

Toruń 2015, 05,24.

Prof. zw. dr hab. Eugenia Tęgowska
Zakład Toksykologii Zwierząt
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu M. Kopernika Toruń

RECENZJA

Rozprawy pt. „Rola agonistów i antagonistów cholinergicznym receptorów muskarynowych w regulacji procesów fizjologicznych chrząszcza *Tenebrio monitor L*”.
mgra Szymona Chowańskiego w postępowaniu o nadanie stopnia doktora

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja powstała w Katedrze o wieloletnich znakomitych tradycjach badań nad fizjologią owadów, prowadzonych pod kierunkiem Profesora Rosińskiego – nic więc dziwnego, że Doktorant ma dobre przygotowanie merytoryczne, metodyczne i opanowany warsztat badawczy. Bardzo nowoczesne i dobrze wyposażone laboratorium Zakładowe umożliwiło magistrowi Chowańskiemu na przeprowadzenie szerokiego spektrum badań, tak że otrzymane wyniki wzajemnie się uzupełniają i tworzą przekonującą całość opisu regulacji cholinergicznym w organizmie owada. Sam Autor pracy musiał jednak wykazać się zdolnościami eksperymentalnymi, tak dotyczącymi pozyskiwania materiału (preparatów) do przeprowadzenia badań, jak i musiał umieć posługiwać się różnorodnymi technikami badawczymi. W sumie pozwoliło to Mu na osiągnięcie celów postawionych w tej pracy.

Praca jest nowatorska bo choć ogólnie istnieje pewna pula wiadomości o układzie cholinergicznym owadów i jest to nawet wykorzystywane w praktyce (insektycydy), to jednak ze względu na tak obszerne wzbogacenie :

1/ wiedzy podstawowej dotyczącej funkcji tego układu i to właśnie u chrząszczy gdzie braku wiedzy są duże, a grupa ta jest ważna gospodarczo

2/ znaczenie aplikacyjne

praca w pełni spełnia kryteria pracy oryginalnej wnoszącej nowe dane do zasobu dotychczasowej wiedzy.

Wstęp pracy wykazuje szerokie wiadomości mgr-a Szymańskiego na temat pracy układu cholinergicznym u owadów, choć moim zdaniem część dotycząca receptora

nikotynowego jest zbyt rozbudowana, np. bez straty dla meritum pracy można by pominąć opisy struktury podjednostek receptora nikotynowego i to u gatunków dalekich od owadów. Natomiast w części opisującej budowę i pracę receptorów muskarynowych takie wiadomości, jak i porównywanie budowy i funkcji receptorów owadzych nawet do ssaków, są oczywiście potrzebne, podobnie jak wszechstronny opis pleiotropowych funkcji ciała tłuszczowego owadów, jeszcze do niedawna uważanego wyłącznie za rezerwy energetyczne. Zasoby wiadomości zawarte we wstępie wyraźnie świadczą o dobrym przygotowaniu Autora do interpretacji wyników. Chciałaby tylko usłyszeć rozstrzygnięcie przez Autora, który koniec C czy N wiąże agonistę (str 10-ta) w receptorze nikotynowym.

Celem pracy były:

Naczelnym celem pracy było zbadanie udziału muskarynowych receptorów cholinergiczných w regulacji procesów fizjologicznych w wybranych tkankach mącznika.

By zrealizować ten cel Autor, po zidentyfikowaniu obecności receptorów muskarynowych, w poszczególnych tkankach zastosował 2 agonistów (jednego specyficznego dla receptorów muskarynowych, a drugiego niespecyficznego) i 2 antagonistów tego receptora, a następnie obserwował ich oddziaływania na regulację gospodarki węglowodanowej i lipidowej, kurczliwość tkanki mięśniowej i wpływu tych substancji na hemocyty.

Zastosowane metody

Różnorodne, i dostosowane do specyfiki przeprowadzanych analiz. Dla szerszego zbadania funkcji układu cholinergicznego badania zostały przeprowadzone na grupach kilkunasto-osobnikowych wykonanych na postaciach tak larwalnych, poczwarkach jak i na osobnikach dorosłych.

Należy wyraźnie podkreślić, że prace te były możliwe tylko dlatego iż Autor ma dar wykonywania finezyjnych preparatów i to różnorodnych - uwzględniających specyfiki tkankowe – tak by preparaty pozostały reaktywne.

Chciałabym jednak by Doktorant w trakcie obrony pracy przekonał mnie co do wyższości zastosowanej przez Niego anestezji w porównaniu np. do anestezji zimnem. Oczywiście w pełni popieram sam fakt anestezjowania, nawet przy pobieraniu hemolimfy do badań pH, nie mówiąc już o pozyskiwaniu preparatów tkankowych. Jednakże w trakcie naszych badań na karaczanach stwierdziliśmy, że anestezja endogennym dwutlenkiem węgla powoduje kwasicę i to o prawie 0,5 jednostek – co dla wielu enzymów oznacza zmianę środowiska działania wykraczającą poza ich spektrum optimum działania. Nie powoduje tego anestezja zimnem. Jeśli jednak tej wielkości zmiany pH jakie występują przy tej anestezji u karaczana wystąpiły również u mącznika, to czy nie będą one wpływały np. na kurczliwość

mięśni zwłaszcza badaną *In vivo*, albo na gospodarkę cukrową - co przynajmniej u psów wykazano?

