



Kraków, 30 czerwca 2022 roku

Ocena rozprawy doktorskiej mgra Kamila Pradla zatytułowanej
„Innervation of rostromedial tegmental nucleus and midbrain dopaminergic neurons
by deep layers of superior colliculus of the rat – neurophysiology and anatomy”,
Przygotowanej pod opieką dra hab. Tomasza Błasiaka
w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii
w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Rozprawa doktorska Pana mgra Kamila Pradla skupia się na działaniu szlaków przekazywania sygnału łączących znajdujące się w pokrywie śródmózgowia wzgórkę górną z przednim-przyśrodkowym jądrem nakrywki oraz częścią zbitą istoty czarnej i brzuszyną nakrywki. Połączenia te odpowiadają za reakcje na pojawiające się bodźce wzrokowe, przez co odgrywają istotną rolę w zdolności do reagowania na pojawiające się w otoczeniu zdarzenia. Zgodnie z tą ideą, w pracy podkreślone jest znaczenie badanych obwodów dla kontroli działania układu nagrody mózgu oraz połączeń między neuronami dopaminergicznymi istoty czarnej i prążkowiem, które są kluczowe dla motoryki i w szczególności wykonywania sekwencji ruchów. Podjęty w rozprawie temat wpisuje się w nurt intensywnie rozwijanych badań nad mechanizmami kontrolującymi zachowanie i ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia etiopatologii chorób związanych z zaburzeniami transmisji dopaminergicznej. Uważam, że w rozprawie równoległym przedmiotem badań jest wdrożenie zaawansowanej metodyki pozwalającej na jakościowy skok w możliwościach funkcjonalnej analizy działania obwodów neuronalnych. Stąd też podjęta tematyka badań ma podwójne znaczenie dla postępu wiedzy w obszarze neuronauk, co dobitnie potwierdza opublikowanie głównych wyników prezentowanych w pracy w wiodącym czasopiśmie naukowym jakim jest *Journal of Neuroscience*.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 153 strony, została przygotowana w języku angielskim, posiada wymagane streszczenia i jest podzielona na części zgodnie z klasycznym układem na wstęp, metody, wyniki i dyskusję. Rozprawę zamyka spis piśmiennictwa, który zawiera ponad 350 pozycji literaturowych oraz umieszczony na końcu życiorys naukowy doktoranta. Rozprawa jest napisana w sposób zrozumiały, natknąłem się jedynie na pomniejsze potknięcia językowe (np., niewłaściwe użycie przedimków *a* i *the*, „exemplary” w znaczeniu „przykład”, „hemogenetic” zamiast „chemogenetic”, „pow” zamiast „paw”, itd.), które nie miały istotnego znaczenia dla oceny pracy. Przyznaję jednocześnie, że nie czuję się uprawniony do oceny jakości stylistyki tekstu w języku angielskim i stąd też nie zgłaszam uwag w tym zakresie.

Wstęp liczy 30 stron i zawiera podsumowanie badań, które są podstawą wiedzy o działaniu dopaminy w układzie nagrody mózgu oraz anatomii zwojów podstawy mózgu i funkcji połączeń



