

dr hab. Jolanta Orzeł-Gryglewska, prof. UG
Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59, 80-308, Gdańsk
jolanta.orzel-gryglewska@ug.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Walczak
pt. „, NMDA receptor independent, acetylcholine induced bursting activity
of mice midbrain dopaminergic neurons - in vivo electrophysiological
and pharmacological studies”
wykonanej w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod opieką dr hab. Tomasza Błasiaka, prof. UJ**

Komórki dopaminergiczne zlokalizowane w śródmózgowiu (w strukturach brzuszego pola nakrywki, VTA oraz istoty czarnej, SN) stanowią początek układu mezolimbicznego, związanego z nagrodą i motywacją oraz układu nigrostriatalnego, kontrolującego czynności ruchowe. Zróżnicowane tryby wydzielania dopaminy (DA) w strukturach docelowych, decydują o przebiegu oraz efektach ich aktywacji i mają swoje podłoże w różnych wzorcach aktywności elektrycznej neuronów dopaminergicznych, od tonicznych i nieregularnych wyładowań, do fazowej aktywności typu „burst”. Głównymi regulatorami czynności neuronów dopaminergicznych są aferenty pochodzące z pnia mózgu przy czym uważa się, że aktywacja glutaminianergiczna VTA w dużym stopniu podlega bramkowaniu przez pre- i postsynaptyczne receptory cholinergiczne, zaś blokowanie receptorów NMDA znacznie osłabia reakcje cholinergiczne. Większość wiedzy na powyższy temat pochodzi z badań in vitro. Doktorantka w swojej pracy postanowiła więc sprawdzić w badaniach in vivo, czy aktywacja receptorów NMDA jest konieczna do aktywowania wyładowań typu „burst” w dopaminergicznych neuronach śródmózgowia. Cele badawcze Pani mgr Walczak zrealizowała przy użyciu genetycznie zmodyfikowanych myszy z delecją podjednostki NR1 receptorów NMDA występującą specyficznie w neuronach dopaminergicznych. Na zwierzętach w narkozie uretanowej przeprowadziła pozakomórkowe rejestracje aktywności neuronów DA, w połączeniu

z jonoforetyczną domózkową aplikacją środków cholinergicznyc. Uzyskany zapis sygnału elektrycznego przeanalizowała wszechstronnie, opisując poziom i wzory aktywności neuronów DA występujące w różnych warunkach doświadczalnych i poszukując szczególnie wzorców wyładowań typu „burst” pojawiających się po aktywacji cholinergiczn. Przeprowadzając te trudne technicznie eksperymenty oraz dokonując analizy i interpretacji ich wyników, doktorantka dowiodła, że posiada duże kompetencje merytoryczne, jak i umiejętności techniczne. 3

Otrzymane wyniki pokazały, że większość zarejestrowanych neuronów w reakcji na karbachol zwiększyła swoją aktywność. W pewnej populacji neuronów, porównywalnej pod względem wielkości w grupie kontrolnej jak i u myszy zmutowanych wystąpiła wyraźna odpowiedź wykazująca podobieństwo do klasycznych fazowych serii wyładowań opisanych w piśmiennictwie. Selektywna aktywacja receptorów muskarynowych wywoływała również odpowiedzi fazowe, podobne pod względem parametrów do reakcji obserwowanych po karbacholu. Natomiast podanie nikotyny, zwiększało aktywność elektryczną testowanych neuronów DA, ale nie zdołało wywołać fazowych odpowiedzi w żadnej z badanych komórek. Okazuje się więc, że neurony dopaminergiczne mogą zachować zdolność do generowania fazowych serii impulsów pomimo braku podjednostki NR1 w receptorze NMDA, a stymulacja receptorów cholinergicznyc może być wystarczająca do rozwinięcia odpowiedzi typu „burst”. Dane otrzymane przez mgr Magdalenę Walczak są bardzo interesujące zwłaszcza w świetle hipotezy o bramkowaniu przez acetylocholinę transmisji glutaminianergicznyc jako sposobie działania prowadzącym do fazowych wyładowań komórek dopaminergicznyc w VTA.

