

Prof. dr hab. Jan R.E. Taylor
Instytut Biologii Uniwersytetu w Białymstoku
ul. Ciołkowskiego 1J
15-245 Białystok

Ocena pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Kowalskiego
pt. „Different functions and properties of venoms
of the water shrew *Neomys fodiens* and the common toad *Bufo bufo*”

Zwierzęta jadowite, ze zrozumiałych względów, od pradziejów interesowały ludzi. Co ciekawe, już w starożytności uważano, że ślina wszystkich ryjówek jest toksyczna, co na długo przysporzyło im złej sławy. Poznanie naukowe zwierząt jadowitych datuje się jednak od stosunkowo niedawna. Dopiero intensywny rozwój biochemicznych metod umożliwiających szybką ekstrakcję i identyfikację składników jadu dało mocny impuls do badań nad jadami zwierzęcymi, co wzmacniane było możliwością zastosowania wyekstrahowanych substancji w farmakologii.

Dotychczasowe poznanie zwierząt jadowitych w sposób dosyć wybiórczy objęło różne taksony, z naciskiem na jady owadów, pajęczaków, gadów i płazów. Bardzo niewiele wiadomo np. o jadowitych ssakach. Rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Kowalskiego przedstawia nowe i bardzo interesujące wyniki badań nad jadowitymi zwierzętami: ryjówkami i ropuchami. Rozprawa składa się z pięciu opublikowanych prac, z których trzy dotyczą ryjówek, a dwie – ropuch. Wspólny wstęp pozwala szybko zorientować się w zawartości rozprawy i zawiera wszystkie hipotezy testowane w opublikowanych pracach. Mgr. Kowalski jest pierwszym autorem wszystkich pięciu prac, autorem korespondencyjnym czterech z nich, a jego deklarowany wkład w poszczególne publikacje wynosi między 65% a 70%.

Wstępem do prac o jadowitych ssakach jest szczegółowy przegląd literatury na ten temat, opublikowany w czasopiśmie „Kosmos”. Przegląd ten podaje ciekawe informacje, że do jadowitych gatunków należą nie tylko niektóre ryjówkowate oraz dziobak, ale „rozluźnione” kryteria jadowitości spełniają także trzy gatunki wampirów i małpiatki lori. Szczególnie ciekawe jest zwrócenie uwagi na niezwykle różnorodność funkcji jadów produkowanych przez ssaki. Ważną częścią tego przeglądu jest rozdział, który opisuje istniejące już zastosowania jadów ssaków w farmakologii i medycynie. Nie sposób nie zauważyć, że bardzo podobny przegląd pt. „Venomous mammals: A review” został opublikowany sześć lat temu (Ligaube-Braun et al., *Toxicon* 59: 680-695). Nie zmienia to jednak faktu, że polskojęzyczny przegląd ssaków jadowitych, ciekawie napisany, z pewnością spopularyzuje opisywane zagadnienia wśród krajowych czytelników.

Dwie kolejne prace mgr. Krzysztofa Kowalskiego dotyczą ssaków, a konkretnie ryjówek i mają charakter eksperymentalny. Fakt, że niektóre ryjówki są jadowite, został naukowo dowiedziony już w latach 40. – 50. zeszłego wieku. Michalina Pucek odkryła wówczas, że ślina rzęsorka rzeczka ma działanie toksyczne. Od tego czasu poznanie jadowitych właściwości ryjówek, w tym rzęsorka, niewiele się posunęło naprzód. Dopiero prace mgr. Krzysztofa Kowalskiego definitywnie wyjaśniły te właściwości.

