



*Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Tokarski  
Zakład Fizjologii  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Smętna 12  
31-343 Kraków*

*Kraków, 20. 04. 2022*

### **Ocena**

osiągnięć naukowo badawczych, działalności dydaktycznej i organizacyjnej oraz osiągnięcia naukowego pt. „**Rytmu okołodobowe i ultradienne struktur neuronalnych podkorowego układu wzrokowego szczura oraz ich modulacja przez oreksyny**” doktora Łukasza Chroboka w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina: nauki biologiczne.

### **Sylwetka Habilitanta**

Dr Łukasz Chrobok w roku 2013 otrzymał tytuł licencjata neurobiologii z wyróżnieniem, na podstawie pracy licencjackiej wykonanej pod kierownictwem Profesora Mariana Lewandowskiego, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego. Następnie w roku 2017 obronił pracę doktorską, również pod opieką Profesora Lewandowskiego i otrzymał z wyróżnieniem stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, na podstawie rozprawy doktorskiej w języku angielskim pod tytułem: „Electrophysiological studies on the rat lateral geniculate nucleus in physiology and pathophysiology”. Po obronie doktoratu Habilitant w roku 2018 odbył 6 miesięczny staż podoktorski w Faculty of Life Science Uniwersytetu w Manchesterze, Zjednoczone Królestwo (staż finansowany ze środków projektu Etiuda 4) Po zakończeniu stażu dr. Chrobok podjął pracę naukową na stanowisku asystenta w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (etat naukowo-badawczy finansowany ze środków projektu Sonatina 2). W okresie od czerwca do grudnia 2021 odbył staż finansowany również ze środków projektu Sonatina 2 w ramach Honorary Research Fellow w College of Medicine and Health Uniwersytetu w Exeter, w Zjednoczonym Królestwie. Dorobek publikacyjny dr. Łukasza Chroboka obejmuje łącznie 30 prac naukowych oraz udział w prezentacjach wyników na 33 zjazdach krajowych i



zagranicznych przy czym w dużej mierze były to prezentacje ustne w języku angielskim. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) opublikowanych prac wynosi 110.695 punktów a sumaryczna ilość punktów MNiSW 1679. Publikacje Habilitanta są często cytowane: sumaryczny indeks cytowań wynosi 166, a h-index 7.

**Ocena merytoryczna i formalna osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

Rytmu okołodobowe są dziedzictwem ewolucyjnym i występują u wszystkich ziemskich organizmów. Jest to konsekwencja dostosowania się istot żywych do powodowanego ruchem osiowym Ziemi, występowania dnia i nocy. Ten jeden z najstarszych filogenetycznie procesów reguluje zasadniczo większość, o ile nie wszystkie, procesy fizjologiczne zachodzące w organizmach żywych. Mechanizmem kontrolującym rytm okołodobowy, który trwa mniej więcej 24 godziny jest tzw. zegar biologiczny. Pojawienie się zegara biologicznego pozwoliło organizmom nie tylko reagować na zmiany środowiska, ale aktywnie je przewidywać, co stanowi zdobycz ewolucyjną. Efekty aktywności zegara biologicznego możemy obserwować na każdym poziomie złożoności, zaczynając od regulacji ekspresji genów a kończąc na regulacji zachowania całego organizmu a czasami całych populacji. Mechanizmy odpowiedzialne za występowanie cyklu okołodobowego były przedmiotem badań od wczesnych lat 70-tych dwudziestego wieku. Pierwsza praca sugerująca, że mamy do czynienia z mechanizmem opartym na zmianach w ekspresji genów ukazała się w 1971. Była to praca Seymoura Benzera i Ronalda Konopki na temat wpływu mutacji jednego genu na cykl okołodobowy muszki owocowej. Obecnie wiemy, że zegar biologiczny to zespół genów, występujących w kilku strukturach mózgu, które poprzez indukcję syntezy białek kontrolują procesy biochemiczne w komórkach organizmu. Do niedawna klasycznie, jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (*ang. suprachiasmatic nuclei, SCN*), czyli niewielka grupa małych neuronów zlokalizowanych w przedniej części podwzgórza tuż nad skrzyżowaniem wzrokowym, uznawane były za zegar biologiczny ze względu na silnie zsynchronizowaną ekspresję tzw. genów zegarowych przez większość komórek nerwowych obecnych w tej strukturze mózgu. Obecnie jest coraz więcej dowodów na istnienie zorganizowanych lokalnych zegarów w innych strukturach neuronalnych i nieneuronalnych mózgowia, o różnym poziomie



