



Kraków, 7 stycznia 2023 roku

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Szlagi zatytułowanej
„Electrophysiological and anatomical studies of interactions between the catecholaminergic system,
interpeduncular nucleus and nucleus incertus of the rat”,
przygotowanej pod opieką dr hab. Anny Błasiak
w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Szlagi skupia się funkcjonalnej anatomii połączeń między brzuszonym polem nakrywki w śródmózgowiu, przylegającym do niego jądrem międzykonarowym, a jądrem niepewnym w tyłomózgowiu i jądrem Darkszewicza w istocie szarej okołowodociągowej. Przedstawione badania wskazują na sprzężenie między kluczowymi obszarami układu nagrody mózgu, a ośrodkami kontrolującymi reakcje na stres i zagrożenie. Doktorantka wskazuje badane szlaki jako kluczowe dla reakcji na nowe bodźce w otoczeniu i stąd też istotne ich znaczenie dla zrozumienia mechanizmów rozwoju zaburzeń w zachowaniu indukowanym przez stres. W pełni zgadzam się z tym uzasadnieniem znaczenia badań; dodałbym też, że nazwa jądra niepewnego nadal trafnie odzwierciedla ograniczoną wiedzę względem jego znaczenia funkcjonalnego, co nadaje dodatkowej wagi podjętej w rozprawie tematyce.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana została w języku angielskim, posiada 121 numerowanych stron i ma klasyczny układ, w tym wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, metody, wyniki, dyskusję oraz liczące 262 pozycje piśmiennictwo. Do pracy zostały dołączone spisy skrótów, rycin i tabel, wykaz publikacji i doniesień zjazdowych oraz informacja o projektach badawczych w których doktorantka brała udział. Praca została przygotowana starannie. Znalazłem w kilku miejscach potknięcia edytorskie (na przykład strona 9 drugi akapit pisownia „modulate” lub strona 21 drugie zdanie w akapicie otwierającym rozdział 5.4.1 na stronie 21, „exemplary” w znaczeniu „przykładowy” w wielu miejscach, c-Fos w trzech różnych pisowniach) lub żargon laboratoryjny (na przykład „bloker” na stronie 5), niemniej potknięcia były rzadkie i nie miały żadnego wpływu na zrozumiałość tekstu, ani poprawność opisywanych wyników.

Wstęp rozprawy liczy 19 stron i rozpoczyna się od wprowadzenia mechanizmów odpowiedzialnych za reakcję na nowe bodźce, ich połączenia z wpływem stresu na mózg oraz wybranymi funkcjami neuronów katecholaminergicznych, w końcu skupiając się na rolach odgrywanych w tym kontekście przez brzuszne pole nakrywki, jądro międzykonarowe oraz jądro niepewne. Opis stanu wiedzy zawiera liczne odniesienia do piśmiennictwa i wyraźnie pokazuje bardzo dobrą znajomość tematyki badań oraz ogólną wiedzę doktorantki. Mam ogólną uwagę względem Wstępu w kwestii wyboru głównych omawianych zagadnień. Pojawia się synteza katecholamin, wprowadzenie do działania układu mezolimbicznego oraz ogólniej szlaków dopaminergicznych i opis szeregu mechanizmów dla istotnych dla efektów stresu, ale brak późniejszego nawiązania do tych wątków w dyskusji wobec czego nie jestem pewien, czy te zagadnienia są kluczowe w kontekście prezentowanych wyników. Z drugiej strony, brak we Wstępie wzmianki o jądrze Darkszewicza i jego znaczeniu w omawianym układzie, brak też ogólniejszego podsumowania całości Wstępu. Dodałbym też



drobną uwagę, gen kodujący receptor dopaminy D1 u ludzi i myszy posiada dwa eksony (jakkolwiek cała sekwencja kodująca białko jest na jednym). Niemniej bez względu na uwagi do układu tekstu, Wstęp jednoznacznie potwierdza wiedzę doktorantki w obszarze prowadzonych badań oraz szeroką znajomość piśmiennictwa.

Cel pracy zdefiniowany jest jako ustalenie funkcjonalnych połączeń między układami katecholaminergicznymi, jądrem międzykonarowym i jądrem niepewnym. W opisie celu ponownie podkreślone jest znaczenie badanego układu dla kontroli zachowań wywołanych nowymi bodźcami w otoczeniu, zawarty jest również dokładny plan badań. Cel postawiony jest jako hipoteza, ale jego opis raczej wskazuje na eksploracyjne podejście. Do opisu celów dołączona jest również rycina (jakkolwiek nie znalazłem odniesienia do niej w tekście), która graficznie podsumowuje cały zarys badań. Rycina umiejętnie oddaje schemat badań i nieco szkoda, że nie jest obszerniej wykorzystana.