W pracy opublikowanej w bardzo dobrym czasopiśmie „Frontiers in Zoology” mgr Kowalski opisał toksyczne działanie jadu obecnego w ślinie rzęsorka rzeczka i po raz pierwszy scharakteryzował składniki jadu o toksycznych właściwościach. W eksperymentach *in vitro* Autor wykazał, że jad zawarty w ślinie rzęsorka powoduje spadek szybkości przewodzenia impulsów nerwowych oraz siły skurczu mięśnia łydkowego żaby. Z drugiej strony, jad ten miał bardzo niewielki wpływ na częstotliwość skurczy serca, czy to chrząszczy mączników, czy żab. Autor wykazał w ten sposób, że jad rzęsorka ma właściwości paralityczne, ale nie kardiainhibycyjne, co potwierdziło hipotezę, iż

jad służy u tego gatunku nie do uśmiercania ofiar, a do ich obezwładniania. Co ciekawe, przeprowadzone przez Autora identyczne eksperymenty przeprowadzone na ryjówce zwyczajnej nie wykazały obecności jadu w jej ślinie. Stąd ważny wniosek, że nie wszystkie ryjówki są jadowite. Warto tu wspomnieć, iż łacińska nazwa ryjówki aksamitnej, *Sorex araneus*, sugeruje, że jadowicie kąsa, podobnie jak pająk (*araneus* po łacinie oznacza pająka). Taki pogląd był przedstawiony w dziele „Historia czworonogów” Edwarda Topsella wydanej w roku 1607. Można więc (z pewnym przymrużeniem oka) stwierdzić, że mgr. Krzysztof Kowalski w sposób naukowy obalił pradawny mit na temat jadowitości tego gatunku. Co jednak najważniejsze, Autor rozdzielił chromatograficznie liczne frakcje białkowe śliny obu gatunków ryjówek, sprawdził ich toksyczne działanie i zidentyfikował wiele substancji białkowych. Była to pierwsza analiza składu śliny rżęsortka i ryjówki aksamitnej. Podobne badania przeprowadzono u ryjówek watach tylko u wspomnianej ryjówki krótkoogonowej. Jedyń minus, jaki znajduję w tej bardzo dobrej pracy, to użycie w eksperymentach żab trawnych i żab z kompleksu żab zielonych, o bardzo odmiennych wymaganiach środowiskowych, a więc możliwe, że i fizjologii, bez informacji, czy wyniki uzyskane z tych żab różniły się.

Logicznym rozwinięciem opisanych badań – stwierdzenia paraliżującego, lecz nie zabijającego działania jadu rżęsortka, było sprawdzenie, czy ryjówki te używają jadu do unieruchomienia dużych ofiar takich jak dżdżownice i żaby (co opisano w pracy opublikowanej w „Journal of Mammalogy”). Autor przewidywał, że małe ofiary będą od razu zjadane, a większe, dzięki unieruchomieniu mogłyby być gromadzone w postaci zapasów. Gromadzenie takich zapasów ofiar obserwowano uprzednio u tego gatunku. W ten sposób właściwości jadu rżęsortków byłyby wykorzystane do zapewnienia sobie magazynu niepsującego się pokarmu. Takie ujęcie tematu jest efektywnym testem teorii optymalnego żerowania, według której drapieżnik maksymalizujący zysk z żerowania, powinien wybierać ofiary o dużej zawartości energii (a więc raczej duże), przy minimalizowaniu czasu potrzebnego na obezwładnienie ofiary. Rżęsortek, z możliwością paraliżowania dużych ofiar, wydawałby się więc idealnym obiektem do testowania teorii optymalnego żerowania, zwłaszcza, że podobnie jak i inne ryjówki, charakteryzuje się on wysokim tempem metabolizmu (dużym zapotrzebowaniem na pokarm) i niewielkimi możliwościami odkładania rezerw tłuszczu. W przeprowadzonym eksperymencie Autor umożliwił rżęsortkom (i ryjówekom aksamitnym jako kontroli) polowanie i gromadzenie ofiar małych (mączniki), średniej wielkości (dżdżownice) i dużych (żaby i ropuchy). Zgodnie z przewidywaniami, małe ofiary były od razu zjadane przez oba gatunki, a ofiary średniej wielkości były unieruchamiane i gromadzone. Rżęsortki zużywały jednak mniej czasu niż ryjówki aksamitne na obezwładnienie ofiary o podobnej masie proporcjonalnie do masy ciała ryjówek i różnica ta rosła wraz ze wzrostem rozmiarów ofiar. Autor wyciągnął z tego wniosek, że za różnicę tę odpowiada jad rżęsortków. Co ciekawe, choć żaby były często atakowane i kęsane przez rżęsortki, nie obserwowano by któraś z nich przejawiała symptomy działania jadu. Autor próbując zinterpretować ten wynik poświęca mu ponad trzy kolumny drobnego druku w dyskusji pracy, by w końcu wyjawić, że kręgowce (więc i żaby) rzadko pojawiają się w diecie rżęsortka i żywi się on przede wszystkim mniejszymi bezkręgowcami. Wydaje mi się, że może to definitywnie wyjaśnić rozważaną kwestię. W tej szczegółowej dyskusji Autor zwraca uwagę na różnorodność w sposobie kęsania ofiar obserwowanej w tej i innych pracach. Nie rozważa jednak możliwości, że rżęsortek umieszczony na otwartej arenie po 5 minutach aklimacji może być na tyle zestresowany, że jego sposób kęsania dużej ofiary jest nieefektywny. Pomijając jednak niejednoznaczność kwestię dużych ofiar, wyniki uzyskane przez Autora w tej pracy są efektywnym testem teorii optymalnego żerowania, potwierdzającym ją w zakresie ofiar małych i średniej wielkości.

