

dr hab. Edyta Jurkowlaniec-Kopeć, prof. UG
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 59
80308 Gdańsk

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Cabana

pt. „Rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza u szczura: badania *in vitro*”

Zaliczane do międzymózgowia podwzgórze pełni szereg funkcji istotnych dla przeżycia gatunku: reguluje rytmy biologiczne, wpływa na wydzielanie hormonów, kontroluje przyjmowanie pokarmów, reguluje poziom aktywności w stanie czuwania i uczestniczy w indukcji snu. Szczególna rola podwzgórza wynika zarówno z właściwości neuronów, budujących poszczególne jądra tej struktury, jak i przebiegających tędy dróg neuronalnych. Przez obszar podwzgórza biegnie brzuszna część tzw. wstępującego systemu synchronizującego czynność hipokampa i innych obszarów kory limbicznej. Aktywacja struktur tego systemu wiązana jest z powstawaniem rytmu theta o zasadniczym znaczeniu dla funkcji poznawczych i procesów pamięciowych, zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Rytm ten występuje w czuwaniu oraz w paradoksalnej fazie snu, w różnym stopniu angażując ośrodkowe układy transmitterowe. Praca doktorska pana mgr Bartosza Cabana dotyczy znaczenia neuronów tylnego podwzgórza w powstawaniu rytmu theta. W doświadczeniach doktorant zastosował technikę izolacji skrawków podwzgórza. Metoda ta jest stosowana w Katedrze Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ do badania elektrofizjologicznych cech rytmu theta przede wszystkim w hipokampie, a w ostatnich latach znalazła zastosowanie do badania innych struktur mózgowych, w tym podwzgórza.

Przechodząc do oceny, układ pracy pana mgr Bartosza Cabana jest zgodny z zasadami redagowania prac doświadczalnych i zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, metodykę badań, wyniki, dyskusję, wnioski oraz spis publikacji, wykorzystanych przy przygotowywaniu pracy. Na początku pracy Autor zamieścił bardzo przydatny recenzentom i osobom czytającym pracę wykaz używanych skrótów.

Obszerny wstęp, liczący 47 stron, składa się z 5 podrozdziałów. W pierwszych dwóch częściach wstępu Autor przedstawił aktualny stan wiedzy, dotyczący znaczenia rytmu theta, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, zwracając uwagę na jego korelacje z funkcjami

poznawczymi, identyfikacją nowych bodźców oraz mechanizmami pamięci. Podał klasyczną kwalifikację form rytmu theta u zwierząt, zależną od poziomu aktywności ruchowej. W tych podrozdziałach pan mgr Caban opisał transmitterowe podłoże rytmu theta, głównie GABA- i cholinergiczne, podkreślając ich znaczenie w modulacji parametrów rytmu theta, tj. jego amplitudy i częstotliwości. Omówił również rolę układu oreksynowego, aktywnego przede wszystkim w warunkach czuwania i regulującego szereg funkcji, takich jak aktywność ruchowa czy przyjmowanie pokarmów. Działanie tego systemu w odniesieniu do oscylacji theta jest znacznie słabiej poznane.

W III części wstępu, w oparciu o obszerne piśmiennictwo, obejmujące zarówno starsze jak i najnowsze pozycje, pan mgr Caban przedstawił wybrane struktury, zaliczane do wstępującego systemu synchronizacji, których czynność wpływa na parametry badanego rytmu theta. Analizował wyniki badań, dotyczące obszaru tylnego podwzgórza, wskazując, iż w odniesieniu do tej struktury jest wiele niejasności: jądra tylnego podwzgórza i sąsiadujące z nim jądra nadsuteczkowate modulują rytm theta, ale jaki jest ten wpływ? Czy ich aktywność może zwiększać/zmniejszać częstotliwość rytmu rejestrowanego z hipokampa? Co z amplitudą rytmu? Do tego tematu wrócę w dalszej części recenzji.

