



Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

☎ (+48-12) 664-53-73

E-mail: marain.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pana magistra **Bartosza CABANA** pt.

„Rytm Theta w Obszarze Tylnego Podwzgórza u Szczura: Badania in Vitro”

Przedstawiona do oceny praca, stanowi kolejne bardzo obszerne i cenne opracowanie grupy Profesora Jana Konopackiego, który od ponad 30 lat wierny jest tematyce badawczej, dotyczącej rytmu theta, podstawowej i bardzo ważnej fizjologicznie neuronalnej aktywności mózgowia.

Głównym celem dysertacji Pana mgr Cabana, było sprawdzenie, czy w kolejnej strukturze mózgowia szczura (obszarze tylnego podwzgórza), możliwe jest wygenerowanie rytmu theta w warunkach *in vitro*.

Praca ma typowy układ rozprawy doktorskiej. Zawiera 142 strony podzielone na 6 rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Cel Pracy 3. Materiał i Metody Doświadczalne, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Literatura. Każdy z rozdziałów uzupełniony jest szczegółowymi podrozdziałami. Praca zawiera także streszczenie (po polsku i angielsku) oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Już ten precyzyjny spis treści jasno pokazuje, że cała praca została bardzo logicznie i konsekwentnie zaplanowana, a bogata liczbowo literatura (248 pozycji!), dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktoranta.

Wstęp pracy, jak to zwykle bywa, jest wprowadzeniem do badanych zagadnień. Autor objaśnia, „czym jest rytm theta”, opisuje jego parametry elektrofizjologicznie, porównuje znaczenie fizjologicznie u człowieka i zwierząt. Wskazuje także, na dwa jego typy u gryzoni, zwracając szczególną uwagę na typ II, który jest przedmiotem badań autora. Opisuje udział wielu neuroprzekaźników w jego generowaniu i modulacji, które wcześniej również były przedmiotem analizy macierzystej grupy badawczej. Niezwykle ciekawy i ważny, z punktu podjętych badań, jest opis wstępującej drogi synchronizującej rytm theta w hipokampie i strukturach limbicznych. Należy ona do układu niespecyficznego

mózgowia, którego źródło leżą w pniu mózgu, a tworzą ją także badane przez doktoranta jądra tylnego podwzgórza. Autor wskazuje, na początek tej drogi w cholinergicznym jądrze konarowo-mostowym nakrywki. Pytanie, jakie mi się nasuwa, dotyczy udziału w aktywności theta, drugiego źródła cholinergicznego, leżącego blisko tego pierwszego, jądra grzbietowo-bocznego nakrywki? W szczegółowym opisie poszczególnych anatomicznych elementów tej drogi, głównie tylnego podwzgórza, które dodatkowo autor uzupełnia czytelnymi schematami, czuję chęć przekonania czytającego, że droga ta jest niezbędna w generowaniu rytmu theta w formacji hipokampa i struktur około hipokampalnych. Jeśli taki był zamiar autora, to cel został osiągnięty. W dalszej części wstępu, doktorant opisuje i klasyfikuje, poznane do tej pory neurony, biorące udział w generowaniu rytmu theta. Opisuje budowę połączeń szczelinowych i przedstawia dowody modulacji tej aktywności przez synapsy elektryczne, które także z dużym sukcesem były przedmiotem wcześniejszych badań grupy Profesora Konopackiego. Przedstawia dowody bardzo dużego podobieństwa rejestracji aktywności theta *in vivo* i w warunkach pozaustrojowych, przekonując, że wykorzystany w pracy model *in vitro*, jest niesłychanie przydatny i powszechnie stosowany.