W przeciwieństwie do jadów ssaków, wiele uwagi poświęcono dotychczas jadom płazów, żab i ropuch. W wydzielinie gruczołów przyusznych (parotydoów) ropuchy szarej rozpoznano dotąd szereg substancji aktywnych. Bardzo niewiele wiadomo jednak o białkach w tej wydzielinie, które teoretycznie mogą wpływać na działanie innych, znanych już substancji. Tak więc kolejna praca mgr. Krzysztofa Kowalskiego (Comp. Biochem. Physiol. C), w której przedstawił wyniki badań

nad tymi białkami i ich właściwościami otwiera, podobnie jak w wypadku jadu rżesorka, nowe, nieeksplorowane pole. Ponieważ jad ropuchy ma znaczenie obronne, Autor postawił hipotezę, że toksyny ropuchy powinny trwale uszkadzać tkanki drapieżnika (co mogłoby prowadzić do jego śmierci), a nie chwilowo go paraliżować. Ekstrakt z gruczołów powodował istotny wzrost częstotliwości skurczów serca mączników, obniżał częstotliwość skurczów u żaby, co prowadziło do zatrzymania pracy serca. Wyniki te potwierdziły więc postawioną hipotezę. Podobnie jak w pracy o rżesorkach, tak i tu rozdzielono chromatograficznie białkowe frakcje wydzieliny, zidentyfikowano niektóre substancje i wykazano toksyczne działanie niektórych frakcji, co jest najcenniejszą częścią tej publikacji.

Logicznym rozwinięciem tej pracy jest badanie nad behawiorem obronnym ropuchy przed drapieżnikiem i rolą jadu w tej obronie (praca w czasopiśmie „Copeia”). Ropuchy i żaby były konfrontowane z drapieżnikami – jeżami, i z królikami jako zwierzętami kontrolnymi. Autor testował hipotezę, że ropuchy, które są nieruchliwe i mają mniejsze możliwości ucieczki przed drapieżnikiem niż żaby, powinny wykazywać znacznie większy repertuar zachowań obronnych. Autorowi udało się potwierdzić tę hipotezę. Nie zwrócił on jednak uwagi na ciekawy fakt w swoich wynikach. Użył dwóch gatunków żab: trawną i wodną. Trawna żyje w wilgotnych środowiskach lądowych i ma mniejsze możliwości ucieczki przed drapieżnikiem niż żaba wodna, która żyje w zbiornikach wodnych i nurkuje. Żaba trawna wykazywała 6 rodzajów zachowań w obecności drapieżnika (w tym 3 odstraszające), podczas gdy żaba wodna – tylko 3 (i brak zachowań odstraszających). Potwierdza to dobitnie hipotezę Autora, że zachowanie płazów w obecności drapieżcy jest ściśle skorelowane z ich ruchliwością i możliwościami ucieczki.

