



Dr hab. Tomasz Błasiak, prof.UJ

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel. (+48) 604-404-941

e-mail: tomasz.blasiak@uj.edu.pl

Kraków, 10 stycznia 2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. **Joanny Bernackiej**, zatytułowanej:

**„NORADRENERGICZNA REGULACJA UWALNIANIA DOPAMINY W UKŁADZIE MEZOLIMBICZNYM:
MECHANIZMY RECEPTOROWE W POLU BRZUSZNYM NAKRYWKI I ICH MODULACJA PRZEZ STRES”**,

wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk,
pod kierunkiem prof. dr. hab. Ryszarda Przewłockiego i dr. hab. Wojciecha Soleckiego, prof. Uczelni.

Rozprawa doktorska mgr. Joanny Bernackiej dotyczy interesującego i aktualnego zagadnienia z zakresu neurobiologii i medycyny, jakim jest noradrenergiczna regulacja uwalniania dopaminy w układzie mezolimbicznym. W rozprawie, Autorka przedstawia wyniki własnych badań eksperymentalnych, które miały na celu wyjaśnienie mechanizmów receptorowych i wpływu stresu na interakcje pomiędzy układami dopaminergicznym i noradrenergicznym w polu brzusznej nakrywki (VTA; z ang. *ventral tegmental area*), które skutkują zmianami w ilości dopaminy (DA) uwalnianej fazowo w części rdzeniowej jądra półleżącego przegrody (NAcc; z ang. *nucleus accumbens, core*) i ciała migdałowatego części podstawno-bocznej ciała migdałowatego (BLA; z ang. *basolateral amygdala*). Badania przeprowadzone przez mgr. Joannę Bernacką zostały opisane w dwóch włączonych do rozprawy oryginalnych publikacjach naukowych oraz w osobnym rozdziale przedstawiającym dodatkowe, jeszcze nie opublikowane wyniki eksperymentów. Zarówno dołączone publikacje, jak i opis badań dodatkowych, są poprzedzone bardzo rzeczowym wstępem zawierającym teoretyczne przesłanki do zaplanowania przeprowadzonych eksperymentów, po którym następuje zwięzłe zarysowanie głównych celów pracy naukowej Pani Bernackiej. Zarówno w publikacjach badawczych, jak i w rozdziale przedstawiającym badania dodatkowe, Autorka opisuje metodykę badań, przedstawia uzyskane wyniki, przeprowadza ich dyskusję i wyciąga wnioski. Ponadto, wyłaniający się z uzyskanych przez doktorantkę wyników, oraz wcześniejszych obserwacji grupy

badawczej Prof. Przewłockiego i dr. Soleckiego, obraz funkcji dopaminy uwalnianej ze szlaku mezo limbicznego, pod wpływem modulacji receptorów noradrenergicznych, został opisany w publikacji koncepcyjnej, stanowiącej również integralną część recenzowanej rozprawy.

Układ poszczególnych rozdziałów recenzowanej rozprawy doktorskiej jest logiczny i dobrze rozplanowany, dzięki czemu czytelnik w naturalny sposób podąża za jej treścią. Jeśli chciałbym marudzić, to sugerowałbym zamieszczenie publikacji koncepcyjnej na końcu lub nawet zamiast rozdziału ostatniego rozprawy, czyli „Podsumowanie i wnioski”,... ale nie chcę (marudzić 😊). Treść rozprawy doktorskiej, zwłaszcza zawarta we wstępie, w tym również włączonych publikacji, jednoznacznie pokazuje **bardzo dobre przygotowanie merytoryczne doktorantki z zakresu wiedzy medycznej, a w szczególności neurobiologicznej**. Opisane w rozprawie doktorskiej wyniki badań, ich dyskusja oraz opis metodologii prowadzonych obserwacji, pokazują, że **doktorantka jest zdolna do poprawnego prowadzenia eksperymentów i samodzielnego planowania dalszej pracy naukowej**.

