



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ
Katedra Neurobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Trenk
pt. *Characteristics of neurons in the nucleus incertus of the rat*
- *electrophysiological studies in vivo*.**

Promotor: dr hab. Tomasz Błasiak, prof. UJ

1. Wartość naukowa rozprawy

Rytm theta jest jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców elektroencefalograficznych rejestrowanych w mózgach ssaków. U gryzoni, częstotliwość rytmu theta mieści się w zakresie od 3 do 12 Hz, a główną strukturą ośrodkowego układu nerwowego związaną z jego generowaniem jest formacja hipokampa. Powstawanie rytmu theta w hipokampie oraz innych elementach układu limbicznego zależne jest od aktywacji szeregu struktur, od pnia mózgu, przez międzymózgowie, aż do podstawnych części kresomózgowia, które łącznie stanowią tzw. wstępujący system synchronizujący. Szlaki systemu synchronizującego mają początek w przednim jądrze siatkowatym mostu oraz jądrze konarowo-mostowym nakrywki, których włókna unerwiają tylne części międzymózgowia, głównie jądra tylnego podwzgórza oraz jądro nadsuteczkowate. Następnie, wstępujące drogi nerwowe ze struktur międzymózgowia docierają do obszaru przyśrodkowej przegrody, stanowiącego swego rodzaju węzeł przekazujący pobudzenie z wstępującego systemu synchronizującego do poszczególnych struktur układu limbicznego, takich jak kora zakrętu obręczy, kora śródwęchowa czy wreszcie formacja hipokampa. Rytmiczne impulsy, przekazywane z przegrody do wymienionych części układu limbicznego są bezpośrednim bodźcem do generowania w nich rytmu theta.

Badania ostatnich lat wskazują, iż przedstawiony powyżej układ elementów neuronalnych wchodzących w skład systemu synchronizującego aktywność hipokampa należy poszerzyć o dodatkowe struktury, wpływające na czynność elektroencefalograficzną kory limbicznej. Jedną z tych struktur jest położone w pniu mózgu jądro niepewne. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Trenk stanowi bardzo oryginalną i cenną analizę właściwości elektrofizjologicznych neuronów jądra niepewnego oraz ich współdziałania z układem septohipokampalnym w modulowaniu/torowaniu oscylacji theta na poziomie kory limbicznej. Przedstawione w recenzowanej rozprawie badania stanowią, w mojej ocenie, istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej mechanizmów leżących u podstaw generowania rytmu theta w ośrodkowym układzie nerwowym.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Teoretyczne tło badań prezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej przedstawione zostało w liczącym 20 stron wstępie. Ten rozdział pracy, podobnie zresztą jak pozostałe części rozprawy, został starannie przemyślany przez Doktorantkę i stanowi bardzo klarowne i logiczne wprowadzenie do prezentowanych w dalszej części rozprawy badań. Wstęp prowadzi czytelnika do jasno przedstawionego celu pracy, w którym scharakteryzowane zostały główne zadania badawcze. Doktorantka postawiła sobie za cel określenie właściwości elektrofizjologicznych komórek jądra niepewnego w odniesieniu do hipokampalnego rytmu theta, charakterystykę biochemiczną i anatomiczną tych neuronów oraz analizę interakcji pomiędzy jądrem niepewnym a obszarem przyśrodkowym przegrody podczas generowania rytmu theta w hipokampie. Badania prowadzono na szczurach szczepu Sprague-Dawley, z zastosowaniem szeregu nowoczesnych technik elektrofizjologicznych i histologicznych. Mnogość zastosowanych technik eksperymentalnych zasługuje na szczególne wyróżnienie. Doktorantka prowadziła podczas swoich badań rejestracje polowe i neuronalne z wykorzystaniem macierzy wielokanałowych, rejestracje elektrofizjologiczne z wykorzystaniem techniki juxtacellular, stymulacje optogenetyczne wybranych struktur mózgowia oraz barwienia immunohistochemiczne. Oceniając stronę metodyczną pracy należy odnotować znakomite przygotowanie Doktorantki pod względem umiejętności praktycznego zastosowania wielu nowoczesnych i trudnych technik eksperymentalnych.