W pracy tej Autor testował też hipotezę optymalizacji użycia jadu. Ponieważ, jak założył, produkcja jadu jest kosztowna, więc ropucha powinna najpierw wykorzystywać w obronie różne formy zachowania, a w ostatniej kolejności uwalniać jad z parotydy. Okazało się, że ropuchy używały jadu bardzo rzadko, dopiero gdy drapieżnik ścisnął parotydy. Fakt, że do uwolnienia jadu ropuchy potrzebny jest fizyczny kontakt, jest od dawna znany. Hipoteza optymalizacji użycia jadu Wiggera dotyczy oszczędnego użycia jadu w zależności od sytuacji, gdzie ważone są koszt i zyski. Wydaje się, że ropuchy nie są najlepszym obiektem do testowania tej hipotezy, zwłaszcza, że fizyczny kontakt z drapieżnikiem to ostatni etap interakcji. Wcześniejsze wydzielenie jadu byłoby całkowicie bezskuteczne.

W opublikowanych pracach, które przeszły przez sito recenzji, trudno jest znaleźć wiele potknięć. Niektóre uwagi krytyczne podałem już powyżej. W takiej sytuacji zwykle do krytykowania pozostaje statystyka. W pracy z „Journal of Mammalogy” dla testowania różnicy między dwoma gatunkami ryjówek w zależności między czasem potrzebnym na obezwładnienie ofiary a masą ofiary zastosowano GLM (ogólny model liniowy). Dla wykluczenia wpływu masy ciała ryjówek użyto stosunku masy ofiary do masy ryjówek i stosunek ten zlogarytmowano. Nie jest jasne, jak użyto modelu liniowego, skoro zależność między czasem a zlogarytmowanym stosunkiem nie jest liniowa (Fig. 5 w tej pracy). Kontrolowanie wpływu masy ciała poprzez policzenie proporcji nie jest szczęśliwym pomysłem, gdyż proporcje z reguły nie mają rozkładu normalnego, o czym jest duża literatura w czasopismach biologicznych. Należałoby raczej potraktować masę ryjówek jako zmienną współtwarzyszącą w analizie kowariancji. Podoba mi się natomiast potraktowanie rodzaju ofiar w tej analizie jako czynnika losowego, gdyż Autora nie interesuje gatunek ofiary, a tylko jego masa (wybór ten nie jest bynajmniej sprawą trywialną).

Wyjaśnienia w trakcie obrony wymaga także fakt istnienia dwóch prac magisterskich przygotowanych na Wydziale Biologii UAM w roku 2011 [1. Grudzień J., 2011. „Wstępne badania nad składem jadów ropuchy szarej (*Bufo bufo*) i rżesorka rzeczka (*Neomys fodiens*)”; 2. Kubczak M., 2011. „Różnice we właściwościach kardioaktywnych jadów ropuchy szarej (*Bufo bufo*) i rżesorka rzeczka (*Neomys fodiens*)”]. Zakładam, że Autor rozprawy nie korzystał z tych wyników, ale powinny być cytowane w publikacjach, by było jasne, co już było wiadomo, gdy Autor przystępował do swych eksperymentów i analiz.

Na pierwszy rzut oka rozprawa dotyczy bardzo odległych zagadnień, powiązanych tylko hasłem „jady”. Obiektem badań są przecież dwa bardzo odległe filogenetycznie taksony, z których ropuchy mogą być tylko obiadem (ofiara) drapieżcy, a więc stracić życie, a rzęsorki (drapieżniki) mogą co najwyżej stracić obiad. Lektura rozprawy przekonuje jednak, że stanowi ona bardzo spójny zestaw prac. Publikacje dotyczące rzęsorków i ropuch są w pewnym sensie symetryczne. W dwóch pracach Autor badał toksyczne działanie białek i peptydów w jadach obu gatunków. W obu pracach zbadano *in vitro* kardio-, myo- i neurotropowy efekt jadów i niektórych ich frakcji otrzymanych na drodze chromatografii, na te same modelowe organizmy: mączniki i żaby. Zidentyfikowano też niektóre z tych frakcji. Te dwie prace, biochemiczno-fizjologiczne, w których bardzo jasno sprecyzowano hipotezy, dały „niesymetryczne” wyniki. Autor wykazał, że jad rzęsorka ma działanie paraliżujące, ale nie zabijające, a jad ropuchy – odwrotnie: nie paraliżujące, a zabijające. Takie zestawienie ma duży walor poznawczy. Dwie pozostałe prace, jedna o rzęsorkach, druga o ropuchach, są logicznym rozwinięciem tych pierwszych i eksplorują behawioralne aspekty odmiennej jadowitości. Ta spójność jest pierwszym walorem rozprawy, na który chciałbym zwrócić uwagę.