autonomii w stosunku do głównego zegara w SCN. Wykazano mianowicie, że aktywność zegarową struktur poza SCN można obserwować w izolacji od głównego zegara. Przykładami takich niezależnych od SCN autonomicznych mózgowych zegarów okołodobowych są między innymi: opuszka węchowa, jądra uzdeczki a także jądra przyśrodkowo-podstawnego podwzgórza. Według teorii wielo-oscylatorowej zegara biologicznego możemy powiedzieć, że cykl okołodobowy jest regulowany poprzez zespół zegarów zlokalizowanych w strukturach podkorowego układu wzrokowego, których cechą wspólną jest silne unerwienie pochodzące z siatkówki oka oraz zdolność do rytmicznej aktywności. Lokalne mózgowy zegary poza SCN wykazują silne rytmy okołodobowe w aktywności elektrycznej niezależne od głównego zegara. Zegary te mimo autonomiczności lub pół-autonomiczności podlegają jednak wzajemnemu oddziaływaniu i synchronizacji. Uwalnianie neuroprzekazników przez neurony jednego ośrodka oscylacyjnego może spowodować zmiany rytmicznej aktywności innego. Logiczną konsekwencją istniejących między nimi współzależności jest to, że rytmy przez nie generowane można podzielić nie tylko pod względem częstotliwości, ale także źródeł i poziomu ich autonomii. Regulacja cyklu okołodobowego jest procesem wielopoziomowym o wysokiej złożoności topologicznej którego wyjaśnienie jest jednym z największych wyzwań chronobiologii.

To właśnie zagadnienie wzajemnych oddziaływań poszczególnych zegarów okołodobowych oraz metod kodowania i przekazywania informacji pomiędzy nimi oraz ich współzależności jest tematem badań których wyniki dr Chrobok prezentuje w opublikowanych pracach wchodzących w skład jego osiągnięcia habilitacyjnego.

Ponieważ poszczególne prace, będące podstawą rozprawy, podlegały już wnikliwej ocenie recenzentów renomowanych czasopism, w których zostały opublikowane, jako recenzent pozwolę sobie tylko wspomnieć najważniejsze osiągnięcia naukowe w zaprezentowanych pracach i omówić je jako pewnego rodzaju całość.

Osiągnięcie naukowe zatytułowane „Rytmy okołodobowe i ultradielne struktur neuronalnych podkorowego układu wzrokowego szczura oraz ich modulacja przez oreksyny”, omówione przez dr. Chroboka w autoreferacie, stanowi syntezę wyników zawartych w 5 opublikowanych oryginalnych pracach, odznaczających się wysokim poziomem merytorycznym oraz bardzo nowoczesnym i właściwie dobranym warsztatem badawczym.



W pierwszej pracy z cyklu habilitacyjnego, Habilitant przeprowadził cykl eleganckich eksperymentów *in vivo i in vitro* mających na celu określenie czy źródłem infra-wolnych oscylacji w różnych strukturach podkorowego układu wzrokowego (ang. *subcortical visual system*, SVS) może być oscylacyjna aktywność siatkówki. Przeprowadzone doświadczenia wykazały występowanie oscylacji infra-wolnych w aktywności neuronów trzech części (grzbietowej DLG, brzusznej VLG i listka ciała kolankowatego bocznego IGL) kompleksu jądra ciała kolankowatego bocznego wzgórza (ang. *lateral geniculate nucleus*, LGN) *in vivo* oraz ich odmienną reakcję na globalne zmiany oświetlenia środowiska. Badania wykazały, że oscylacje infra-wolne w DLG i VLG można zarejestrować w świetle a także w całkowitej ciemności. Stwierdzono także, że częstotliwość rytmu infra-wolnego jest istotnie zwiększona w ciemności. Co istotne oscylacje infra-wolne w IGL można rejestrować jedynie w świetle, a przy jego braku aktywność neuronalna IGL niemal całkowicie zanika. Co najbardziej istotne, habilitant, wykazał, że aktywność neuronalna VLG i DLG, ale nie IGL, jest dodatkowo kształtowana przez nowo zdefiniowany rytm czyli aktywność oscylacyjną w paśmie gamma (około 30 Hz), którego źródłem są komórki siatkówki, oraz wykazał, że oscylacje w paśmie infra-wolnym przekazują informacje do struktur SVS o wolnych, utrzymujących się zmianach oświetlenia środowiska, zaś oscylacje gamma kodują dynamiczne zmiany intensywności światła padającego na siatkówkę.