Rozdział metod liczy jedenaście stron i w sposób skondensowany ale szczegółowy opisuje wszystkie procedury badawcze. Rozpoczyna go opis przygotowania zwierząt doświadczalnych, przez transdukcję z wykorzystaniem wektorów wirusowych, barwienia z wykorzystaniem immunofluorescencji oraz in situ hybrydyzacji do metod rejestracji aktywności neuronów ex vivo w skrawkach, z wykorzystaniem optogenetyki, metodyki patch-clamp i macierzy elektrod. Sposób opisu metod uważam za optymalny; informacje są skondensowane, ale w większości przypadków zawierają wszystkie istotne szczegóły konieczne do powtórzenia doświadczeń. Jako drobne niedociągnięcia wymieniłbym brak wskazania konkretnych zgód właściwej komisji etycznej przy opisie przygotowania zwierząt doświadczalnych oraz brak wydzielenia metod analizy statystycznej jako osobnego podrozdziału metod (i tu pozwolę sobie dodać, że przy analizie rozkładu testuję się znamienne odstępstwo od normalności, a nie normalny charakter rozkładu). Jeśli dobrze rozumiem, analizy zostały przeprowadzone wyłącznie na samcach szczurów. Zrozumiałym jest, że przy złożoności i skali przeprowadzonych doświadczeń uwzględnienie obu płci mogłoby przekraczać ramy czasowe doktoratu ale pozostaje niepewność, czy badane połączenia mają identyczną funkcjonalną anatomię u samic. Podsumowując, chciałbym pokreślić, że bez względu na drobne uwagi krytyczne zastosowana w pracy metodyka badań jest imponująca, wymaga od eksperymentatora ogromnych umiejętności i wykorzystuje szereg najnowocześniejszych narzędzi służących do analizy aktywności neuronów.

Wyniki pracy przedstawione są na 36 stronach w sposób, który ponownie określiłbym jako zwięzły, ale szczegółowy. Podzielone są na trzy główne części. W pierwszej kolejności przedstawiona jest analiza anatomiczna obecności zakończeń dopaminergicznych w jądrze międzykonarowym, które zgodnie z obserwacją doktorantki pochodzą w przeważającej mierze z brzuszno-pole nakrywki, znajdują się w grzbietowych częściach jądra międzykonarowego i pobudzają aktywność neuronów. Druga część poświęcona jest analizie połączeń między jądrem niepewnym i jądrem międzykonarowym, ich rodzajowi oraz modulacji przez dopaminę. Przy tej części wyników opisane są również połączenia między jądrem niepewnym i brzuszno-pole nakrywki. Ostatnia, trzecia część wyników przedstawia analizę zakończeń katecholaminergicznych w jądrze niepewnym i wskazuje na jądro Darkszewicza jako główne miejsce ich pochodzenia. Wnikliwej analizie poddany jest rodzaj wydzielanych neuroprzebieżników, funkcjonalne znaczenie poszczególnych rodzajów połączeń oraz modulacja szlaków przez receptory dopaminy typu D1 lub D2. W części poświęconej jądrze międzykonarowemu przeprowadzona jest dodatkowo analiza wrażliwości neuronów na działanie nikotyny, która w znacznej mierze pokrywa się podatnością na działanie agonisty receptorów typu D1. Przedstawione wyniki wskazują na dużą złożoność analizowanych połączeń,



przeplatanie się szlaków pobudzających i hamujących, wyraźną rolę dopaminy (lub katecholamin) w pobudzaniu aktywności części neuronów jądra międzykonarowego i mieszane efekty aktywacji receptorów dopaminy D2 na aktywność komórek w jądrze niepewnym.

Wyniki to zdecydowanie robiąca największe wrażenie część pracy, zarówno ze względu na skalę i złożoność przeprowadzonych badań, jak również szczegółową i ostrożną analizę danych. Aby zilustrować ilość przedstawionych danych można wskazać, że większość z 13 rycin ma ponad 10 paneli, a kilka ponad 20 paneli z mikrofotografiami, przebiegami aktywności lub wykresami podsumowującymi. Każda z rycin przedstawia duży zbiór doświadczeń, najczęściej pokazując przykładowe rejestracje/mikrofotografie i podsumowanie w postaci wykresów kołowych lub słupkowych. Uzupełnieniem dla części rycin są tabele, które podsumowują liczbę obserwacji w każdej grupie i podają wyniki analiz statystycznych. Złożoność jest chyba również najistotniejszą słabością jaką wskazałbym w tej części pracy – nie łatwo jest nadążyć za kolejnością przedstawianych danych i śledzić ogólniejszych schemat wyłaniający się z poszczególnych informacji. Ogromnie pomocne były dla mnie schematy pokazane na Rycinach 3, 18 oraz 19 i jak już wcześniej zostało to zaznaczone uważam, że mogły zostać obszerniej wykorzystane w tekście dla łatwiejszego pokazania wzajemnego kontekstu poszczególnych obserwacji. Mam też dwie drobniejsze uwagi względem metodyki analizy wyników. Nie do końca rozumiem, dlaczego Tabela 5 podsumowująca wyniki zliczenia neuronów przygotowana jest inaczej niż Tabela 1. Druga kwestia to analiza znamienności statystycznej pokazana w Tabelach 2 i 6. Liczba przeprowadzonych równoległe porównań jest bardzo duża, co może sugerować potrzebę ostrożności w interpretacji. Bez względu na zastrzeżenia, wszystkie analizy są poprawne, a ogólna interpretacja wyników nie budzi wątpliwości.