Czwarty podrozdział wstępu jest szczególnie istotny dla interpretacji wyników doświadczeń pana mgr Cabana, gdyż dotyczy cech neuronów, których aktywność wpływa na występowanie rytmu theta oraz roli połączeń szczelinowych w synchronizacji aktywności neuronalnej. Pan mgr Bartosz Caban przedstawił charakterystykę elektrofizjologiczną neuronów, których czynność bezpośrednio wpływa na występowanie w hipokampie rytmu theta, tzw. neuronów theta-zależnych. Są to neurony zwiększające lub zmniejszające swoją aktywność podczas theta, w sposób fazowy lub toniczny. Ważną grupę stanowią tak zwane neurony bramkujące, które zostały opisane po raz pierwszy w hipokampie przez zespół pana prof. Jana Konopackiego. Warto podkreślić, że neurony theta-zależne występują we wszystkich strukturach systemu synchronizacji, również w tylnym podwzgórzu.

W ostatniej części wstępu Autor podał charakterystykę zastosowanego w doświadczeniach modelu doświadczalnego, jaki stanowiły izolowane skrawki podwzgórza. W modelu tym można ocenić elektrofizjologiczne cechy neuronów, budujących strukturę, a zastosowanie farmakologicznych manipulacji, symulujących procesy aktywacji bądź hamowania, umożliwia śledzenie działania poszczególnych układów transmitterowych.

Szeroki zakres tematyczny wstępu sprawił, że w tej części pracy doktorant musiał wykazać się umiejętnością krótkiego, syntetycznego przedstawiania problemów, w mojej opinii wywiązał się z tego bardzo dobrze. Wstęp kończy się rozdziałem, przedstawiającym cel

pracy, którym było oszacowanie możliwości generacji rytmu theta w odnerwionych strukturach tylnego podwzgórza oraz zbadanie wybranych aspektów indukcji rytmu theta.

W pierwszej części rozdziału "Materiał i metody doświadczalne" Autor szczegółowo przedstawił metodykę preparowania skrawków podwzgórzowych oraz sposób ich utrzymywania podczas doświadczeń. Technika rejestracji zbiorczej (polowej) aktywności oraz rejestracji potencjałów komórkowych została opisana przez doktoranta w sposób wystarczający do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. Zaplanowano cztery serie doświadczeń, które zostały syntetycznie opisane i ilustrowane pomysłowymi schematami, ułatwiającymi orientację w ich przebiegu. Końcowa część tego rozdziału dotyczy sposobu analizy mierzonych parametrów na poziomie potencjałów zbiorczych oraz aktywności neuronalnej.

Główną część pracy stanowi rozdział "Wyniki", ilustrowany przykładowymi zapisami aktywności polowej, histogramami analizy FFT oraz tabelkami, podsumowującymi parametry rytmu theta, czyli częstotliwość, amplitudę i moc dominującej częstotliwości w poszczególnych grupach doświadczalnych. Opis wyników podporządkowano sformułowanym szczegółowo celom pracy.

Pierwsza część dotyczy skutecznej indukcji rytmu theta z badanej struktury, tj. ustalenia dawki analogu acetylocholino – karbacholu oraz charakterystyki uzyskiwanego rytmu. Rytm theta blokowany był podaniem atropiny, co wskazuje jednoznacznie na jego cholinergiczne podłoże. W skrawkach tylnego podwzgórza (podobnie jak w hipokampalnych) nie jest możliwa rejestracja „spontanicznego” rytmu theta, bez stymulacji cholinergicznej. Jednym z celów pracy było porównanie rytmu theta z tylnego podwzgórza i formacji hipokampa. W tej części zabrakło mi takiego porównania (np. w postaci fragmentów zapisu, bądź wyników analizy mocy pasma dominującej częstotliwości, PWR), jednak rozumiem doktoranta, który we własnej pracy nie chciał prezentować wyników uzyskanych przez innych autorów. Takie porównanie zamieszczone zostało w dyskusji, a więc wróć do tematu w dalszej części recenzji.

Tu pytanie: jak wynika metodyki i z ryc. 15, przynajmniej w odniesieniu do niektórych skrawków (bregma -4,36) obie struktury (grupa jąder podwzgórza i jądro nadsuteczkwate) znajdowały się w tym samym preparacie. Czy zdarzało się, że czynność obu grup jąder badano w jednym eksperymencie, a jeśli tak, to czy zaobserwowano różnicę w zależności od kolejności prowadzonych rejestracji?