Uzyskane wyniki zostały opisane w sposób jasny i syntetyczny, dodatkowo zilustrowano je wieloma czytelnymi rycinami, znacząco ułatwiającymi odbiór wielowątkowych danych. Otrzymane wyniki wskazują, że pod względem elektrofizjologicznym neurony jądra niepewnego należy podzielić na dwie podstawowe grupy, których aktywność powiązana jest lub nie, z fazą oscylacji theta obserwowanych jednocześnie w formacji hipokampa. W obrębie obu grup komórek Doktorantka dokonała dodatkowych podziałów w zależności od częstotliwości

generowanych potencjałów czynnościowych, ich powtarzalności i przebiegu w czasie. W dalszym etapie badań, mgr Trenk scharakteryzowała, przy użyciu techniki stymulacji optogenetycznych, które z opisanych wcześniej populacji neuronów otrzymują projekcję zstępującą z obszaru przyśrodkowej przegrody, a które takie szlaki do przegrody wysyłają. Dodatkowo wykazała, że neurony jądra niepewnego wysyłające projekcje wstępujące do przyśrodkowej przegrody to w większości komórki zawierające relaksynę-3. Przedstawione w pracy wyniki zostały ciekawie omówione w części dyskusyjnej rozprawy. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki pod względem teoretycznym i prowadzi do przemyślanych oraz dobrze udokumentowanych na drodze krytycznej analizy wniosków.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy:

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Trenk ma konstrukcję charakterystyczną dla tego typu opracowań. Pracę rozpoczyna przemyślany, dwudziestostronicowy wstęp, prowadzący do jasno sformułowanych zadań badawczych. W kolejnym rozdziale Doktorantka w przystępny sposób opisuje stosowane techniki badawcze, a następnie przejrzyście, z wykorzystaniem wielu czytelnych rycin i tabel prezentuje otrzymane wyniki. Rozprawę kończy piętnastostronicowa dyskusja, w której Autorka w sposób krytyczny i z niewątpliwie szeroką znajomością tematu, konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z wcześniejszymi danymi literaturowymi. O dobrym przygotowaniu Doktorantki świadczy również liczba trafnie wyselekcjonowanych i przytoczonych ponad 150 pozycji piśmiennictwa.

Recenzowana praca napisana została w języku angielskim. Nie będąc anglistą z wykształcenia, oceniam język manuskryptu jako dobry, wypowiedź prowadzona jest w jasny i klarowny sposób, bez większych błędów. Z obowiązku recenzenta, pragnę zwrócić uwagę Doktorantki na częsty brak przedimka nieokreślonego „the” przed nazwami własnymi struktur anatomicznych.

Szata graficzna przedstawionego manuskryptu jest na wysokim poziomie. Ryciny i schematy obecne we wstępie i dyskusji znacząco pomagają czytelnikowi odbiór przekazywanych treści, natomiast te umieszczone w rozdziale „Wyniki” w jasny sposób ilustrują otrzymane przez Doktorantkę dane.

4. Uwagi krytyczne

Całość przedstawionej przez mgr Aleksandrę Trenk rozprawy oceniam bardzo wysoko. Mam kilka uwag, które nie stanowią bezpośredniej krytyki, są jedynie swego rodzaju zaproszeniem do rozszerzonej dyskusji przedstawionego tematu. W związku z powyższym chciałbym poprosić Doktorantkę do ustosunkowania się do następujących zagadnień:

