



# UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii  
Prof. dr hab. Jerzy Mozrzyk – Kierownik jednostki

23.02.2023

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Szlagi pt. „Elektrofizjologiczne i anatomiczne badania oddziaływań między układem katecholaminowym, jądrem międzikonarowym i jądrem niepewnym szczura”.**

Aby zrozumieć funkcjonowanie mózgu nie wystarczy badać pojedyncze synapsy czy neurony. Nie da się opisać funkcjonowania naszych umysłów bez zgłębienia modus operandi sieci neuronalnych, w których wykrywalizowują się nasze engramy pamięciowe i, ogólnie, procesy myślowe. Sprzeciw wobec takiego redukcjonizmu nieco prowokacyjnie ujął socjolog Tom Kondo (Univ. Sacramento) stwierdzając „What is the mind ? Don't study brain cells to understand it”. Oczywiście chcąc zgłębić tajemnice umysłu trzeba badać neurony ale w wielu różnych skalach od molekularnej do wielkich sieci neuronalnych i to nie tracąc z pola widzenia behawioru. Nie wystarczy również wyspecjalizować się w opisie określonej struktury mózgowej, choćby nie wiadomo jak ważnej, gdyż to, co ostatecznie ujawnia się nam jako świadomy percept przechodzi najczęściej nieświadomie długą drogę poprzez szereg różnych ośrodków mózgowych pozwalających na ekstrakcję najistotniejszych informacji i nadanie im znaczenia emocjonalnego lub poznawczego na przykład czy obserwowany bodziec jest dla podmiotu nowy czy już znany. W taki trend badań nad mózgiem wpisuje się właśnie rozprawa doktorska mgr Agaty Szlagi wykonana pod opieką prof. Anny Błasiak i dotycząca badań nad połączeniami zarówno anatomicznymi jak i funkcjonalnymi między układem katecholaminowym (głównie pole brzusne nakrywki, VTA i istota czarna, substantia nigra, SN), jądrem międzikonarowym (IPN) i jądrem niepewnym (NI) szczura.

Wstęp jest ciekawie skomponowany i zaczyna się od syntetycznego omówienia stanu wiedzy na temat struktur mózgowych odpowiedzialnych za detekcję nowości w różnych kontekstach – m. in. stresu i nagrody. Zwraca tu uwagę fakt bardzo bogatego doboru cytowanej literatury, w tym wielu prac z lat dwudziestych XXI-go wieku. Następnie Autorka przechodzi do zwięzłego omówienia układu dopaminergicznego w tym, głównych struktur mózgowych tego układu, klasyfikacji receptorów dopaminowych i najważniejszych funkcji układu dopaminergicznego. Na tym tle są następnie omówione bardziej szczegółowo trzy struktury: pole brzusne nakrywki (VTA), jądro międzikonarowe (IPN) oraz jądro niepewne (NI). Te stosunkowo niedługie podrozdziały są niezwykle bogate w cenne informacje, które pozwalają w sposób bardzo ciekawy sformułować podejmowany w rozprawie problem. Mowa jest nie tylko na temat lokalizacji tych struktur, ale również projekcji aferentnych i eferentnych i występujących tam typach neuronów oraz ich roli w kontekście analizy nowości, znajomości, nagrody i stresu. Prezentacja badań opierających się o tak wielopłaszczyznowe podstawy począwszy od behawioru a skończywszy na szczegółach

dotyczących właściwości pojedynczych neuronów nie było proste, ale Doktorantka poradziła sobie z tym zadaniem bardzo dobrze.

Bogate, ale też umiejętnie przedstawione informacje we wstępie pozwoliły Autorce sformułować cel swoich badań w sposób bardzo elegancji. W mojej praktyce recenzenckiej nie zawsze było regułą by autor dysertacji sformułował główny cel pracy jako weryfikację explicite określonej hipotezy wiodącej. Świadczy to o dojrzałości naukowej Kandydatki, która doskonale zdaje sobie sprawę, że w badaniach naukowych stawiamy kolejne kroki poprzez weryfikację kolejnych hipotez. Bardzo dobrym pomysłem było schematyczne zaprezentowanie badanych struktur mózgowych w podrozdziale dotyczącym celu badań a następnie zamknięcie dyskusji rozprawy podobnym schematem, który ilustruje w sposób graficzny główne wyniki i wnioski otrzymane w ramach ocenianej dysertacji.

Bardzo dużym atutem rozprawy jest zastosowanie imponującego arsenału zaawansowanych technik eksperymentalnych począwszy od metod morfologicznych w tym wsteczne znakowanie szlaków neuronalnych poszczególnych struktur, wybarwienie immunohistochemiczne, hybrydyzacja in situ oraz techniki pozwalające na ocenę funkcjonalną: patch-clamp oraz optogenetyka. Strategia zastosowania tych technik została dobrze przemyślana i ich użycie faktycznie przełożyło się na uzyskanie bardzo cennych wyników dotyczących określonemu celowi badań. Jedyną metodologiczną wskazówkę, którą polecałbym uwadze na przyszłość to sugestia by zawrzeć w metodologii dotyczącej użycia zwierząt statystyczną analizę mocy (liczby użytych zwierząt). Tego typu analiza jest aktualnie uważana jako bardzo ważna informacja metodologiczna bez której trudno się obyć przy składaniu wniosków o projekty badawcze. Skonfrontowanie tej analizy mocy z faktycznym wykorzystaniem zwierząt stanowiłoby cenną informację w duchu aktualnych standardów wykorzystywania zwierząt w doświadczeniach naukowych. Odnośnie reszty metodologii mam tutaj tylko niewielkie uwagi czy może raczej porady, o których wspomnę w dalszej części recenzji.