Z racji obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić uwagę na pewne aspekty recenzowanej rozprawy doktorskiej, które wskazują obszary, na których Pani mgr. Joanna Bernacka może jeszcze udoskonalić prowadzoną przez siebie działalność naukową i publikacyjną. W pierwszej kolejności zasugerowałbym nieco bardziej ostrożne podejście do interpretacji i tłumaczenia mechanizmu powstawania obserwowanych zjawisk. W szczególności, gdy są one tak zaskakujące, jak to, że, cytuję za jedną z prac włączonych do rozprawy doktorskiej, „[...] podanie wyższej dawki RX-821002 (antagonisty receptorów α_2 -adrenergicznych – *przyp. tłum.*), tj. 13,5 μg , spowodowało niemal całkowite zablokowanie uwalniania DA do BLA” („[...] administration of a higher dose of RX-821002, i.e., 13.5 μg resulted in nearly complete blockade of DA release into the BLA [...]”; Kiełbiński i wsp., 2022). Opis podobnego zjawiska, dotyczącego tym razem uwalniania dopaminy w NAcc, można znaleźć również w jednej z wcześniejszych publikacji, której doktorantka jest współautorem, a na której w dużej mierze oparła Ona planowanie swoich badań opisanych w niniejszej rozprawie (Kiełbiński i wsp., 2019). Reasumując, to co pokazuje Autorka rozprawy wraz ze współautorami wspomnianych powyżej publikacji, to że podanie do brzuszego śródmózgowia antagonisty receptorów α_2 -adrenergicznych (RX-821002), radykalnie niweluje wywołane silnym, elektrycznym drażnieniem brzuszego śródmózgowia uwalnianie DA w NAcc (zmniejszenie o około 90%) i BLA (zmniejszenie o około 85%). Co więcej, na jednym z paneli ryciny 3, znajdującej się w powyżej cytowanej publikacji, został pokazany, jak twierdzą autorzy, reprezentatywny przypadek ilustrujący opisywane zjawisko, na którym widać wywołany podaniem RX-821002 całkowity zanik fazowego uwalniania DA do BLA, a wręcz, choć nie mogę odnaleźć takiego przypadku na panelu „h” wspomnianej ryciny, wydaje się, że po elektrycznym drażnieniu VTA następuje niewielki spadek uwalniania DA poniżej wartości

bazowej. Tak radykalnego spadku uwalniania DA, wywołanego elektrycznym drażnieniem VTA, nie zaobserwowano ani po domiejscowym podaniu idazoxanu - antagonisty receptorów $\alpha 2$ -adrenergicznych, ani BRL-44408 – relatywnie selektywnego antagonisty receptorów $\alpha 2A$ -adrenergicznych. Doktorantka tłumaczy to zjawisko tym, że po zablokowaniu autoreceptorów hamujących $\alpha 2A$ -adrenergicznych w VTA, następuje znaczny wzrost fazowego wyrzutu noradrenaliny z drażnionych elektrycznie noradrenergicznych zakończeń aksonalnych znajdujących się w obrębie tej struktury. To z kolei, jak twierdzi doktorantka, powoduje tak silne zahamowanie neuronów dopaminergicznych wywołane aktywacją znajdujących się w ich błonie autoreceptorów hamujących typu D2. Takie wytłumaczenie wydają się potwierdzać przedstawione w rozprawie wyniki eksperymentów, w których zablokowanie tych receptorów, tj. autoreceptorów D2, znosiło efekt, wywołanego zablokowaniem w VTA receptorów $\alpha 2$ -adrenergicznych, radykalnej redukcji wyrzutu dopaminy w NAcc i BLA w odpowiedzi na elektryczne drażnienie VTA. Postulowany przez doktorantkę mechanizm powstawania opisywanego zjawiska, uwiarygadniają również eksperymenty przeprowadzone na zwierzętach eksponowanych na jednokrotny stresor, jakim była seria czterech szoków elektrycznych. Wszystko to, sądząc po treści pracy koncepcyjnej włączonej w recenzowaną rozprawę, przekonało doktorantkę co do takiego właśnie mechanizmu powstawania obserwowanego zjawiska. Uważam jednak, że krytyczny naukowiec nie powinien tak entuzjastycznie przyjąć, że wywołane przez noradrenalinę działającą na receptory D2, obniżenie pobudliwości neuronów dopaminergicznych jest w stanie przewyciężyć/zablokować bezpośrednio, silne drażnienie elektryczne VTA. Nawet jeśli postulowana aktywacja receptorów D2, wywoływana domniemanym uwolnieniem noradrenaliny, powoduje hyperpolaryzację ciał komórkowych i dendrytów neuronów DA, to przecież, jak pokazują liczne publikacje, drażnienie elektryczne tkanki w pierwszej kolejności aktywuje aksony komórek nerwowych. Zmiany pobudliwości błony w obszarze somatodendrytycznym, nawet jeśli zajdą w wyniku zadziałania postulowanego w rozprawie mechanizmu, to nastąpi to zapewne, gdy wygenerowane w aksonach potencjały czynnościowe będą już propagowały wzdłuż aksonów szlaku mezolimbicznego i mezo-kortykalnego. Zatem należało by się spodziewać, że aktywacja receptorów D2 w obrębie VTA tylko w niewielkim stopniu lub wcale nie wpłynie na wywołane bezpośrednim drażnieniem elektrycznym tej struktury uwalnianie dopaminy z zakończeń szlaku mezolimbicznego, czy też mezo-kortykalnego. Sugerują to również dane literaturowe, pokazujące, że zarówno dosystemowe, jak i domiejskowe podanie do NAcc agonisty receptora D2 wywołuje porównywalną/taką samą redukcję w ilości DA uwalnianej elektryczną stymulacją VTA (Escobar i wsp., 2015). Gdyby na skuteczność elektrycznego drażnienia VTA wpływała lokalna (w obrębie VTA) aktywacja receptorów D2, spodziewałbym się, że autorzy wspomnianej powyżej pracy obserwowali by