Dyskusja rozprawy liczy 14 stron i skupiona jest na zestawieniu uzyskanych wyników ze stanem wiedzy i ostatnimi doniesieniami literaturowymi. Szczególnie umiejętnie przeprowadzone jest to w pierwszej części, gdzie dyskutowane są różnice w uzyskanych wynikach względem postulowanych połączeń (lub ich braku) między brzuszyną polek nakrywki a jądrem międzykonarowym, opisane w trzech niedawnych publikacjach. Ogólnie, znaczny nacisk stawiany jest na dyskusję metodycznych aspektów przeprowadzonych badań (w szczególności elektrofizjologii) oraz na rolę transmisji dopaminergicznej. Bardzo pomocne w podsumowaniu wyników są Ryciny 18 i 19; szkoda że ta druga pojawia się dopiero na końcu tekstu. Podobnie jak Wstęp, Dyskusja pokazuje znajomość tematyki badań oraz wcześniejszych publikacji istotnych dla prowadzonych badań. Dodatkowo, w połączeniu z Metodami potwierdza bardzo dobrą znajomość metodyki badań w obszarze elektrofizjologii. Mam jedynie drobne uwagi względem tego rozdziału; przy wzmiance o sygnale dopaminowym skalowanym do wielkości nagrody warto chyba wskazać też prace Fiorillo i Schultza, nie byłem też pewien w jakim znaczeniu receptory dopaminy typu D2 mogą być „presynaptyczne” przy opisie na 84 stronie.

W odpowiedzi na recenzję prosiłbym o przedyskutowanie następujących kwestii:

1. Duży nacisk w wynikach i dyskusji stawiany jest na zależną od receptorów dopaminy D1 aktywność neuronów, która badana jest z wykorzystaniem agonisty SKF 81,297. Czy można jednoznacznie stwierdzić, że aktywuje on swoiście receptory dopaminy D1?
2. Postuluje się, że transmisja dopaminergiczna jest objętościowa. Zważywszy na względnie niskie powinowactwo dopaminy do receptorów typu D1 może to oznaczać, że aktywowane będą jedynie te znajdujące się w pobliżu zakończeń dopaminergicznych. Czy może to mieć wpływ na



interpretację wyników uzyskanych przy pomocy agonisty o wysokim powinowactwie dodanym do medium na skrawku?

3. Jaki może być potencjalny mechanizm wzrostu aktywności neuronów w jądrze niepewnym po podaniu agonisty receptorów dopaminy typu D2?
4. W rozprawie pojawiają się rozważania wskazujące na noradrenalinę jako ligand dla receptorów dopaminy w jądrze niepewnym. Czy jest możliwym, że neurony posiadające ekspresję beta hydroksylazy dopaminy wydzielają znaczące ilości dopaminy?

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawione w rozprawie przez Pani mgr Agaty Szlagi wyniki są znaczącym wkładem w badania nad działaniem mózgu, a zatem oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Doktorantka jest współautorką ośmiu opublikowanych prac naukowych (w tym w dwóch jest główną autorką), które zawierają znaczną część wyników zaprezentowanych w rozprawie. Praca doktorska prezentuje ogólną i szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr Agaty Szlagi oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stąd też z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Szlagi spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. Z 2018 r. poz.1668 z późn. zm.). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Agaty Szlagi do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

W recenzji zawarłem bardzo wiele uwag krytycznych, ale w żadnej mierze nie umniejszają one znakomitej jakości naukowej przedstawionych wyników. Stąd też, mając na uwadze bardzo dobry dorobek publikacyjny doktorantki potwierdzający wpływ wyników na rozwój dziedziny badań, zwracam się również do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

dr hab. Jan Rodriguez Parkitna

Zastępca Dyrektora ds. Naukowych

Kierownik Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Smętna 12, 31-343 Kraków, tel.: +48 12 6623316, e-mail: janrod@if-pan.krakow.pl