Szczegółowe cele dysertacji, autor przedstawia w bardzo czytelnej graficznej formie, zamykając je w 4 kolejnych, dobrze przemyślanych i logicznie zaplanowanych etapach. Pierwszy, który implikuje kolejne, to sprawdzenie czy w dwu jądrach tylnego podwzgórza możliwe jest generowanie rytmu theta w warunkach cholinergicznego wzbudzenia. A jeśli tak, to jaka jest jego anatomiczna lokalizacja i podobieństwo z rytmem w hipokampie. Kolejny etap to określenie podłoża komórkowego mechanizmu i sprawdzenie udziału połączeń szczelinowych w jego generowaniu. W końcu, i to jest niesłychanie ważny etap badań, autor stawia pytanie o wpływ na jego generowanie i przebieg, unerwienia oreksynergicznego, nadrzędnej nad aktywnością cholinergiczną, bardzo ważnej projekcji niespecyficznej mózgowia.

Nie mam żadnych uwag merytorycznych do stosowanej przez autora metodologii badawczej w zakresie pomiarów elektrofizjologicznych. Jest ona prawidłowa i powszechnie stosowana w pomiarach *in vitro*. Jednak, pewien mój niedosyt, budzi metoda mapowania miejsc rejestracji rytmu theta. Czy nie lepsze i bardziej precyzyjne byłoby pozostawienie chemicznego śladu elektrody rejestrującej i analiza jego położenia pod mikroskopem? Mam także uwagę ogólną do tego rozdziału pracy. Miejscami opis jest zbyt szczegółowy, np. komory pomiarowej, z podawaniem jej wymiarów, i moim zdaniem

zdecydowanie za bardzo obrazowy, jest opis preparatyki skrawków mózgowia (str. 53, wiersz 6). Myślę i tak było by lepiej zastąpić to „barwne” zdanie, słowem „dekapitacja”.

Autor wyniki swojej pracy przedstawia bardzo jasno, konsekwentnie do podjętych zadań badawczych. Ich wizualizacja w postaci oryginalnych przebiegów rejestrowanej aktywności neuronalnej, histogramy mocy i autokorelacji, a także zbiorcze tabele i schematy mapowania rejestrowanych komórek, dodatkowo sprawiają, że są one bardzo czytelne. Pan mgr Caban jednoznacznie udowodnił, możliwość generowania rytmu theta z obszaru tylnego podwzgórza, jednak tylko w warunkach stymulacji cholinergiczej. Potwierdził tym samym wcześniej uzyskane wyniki w warunkach *in vivo*. Procentowo aktywność ta rozkłada się równo na dwa analizowane obszary: główne jądra podwzgórza i nadsuteczkwate. Określił optymalne stężenie agonisty cholinergicznego, które stosował w kolejnych etapach badań. Blokowanie, jak i aktywacja połączeń szczelinowych nie miały wpływu na generowanie aktywności theta w badanych strukturach. Jednak, samo zablokowanie połączeń szczelinowych, statystycznie istotnie poprawiało parametry elektrofizjologiczne rejestrowanej aktywności. Mechanizm nie był jednak bezpośredni i wg autora zachodził pośrednio, poprzez aktywację receptorów mineralokortykoidowych. Ich bowiem zablokowaniem znosiło obserwowany efekt. Dyskutując tą część wyników, doktorant piszę cyt. „*Należy podkreślić, że nie istnieją dane literaturowe potwierdzające obecność GJs w jądrze nadsuteczkwatym i głównych jądrach tylnego podwzgórza*”. Moje pytanie dotyczy sformułowania „*nie istnieją dane...*”. Co ono oznacza, były robione badania, ale nie wykryto GJs, czy nie ma takich badań? Jeśli nie ma takich badań, to czy zdaniem autora, nie warto byłoby je zrobić? Dyskusji potencjalnego udziału aktywności mineralokortykoidowej, autor poświęca dużo miejsca, jest ona jednak oparta tylko na wynikach wcześniejszych i to głównie w odniesieniu do hipokampa. Uważam zatem, że ostatnie zdanie podrozdziału II.1. (str. 106), powinno być napisane w trybie przypuszczającym.