silniejszy spadek uwalniania DA w NAc po dosystemowym podaniu agonisty, w porównaniu z podaniem lokalnym (do NAc). Jeśli jednak jest tak, jak postuluje doktorantka, że aktywacja receptorów D2 w obrębie VTA jest w stanie przewyżczyć bezpośrednie drażnienie tego obszaru prądem, to można by w łatwy sposób to zweryfikować podając do VTA agonistę tych receptorów. Dlaczego tego nie zrobiono? Moje wątpliwości, również rozwiązałyby pokazanie, że obserwowane zjawisko zachodzi, gdy wyrzut noradrenaliny w VTA zostanie wywołany aktywacją optogenetyczną jądra sinawego, albo jego aksonów w brzusznej części śródmózgowia. Przeprowadzenie takich eksperymentów pozwoliło by na znacznie zasadniejsze wysnuwanie tak odważnych wniosków, jak te zawarte w recenzowanej rozprawie, a jednocześnie pozwoliłoby zweryfikować obserwacje Park i współpracowników (Park i wsp., 2017) uzyskane przy użyciu mniej selektywnej niż optogenetyka metody aktywacji jądra sinawego. Dziwi mnie zatem, że takie eksperymenty nie zostały jeszcze przeprowadzone w laboratorium, w którym przecież od wielu lat prowadzi się prace na zwierzętach TH-Cre. Jeśli jednak takie badania zostały przeprowadzone w zespole badawczym Prof. Przewłockiego i dr. Soleckiego, ale nie w ramach doktoratu pani Bernackiej, to wspomnienie o uzyskanych wynikach w dyskusji mogłoby być cennym argumentem, mam nadzieję popierającym postulowany w rozprawie mechanizm.

Wobec powyższych kontrowersji, to czego bardzo brakuje mi w rozprawie, to przedyskutowanie, albo choćby zasygnalizowanie, że możliwe są inne mechanizmy powstawania, albo przynajmniej silnej modulacji obserwowanego przez doktorantkę zjawiska. Co więcej, wydaje mi się, że w przypadku zastosowanej w badaniach metodologii, możliwe jest, że obserwowane zjawisko nie musi mieć podłoża receptorowego. Zarówno stres, jak i dosystemowe podanie antagonisty receptorów D2-dopaminergicznych, w istotny sposób, nawet kilkakrotnie, podnosi ilość DA uwalnianej w NAcc elektryczną stymulacją VTA. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w przypadku wysokich częstotliwości stymulacji, jak te użyte w badaniach doktorantki. Czy obserwowane zjawiska mogą, choćby częściowo, wynikać z dużego wzrostu ilości DA fazowo uwalnianej w NAcc stresowanych zwierząt i wynikającej z tego utraty zdolności zastosowanej przez doktorantkę metody, tj. FSCV, do wykrywania zmian w uwalnianiu będącym na tak wysokim poziomie? Ponadto, skuteczność i zasięg zastosowanej w przeprowadzonych badaniach metody drażnienia tkanki nerwowej są zależne od wielu czynników. Może to być szczególnie istotne w przypadku połączonej, elektrycznej i farmakologicznej manipulacji aktywności VTA przy pomocy implantowanego do mózgu zwierząt „zestawu stymulacyjno-iniekcyjnego” - tak jak go sobie wyobrażam, bo ani w opisie badań dodatkowych, ani w opisie metod we włączonych do rozprawy publikacjach, nie został on opisany. Zarówno zasięg, jak i skuteczność stymulacji elektrycznej tkanki nerwowej mogą być zdecydowanie inne po podaniu