Rozprawa przedstawiona została w języku angielskim – z wyjaśnienia Autorki wynika, że powodem tego jest uprzednie przygotowanie wszystkich danych w celu publikacji w formie anglojęzycznego artykułu naukowego. Praca zawiera 129 stron numerowanych, 24 ryciny i 33 tabele, a jej układ jest typowy dla prac doświadczalnych. Tekst główny poprzedzony jest streszczeniem i spisem używanych skrótów. Wstęp stanowi 16 stron wprowadzenia do tematu, jest on napisany logicznie, jasno, wyczerpująco i treściwie. Autorka omawia kolejno lokalizację, połączenia i czynność neuronów DA śródmózgowia, oraz opisuje typy ich aktywności elektrycznej. Następnie przedstawia efekty aktywacji cholinergicznyc tych komórek, omawia znaczenie tej aktywacji w czynności VTA,

opisuje cholinergiczne projekcje do VTA i typy receptorów Ach, a na koniec charakteryzuje cechy mutacji indukowanej u zwierząt doświadczalnych w celu uniemożliwienia aktywacji neuronów DA za pomocą receptorów NMDA.

W osobnym rozdziale przedstawiony został cel pracy, który został sformułowany bardzo szczegółowo w postaci wypunktowanej listy, a w zarysie polegał na analizie efektów aplikacji cholinomimetyków do VTA/SN i drobiazgowym opisie parametrów otrzymanych odpowiedzi neuronalnych.

Opis metody zajmuje 7 stron tekstu. Doktorantka w swoich badaniach użyła szeregu nowoczesnych i trudnych metod eksperymentalnych, takich jak operacja stereotaktyczna i mikrojonoforeza połączona z rejestracją sygnału elektrycznego, zastosowała wiarygodną metodę potrójnej identyfikacji komórek DA przeznaczonych do analizy, obejmującej odpowiednie parametry elektrofizjologiczne, prawidłową reakcję na agonistę i antagonistę receptorów D2 oraz weryfikację histologiczną. Przedstawiła także sposób przetwarzania i analizy pozyskanych danych. Natomiast nie znalazłam tu informacji o liczbie użytych do doświadczeń myszy – znajduje się ona dopiero w rozdziale o efektach podawania NMDA, ale nie jest jasne, czy dotyczy wszystkich doświadczeń, czy tylko tej części eksperymentu. Zbyt ogólny jest też opis sposobu podawania stosowanych substancji – ile ich otrzymywało pojedyncze zwierzę i (skoro mikropipety do jonoforezy składały się z 3 lub 4 cylindrów, a aplikowano 5-6 roztworów) jak można mieć pewność, że na badanej komórce sprawdzono działanie całego zestawu środków? Mam również pytanie dotyczące kryterium ustalania dawek oraz niskiego pH roztworów większości substancji użytych w mikrojonoforezie – czy nie zakłócało ono normalnego procesu aktywacji neuronów? Zwłaszcza wyniki uzyskane po podaniu karbacholu (pH 4), nikotyny (pH 7) i oksotremoryny-M (pH 4,1) wydają się trudne do porównania, jeżeli jeden z agonistów wprowadzany jest w innym środowisku niż pozostałe – może właśnie z tego powodu nikotyna nie indukowała polifazowych wyładowań komórek DA?

Na następnych 60 stronach rozprawy w 3 podrozdziałach zostały przedstawione wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Doktorantka otrzymała mnogość danych, które zostały przez nią starannie opracowane. Opis efektów działania każdej z pięciu zastosowanych substancji obejmuje analizę 6 różnych parametrów badanych potencjałów w ramach każdego z 4 typów otrzymanych odpowiedzi. Środki farmakologiczne użyte do jonoforezy zostały dobrane w taki

sposób, aby prześledzić wszystkie warianty aktywowania wybranych komórek oraz ich receptorów. Autorka przeanalizowała również topograficzny rozkład badanych neuronów we wszystkich trzech wymiarach koordynat stereotaktycznych VTA. Obszernie i wyczerpująco napisany rozdział zakończony jest krótkim podsumowaniem najważniejszych wyników. Tekst wzbogacony został wieloma szczegółowymi tabelami średnich parametrów potencjałów mierzonych w doświadczeniu, a także tabelami wartości parametrów analizy statystycznej; stanowią one rodzaj drobiazgowej dokumentacji przeprowadzonych badań. Towarzyszą im znakomite ilustracje, dopracowane, staranne, rozbudowane w formie podpunktów i wstawianych paneli, z wyraźnym przeznaczeniem do wykorzystania w przyszłym artykule. Zauważyłam tu jedynie pomyłkę w numerowaniu rycin – opuszczony został nr 4.13.

