

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

**Imię i nazwisko kandydata: KAMIL PRADEL**

**Tytuł rozprawy doktorskiej: Innervation of rostromedial tegmental nucleus and midbrain dopaminergic neurons by deep layers of superior colliculus of the rat – neurophysiology and anatomy**

**Promotor: dr hab. Tomasz Błasiak**

**Recenzentka: dr hab. Ewa Kublik**

**1. Wartość naukowa rozprawy**

*(Oryginalność badań i wartość naukowa rozdziałów/artykówów)*

Bardzo wysoko oceniam oryginalność badań przedstawionej rozprawy. Dotyczy ona sieci połączeń uczestniczących w przekazywaniu informacji zmysłowych do ośrodków dopaminergicznych śródmózgowia (pola brzuszego nakrywki (*ventral tegmental area*, VTA) i części zbitej istoty czarnej (*substantia nigra pars compacta*, SNc)). Komórki dopaminergiczne (DA) tych struktur m.in. regulują aktywność układu ruchowego, w tym także orientacyjne reakcje ruchowe w kierunku istotnych bodźców zmysłowych. Warunkiem takiego ich działania jest dostępność adekwatnych informacji zmysłowych, a także – na co we wstępie zwraca uwagę Doktorant – mechanizm wymuszający zlateralizowanie aktywności wzbudzonej przez jednostronne bodźce. Dotychczasowe dane z literatury wskazywały, że istotnym źródłem informacji zmysłowych dla struktur dopaminergicznych są dolne warstwy wzgórków czworaczych górnych (*superior colliculi*, SC). Przegląd tej literatury sugerował także dominację jednostronnych połączeń z SC do VTA i SNc, nie było jednak konsekwentnych badań weryfikujących i kwantyfikujących te przesłanki. Uzupełnienia tej istotnej luki podjął się Doktorant w ramach przygotowywanej rozprawy. Wykorzystując metody histologiczne wyznakował połączenia aksonalne między badanymi strukturami a dzięki eksperymentom opto-elektrofizjologicznym zweryfikował ich działanie. Warto podkreślić, że poza oczywistymi elementami tej sieci, czyli SNc, VTA i SC, Doktorant zwrócił uwagę na przednio-przyśrodkowe jądro nakrywki (*rostromedial tegmental nucleus*, RMTg) zawierające GABAergiczne komórki, specyficznie hamujące komórki układu dopaminergicznego. Aby odpowiedzieć na postawione pytania zrealizował projekt składający się z czterech eksperymentów anatomicznych i pięciu eksperymentów opto-elektrofizjologicznych.

Istotność zadanych pytań badawczych, metodyczna jakość eksperymentów i wynikająca z tego naukowa wartość uzyskanych wyników jest bardzo wysoka. Część badań, dotycząca funkcjonowania połączeń SC z RMTg, i potwierdzająca ich znaczącą lateralizację, przeszła już przez proces recenzji i została opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie *Journal of Neuroscience*. Zgodnie z deklaracją Doktoranta wyniki pozostałych eksperymentów, charakteryzujących połączenia SC do VTA i SNc, także zostały już przygotowane do publikacji i spodziewam się, że nie będzie problemu z ich przyjęciem do dobrego czasopisma.

## **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):*

Wartość badań jak i przygotowanej rozprawy jest bardzo wysoka. Wstęp szeroko i dogłębnie wprowadza w tematykę badawczą. Starannie zarysowuje zakres dotychczasowej wiedzy i w logiczny sposób wskazuje na luki, które wymagają uzupełnienia. Rozdział ten stanowi bardzo wartościowy materiał przeglądowy i w zasadzie mógłby być jako taki opublikowany; nie mniej cenny byłby gdyby został udostępniony w polskiej wersji językowej.