Autor dokonał także klasyfikacji neuronalnej, komórek biorących udział w generowaniu badanego rytmu. W większości były to komórki do tej pory niewiązane z aktywnością theta, które po raz pierwszy zostały przez Pana Cabana opisane, jako tzw. komórki chronometryczne. To jest niewątpliwe osiągnięcie i istotny nowy wkład autora w badania rytmu theta. Sporą grupę w tej klasyfikacji, stanowiły także komórki theta-On fazowe. Ciekawa jest obecność tylko jednej komórki theta-OFF tonicznej, jak można to wytłumaczyć? Tu należy podkreślić, na co również autor zwraca uwagę, że zdecydowana

większość z klasyfikowanych neuronów zlokalizowana została w jądrze suteczkowatym. Co biorąc pod uwagę równe rozłożenie rejestrowanej aktywności theta w oby badanych jądrach, jest niesłychanie interesujące, w kontekście wzajemnych interakcji obu jąder. Stosowana przez autora metoda rejestracji elektrofizjologicznej nie pozwalała, na jednoczesną rejestrację aktywności theta z obu jąder, na co doktorant zwraca uwagę. Zastosowanie, jakiej innej metody pomiarowej, zdaniem autora, mogłoby spełniać warunki jednoczesnej rejestracji?

Badane oreksyny, podobnie jak połączenia szczelinowe, nie biorą udziału w generowaniu aktywności theta, jednak podanie, ale tylko oreksyny B, poprawia parametry generowanego cholinergicznego rytmu. Autor próbuje tłumaczyć potencjalne mechanizmy działania oreksyny, ale przy braku jasnych dowodów obecności receptorów tego peptydu na neuronach badanych struktur, może tylko spekulować. Tu również przydałyby się badania immunohistochemiczne, czy biochemiczne na obecność receptorów oreksynowych. Nie było to oczywiście celem tej pracy, ale ciekaw jestem komentarza autora w tej sprawie.

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie podkreślić, że mgr Bartosz Caban wynikami swojej pracy zrealizował zamierzone cele. Wykazał zdolność badanej struktury mózgowia do generowania rytmu theta, po raz pierwszy określił rodzaj dominującej aktywności komórkowej biorącej udział tym rytmem. Wykazał modulujący wpływ zarówno połączeń szczelinowych, jak i aktywności oreksynergicznej na rejestrowany rytmu theta, jednak bez ich udziału w jego generowaniu.

Na uwagę zasługuje także istotny fakt, który nie jest bez znaczenia na końcową ocenę doktoratu, zdecydowanie bowiem podnosi jego wartość. Większość przedstawionych w dysertacji wyników została opublikowana w 3 oryginalnych publikacjach naukowych o wysokim czynniku przebiccia, takich jak: *Hippocampus*, *European Journal of Neuroscience*, których Pan mgr Caban jest współautorem. Publikacje te są najlepszą recenzją doktoratu, bowiem zostały już wcześniej ocenione przez niezależnych międzynarodowych specjalistów z badanej dziedziny. Dodatkowo, prace te były realizowane w ramach dwu projektów badawczych NCN, promotora i opiekuna naukowego.

Czytając pracę znalazłem kilka błędów i niezręczności językowych. Nie mają one istotnego znaczenia, a z całą pewnością nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę części merytorycznej dysertacji. Z obowiązku recenzenta zwracam jednak uwagę na kilka z nich.

- str. 25, 114. linia 7 i 3, powinno być: „[PEKALA i wsp., 2011]”, a nie „[PEKAŁA i wsp., 2011]”
- str. 29. podpis pod Ryc. 2 PH ma kolor zielony, a SuM niebieski, jest odwrotnie
- str. 37. linia 8, końcówka zdania jest nie gramatyczna - nie „u komórek”, a w komórkach
- str. 56. linia 3, Atropina to antagonist, a nie agonista receptorów cholinergicznych
- str. 72. linia 1, powinno być „(Ryc. 13B)”
- str. 80. podpis pod Ryc. 17 w nawisach powinno być (I, II, III, V, VI)
- str. 93, 95. linia 12, 14, powinno być „rytmu”, a nie „rymu”
- str. 100, 115. linia 1, 3 i 10 od dołu, słowo „premedykacja”, jest wg mnie niezręcznie użyte
- str. 119. linia 10 od dołu, powinno być „pola”, a nie „pół”

Konkludując, uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Bartosza CABANA do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Kraków dnia 09. styczeń 2017.