W publikacji nr 2 habilitant podejmuje badania na temat mechanizmów odpowiedzialnych za sekrecję oreksyn do struktur neuronalnych SVS. Oreksyny czyli neuropeptydy wytwarzane przez grupę komórek nerwowych znajdujących się w podwzgórzu i pniu mózgu regulują, kiedy stan snu i czuwania jest stosowny dla organizmu tak więc ich działanie pozostaje w ścisłej interakcji z systemem regulującym emocje. Najprościej mówiąc dzięki prawidłowemu uwalnianiu oreksyn wieczorem zasypiamy, kiedy jesteśmy zrelaksowani natomiast czuwamy, gdy mamy poczucie zagrożenia. Wyniki przedstawione w omawianej publikacji sugerują, że sekrecja oreksyny na wejściach do struktur neuronalnych SVS charakteryzuje się rytmiką okołodobową. Habilitant wykazał także silną konwergencję układu oreksynowego z sygnałami wzrokowymi w LGN. Na podstawie uzyskanych wyników Habilitant hipotetyzuje, że układ oreksynowy moduluje aktywność unerwionych przez siatkówkę neuronów LGN, przekazując informację o czasie okołodobowym, zależną od głównego zegara w SCN.



Zagadnienie współzależności pomiędzy uwalnianiem oreksyn a aktywnością neuronalną SC jest tematem kolejnej z prac cyklu habilitacyjnego dr. Chroboka. Habilitant przeprowadzając szereg zawansowanych metodologicznie jak również doskonale logicznie zaplanowanych badań wykazał modulujący wpływ układu oreksynowego bocznego podwzgórza na aktywność neuronalną wzrokowych warstw SC. Dodatkowo habilitant wykazał, że mimo zaliczania SC do niezależnych oscylatorów dobowych to jego dobową aktywność jest jednak modulowana przez SCN, nie w sposób bezpośredni, ale pośrednio przez zależny od SCN układ oreksynowy.

W następnej pracy będącej częścią cyklu habilitacyjnego dr Chrobok kontynuuje badanie wzajemnych oddziaływań poszczególnych zegarów okołodobowych oraz metod kodowania informacji przekazywanych pomiędzy. Otrzymane przez niego wyniki wykazują dotychczas nieznane okołodobowe właściwości neuronów LGN, widoczne zarówno w ekspresji genów zegarowych jak i aktywności elektrycznej. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że IGL oraz VLG są niezależnymi od SCN autonomicznymi zegarami okołodobowymi, natomiast DLG którego właściwości zegarowe zanikają w warunkach *ex vivo*, jest oscylatorem półautonomicznym lub podrzędnym. W pracy wykazano także istotną rolę przewodnictwa GABA-w modulacji aktywności elektrycznej neuronów zegarowych IGL i VLG.

Ostatnia z prac wchodzących w dzieło habilitacyjne dr. Chroboka jest pracą przeglądową. W pracy tej Habilitant omawia w sposób obszerny ale przejrzysty opublikowane przez niego wyniki oraz jeszcze nieopublikowane ciekawe obserwacje przeprowadzonych przez badań na tle wyników innych grup badawczych.

Podsumowując osiągnięcie naukowe Habilitanta możemy stwierdzić, że prace doświadczalne wchodzące w jego skład są wysoce spójne tematycznie. Zarówno pod względem merytorycznym oraz metodologicznym reprezentują bardzo wysoki poziom naukowy. Są to artykuły, które ukazały się w czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym, o bardzo wysokim IF. Należy tu podkreślić, że sumaryczny IF pięciu 5 prac stanowiących osiągnięcie naukowe to 24.087. Z oświadczeń Habilitanta i współautorów wynika, że odgrywał on istotną rolę w powstawaniu każdego z wymienionych artykułów o czym świadczy zresztą to, że dr Chrobok jest w każdej z tych prac zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem.



