

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Imię i nazwisko kandydatki: mgr ALEKSANDRA TRENK

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Characteristics of neurons in the nucleus incertus of the rat — electrophysiological studies *in vivo*.”

Promotor: dr hab. Tomasz Błasiak

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): brak

Recenzent: dr hab. Ewa Kublik

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Synchronizacja aktywności neuronów w określonych pasmach częstotliwości stanowi jeden z elementarnych mechanizmów odpowiedzialnych za realizację złożonych funkcji mózgu. Zaobserwowane w formacji hipokampa oscylacje w pasmie theta wiązane są z funkcjami takimi jak nawigacja i orientacja w przestrzeni, koordynacja zmysłowo-ruchowa czy pamięć. Podstawowy generator rytmu theta początkowo lokowano w prostym układzie połączeń hipokampa i przyśrodkowych jąder przegrody. Obecnie wiadomo, że system ten jest dużo bardziej złożony, i że podlega silnym wpływom modulującym z podwzgórza i pnia mózgu. Niestety, dalecy jesteśmy od pełnego zrozumienia wszystkich jego elementów.

Rozprawa pani Trenk wpisuje się zatem w bardzo ważny nurt badawczy mający na celu szczegółowe—anatomiczne, hodologiczne i fizjologiczne scharakteryzowanie struktur uczestniczących w indukcji, utrzymaniu i desynchronizacji rytmu theta. Na podstawie przesłanek z literatury pani Trenk wskazała kolejny istotny element tej sieci—jądro niepewne mostu (NI) i zaplanowała rozbudowane badania mające na celu jego dokładną charakterystykę. Uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w dziedzinę badawczą; zostały zaprezentowane na konferencjach i nagrodzone *Young Investigator Award* Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego. Prowadzone przez panią Trenk badania uzyskały też pozytywną ocenę recenzentów—otrzymała ona finansowanie z NCN (Etiuda 6) oraz z funduszy Uniwersytetu Jagiellońskiego.

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

Wartość naukowa badawczej części rozprawy jest bardzo wysoka zarówno ze względu na ważkość postawionych pytań jak i na jakość przeprowadzonych badań opartych o doskonałą metodykę badawczą. Poziom naukowych poszczególnych rozdziałów jest wyrównany. Niestety na liście publikacji pani Trenk nie ma jeszcze pracy z tego materiału, a szkoda - badania zdecydowanie powinny zostać przygotowane do publikacji w dobrym międzynarodowym czasopiśmie.

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):

Wysoko oceniam merytoryczną wartość rozprawy. We wstępie Autorka przedstawiła tło badań wskazując luki w obecnej wiedzy dotyczącej charakterystyki jądra niepewnego oraz jego udziału w sieci struktur odpowiedzialnych za generację i utrzymanie hipokampalnego rytmu theta. Na tej podstawie sformułowała konkretne pytania badawcze dotyczące fizjologicznej aktywności tych neuronów, ich cech neurochemicznych i sieci połączeń. Poza drobnymi zastrzeżeniami wskazanymi w punkcie 4. dobór tych szczegółowych zagadnień uważam za właściwy.

Zdecydowanie godny pochwały jest szeroki zakres wykorzystanych metod i połączenie klasycznych technik elektrofizjologicznych i histologicznych z najnowocześniejszymi metodami optogenetyki. Wykorzystanie nowoczesnych, wielokanałowych sond krzemowych pozwoliło na zarejestrowanie aktywności iglicowej dużej liczby neuronów (przy poświęceniu stosunkowo małej liczby zwierząt) i wiarygodne określenie liczebności poszczególnych elektrofizjologicznych klas komórek. Między innymi udało się udowodnić istnienie zsynchronizowanych z rytmem theta komórek o „paczkowym” trybie wyładowań iglicowych i wskazać ich lokalizację w bocznej, rozproszonej części jądra niepewnego.

Rejestracje wielokanałowymi sondami połączono z precyzyjną optogenetyczną stymulacją neuronów przyśrodkowej przegrody (MS) i (w drugim doświadczeniu) retrogradnie transfekowanych neuronów jądra niepewnego dających projekcję do MS. Dzięki temu pokazano, że za dwukierunkowe połączenie tych struktur odpowiedzialne są różne populacje neuronów. Wyjścia z NI do MS pochodzą z komórek o spontanicznej aktywności niezależnej od rytmu theta; natomiast wejścia z MS dostają komórki theta-zależne.

Wykorzystanie klasycznych elektrod szklanych i wzmacniacza mostkowego pozwoliło na zarejestrowanie aktywności iglicowej i wypełnienie barwnikiem pojedynczych komórek NI, a w następnym kroku ich wyznakowanie metodami immunohistochemicznymi. Dzięki temu można było do elektrofizjologicznej charakterystyki neuronów dodać informacje o ich cechach neurochemicznych a w szczególności o ekspresji relaksyny-3. Tu muszę podkreślić dużą wartość tego typu doświadczeń. Wraz z rozwojem i miniaturyzacją elektroniki, wielkoskalowe rejestracje elektrofizjologiczne dużych populacji komórek stały się stosunkowo łatwe i powszechne; niestety nie dają one możliwości precyzyjnej charakterystyki konkretnych neuronów. Klasyczne rejestracje jednokanałowe w trybie „juxtacellular” to „wyższa szkoła” elektrofizjologii, stosowana przez najlepsze laboratoria.

Nie budzą zastrzeżeń zastosowane przez Autorkę metody statystyczne. Wyniki przedstawione są w sposób bardzo czytelny i zilustrowane rycinami bardzo dobrej (merytorycznie i graficznie) jakości. W Dyskusji Autorka dobrze interpretuje wyniki na tle literatury przedmiotu i proponuje przekonujące wyjaśnienia zaobserwowanych rozbieżności.