Część eksperymentalna także bardzo jest bardzo dobra. Badania zrealizowano korzystając z szerokiego wachlarza metod – zarówno sprawdzonych, klasycznych podejść jak i najnowszych osiągnięć inżynierii genetycznej, dopasowanych do kolejnych pytań badawczych. Połączenia neuronalne znakowano wstrzykując barwniki fluorescencyjne i trans-synaptyczne wektory wirusowe. Sygnał elektrofizjologiczny z jądra RMTg rejestrowano 32-kanałowymi sondami krzemowymi, zapewniającymi populacyjny sygnał z wielu komórek i znacznego obszaru tkanki. Do rejestracji i identyfikacji dopaminergicznych komórek w VTA i SNc wykorzystano technikę rejestracji pojedynczych komórek elektrodami szklanymi, zapewniającymi bardzo dobry stosunek sygnału iglicowego do szumu, oraz pozwalającymi na precyzyjne oznakowanie każdego punktu rejestracji. Transfekcja komórek SC wektorami kodującymi pobudzeniowe (depolaryzujące) opsyny i stymulacja laserowa ich zakończeń aksonalnych w VTA i SNc pozwoliła na potwierdzenie wyraźnej przewagi ipsilateralnych połączeń skierowanych na komórki DA (co zostało potwierdzone farmakologicznie). Podwójne iniekcje wektorów cre-zależnych pozwoliły na zidentyfikowanie populacji neuronów w RMTg unerwianych przez przeciwstronny CS i hamujących neurony DA w VTA i SNc. Metody analizy obrazu, danych elektrofizjologicznych i metody statystyczne zostały opisane wyczerpująco i nie budzą zastrzeżeń. Pojedyncze pytania o szczegóły wymienię w dalszej części recenzji.

Dyskusja zaczyna się od przejrzystego podsumowania wyników, następnie wyczerpująco pokazuje w jaki sposób uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia i uzupełniają wiedzę dotychczas niedostępną.

## **3. Poprawność redakcyjna rozprawy**

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

Praca została napisana w języku angielskim, bardzo poprawnie. Zauważyłam nieliczne błędy interpunkcyjne czy pojedyncze brakujące rodzajniki; maść to po angielsku *ointment* nie *balm* (a Tribiotic to maść nie balsam). W pracy są też pojedyncze usterki edytorskie takie jak np. pojedyncze litery (rodzajniki czy spójniki) na końcu linii, niepotrzebnie pogrubiona czcionka (opis panelu B Figury 8.)

Układ pracy jest klasyczny. Po streszczeniu polskim i angielskim dostępna jest lista skrótów, spis treści, typowe główne rozdziały rozprawy i spis publikacji. Dodatkowo na końcu rozprawy Doktorant przygotował „Listę figur i tabel” oraz podsumowanie swojego dotychczasowego dorobku naukowego. Spis tabel i figur w zasadzie nie jest potrzebny – tabela jest jedna a ilustracji 16 i znajdują się one w adekwatnych miejscach tekstu więc nie ma trudności z ich poszukiwaniem.

Bibliografia obejmuje 376 pozycji (podanych alfabetycznie, zgodnie z nazwiskiem pierwszego autora). Są to artykuły zarówno z najnowszej jak i klasycznej literatury. Ta bogata literatura odzwierciedla bardzo szczegółowy Wstęp rozprawy.

Opisowy styl rozprawy bardzo sprawdza się we Wstępie i Dyskusji. Mniej w części dotyczącej wyników – lity tekst wymieniający kolejne wartości liczbowe średnich, ich odchyień i miar istotności statystycznej jest trudny do śledzenia – zdecydowanie lepiej byłoby podawać te dane w formie tabel i/lub wypunktowanych list. W przyswojeniu dużej ilości wyników pomagają krótkie podsumowania podawane na końcu każdego podrozdziału opisującego kolejne eksperymenty.

Ryciny. Z jednej strony muszę przyznać, że są to doskonałej jakości ilustracje zgodne ze stylistyką publikacji w wysoko punktowanych czasopismach. Niestety oznacza to również, że część z nich jest przeładowana – zawierają nawet po kilkanaście malutkich paneli. Tekst rozprawy doktorskiej nie ogranicza liczby figur, więc można było rozdzielić złożone ilustracje na więcej, większych figur co znacznie poprawiałoby ich czytelność. Niektóre istotne elementy są tak małe, że prawie nie do odczytania (np. rozmiar kropeczek na Fig. 3B (dolny panek), linia i wypełnienie kropeczek na Fig. 7I). Opisy figur są także bardzo długie, trudno odnaleźć fragmenty dedykowane poszczególnym panelom, tym bardziej, że w kilku przypadkach (Fig. 3, 7, 10, 13) opisy nie mieszczą się na tej samej stronie co figura. Większość ilustracji znajduje się w rozdziale „Results”. To w nich zostały umieszczone także metodyczne schematy – zdecydowanie wolałabym, aby te były dostępne w rozdziale Metody, przy opisach poszczególnych eksperymentów.