Drugim i znacznie ważniejszym walorem rozprawy jest jej nowatorstwo. Jak wspomniałem, jady ssaków są bardzo mało poznane. Autor po raz pierwszy zbadał skład, a szczegółowo także działanie jadu rzęsorka i ryjówki aksamitnej. U ryjówkowatych podobne analizy przeprowadzono tylko u amerykańskiej ryjówki krótkoogonowej. Autor udowodnił na przykładzie ryjówki aksamitnej, że jadowitość nie jest cechą wszystkich ryjówek. Nowe informacje wnoszą też rozpoznanie białkowych komponentów jadu ropuchy, którym poświęcono dotąd niewiele uwagi. Należy też podkreślić, że w przeciwieństwie do wielu poprzednich autorów, Autor rozprawy nie badał wpływ jadów i ich frakcji na cały organizm, a na konkretne narządy czy tkanki, co umożliwiło lepsze poznanie właściwości komponentów jadów. Znaczące merytorycznie są także dwie prace o charakterze behawioralnym. Szczególnie interesująca jest praca o ryjówkach, która przedstawia test ważnej w biologii teorii optymalnego żerowania i potwierdza ją w przedziale rozmiarów ofiar od małych do średnich. Jak szczegółowo uzasadniłem powyżej, ryjówki są idealnym modelem do testowania tej teorii.

Kolejnym istotnym walorem uzyskanych przez Autora wyników jest potencjalna możliwość zastosowania stwierdzonych w jadach białkowych i polipeptydowych komponentów w farmakologii i medycynie. Choć, jak Autor podkreśla, obecne rozpoznanie tych związków ma charakter wstępny i dalsze badania powinny iść w kierunku dobrego oczyszczenia uzyskanych związków, to już na obecnym etapie był w stanie wskazać, że mogą być one wykorzystane jako blokery nerwowomięśniowe i pracy serca. Trudno sobie wyobrazić pozyskanie tych substancji z śliny i wydzieliny rzadko występujących chronionych gatunków (rzęsorki przy tym jest trudno rozmnażać), ale prawdopodobnie można by je otrzymywać syntetycznie.

Oceniając rozprawę należy też zwrócić uwagę na różnorodność technik opanowanych przez Autora, począwszy od metod terenowych i rygorystycznie prowadzonych obserwacji behawioralnych, do metod zaawansowanej chromatografii i mikrodensytometrycznych pomiarów zmian częstotliwości skurczów serca na pół-izolowanych sercach mączników. W opisanych w publikacjach metodach widoczna jest dbałość o wysokie standardy pracy.

Na koniec warto podkreślić, że część badań, ta dotycząca ryjówek, była finansowana ze zdobytego przez Autora rozprawy grantu „Preludium”.

Biorąc to wszystko pod uwagę, oceniam pracę mgr. Krzysztofa Kowalskiego pt. „Different functions and properties of venoms of the water shrew *Neomys fodiens* and the common toad *Bufo bufo*” jako spełniającą wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym wymienione w Ustawie z 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Z pełnym przekonaniem proszę Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów

przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy. Ponadto, doceniając oryginalność i wysoki poziom naukowy rozprawy, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o jej wyróżnienie.

Białystok, dnia 11 maja 2018.



(prof. dr hab. Jan R.E. Taylor)