

Prof. dr hab. Paweł Miguła
Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pawel.migula@us.edu.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Szymona Chowańskiego:
"Rola agonistów i antagonistów cholinergicznych receptorów
muskarynowych w regulacji procesów fizjologicznych
chrząszcza *Tenebrio molitor* L."**

Ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska daje istotny wkład do zrozumienia oddziaływań czterech substancji biologicznie aktywnych i wykorzystywanych farmaceutycznie agonistów (katechol i pilokarpina) oraz antagonistów (atropina i skopolamin) cholinergicznych receptorów muskarynowych na organizm owada. Gatunkiem wybranym do badań był jeden z częściej wykorzystywanych w badaniach neuroendokrynologicznych – mącznik *Tenebrio molitor*. Praca nie dotyczy więc substancji chemicznych pełniących rolę neuropeptydów, lecz związków, które mogą wiązać się z występującymi także u owadów receptorami muskarynowymi acetylocholiny (ACh). Mogą one w różnym stopniu, zależnym od stężenia, nasilać lub hamować różnorodne procesy fizjologiczne. Autor, w oparciu o dotychczasową wiedzę, założył słusznie możliwość pleiotropowego oddziaływania testowanych związków i zapewne dlatego jego badania objęły szerokie spektrum możliwych oddziaływań tych związków.

Treść pracy odpowiada tytułowi. Autor przeprowadził badania immunocytochemiczne w celu identyfikacji receptorów muskarynowych ACh w różnych stadiach rozwojowych *T. molitor*. Badań tego typu na tym gatunku jeszcze nie prowadzono. Immunocytochemicznie wykazał ich obecność i scharakteryzował masy cząsteczkowe w brzuszny łańcuszek nerwowy i jelicie larw, poczwerek oraz imago, potwierdzając obecność dwóch typów receptorów muskarynowych ACh (A i B). Skoncentrował się głównie na badaniach służących udokumentowaniu możliwego udziału wymienionych wyżej farmaceutyków w procesach regulacyjnych, które dotyczyły:

- motoryki istotnych dla owada narządów wewnętrznych. Dzięki opracowanym przez zespół prof. Grzegorza Rosińskiego nowoczesnym biotestom, stosowanym w laboratorium neuroendokrynologii owadów, doktorant miał możliwość poszukiwania ilościowych zależności, porównywania działań agonistów i antagonistów, poprzez rejestrację aktywności kurczliwej serca, jelita i jajowodu mącznika.
- w badaniach biochemicznych mógł wykazać jak wybrane farmaceutyki wpływają na zawartość podstawowych składników decydujących o sprawności procesów metabolicznych – glikogenu i lipidów w ciele tłuszczowym oraz wolnych cukrów w hemocytach larw mącznika
- ocenił działanie hemocytotropowe testowanych związków analizując ich wpływ na morfologię hemocytów, ich zdolność do adhezji oraz indukowania procesów apoptozy

Wykonanie badań w takim zakresie musiało być poprzedzone żmudnym treningiem metodycznym. Doktorant przede wszystkim musiał opanować umiejętność hodowli owadów, gdyż od ich żywotności zależała jakość i rzetelność uzyskiwanych później wyników. Kolejnym etapem było opanowanie technik preparowania owadów, przygotowując je do pomiarów wykonywanych z wykorzystaniem różnych biotestów. Musiał także opanować techniki immunocytochemiczne i analizy obrazu w doświadczeniach hematologicznych, w tym także posługiwanie się technikami do oceny stopnia apoptozy. W biotestach rejestrujących zmiany motoryki narządów wewnętrznych musiał nabyć umiejętność sprawnego posługiwania się systemem do mikroperfuzji biofarmaceutyków do izolowanych narządów trzewnych; nauczyć się technik opartych o mikrodensytometrię i wykorzystania odpowiedniego oprogramowania do badań kurczliwości różnych narządów trzewnych i mięśni; opanować biotest do badania mechaniki i hemodynamiki izolowanego serca owada oraz innych narządów kurczliwych sprzęgając techniki mikroskopowe, wideo-rejestrację i analizę komputerową obrazu. Ponadto, nauczyć się stosowania techniki optoelektronicznej do rejestracji endogennej aktywności kurczliwej serca owada.