W drugiej części Wyników pan mgr Bartosz Caban przedstawił doświadczenia, w których badał znaczenie połączeń szczelinowych dla indukcji rytmu theta, wypróbując ich bloker i aktywator. Doktorant wykazał, że zablokowanie tych połączeń karbenoksolonem „poprawiało” rytm theta, zwiększając amplitudę i moc dominującej częstotliwości, nie wpływając na samą częstotliwość rytmu. Działanie to może wynikać z aktywacji przez karbenoksolon receptorów mineralokortykoidowych, powszechnych w OUN i występujących również w badanej strukturze. Wyłączenie tych receptorów w doświadczeniach pana Cabana skutkowało powrotem parametrów theta do wartości obserwowanych po wyłącznie cholinergicznym stymulacji. W komentarzu, zawartym w dyskusji doktorant wnioskuje, że połączenia szczelinowe w tylnym podwzgórzu (o ile są), wydają się nie mieć takiego znaczenia dla rytmu theta, jak np. w hipokampie.

Kolejne doświadczenia, przeprowadzone przez doktoranta, dotyczyły możliwej roli systemu oreksynowego w modulacji rytmu theta w tylnym podwzgórzu. Oreksyny (należące do 2 typów, A i B) działają przez dwa typy receptorów (OX1-R i OX2-R), wykazując do nich różne powinowactwo. Jak wiadomo, ośrodkowym źródłem oreksyn jest boczny i okołokomorowy obszar podwzgórza, z tych miejsc projekcje rozchodzą się do niemal wszystkich obszarów mózgowych. Ponadto, w badaniach zespołu pana prof. Konopackiego oba typy oreksyn okazały się skuteczne w indukcji rytmu theta w hipokampie, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, stąd mgr Caban uznał za niezbędne przeprowadzenie doświadczeń ze stymulacją/blokadą receptorów oreksynowych również w tylnym podwzgórzu. W odróżnieniu od hipokampa, oreksyny w tylnym podwzgórzu samodzielnie nie wywoływały rytmu theta, natomiast zastosowanie ORX-B po stymulacji cholinergicznym (indukującej theta) poprawiało amplitudę i dominującą moc sygnału, bez wpływu na częstotliwość. Działanie to okazało się zależne od aktywacji obu typów receptorów, gdyż nie występowało po ich zablokowaniu.

W ostatniej grupie doświadczeń, o której chcę napisać (w pracy umieszczonych w części III) pan mgr Caban rejestrował zarówno zbiorczą (polową) aktywność podczas cholinergicznie indukowanego rytmu theta, jak i czynność pojedynczych neuronów, poszukując neuronów theta-zależnych w tej strukturze. Na znacznym materiale doświadczalnym (139 skrawków, czynność 176 pojedynczych neuronów) wykazał występowanie fazowych i tonicznych neuronów typu theta-ON, przy czym neurony fazowe w jądrach tylnego podwzgórza zostały opisane po raz pierwszy. Zarejestrował również czynność neuronów, wykazujących wyładowania w stałym, charakterystycznym dla danej komórki rytmie, które określił mianem „chronometrycznych”.

Dyskusja, obejmująca 30 stron, zaczyna się krótkim podsumowaniem najważniejszych wyników, uzyskanych w poszczególnych seriach doświadczeń. Jest podzielona na podrozdziały, w których kolejno Autor omawia uzyskane wyniki. Odnosi je do faktów, znanych z piśmiennictwa, wykazując się przy tej okazji bardzo dobrą znajomością publikacji dotyczących tematu. Łączna liczba cytowanych publikacji (w części wstępnej jak i w dyskusji) wynosi 248 pozycji.

Analiza wyników w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa jest bardzo rzeczowa i dokładna; przykładowo, przy interpretacji efektów stosowania karbenoksolonu, doktorant wskazuje szereg innych możliwych działań tego środka, niezwiązanych z blokadą połączeń szczelinowych.