1. W wykazie dotychczasowych osiągnięć naukowych Doktorantki znaleźć możemy 2 artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR oraz 3 prace polskojęzyczne. Chciałbym zadać pytanie, dlaczego jak dotąd ani jeden fragment badań przedstawionych w recenzowanej rozprawie nie został opublikowany w renomowanym, międzynarodowym czasopiśmie neurobiologicznym?
2. Uwaga dotycząca wyników. Na stronie 53. Pani mgr Trenk przedstawia charakterystykę elektrofizjologiczną komórek jądra niepewnego w powiązaniu z hipokampalnym rytmem theta. Jedną z grup neuronów są komórki generujące pojedyncze potencjały czynnościowe, zgodnie z fazą rytmu (na ramieniu wstępującym hipokampalnych oscylacji połowych, co widać wyraźnie na rycinie 4.4, część dolna z prawej strony). Jeśli neurony te wyładowują zgodnie z fazą rytmu, a częstotliwość typu II rytmu theta waha się w granicach 3-6 Hz, to dlaczego mediana częstotliwości wyładowań opisywanych neuronów wynosi 2Hz (częstotliwość charakterystyczna dla pasma delta)?
3. Pani Magister pisze we wstępie do swojej rozprawy o silnych połączeniach pomiędzy neuronami jądra niepewnego a obszarem tylnego podwzgórza, w szczególności jądrem nadsuteczkwatym i tylnymi jądrami podwzgórza. Niestety w dyskusji, w przedstawionym przez siebie modelu generowania/modulowania hipokampalnego rytmu theta obszar ten został całkowicie pominięty. Wcześniejsze, wieloletnie badania doprowadziły do sformułowania tezy, iż ogólnie rzecz ujmując, na poziomie tylnego podwzgórza zachodzi kodowanie częstotliwości hipokampalnego rytmu theta u znieczulonych uretanem szczurów oraz kodowania częstotliwości i częściowo amplitudy rytmu u zwierząt swobodnie poruszających się. Czy zatem, biorąc pod uwagę ścisłe połączenia obszaru tylnego podwzgórza z jądrem niepewnym, nie można wysnuć przypuszczenia, że część z obserwowanych przez Doktorantkę funkcji modulacyjnych jądra niepewnego może nie być całkowicie lokalną cechą samej struktury, ale pewnym przekazem informacji, biegnącej z innych elementów układu wstępującego, w tym głównie jąder tylnego podwzgórza i jądra nadsuteczkwatego?
4. Pogłębiona analiza uzyskanych danych doprowadzała do opisu dwóch podstawowych grup komórek jądra niepewnego. Pierwszą grupę stanowią neurony o regularnym, szybkim wzorcu aktywności, niezależnym od fazy hipokampalnego rytmu theta, które modulują zdolności oscylacyjne układu septohipokampalnego poprzez swe połączenia wstępujące. Do drugiej grupy należą neurony wyładowujące rytmicznie, w paczkach zgodnych z fazą rytmu theta, które z kolei otrzymują projekcję zstępującą z przysrodkowej przegrody. Chce zapytać, czy Doktorantka badała lub brała pod uwagę możliwość występowania interakcji pomiędzy tymi dwiema subpopulacjami neuronów jądra

niepewnego? Jeśli tak, to jakie mogłyby mieć one wpływ na przedstawiony proces modulowania aktywności układu septohipokampalnego przez jądro niepewne?

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Trenk dowodzi, że Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym do pracy naukowej. Recenzowana praca stanowi przemyślaną koncepcyjnie, bardzo dobrze wykonaną pod względem mnogości użytych technik oraz jasno i zwięźle opisaną całość, co składa się na wartościową i dojrzałą pracę naukową. Uzyskane przez mgr Aleksandrę Trenk wyniki mają istotną wartość dla zrozumienia procesów determinujących rolę odmiennych subpopulacji neuronów zlokalizowanych w obrębie jądra niepewnego w mechanizmach modulowania aktywności oscylacyjnej theta w układzie septohipokampalnym.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr 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 mgr Aleksandry Trenk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pragę dodatkowo zwrócić uwagę na szerokie i wieloaspektowe podejście do badanego zagadnienia zaprezentowane przez Doktorantkę. Dzięki opanowaniu i umiejętnym zastosowaniu najnowocześniejszych technik elektrofizjologicznych i neurochemicznych Pani Magister nie tylko scharakteryzowała zachowanie elektrofizjologiczne subpopulacji neuronalnych jądra niepewnego ale dodatkowo określiła charakter ich projekcji wstępujących i zstępujących oraz naturę neurochemiczną. Tak kompleksowe podejście do badanego zagadnienia związane było z doskonałym warsztatem eksperymentatorskim, szeroką wiedzą i umiejętnością krytycznej analizy wielopoziomowych danych. Dzięki takiemu właśnie podejściu uzyskane wyniki mają, w moim przekonaniu, ogromną wartość merytoryczną i wnoszą istotny wkład w charakterystykę mechanizmów modulowania i generowania aktywności oscylacyjnej theta w ośrodkowym układzie nerwowym. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Trenk.