Habilitant uczestniczył w procesie przygotowania i opracowania koncepcji poszczególnych prac oraz brał czynny udział w realizacji części eksperymentalnej, wykonywanej z zastosowaniem wręcz imponującej wysoce zaawansowanej metodologii. Co ważne bardzo szeroki wachlarz zaawansowanych technik badawczych, został użytych w bardzo konkretnym celu. Nie ma tutaj nieprzyjemnego wrażenia, że techniki zostały użyte dla samego efektu “wow”, co jest niestety częste w dzisiejszych badaniach. Nie, tutaj każda użyta metoda, mniej lub bardziej nowoczesna, ma pełne uzasadnienie i jest zaadaptowana do projektu, a nie odwrotnie. Każda praca Habilitanta jest przykładem znakomicie realizowanego planu badawczego, zasługującego na najwyższe uznanie. Dr Chrobok wręcz w oczywisty sposób brał udział w interpretacji, dyskusji i wnioskowaniu uzyskanych wyników. Dodatkowo prace te były finansowane przez projekty badawcze uzyskane w wyniku starań dr. Chroboka. Wszystko to udowadnia nam, że dr Chrobok doskonale radzi sobie w roli samodzielnego pracownika naukowego, nie tylko w sposób perfekcyjny kierującego samodzielnie projektami badawczymi o wysokim stopniu trudności z wykorzystaniem niestandardowych metodologii i innowacyjnych technik badawczych, ale także zapewniającego źródła finansowania prowadzonych badań.

**Reasumując oceniane przeze mnie osiągnięcie naukowe stanowi wydzielony, samodzielny fragment szerszego dorobku naukowego dr Łukasza Chroboka i niewątpliwie spełnia wymogi stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.**

### **Ocena pozostałej działalności naukowej, dydaktycznej i popularyzatorskiej**

Dorobek naukowy habilitanta nie wliczany w jego osiągnięcie habilitacyjne jest równie imponujący jak osiągnięcie habilitacyjne. Otwiera go 14 naukowych publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora oraz kontynuuje 11 bardzo dobrych publikacji naukowych po uzyskaniu stopnia doktora biologii, w których to Habilitant jest w większości pierwszym autorem. Bardzo widoczny od początku kariery naukowej dominujący profil zainteresowań ukierunkowany na zagadnienia związane rytmami około-dobowymi w rezultacie powoduje, że dorobek naukowy dr. Łukasza Chroboka cechuje wierność tematyczna i konsekwencja prowadzonych badań oraz ich logiczne wzajemnie się uzupełniające następstwa które mają w nim swoje odbicie. Habilitant jest m.in. współautorem niezwykle interesujących prac z tematyki





medycznej dotyczących wpływu zaburzeń zegara okołodobowego na predyspozycje w kierunku epilepsji. Inny fascynujący cykl badawczy dotyczy potencjalnych zmian wywołanych dietą wysokotłuszczową w aktywności struktur mózgowych zaangażowanych w okołodobową regulację zachowań pokarmowych, jeszcze przed wykształceniem nadwagi czy otyłości. Jest to istotny przyczynek w kierunku wykrycia potencjalnych przyczyn otyłości, co w dzisiejszych czasach jest jednym z głównych nurtów badawczych w zapobieganiu zjawisku otyłości a tym samym większości chorób cywilizacyjnych.

Oceniany w tej części recenzji dorobek Habilitanta bezsprzecznie zasługuje na pozytywną ocenę zarówno od strony ilościowej jak i merytorycznej. Również te prace, podobnie jak prace tworzące osiągnięcie naukowego w świetle Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowią oryginalny i istotny wkład w naukę oraz mogą mieć zastosowanie praktyczne.