Prezentacja wyników rozpoczyna się od zaprezentowania badań z wykorzystaniem znakowania szlaków neuronalnych i oznaczeń immunohistochemicznych wskazujących na to, że neurony dopaminergiczne śródmózgowia są głównym źródłem dopaminy w IPN przy czym neurony dopaminergiczne VTA i SN unerwiają głównie rostralną część jądra IPN. W podrozdziale 8.1.3 Autorka przytacza wyniki pomiarów elektrofizjologicznych, które wskazują na pobudzający efekt aktywacji receptora D1R przez specyficznego agonistę (SKF81297). Autorka w większości pomiarów stosuje stężenie 10  $\mu\text{M}$  tego agonisty, ale porównuje wyniki tych doświadczeń również dla 20 i 100  $\mu\text{M}$ . Brakuje tutaj trochę komentarza odnośnie tak szerokiego zakresu dużych stężeń SKF81297. W doświadczeniach opisywanych w literaturze często stosuje się stężenie 10  $\mu\text{M}$ , choć i tak wydaje się one nadmiarowe (wartość  $K_i$  to 1.9 nM). Czy zastosowanie tak wysokiego stężenia tego agonisty (100  $\mu\text{M}$ ) nie budzi obaw odnośnie jego specyficzności w tych warunkach? W rozdziale tym podana jest zmierzona wartość prądu dokomórkowego (średnia -23,4 pA). Myślę, że bardziej precyzyjną byłaby informacja o gęstości tego prądu (iloraz natężenia i pojemności elektrycznej, która jest proporcjonalna do powierzchni błony). Aby móc ostatecznie sklasyfikować ten prąd jako wyłącznie pobudzający należałoby jeszcze dokonać analizy oporu wejścia (input resistance) albowiem zmniejszenie wartości tego parametru może zmniejszyć pobudliwość nawet jeśli towarzyszy temu prądowi depolaryzacja. Dodatkowe światło na pobudzające działanie agonisty receptora D1R mogłyby rzucić analizy przebiegów napięcia błonowego w opcji current-clamp, które prawdopodobnie są w posiadaniu Autorki. W opisie dokomórkowego prądu wywołanego podaniem SKF81297 stwierdza się, że w dalszym ciągu występuje on w obecności TTX i klasycznych blokerów receptorów glutaminianu i GABA i że jest to zatem prąd postsynaptyczny. Analiza prądów ePSC wykazała, że podanie SKF81297 powoduje spowolnienie narastania (rise time) ePSC. Z

czego to może wynikać? Czy zdaniem Autorki możliwe jest, że aktywacji przewodnictwa skutkującego dokomórkowym prądem towarzyszy zwiększone elektrotoniczne filtrowanie sygnałów synaptycznych szczególnie w bardziej dystalnych częściach drzewa dendrytycznego? Jako elektrofizjolog oczekiwałbym nieco bardziej dogłębnej dyskusji tych wyników, ale na pewno badania te będą kontynuowane i poznamy wtedy jaki jest mechanizm generowania opisanych prądów przy aplikacji SKF81297.

W dalszej części rozprawy Autorka stosuje analogiczne instrumentarium badawcze do opisu projekcji z NI do IPN i stwierdza, że IN unerwia głównie grzbietowo-przyśrodkową część IPN. W tych badaniach zastosowano metodę optogenetyczną wykorzystując skrawki mózgowie zwierząt, które zostały zainfekowane odpowiednim wirusem wywołującym ekspresję channelrodopsyny w neuronach NI. Mam tutaj pytanie techniczne: czy channelrodopsyna, której ekspresja ma miejsce w tym modelu jest przepuszczalna dla jonów wapnia? Jest to ważne szczególnie przy wielokrotnej aktywacji tych kanałów, które w przypadku ich przepuszczalności dla tych jonów mogłyby uruchamiać zmiany plastyczne w komórkach postsynaptycznych, stymulowane sygnałem wapniowym. Badania funkcjonalne dotyczące projekcji NI → IPN są bardzo interesujące. Okazuje się, że aplikacja SKF81297 skutkuje wywołaniem podobnego do wspomnianego wyżej prądu dokomórkowego, ale jednocześnie osłabieniu ulegają GABAergiczne prądy hamujące IPSC. Bardzo jestem ciekaw jaki jest mechanizm tego efektu, ale rozumiem, że dogłębne badania w tym kierunku nie musiały być realizowane w ramach niniejszej rozprawy, która jest i tak bardzo bogata jeśli idzie o wyniki prac eksperymentalnych.