między wzgórkami górnymi śródmózgowia, przednim-przyśrodkowym jądrem nakrywki oraz neuronami dopaminergicznymi w brzuszynym śródmózgowiu. Ogromne wrażenie zrobiła na mnie pierwsza część wstępu, do której doktorant bardzo zręcznie wprowadził szereg kluczowych prac dla badań nad działaniem dopaminy i układu nagrody mózgu. Pojawia się odwołanie do Pawłowa oraz kluczowych badań behawiorystów, wplecione są prace Carlssona i Hornykiewicza i pokazana została ewolucja poglądów zwieńczona pracami Wolframa Schultza, które są podstawą współczesnego modelu działania dopaminy, ale jednocześnie zwrócona jest uwaga na prace wskazujące na złożoność działania dopaminy, wykraczającą poza sygnał błędu przewidywań. Druga część wstępu jest kompleksowym wprowadzeniem w stan wiedzy względem anatomii połączeń między badanymi obszarami śródmózgowia w oparciu o przegląd stosownych doniesień literatury. Całość wstępu zamyka hipoteza badawcza, zgodnie z którą wzgórki górne posiadają asymetryczne połączenia z przednim-przyśrodkowym jądrem nakrywki oraz brzuszynym polem nakrywki i częścią zbitą istoty czarnej, dzięki czemu mogą aktywować neurony dopaminergiczne zlokalizowane po tej samej stronie co wzgórek i hamować aktywność neuronów dopaminergicznych zlokalizowanych po przeciwnej stronie. Zamknięcie wstępu hipotezą jest bardzo dobrym wprowadzeniem do przeprowadzonych badań i bardzo ułatwia zrozumienie wyboru metodyki oraz kolejności przeprowadzonych badań. Całość wstępu jest bardzo dobrze przygotowana, z obowiązku recenzenta poczynię dwie uwagi. Opis działania układu nagrody oraz anatomii pośrednich i bezpośrednich połączeń tworzonych przez średnie neurony kolczyste prążkowiec jest chyba nadmiernie rozbudowany. Przypuszczam, że intencją było wskazanie znaczenia badań dla zrozumienia działania zwojów podstawy, ale wątki te nie są później szerzej wykorzystane w dyskusji. Druga kwestia to uproszczenia w prezentowaniu stanu wiedzy. Podział na szlaki pośrednie i bezpośrednie dotyczy grzbietowego prążkowiec i jest jedynie częściowo zachowany dla jego brzuszynnej części. Dodatkowo zwracam uwagę, że określenie roli dopaminy w układzie nagrody w kontekście „chcenia” i „lubienia” jest charakterystyczne dla prac Robinsona i Berridge’a, podczas gdy szereg z innych cytowanych autorów tę ideę kontestowało (np. Roy Wise), kontestuje (np. Wolfram Schultz) lub wskazuje na większą złożoność działania układu mezolimbicznego (np. John Salamone). Wskazana jest ostrożność w łączeniu prac różnych grup badawczych w tym kontekście.

Cele pracy wskazane są w pięciu punktach i obejmują anatomiczną i funkcjonalną charakteryzację połączeń między wzgórkami górnymi śródmózgowia, przednim-przyśrodkowym jądrem nakrywki oraz brzuszynym polem nakrywki i częścią zbitą istoty czarnej, ze szczególnym uwzględnieniem lateralizacji połączeń.

Metody przedstawione są w sposób bardzo skondensowany, na zaledwie 16 stronach opisana jest między innymi metodyka wykorzystania w badaniach genetycznie modyfikowanych zwierząt, śledzenia połączeń synaptycznych (następczo i wstępnie), wykorzystanie transdukcji wirusami wyrażającymi rekombinazy lub rodopsyny kanałowe, optogenetyczne pobudzenie neuronów, jedno- i wielokanałowe pomiary aktywności neuronów *in vivo*, analiza aktywności neuronów *ex vivo*. Opisane w pracy połączenie metody jest wybitnym osiągnięciem i samo w sobie wkładem w rozwój



badania, stąd też moim zdaniem powinno być obszerniejsze. Zabrakło mi między innymi szerszego opisu przygotowania genetycznie modyfikowanych zwierząt (np. metody genotypowania), wskazania konkretnych pozwoleń wydanych przez LKE, informacji o tym, czy wirusy były dodatkowo mianowane, czy też wskazania źródła, gdzie znajdują się skrypty MATLAB wykorzystane w analizie danych. Dodatkowo w analizie danych nie do końca zrozumiałym jest dla mnie zastosowanie dwóch różnych metod sprawdzania znamienych odstępstw od rozkładu normalnego oraz nie znalazłem wzmianki o teście Mauchly'ego w analizie wariancji, ale pojawiają się ułamkowe wartości stopni swobody (np. strona 73) więc zgaduję, że w przynajmniej części przypadków modeli z powtórzeniami badana była sferyczność. Pomimo wszelkich zastrzeżeń chciałbym jeszcze raz podkreślić, że zastosowana przed doktoranta metodyka jest zupełnie nową jakością badań i zdecydowanie bardzo mocną stroną rozprawy.