między bieguny elektrody stymulacyjnej 0,9% roztworu NaCl (stosowany w opisanych badaniach rozpuszczalnik) w porównaniu z tym, gdy między bieguny elektrody zostanie podane, na przykład 13,5µg cholowodorku RX-821002 rozpuszczonego w 0,9% roztworze NaCl. W drugim przypadku, między bieguny elektrody stymulacyjnej jest wprowadzane około dwukrotnie więcej jonów mogących przenosić ładunek elektryczny. Może to obniżyć opór tkanki znajdującej się pomiędzy biegunami elektrody i osłabić pole elektryczne wokół nich wytwarzane, a tym samym stymulacja elektryczna VTA może skutkować zmniejszonym fazowym uwolnieniem DA. Ponadto, jeśli między biegunami elektrody stymulującej znajdował się koniec kaniuli/rurki poprzez którą były podawane substancje chemiczne, to w zależności od materiału, z którego ta rurka była wykonana (przewodnik?, izolator?) oraz położenia/odległości jej krawędzi od końcówek biegunów stymulujących, mogło to mieć istotny wpływ na przepływ prądu pomiędzy biegunami elektrody. Co więcej, wpływ ten mógł się również zmieniać w zależności od tego czy i jaka substancja wypływała z kaniuli iniekcyjnej, w szczególności jeśli była ona wykonana z metalu. Niestety w rozprawie, w tym również we włączonych do niej publikacjach, brak jakichkolwiek informacji na temat tego jak był skonstruowany i z jakich materiałów wykonany zestaw iniekcynostymulujący (np., wymiary poszczególnych elementów, odległości pomiędzy elementami, itd.).

Podkreślam jednak, że nie ma(m) dowodów na to, że obserwowane zjawiska mają, przynajmniej częściowo, podłoże niereceptorowe. Jest to jednak możliwe i w mojej opinii nie zostało wykluczone w toku badań opisanych w rozprawie doktorskiej, a istnienie mechanizmu przedstawionego w rozprawie, w tym we włączonych w nią publikacjach naukowych, wydaje się być jeszcze dalekie od udowodnienia. Oprócz wspomnianych powyżej sugestii co do tego, jak można by uwiarygodnić i zweryfikować postulowany mechanizm powstawania obserwowanych zjawisk, chciałbym wymienić poniżej nieco mniej istotne uwagi oraz zadać kilka drobnych pytań, które nasunęły mi się podczas czytania rozprawy doktorskiej, w tym włączonych do niej publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych:

- Odnoszę wrażenie, że autorka rozprawy, jak i współautorzy publikacji w nią włączonych, w sposób stroniczy określają/precyzują obszar mózgu poddawany manipulacjom eksperymentalnym. Jest to niestety zjawisko powszechne w literaturze, które wprowadza w błąd środowisko naukowe i jest powodem wielu nieporozumień i błędów pojawiających się, m.in. na etapie planowania eksperymentów i kreślenia koncepcji naukowych. W przypadku pracy doktorskiej Pani Bernackiej, wątpliwe wydaje mi się, czy są podstawy do tak precyzyjnego twierdzenia, że elektryczne drażnienie oraz domiejskowe podania środków neuroaktywnych dotyczyły VTA. Choć w rozprawie, jak już powyżej wspomniałem, brak informacji na temat wymiarów zestawu