Poza kwestią przeładowania, figury przygotowane były bardzo starannie. Zauważyłam jeden błąd edytorski – legenda kolorów dla paneli C i F na Figurze 7. jest zamieniona – zgodnie z intuicją (i kolejnymi podobnymi rycinami) pobudzenie to kolor czerwony nie niebieski; hamowanie to niebieski nie szary, a brak efektu powinien być szary nie czerwony. Nie jest też jasne do czego odnoszą się pionowo ustawione gwiazdki istotności na wykresach znormalizowanej częstotliwości i zmian częstotliwości (np., Fig. 7E, Fig. 11B).

#### 4. Pytania

Od strony merytorycznej w zasadzie nie mam istotnych uwag krytycznych, a jedynie pytania o dodatkowe wyjaśnienia. Konieczna jest drobna korekta jeśli chodzi o mianownictwo anatomiczne – w języku polskim *superior colliculus* to wzgórek czworaczy górny a nie wzgórek górny (odpowiednio jest też wzgórek czworaczy dolny).

Nie zrozumiałam algorytmu i celu łączenia danych elektrofizjologicznych z różnych systemów rejestrujących (Plexon, CED, Multichannel System) w plikach *smrx*.

Czy jednostronne iniekcje wektorów wirusowych zawsze były po jednej stronie mózgu? I czy rejestracje z VTA, CNc i RMTg były zawsze po jednej stronie? Jeśli tak, to czy nie ma ryzyka, że lateralizacja jest związana z ogólną lateralizacją funkcji ruchowych w mózgu?

W metodzie nie widzę informacji o tym, czy skrawki mózgu po doświadczeniach elektrofizjologicznych z rejestracją z jądra RMTg były barwione przeciwko FoxP1. Były? Istotna część wyników w sekcji 4.2.3 dotyczy rozkładu przestrzennego komórek charakteryzujących się różną odpowiedzią na pobudzenie tożsamo- i przeciwstronnego wzgórka czworaczego górnego. W tym kontekście precyzyjne oznaczenie granic struktury wydaje się bardzo ważne aby wybrać właściwą populację komórek do analizy. Dobrze byłoby mieć na figurze 13, w panelach Ade i Dde wrysowane granice RMTg.

Nie wiem co Doktorant rozumie przez „automated statistical effect detection (details in the 3.5.2. Electrophysiological data analysis section)”? Opis metod statystycznych znajduje się w sekcji 3.5.3 i nie wynika z niego, żeby analiza ta była w jakiś sposób zautomatyzowana.

Na podstawie pokazanych wyników nie jest uprawniona konkluzja, że RMTg jest unerwione głównie przez boczą część przeciwstronnego wzgórka czworacznego bocznego. Zgodnie z Fig. 6A, efektywną ekspresję białka fluorescencyjnego (a zatem także i opsyn) widać jedynie w bocznej części SC – zatem nie wiemy czy unerwienie z części przyśrodkowej nie było by równie silne.

#### 5. Ocena końcowa:

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską pana mgr. Kamila Pradela zarówno w zakresie opisu teoretycznego tła badań jak i jakości przeprowadzonych eksperymentów oraz uzyskanych wyników. Nie mam też zastrzeżeń odnośnie staranności przygotowania tekstu rozprawy.

Ja, niżej podpisana Ewa Kublik stwierdzam bez najmniejszych wątpliwości, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Kamila Pradela 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. Kamila Pradela do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Kamila Pradela. Uważam, że wykazał się głęboką wiedzą teoretyczną i umiał na jej podstawie zadać ważne pytania. Wysokie kompetencje i zaangażowanie pozwoliły mu na przeprowadzenie licznych eksperymentów opartych o złożone metody badawcze. Uzyskał bardzo ciekawe wyniki z których część już opublikował w bardzo dobrym czasopiśmie. Dodam, że rozprawa została przygotowana z dużą starannością a dotychczasowy dorobek także zasługuje na wyróżnienie. Doktorant był kierownikiem dwóch grantów NCN (Preludium i Etiuda) i dwóch grantów z uczelni; jest pierwszym autorem dwóch publikacji i współautorem dwunastu artykułów z pokrewnej tematyki. Siedem razy prezentował wyniki na konferencjach i jest autorem lub współautorem 33 posterów.

08.07.2012

.....  
data sporządzenia recenzji



.....  
podpis recenzenta