W Dyskusji cała część (od str. 118) poświęcona jest porównaniu parametrów rytmu theta rejestrowanego z hipokampa i tylnego podwzgórza. Jest tam informacja o przyjmowaniu przez rytm theta w skrawkach hipokampalnych pełnego zakresu częstotliwości, tj. 3-12 Hz oraz osiąganiu amplitudy do 2000 μ V. Na bazie wyników pana mgr Cabana rytm theta ze skrawków podwzgórzowych można określić w uproszczeniu jako „gorszy”: cechował się znacznie niższą amplitudą, mieścił się wyłącznie w zakresie częstotliwości charakterystycznych dla II typu rytmu theta, a jego indukcja wymagała zastosowania wyższych stężeń karbacholu. Ponieważ atropina blokuje theta zarówno w skrawkach hipokampalnych, jak i podwzgórzowych, rytm ten można uznać za cholinergiczny. Autor przypuszcza, że jedną z przyczyn różnic w jakości rytmu jest mniejsza liczba neuronów theta-zależnych w podwzgórzu. Nasuwa się pytanie, czy na pewno rytm indukowany w podwzgórzu odpowiada temu w hipokampie? Przeczy temu głównie zakres częstotliwości (mimo prób manipulacji farmakologicznych, stosowanych w tej pracy, indukowano zaledwie wzrost amplitudy i mocy dominującej częstotliwości, ale stale w zakresie theta II typu). Jestem ciekawa zdania Autora w tym względzie i uzyskane przez niego wyniki uważam za niezwykle interesujące z punktu widzenia funkcjonowania wstępującego systemu synchronizacji czynności hipokampa.

Pracę doktorską kończą wnioski, sformułowane ostrożne i uzasadnione wynikami. Z badań prowadzonych przez pana mgr Bartosza Cabana wynika, że można wywołać rytm theta pozaustrojowo, w preparatach zawierających tylne podwzgórze, a parametry rytmu (amplitudę i moc) można modyfikować farmakologicznie. Część komórek badanej struktury wykazuje cechy charakterystyczne dla neuronów theta-zależnych, co potwierdza miejsce tylnego podwzgórza wśród struktur regulujących hipokampalny rytm theta. Praca jest

napisana poprawną polszczyzną i wolna od żargonowych określeń, pod względem edycyjnym jest przygotowana starannie. Znalazłam jedynie 2 (i to drobne) miejsca, wymagające korekty:

we WSTĘPIE - Ryc. 2. – kolory struktur (PH i SUM) zostały opisane odwrotnie,

w WYNIKACH – część II, grupa III jest: „Następnie, po wywołaniu rytmu theta (CBX 75 μ M) poddawano je perfuzji roztworem CCH (75 μ M) i CBX (100 μ M).” – chodziło zapewne o CCH (na rycinie i w tabeli jest dobrze).

Podsumowując, zarówno merytoryczną jak i formalną stronę pracy oceniam bardzo wysoko. Autor przedstawił oryginalne wyniki, uzyskane na obszernym materiale doświadczalnym. Wyniki były częściowo publikowane w 3 pracach oryginalnych (2014-2016) oraz licznych doniesieniach konferencyjnych. Finansowanie badań pochodziło z grantów NCN oraz 2 projektów samodzielnych (dla uczestników studiów doktoranckich), które realizował pan mgr Bartosz Caban.

Wniosek końcowy

Recenzowana przeze mnie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., opublikowanej w Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595. Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie neurofizjologii i anatomii podwzgórza, umiejętnością planowania i przeprowadzania badań naukowych, właściwego opracowania i przedstawiania wyników. Stawiam wniosek o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pana mgr Bartosza Cabana do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jeżeli Wysoka Rada przewiduje nagrodzenie Doktoranta za wykonanie pracy doktorskiej, wnioskuję o przyznanie wyróżnienia panu mgr Bartoszowi Cabanowi.

Dr. hab. Edyta Jurkowlanec-Kopeć, prof. UG

Gdańsk, 15 stycznia 2017 r.