stymulacyjno-iniekcyjnego, to mam powody by przypuszczać, że był on duży. Nawet, przy perfekcyjnej, stereotaktycznej implantacji tego zestawu, z pewnością elektryczna stymulacja i podawane substancje chemiczne obejmowały swoim bezpośrednim zasięgiem również przylegające do VTA, a w niektórych przypadkach wręcz współwystępujące w przestrzeni z neuronami VTA populacje neuronalne, zaliczane do innych struktury mózgu, np.: istotę czarną, zarówno część zbitą (grupa A9; zawiera neurony DA), jak i siatkowatą, jądro czerwienne, obszar zaczerwienny (grupa A8; zawiera neurony DA), wstęgę przyśrodkową, pęczek tyłozgięty (silne, glutaminianergiczne wejście pobudzające do VTA), dziobową część przyśrodkowego jądra nakrywki (tzw. ogon VTA; silne, GABA-ergiczne wejście hamujące do VTA), itd. Uważam zatem, że rekonstrukcje położenia miejsc stymulacji/iniekcji, zawarte we włączonych do rozprawy publikacjach, mogą sprawiać błędne wrażenie, że drażnienie elektryczne i manipulacje farmakologiczne dotyczyły wyłącznie VTA. Niestety w tym przeświadczeniu, na każdym kroku utwierdza nas treść rozprawy, w tym włączonych w nią publikacji naukowych.

- Autorka rozprawy, w drugim podrozdziale Dyskusji, proponuje wyjaśnienie obserwowanych różnic pomiędzy wpływem/udziałem układu noradrenergicznego w wydzielaniu DA z zakończeń układu mezolimbicznego i mezokortykalnego. Wyjaśnienie to, w zasadniczy sposób opiera się na występowaniu różnic w mechanizmach błonowych kontrolujących pobudliwość neuronów DA dających początek obu szlakom i konsekwentnie skupia się na zjawiskach zachodzących lokalnie w obrębie VTA. Natomiast, wydaje mi się, że prawdopodobne jest istnienie innych przyczyn powstawania różnic w obserwowanych zjawiskach, niekoniecznie zakładające, że zmiana w pobudliwości neuronów dopaminergicznych jest w stanie tak radykalnie przełożyć się na skuteczność elektrycznego drażnienia obszaru VTA. Stymulacja elektryczna obszaru brzuszno-śródmózgowia, powinna skutkować wywołaniem w zakońzeniach aksonalnych, oraz w przesywających ten obszar aksonach neuronów noradrenergicznych, antydromowych potencjałów czynnościowych. Potencjały te, po dotarciu do rozgałęzień aksonów i/lub ciał komórkowych zwykle powodują powstanie ortodromowych sygnałów, które skutkują „normalnym” uwolnieniem neurotransmitera w strukturach docelowych. W świetle licznych badań (Devoto i wsp, 2006, 2019 i 2020; Hartel i wsp, 1999; Srinivasan i Schmidt, 2004; i.in.) można by się spodziewać, że tym neurotransmiterem w prążkowiu będzie noradrenalina, a w przyśrodkowej korze przedczołowej noradrenalina i dopamina. Zaznaczam, że nie twierdzę, że DA uwalniania w mPFC nie pochodzi, przynajmniej częściowo, również z zakończeń szlaku mezokortykalnego.