Przebieg badań .

Podstawą dla dalszych badań było wykazanie przez Autora obecności receptorów muskarynowych w badanych tkankach.

Dla pozostałych analiz przeprowadzono dwa rodzaje badań: *In vivo* i *In vitro* i tak:

Biotest sercowy wykonano *in vivo* na poczwarkach, natomiast *in vitro* przeprowadzono testy nad kurczliwością serca, jajowodów i jelita na osobnikach dorosłych, ponadto badania nad wpływem testowanych substancji na zawartości lipidów, glikogenu w tkankach oraz cukru i hemocytów w hemolimfie larw.

Badania nad ekspresją receptorów muskarynowych w badanych tkankach wykonano na larwach, poczwarkach i osobnikach dorosłych. O rozległości tych nowatorskich badań jednak dowiadujemy się nie już z opisu metodyki lecz dopiero z wyników, a przecież fakt ten zasługuje na szczególne podkreślenie, skoro mamy okazję poznać zmiany ekspresji w rozwoju ontogenetycznym i jest to badanie unikatowe.

Wyniki przedstawiono tabelarycznie i na rycinach, dobrze uwypuklających osiągnięcia pracy. Wyniki zostały opracowane statystycznie.

Dyskusja

Jest obszerna i zostały w niej omówione osiągnięcia Autora w porównaniu do dotychczasowych zasobów wiedzy, często sprzecznej, lub zróżnicowanej, gdy porównamy wyniki otrzymane z badań przeprowadzonych na różnych gatunkach, lub przeprowadzone z zastosowaniem mniej lub bardziej wybiórczych agonistów czy antagonistów. Potwierdza to, że badania przedstawione w rozprawie są potrzebne a fakt, że również nie wszystkie wyniki otrzymane po zastosowaniu agonisty (zarówno specyficznego jak i częściowo nie specyficznego) i antagonisty przedstawione w tej pracy są przeciwstawne, świadczy tylko o konieczności dalszych badań z bardziej selektywnymi substancjami. Niestety ta dobra rada ma ogromne ograniczenie w postaci różnic w budowie i pracy układu cholinergicznego ssaków i owadów, a agoniści i antagoniści są tworzeni głównie na potrzeby terapii lub badań prowadzonych na ssakach.

Dlatego ponownie stwierdzam wagę wyników z badania ekspresji receptorów w poszczególnych tkankach i w poszczególnych stadiach rozwojowych – które zostały przedstawione w tej pracy i które mogą stanowić niezbędną podstawę do dalszych badań.

Z kolei tylko dzięki temu iż badania nad gospodarką węglowodanowo-lipidową zostały przeprowadzone zarówno metodą *in vivo* jak i *in vitro* pozwoliły Autorowi na

stwierdzeniu o pośrednim wpływie układu cholinergicznego na badane parametry. Świadczy to umiejętnym typowaniu planowanych badań co dobrze rokuje dalszej drodze naukowej doktoranta. Autorowi udało się również wykazać, iż układ cholinergiczny owada jest zaangażowany w kontrolę liczby i aktywności fizjologicznej hemocytów – co jest faktem nowym.

Na koniec Autor przedstawił cztery ogólne wnioski ze swoich badań z których 3: dotyczące oddziaływania agonistów i antagonistów receptorów muskarynowych na kurczliwość narządów trzewnych, ich właściwości metabotropowych i oddziaływania na hemocyty, Autor obszernie omówił w dyskusji, natomiast czuję niedosyt w przedyskutowaniu danych do wniosku – czwartego – omawianego niejako przy okazji innych badań, a moim zdaniem są to wyniki na tyle istotne, że należało je omówić szerzej..

Literatura, z której korzystał mgr Szymański jest dość obszerna, ściśle związana z tematem pracy i złożona głównie z pozycji powstałych w ostatnich latach, z czego połowa po roku 2000, a około 10% to prace z ostatnich 2 lat. Doktorant śledzi więc na bieżąco literaturę związaną z głównym nurtem Jego badań. Dlaczego jednak literatura zaczyna się od pozycji 10-tej?

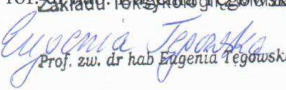
Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam prześledzenie ekspresji receptorów muskarynowych w różnych stadiach rozwojowych i w różnych tkankach *Tenebrio molitor*. Takich badań jak dotąd nie było. Wykazano też wysoce zróżnicowane i plejotropowe działanie tak agonistów jak i antagonistów badanych receptorów.

W moim przekonaniu badania przeprowadzone przez Autora są nowatorskie i osiągnęły wysoki standard naukowy, w pełni więc pozwalają na wyciągnięcie wniosku końcowego:

Wniosek końcowy

Jako recenzentka powyższej rozprawy doktorskiej z głębokim przekonaniem uważam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom kandydatów do uzyskania stopnia naukowego doktora. Tak więc przedłożona do recenzji praca odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 16 ust. 5 Ustawy z dn. 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym z zakresu sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, Dz. U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r., nr 84, poz. 455) i stanowi uzasadnioną podstawę do dopuszczeniu mgr Szymona Chowańskiego do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

24,05,2015 Toruń

Kierownik
Zakładu Toksykologii
Prof. dr hab. 
Prof. zw. dr hab. Eugenia Tęgowaska