W dalszej kolejności Autorka przedstawia wyniki, które dowodzą, że brzuszna część VTA unerwana jest przez zarówno neurony GABAergiczne i glutaminianergiczne pochodzące z NI.

W ramach badań dotyczących dopaminergicznego sygnałowania w NI, Autorka zaprezentowała w rozdziale 8.5 interesujące i przekonujące wyniki, że w jądrze tym jest ekspresjonowany receptor typu D2R. Co bardzo interesujące, Autorka stwierdziła, że mRNA receptora D2R współwystępuje w neuronach z NI najczęściej wspólnie z innymi markerami synaptycznymi i neuronalnymi takimi jak vGAT1, vGlut2, CCK czy RLN3. Oprócz badań morfologicznych przeprowadzono również studia funkcjonalne z wykorzystaniem techniki patch-clamp w opcji current clamp i wykazano, że podanie quinpirolu, selektywnego agonisty receptorów typu D2R (receptory D2 i D3) powodowało w różnych rejestracjach albo działanie pobudzające (depolaryzacja ponadprogowa) jak i hamujące – przerwanie serii wyładowań potencjałów czynnościowych. Mechanizmy molekularne tych różnych efektów z pewnością będą badane przez grupę prof. Anny Błasiak jako kolejny etap tych rozważań. Dodatkowo zbadano wpływ aktywacji receptora D2R na prądy synaptyczne zarówno GABAergiczne jak i glutaminianergiczne i w neuronach typu I stwierdzono istotne przyspieszenie czasu narastania ePSC. Bardzo byłbym ciekaw jak Autorka interpretuje ten wynik. Mam tutaj problem z Ryc. 17, w której opisie mowa jest o prądach IPSC jak i EPSC, ale w sekcji A widzę tylko prądy GABAergiczne (outward).

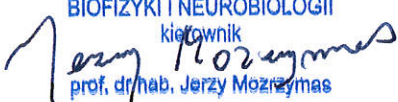
Rozprawę doktorską wieńczy dość obszerna dyskusja. Omówione są kolejne etapy badań pod kątem aktualnego status quo wiedzy w podjętej tematyce. Ze względu na wielość wątków poruszonych w rozprawie rozdział ten jest podzielony na odpowiednie sekcje tematyczne dzięki czemu tą część rozprawy czyta się bardzo dobrze. Ogromna ilość wyników doświadczalnych jest skonfrontowana z bogatym, aktualnym stanem wiedzy literaturowej. Warto tu podkreślić, że Autorka włożyła ogromną pracę nie tylko w otrzymanie tak imponujących wyników, ale również w zapoznanie się z niezwykle obszerną literaturą w podjętej tematyce. Liczba referencji jest 262 przy czym zdecydowana większość tych prac to publikacje z ostatnich 10 lat. Sugeruję by tą wiedzę wykorzystać w postaci prac przeglądowych z tej tematyki. Jak już wspomniałem, dyskusja jest zwieńczona

zaprezentowaniem schematu, który jest odpowiedzią Autorki na główną hipotezę badawczą zaprezentowaną w rozdziale „Cel badań” tej dysertacji. Autorka, w nawiązaniu do głównej hipotezy badawczej, wnioskuje, że układ katecholaminergiczny wraz z IPN i NI tworzą strukturalnie i funkcjonalnie połączoną „pętlę”, która pełni ważną rolę w procesowaniu informacji pod kątem ich nowości. W szczególności, zgadzam się z Autorką, że przedstawione wyniki stanowią ważki argument za tym, że IPN może pełnić rolę swego rodzaju przełącznika, który dokonuje rozpoznania pomiędzy nowością (novelty) a znajomością (familiarity) postrzeganych bodźców.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agaty Szlagi jest bardzo ważkim dokonaniem naukowym i doskonale rokuje jeśli idzie o dalszy rozwój naukowy Autorki. Połączenie wielu wątków spójną całość stosując wiele różnych technik bardzo dobrze świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, ale również o tym, że pod opieką prof. Anny Błasiak znalazła niezwykle stymulujące środowisko do rozwoju swych zainteresowań naukowych. Chociaż niniejsza rozprawa została zaprezentowana w postaci monografii to warto zwrócić również uwagę na to, że Doktorantka jest już współautorem licznych prac badawczych, opublikowanych w liczących się periodykach, w tym w części z nich jako pierwszy autor.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Agaty Szlagi spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca marca 2018 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ust. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Agaty Szlagi do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Mając na uwadze ponadprzeciętny poziom tej rozprawy doktorskiej, doskonale przygotowanie merytoryczne i bogaty warsztat badawczy wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie zarówno recenzowanej rozprawy jak i samej Doktorantki stosowną nagrodą.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Z wydziału Katedra Zakładu  
BIOFIZYKI I NEUROBIOLOGII  
kierownik  
  
prof. dr/hab. Jerzy Mozrzyimas  
Prof. Jerzy Mozrzyimas