- Część stwierdzeń i konkluzji zawartych, m.in. w publikacjach naukowych włączonych w recenzowaną rozprawę doktorską, wydaje mi się dyskusyjna, i skłaniałbym się do uznania ich, co najwyżej, za spekulacje. Oto przykłady:
 - W pierwszej, włączonej do rozprawy publikacji naukowej, w rozdziale „Conclusions”, można przeczytać: „Pokazaliśmy, że w VTA wyrzut NA jest specyficznie kontrolowany przez receptory α 2A-adrenergiczne” (“Here, we have shown that in the VTA, NA efflux is specifically controlled by the α 2A-AR”; Bernacka i wsp., 2022). Wydaje mi się, że aby móc coś takiego stwierdzić niezbędny jest bezpośredni pomiar/obserwacja uwalniania NA, co we wspomnianej pracy nie zostało pokazane. Zatem w mojej opinii jest to spekulacja dotycząca istnienia danego zjawiska. Nie da się ukryć, że gdyby zostało ono wiarygodnie pokazane, mogłoby stanowić sporą wartość dodaną do rozprawy doktorskiej i wzmocniłoby tak silnie promowany w rozprawie mechanizm powstawania obserwowanych zjawisk.
 - W drugiej, włączonej do rozprawy publikacji naukowej można przeczytać: “W celu wywołania uwalniania DA, VTA stymulowano dwufazową falą prostokątną [...] o częstotliwości 60Hz, odpowiadającej aktywności „fazowej”” („For evoking DA release, the VTA was stimulated with a biphasic square waveform [...] with 60 Hz frequency corresponding to “phasic” activity””; Kiełbiński i wsp., 2022). Domyślam się, że chodzi o fazową (erupcyjną, burstującą) aktywność elektryczną neuronów DA. Jeśli tak, to na jakiej podstawie autorzy twierdzą, że taka stymulacja VTA odpowiada fazowej aktywności elektrycznej neuronów DA?
 - W pierwszym podrozdziale ogólnej dyskusji (na stronie 85 rozprawy) można znaleźć stwierdzenie: „[...] zastosowana elektryczna (60 Hz) stymulacja VTA, połączona z blokadą receptorów α 2A-adrenergicznych, prawdopodobnie prowadzi do szybkiego i znaczącego wzrostu uwalnianej noradrenaliny na drodze fazowej aktywności neuronów noradrenergicznych”. Bardzo ciekawi mnie mechanizm poprzez który, w opisanych eksperymentach mogła zostać wywołana fazowa aktywność neuronów adrenergicznych.
[koniec przykładów]
- We wstępie, w paragrafie zaczynającym się na końcu strony 16, Autorka pisze, że pojawienie się „istotnej stymulacji” lub „istotnego bodźca”, wywołuje erupcyjną/napadową/burstującą aktywność elektryczną neuronów dopaminergicznych. To rodzi pytanie, trochę z kategorii „Co było pierwsze – kura czy jajko?”. Czy to nie jest tak, że „istotność” bodźca to etykieta „nadawana” przez aktywność, prawdopodobnie niektórych neuronów dopaminergicznych? Dopiero,

gdy wygenerują one burst potencjałów czynnościowych, który często, choć nie zawsze, powoduje fazowe uwolnienie DA w strukturach docelowych, to bodziec staje się „istotny”?

- Czy rzeczywiście jednym z celów badań było określenie aktywności receptorów noradrenergicznych?
- Końcowe stężenia wprowadzanych do VTA substancji, podane w drugiej publikacji włączonej do rozprawy doktorskiej oraz w opisie badań dodatkowych, są błędne.
- Zgodnie z informacją producenta, największe, stosowane w opisanych badaniach stężenia BRL-44408 (10µg/0,5µl, tj. stężenie 60,36mM) i RX-821002 (13.5µg/µl, tj. stężenie 115.26mM), z uwagi na rozpuszczalność tych substancji w roztworach wodnych, są nieosiągalne.
- W pierwszej, włączonej do rozprawy publikacji naukowej podano, że raklopryd został rozpuszczony w 0,9%, wodnym roztworze NaCl. Zgodnie z informacją producenta, raklopryd jest nierozpuszczalny w wodzie. Czy rzeczywiście udało się doktorantce rozpuścić raklopryd w roztworze wodnym i jak zostało oszacowane/obliczone końcowe stężenie tej substancji w podawanym roztworze? – domyślam się, że nie było ono takie jak podano w publikacji.
- W jakim tempie były podawane substancje?
- Jakim urządzeniem generowano prądowe impulsy stymulujące tkankę nerwową?
- Jakim urządzeniem generowane były impulsy elektryczne podczas stresowania zwierząt?
- Podanie wartości napięcia, które zasilало źródła światła wykorzystywane podczas warunkowania strachu nic nie mówi ani o świetle wychodzącym z jego źródła, ani o świetle docierającym do/w okolice zwierzęcia. Na przykład, 24V żarówka może być źródłem światła zarówno o mocy 10 lumenów, jak i 100 lumenów, co w okolicy zwierzęcia, znajdującego się około 1m od żarówki, będzie dawało natężenie światła odpowiednio około 10 luksów albo 100 luksów [przy założeniu, że światło zostało „doskonale” skupione], czyli natężenia mogące w znacząco różny sposób wpływać na zachowanie zwierzęcia).
- Na figurze nr 3 w drugiej „włączonej” publikacji brakuje skali czasowej.
- Czym znieczulano zwierzęta kończąc badania behawioralne? – podano dawkę, ale nie podano nazwy substancji.
- Jakie było stężenie roztworu Chicago Sky-Blue, podawanego w celu oznaczenia miejsca położenia kaniuli iniekcyjnych?
- Jakie były parametry/model implantowanych w mózгах zwierząt warunkowanych strachem podwójnych kaniul wodzących, a jakie były parametry/model kaniul iniekcyjnych?