Dyskusja wyników poprzedzona jest omówieniem uwarunkowań technicznych eksperymentów i świadczy o dużym rozeznaniu doktorantki w prawidłowym planowaniu przebiegu doświadczeń. Autorka rozważa tu kilka możliwości wystąpienia różnych efektów jonoforetycznie podawanego karbacholu, niespecyficzne wpływy prądu elektrycznego stosowanego w procedurze jonoforezy oraz tłumaczy konieczność zastosowania metod wielostronnej identyfikacji neuronów DA. Właściwa dyskusja zajmuje 7 stron, jest podzielona na 6 podrozdziałów i zawiera ciekawe rozważania dotyczące porównania podobieństw i różnic pomiędzy otrzymaną odpowiedzią fazową a klasycznymi opisami wyładowań typu „burst”. Omówiony został mechanizm odpowiedzi fazowych w badaniach *in vitro* oraz zaprezentowane zostały alternatywne mechanizmy rozwoju fazowych odpowiedzi neuronów dopaminergicznych. Zaobserwowane reakcje na agonistów cholinergicznych zostały porównane z doniesieniami innych autorów. Rozdział kończą rozważania nad konsekwencjami funkcjonalnymi działania acetylocholiny na neurony dopaminergiczne. Dyskusja jest interesująca, sprawnie poprowadzona, świadczy o dużym odczytaniu doktorantki i umiejętności spojrzenia z różnych stron na otrzymane dane oraz zawiera próbę wytłumaczenia niespójności z niektórymi doniesieniami z piśmiennictwa. Natomiast zdecydowanie brakuje mi wyodrębnionego rozdziału „Wnioski”, których trzeba pośrednio domyślać się w tekście dyskusji.

Spis piśmiennictwa obejmuje 146 anglojęzycznych pozycji i zawiera zarówno klasyczne jak i najnowsze doniesienia. Na końcu rozprawy doktorantka umieściła krótki wykaz swoich całkiem sporych osiągnięć naukowych: jest to spis otrzymanych i zrealizowanych grantów, publikacji, wystąpień na konferencjach oraz plakatów.

Przedstawiona rozprawa jest kontynuacją badań pani Magdaleny Walczak wykonanych w ramach pracy mgr, a dotyczących wpływu selektywnego usunięcia podjednostki NR1 receptora NMDA na aktywność elektryczną neuronów dopaminowych śródmózgowia myszy. Wydaje się, że rozdziały nr 4.1 i 4.2 niniejszej rozprawy pokrywają się tematycznie z jej pracą dyplomową, choć zapewne stanowią postęp w stosunku do niej. Jednak treść streszczeń w obu pracach różni się tylko nieznacznie (w streszczeniu pracy doktorskiej zostało dopisane 10 wierszy, stanowiących 20% tekstu), co sugeruje, że doktorantka w pewnym stopniu obniżyła stopień dbałości o szczegóły dopracowania rozprawy, zwłaszcza, że pozostawiła w streszczeniu te same drobne błędy redakcyjne (brak użycia polskich nazw karbacholu i uretanu, 3 literówki). Innym przykładem są edycyjne uchybienia w formatowaniu piśmiennictwa, np: nr 1 i 2 to jedna pozycja (Addy i wsp., 2015) podzielona na 2 akapity; nr 17 – brak części nazwisk autorów; nr 28 – brak stron i woluminu; nr 73 zawiera w sobie 2 pozycje i jest całkowicie niezredagowany. Ponadto, mimo dużej staranności, zdarza się tu brak pełnej jednolitości cytowania (sporadycznie: przestawianie inicjałów z nazwiskami, symbol & wpisany przed ostatnim autorem, wszystkie wyrazy tytułu pisane wielką literą, rok wydania podawany w różnych miejscach/w różnej kolejności, w nawiasie i bez niego).

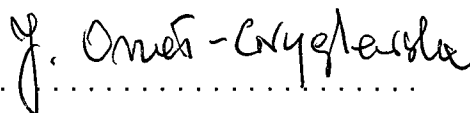
Wszystkie te (stosunkowo drobne) uchybienia zostały wymienione tu z obowiązku recenzenta i nie mają wpływu na ostateczną wysoką ocenę pracy doktorskiej pani mgr Magdaleny Walczak. Przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Pani mgr Walczak posiada umiejętność planowania badań oraz wnikliwej i krytycznej oceny wyników. Badania przeprowadziła na obszernym materiale, stosując złożone metody pozyskiwania i analizy danych. Doktorantka potwierdziła, że potrafi zaplanować ścieżkę badawczą i skrupulatnie realizować poszczególne jej etapy, a przedstawione badania prezentują wysoki poziom naukowy oraz wnoszą nowe i ważne wątki do wiedzy dotyczącej sposobu funkcjonowania śródmózgowiowych

neuronów dopaminergicznych w odpowiedzi na działające na nie neurotransmitery.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Walczak spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz.595 z późniejszymi zmianami – *Dz.U. z 2011, nr 84 poz. 455*).

Doktorantka w swojej rozprawie przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną z zakresu biologii, a także umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


.....

Gdańsk, 22 czerwca 2022 r