprawnie wykonaną i opisaną całość, co składa się na wybitną pracę naukową. Fakt opublikowania w całości wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej (co nie zdarza się często) upoważnia recenzenta do dokonania oceny parametrycznej. Cykl prezentowanych prac ma łączny IF 10.974 a punktacja MNiSW wynosi 95. Parametry te nie wymagają dalszego komentarza. Wyniki uzyskane przez doktorantkę w sposób znaczący przyczyniają się do poznania roli skomplikowanych mechanizmów neuronalnych listka ciała kolankowatego bocznego biorących udział w programowaniu zegara biologicznego u ssaków.

Uważam, że recenzowana praca odpowiada wszystkim wymagom stawianym rozprawom doktorskim w art. 13 Ustawy z dnia 14. 03. 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Palus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Fakt, że przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki zostały już wcześniej ocenione przez recenzentów i opublikowane w bardzo markowych fachowych periodykach z listy JCR upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej pracy.

Prof. dr hab. Jan Konopacki