- Jakie było natężenie światła w okolicy podłogi testu otwartego pola przy jego ściankach i w rogach? W pracy jest jedynie informacja, że: „środek testu (o średnicy około 28cm) był oświetlony światłem o natężeniu 150 luksów”.
- Jakie były parametry (rozmiar, kształt) strefy centralnej w oparciu o przebywanie, w której szacowano poziom zachowania lękowego?
- System RWD R820 skonfigurowany na rejestrację sygnału z częstotliwością 60FPS, przy wykorzystywaniu 2 kanałów fluorescencyjnych (470nm i 410nm) w rzeczywistości rejestruje sygnał z pojedynczego kanału z częstotliwością 30FPS, czyli fluorescencja emitowana przez sensor DA jest podawana/zapisywana co około 33ms (30FPS), a nie co około 16ms (60FPS). Z tą rozdzielczością czasową (około 33ms) są również wykrywane w tym przypadku sygnały o zdarzeniach zewnętrznych, np. momentach stymulacji elektrycznej, a w przypadku gdy zdarzenie zewnętrzne jest relatywnie długie (> ~33ms) precyzja określenia jego położenia znacznie spada. Domyślam się, że to z tego powodu na rycinie 11 moment stymulacji nie znajduje się w czasie = 0s. Jak został określony rzeczywisty moment stymulacji? Czy strzałka na wykresie pokazuje początek, czy środek stymulacji?

Powyższe uwagi, dotyczące nieco zbyt bezkrytycznego podejścia do interpretacji obserwowanych zjawisk, w połączeniu z pewną niedbałością o precyzję i skrupulatność w opisie przeprowadzonych eksperymentów, nie pozwalają mi uznać recenzowanej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą się. Nie zmienia to jednak faktu, że jest to zdecydowanie dobra rozprawa doktorska, w której zostały opisane i przedyskutowane, choć może nieco zbyt optymistycznie, eksperymenty naukowe stanowiące istotny wkład w trwającą wśród naukowców dyskusję na temat interakcji pomiędzy systemami katecholaminergicznymi mózgowia ssaków. **Zatem, przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską mgr. Joanny Bernackiej oceniam pozytywnie, stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2023, poz. 742) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Joanny Bernackiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.**


T. Błasiak
dr hab. Tomasz Błasiak, prof.UJ

Spis literatury:

Devoto P, Flore G. On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr Neuropharmacol*. 2006 Apr;4(2):115-25.

Devoto P, Flore G, Saba P, Scheggi S, Mulas G, Gambarana C, Spiga S, Gessa GL. Noradrenergic terminals are the primary source of α 2-adrenoceptor mediated dopamine release in the medial prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Mar 2;90:97-103.

Devoto P, Sagheddu C, Santoni M, Flore G, Saba P, Pistis M, Gessa GL. Noradrenergic Source of Dopamine Assessed by Microdialysis in the Medial Prefrontal Cortex. *Front Pharmacol*. 2020 Sep 23;11:588160.

Escobar AP, Cornejo FA, Olivares-Costa M, González M, Fuentealba JA, Gysling K, España RA, Andrés ME. Reduced dopamine and glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens of quinpirole-sensitized rats hints at inhibitory D2 autoreceptor function. *J Neurochem*. 2015 Sep;134(6):1081-90.

Hertel P, Nomikos GG, Svensson TH. Idazoxan preferentially increases dopamine output in the rat medial prefrontal cortex at the nerve terminal level. *Eur J Pharmacol*. 1999 Apr 29;371(2-3):153-8.

Nemets VV, Deal AL, Sobolev VE, Grinevich VP, Gainetdinov RR, Budygin EA. Short-Term Consequences of Single Social Defeat on Accumbal Dopamine and Behaviors in Rats. *Biomolecules*. 2022 Dec 24;13(1):35.

Srinivasan J, Schmidt WJ. The effect of the alpha2-adrenoreceptor antagonist idazoxan against 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: multiple facets of action? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004 Jun;369(6):629-38.

... i oczywiście trzy publikacje naukowe, włączone do recenzowanej rozprawy doktorskiej.