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

Praca doktorska pani Aleksandry Trenk została przygotowana w języku angielskim, w formie tradycyjnej rozprawy podzielonej na Wstęp, Cele, Metody, Wyniki, Dyskusję i finalne podsumowanie w punktach głównych konkluzji rozprawy. Szkoda, że podobnego zestawienia było na koniec rozdziału Wyniki—pomogło by to w płynnym przejściu do Dyskusji. Ostatnia część rozprawy zawiera informacje o udziale Autorki w realizacji projektów i uzyskanym finansowaniu badań, prezentacjach konferencyjnych i publikacjach. Orientację w tekście ułatwia spis treści, w wersji pdf z aktywnymi powiązaniem do właściwych sekcji; przydatna jest lista stosowanych w pracy skrótów. Autorka cytuje 156 pozycji z literatury zarówno klasycznej jak i najnowszej, co dobrze świadczy o dogłębnym zapoznaniu się z tematyką badawczą. Drobną niedogodność stanowi kolejność podawanych w spisie cytacji—alfabetyczna, zgodnie z nazwiskiem pierwszego, a potem drugiego autora zamiast roku publikacji (kolejność ośmiu prac Ma et al. w Referencjach jest przez to zupełnie nieintuicyjna).

Rozprawa zawiera 106 stron, 25 ilustracji i dwie tabelki doskonale ilustrujące część wyników rozprawy. We wstępie zabrakło mi schematu ukazującego pozycję badanej struktury w omawianych sieciach funkcjonalnych. Figura 1.3 pokazuje uproszczony schemat układu generującego rytm theta ale jądro niepewne nie zostało w nim uwzględnione.

Praca jest napisana treściwie i przejrzysto. Sekcja metodyczna opisana jest bardzo rzetelnie w zakresie technik optogenetycznych, elektrofizjologicznych i anatomicznych. Nieco słabiej wypada akapit o analizie danych—brakuje tu detali dotyczących typów i parametrów stosowanych filtrów, informacji o algorytmie wykorzystanym do policzenia spektrogramu, parametrów detekcji potencjałów czynnościowych (podana konfiguracja programu Kilosort nie mówi nic osobie, która z niego nie korzysta).

4. Uwagi krytyczne

Nie mam poważnych uwag krytycznych ani do przeprowadzonych eksperymentów ani ich opisu czy dyskusji w rozprawie. Nasunęły mi się jednak komentarze, które przedstawiam poniżej.

We wstępie pojawia się informacja o obecności w jądrze niepewnym nie tylko komórek GABA i komórek z ekspresją relaksyny-3, ale też komórek glutaminianergicznych, komórek z ekspresją cholecystokininy, neuromedyny B, neurotensyny i innych neuropeptydów. Znaczenie neuromedyny B dla generacji rytmu theta Autorka opisuje we wstępie a dodanie informacji o pobudzeniowym lub hamującym charakterze opisanych elektrofizjologicznie klas komórek badanych projekcji z NI byłoby w oczywisty sposób interesujące i ważne. Dlaczego zamiast tego zdecydowano się na zbadanie obecności w neuronach cholecystokininy?

Wcześniejsze badania nie wykazały istnienia w NI neuronów o „paczkowym” (bursting) charakterze wyładowań (poza jednym przypadkiem w pracy Ma i in. 2013). Pani Trenk zarejestrowała 26% takich komórek w danych z wielokanałowych sond krzemowych (MEA) ale tylko 12% w rejestracjach elektrodami szklanymi (w technice juxtacellular). Podany w dyskusji—przekonujący—argument o specyficznym występowaniu tego typu neuronów jedynie w bocznej, rozproszonej części jądra niepewnego został oparty o analizę lokalizacji komórek z rejestracji MEA. Dziwi brak takiej analizy dla barwionych metodą juxtacellular neuronów z rejestracji pipetami.

W pracy było kilka błędów edytorskich nie wartych uwagi poza dwiema, które wpływają na merytoryczne znaczenie tekstu:

- 1) podana dawka mieszanki znieczulającej ketamina z ksylazyną jest zdecydowanie za duża—prawdopodobnie pomyłkowo podano ją jako dawkę na 100 g zamiast na kilogram masy ciała;
- 2) podana w opisie wyników (str. 48) częstotliwość wyładowań komórek theta-ON to mediana 5,2 Hz oraz 1. i 3. kwartyli odpowiednio 2.0 i 4.0 Hz—zapewne chodziło o 14 Hz?

Ponadto zauważyłam niekonsekwencję w stosowaniu nazwy anatomicznych struktur: większość podawana była w nomenklaturze angielskiej z wyjątkiem łacińskiego „*reticularis pontis oralis*” nucleus. Pierwsze przywołanie tej nazwy poparte jest cytacją pracy Goto i in. 2001, w której autorzy stosowali angielską nazwę rostral part of pontine reticular nucleus.

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

W podsumowaniu pragnę powtórzyć, że w rozprawie doktorskiej pani mgr Aleksandry Trenk, przeprowadziła rzetelny przegląd literatury i postawiła ciekawe pytania badawcze, zaplanowała badania oparte o szeroki zakres klasycznych i najnowszych metod badawczych i analitycznych, a uzyskane (oryginalne i ciekawe) wyniki opisała i przedyskutowała w treściwy i przejrzysty sposób.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani **Aleksandry Trenk** 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 Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pani **Aleksandry Trenk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

03. lipca 2020

.....
data sporządzenia recenzji



.....
podpis recenzenta