Wyniki rozprawy, podobnie jak metodyka, przedstawione są bardzo zwięźle. Cały rozdział liczy 29 stron, z czego około 13 to ryciny i ich opisy, niemniej ilość zawartych danych jest wprost przytłaczająca. W ogromnym skrócie; wpierw doktorant wpierw wykazał, że wzgórek górny wysyła projekcje do znajdujących się po tej samej stronie brzuszego pola nakrywki i części zbitej istoty czarnej, w ponad połowie przypadków tworząc monosynaptyczne połączenia z neuronami dopaminergicznymi. Następnie wykazał, że boczna część pośredniej warstwy wzgórka wysyła projekcje do znajdującego się po przeciwległej stronie przedniego-przyśrodkowego jądra nakrywki, przede wszystkim do jego tylnej części. Kontynuacją badań anatomicznych było potwierdzenie, że pobudzenie neuronów wzgórka górnego *in vivo* pobudza neurony dopaminergiczne śródmózgowia, a jak wykazała analiza *ex vivo* w efekcie tym zachowana jest lateralizacja połączeń zgodna z obserwacjami anatomicznymi. W dalszych badaniach doktorant wykazał, że pobudzenie wzgórka aktywowało część przedniego-przyśrodkowego jądra nakrywki po obu stronach mózgu, z przewagą neuronów zlokalizowanych przeciwstronnie. W ostatniej części wyników pokazano, że aktywacja neuronów przedniego-przyśrodkowego jądra nakrywki unerwionych przez przeciwstronny wzgórek powodowała z kolei zahamowanie aktywności neuronów dopaminergicznych po tej samej stronie. Zatem przedstawione wyniki potwierdziły postawioną na końcu Wstępu hipotezę i osiągnęły wszystkie wskazane cele. Nie mam żadnych istotnych uwag krytycznych to wyników rozprawy, jedynie drobne komentarze do formy prezentacji na rycinach oraz jedno pytanie. Na rycinach jest bardzo wiele wykresów kołowych, nie jestem pewien czy jest to optymalna forma prezentacji wyników. Część (np. Rycina 7G albo 12D) prawdopodobnie łatwiej byłoby przedstawić w postaci diagramów Venna. Z kolei wykresy dystrybucji komórek (np. Rycina 13Ad) może byłoby czytelniejsze w postaci map gęstości. Mam też pytanie – czy była analizowana aktywność neuronów przedniego-przyśrodkowego jądra nakrywki po obustronnym pobudzeniu wzgórków?

Dyskusja rozprawy skupiona jest na wskazaniu znaczenia uzyskanych wyników w kontekście wiedzy względem działania badanych obszarów śródmózgowia. Podobnie jak w drugiej części Wstępu, bardzo obszernie omawiane jest całe dostępne piśmiennictwo. Wskazywana jest zgodność uzyskanych wyników z wcześniej opisywaną lateralizacją połączeń między wzgórkami i neuronami



dopaminergicznymi. Z drugiej strony, wyniki dotyczące stronności połączeń z przednio-przyśrodkowym jądrem nakrywki są w znacznej mierze nowym odkryciem i znaczącym wkładem w zrozumienie mechanizmów wyzwalających reakcję na bodźce. Nie mam istotnych uwag krytycznych do dyskusji wyników, ale w odpowiedzi na recenzję prosiłbym o rozważenie trzech kwestii. Pierwszą jest swoistość opisanego szlaku przekazywania sygnałów do reakcji na bodźce wzrokowe. Czy anatomia połączeń dla wzgórków dolnych powinna być podobna? Co z innymi rodzajami bodźców? Drugą kwestią jest fakt, że wzgórki jednocześnie unerwiają neurony dopaminergiczne i GABAergiczne części zbitej istoty czarnej i brzuszego pola nakrywki. Jaka jest rola połączeń z neuronami GABAergicznymi? Trzecią kwestią do dyskusji jest znaczenie zmian w aktywności neuronów dopaminergicznych. Zgodnie z tezą zawartą w ostatnim akapicie dyskusji, część autorów wskazuje silną korelację między aktywnością neuronów dopaminergicznych i wydzielaniem dopaminy, niemniej kilka doniesień sugeruje, że kluczowe znaczenie może mieć lokalna regulacja wydzielania dopaminy na poziomie prążkowie. Bardzo prosiłbym o odniesienie się do tych kwestii.

W recenzji przedstawiłem cały szereg uwag krytycznych. Niemniej nie mam wątpliwości, że przedstawione w rozprawie przez Pana mgra Kamila Pradla wyniki są bardzo znaczącym wkładem w badania nad działaniem mózgu, a zatem niewątpliwie są oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Nie mam też wątpliwości, że rozprawa doktorska prezentuje ogólną i szeroką wiedzę teoretyczną Pana mgra Kamila Pradla oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Co więcej- nie waham się napisać, że przedstawiona do oceny rozprawa jest pracą wybitną i całą pewnością zasługuje na wyróżnienie, tym bardziej, że główne wyniki zostały opublikowane w jednym z najlepszych czasopism naukowych z obszaru neuronauki.

Stąd też z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgra Kamila Pradla spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Zwracam się wnioskiem o dopuszczenie Pana mgra Kamila Pradla do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz 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 6623328, e-mail: janrod@if-pan.krakow.pl