Z dostarczonych dokumentów wynika, że Pan dr Chrobok ma bardzo duże doświadczenie dydaktyczne. W trakcie studiów doktoranckich prowadził zajęcia dydaktyczne dla studentów I i II stopnia studiów Biologia oraz Neurobiologia na Wydziale Biologii UJ w wymiarze 60 h rocznie. Habilitant sprawował także opiekę nad jedną eksperymentalną pracą licencjacką oraz dwoma pracami magisterskimi w grupie prof. dr hab. Mariana Lewandowskiego. Mimo intensywnie prowadzonych badań dr Chrobok nadzorował prace laboratoryjne studentów wykraczające poza ich obowiązkowe badania nad pracami dyplomowymi. Co godne podkreślenia opieka nad tymi studentami w rezultacie dała efekty w postaci współautorstwa ww. studentów w publikacjach Habilitanta.

Dr Chrobok był i jest recenzentem oraz co należy podkreślić edytorem prac w renomowanych czasopismach naukowych, autorem wielu artykułów popularnonaukowych, wystąpień i dyskusji w mediach elektronicznych. Imponująca lista komunikatów, doniesień zjazdowych oraz wygłoszonych wykładów potwierdza Jego aktywny udział w Krajowych i Międzynarodowych spotkaniach naukowych.

Dr Chrobok jest członkiem Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego, członkiem Federation of European Neuroscience Societies oraz członkiem prestiżowego towarzystwa European Biological Rhythms Society.



Habilitant regularnie otrzymuje granty badawcze. Doktor Łukasz Chrobok był kierownikiem projektu NCN Sonata 2, stypendystą grantu doktorskiego NCN Etiuda 4 oraz kierownikiem grantu MNiSW Diamentowy grant 3. Oprócz tego doktor Łukasz Chrobok był wykonawcą grantu NCN Opus 13, grantu NCN Harmonia 6 oraz grantu NCN Opus 5.

W karierze naukowej Dr. Chroboka widać wyraźnie, że posiada wybitne zdolności w nawiązywaniu i rozwoju współpracy naukowej zarówno z krajowymi jak i zagranicznymi jednostkami badawczymi. Przed osiągnięciem stopnia doktora Habilitant odbył nieobowiązkową 6 tygodniową praktykę w wiodącym polskim ośrodku badawczym z zakresu technik elektrofizjologicznych a mianowicie w Samodzielnej Pracowni Biofizyki Układu Nerwowego, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu kierowaną przez profesora Jerzego Mozrzymasa. Po osiągnięciu stopnia doktora Habilitant odbył wielomiesięczny staż podoktorski w laboratorium prof. Hugh Pigginsa na Uniwersytecie w Manchesterze, oraz wielomiesięczny pobyt badawczy jako Honorary Research Fellow w College of Medicine and Health Uniwersytetu w Exeter. Co warte podkreślenia wyjazdy te przyniosły rezultaty w postaci opanowania przez Pana Chroboka nowych, wysoce zawansowanych technik badawczych, współautorstwa w wysokiej klasy pracach badawczych oraz nawiązaniu długotrwałej współpracy naukowej z ww. ośrodkami





### Podsumowanie

Działalność naukowa i pedagogiczna dr. Łukasza Chroboka jest wszechstronna i harmonijna, co doskonale charakteryzuje i uzupełnia sylwetkę wybitnego współczesnego samodzielnego naukowca do grona, których niewątpliwie należy i w pełni uzasadnia jego starania o otrzymanie przez stopnia doktora habilitowanego. W mojej opinii dr Chrobok to w pełni ukształtowany, doskonały pracownik naukowy, wszechstronny badacz, doświadczony we współpracy interdyscyplinarnej, a także osoba posiadająca cechy predysponujące do samodzielnej działalności naukowej. Zdaniem Recenzenta przedstawione do oceny osiągnięcia naukowe, a także całociowy dorobek zarówno naukowy, dydaktyczny jak i popularyzatorski spełnia wszelkie wymogi formalne i merytoryczne wynikające z art. 219 ust. 1 pkt 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.).

Wobec powyższego z pełnym przekonaniem popieram starania dr. Chroboka o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina: nauki biologiczne. Zwracam się zatem z prośbą do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Habilitanta do dalszych etatów procedury habilitacyjnej oraz nadanie dr. Łukaszowi Chrobokowi stopnia doktora habilitowanego.

Łączę wyrazy szacunku

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Tokarski