Uwzględniając kompleksowość ujęcia tematycznego nie dziwi recenzenta obszerność rozprawy. Praca zawiera wszystkie niezbędne rozdziały, które są opracowywane w publikacjach przedstawiających wyniki z badań eksperymentalnych. Proporcje poszczególnych rozdziałów są właściwe, poza zbyt rozbudowaną częścią wynikową, którą można było przedstawić w nieco krótszej lecz bardziej przyjaznej dla czytelnika formie. Ze 120 stron tekstu blisko połowę zajmuje opis i dokumentacja wyników, zawierająca aż 56 rycin w tym 2 tablice z 12 fotografiami hemocytów uzyskanych z mikroskopu fluorescencyjnego. Rozszerzony powinien być rozdział „Materiał i metody”, gdyż pozostało w nim nieco niedomówień, kosztem skrócenia objętościowego rozdziału „Wyniki” poprzez przeróbki układu graficznego, ale do tego zagadnienia wrócę w dalszej części oceny.

Praca napisana jest bardzo jasno, z nielicznymi wtrętami żargonowej terminologii, nielicznymi błędami pisowni (najczęściej tzw. „literówki”). Format pracy jest przejrzysty i przyjazny dla czytelnika, poza niepotrzebnie powtarzanymi fragmentami tekstu w podpisach pod rycinami, co można było znacznie uprościć. Rozprawę kończy spis piśmiennictwa obejmujący przeszło 470 pozycji, w którym zdecydowana większość to oryginalne i najnowsze publikacje wykorzystywane głównie we wstępie i dyskusji.

Ocena merytoryczna

Z przyjemnością stwierdziłem, że po uważnym przeczytaniu pracy w zestawie czynionych przeze mnie uwag roboczych nie znalazłem takich, które wskazują na niedociągnięcia merytoryczne. Wyniki przedstawione są rzetelnie a ich krytyczna dyskusja jest klarowna i nie ma w niej wielu takich fragmentów, w których Autor snuje przypuszczenia nie poparte już wynikami badań naukowych opublikowanymi przez innych Autorów, lub wynikami z własnych doświadczeń. Rozprawa doktorska w swoim opisie musi jednak umożliwiać czytelnikowi śledzenie wszelkich jego działań badawczych by analiza dokumentacji wynikowej i jej opis nie budziły wątpliwości. Podobnie jak ich krytyczna analiza w rozdziale „Dyskusja”, oraz wynikające z tego wnioski. Dlatego moje uwagi do rozprawy przedstawię w odniesieniu do poszczególnych jego części.

Wstęp jest solidnym przeglądem aktualnego stanu wiedzy o receptorach acetylocholinowych u ssaków i owadów. Autor omawia aktualny stan wiedzy, dotyczący zarówno nikotynowych jak i muskarynowych receptorów ACh. Ponieważ tematyka pracy doktorskiej dotyczy receptorów muskarynowych we wstępie znalazła się charakterystyka wszystkich 5 klas tych receptorów u ssaków. Omawia także szeroko dwie klasy tych receptorów (A i B) obecnych u owadów, pokazując czytelnikowi zarówno stan wiedzy jak i niewiedzy na ten temat. Tym samym uzasadnia bezpośrednio potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym kierunku. Daje także dobrą charakterystykę farmakologiczną receptorów muskarynowych ACh. Wprowadzając czytelnika ogólnie w zagadnienia regulacji nerwowej i neuroendokrynnej u owadów skupia się przede wszystkim na tych funkcjach, które wymagają pogłębionej wiedzy odnośnie kontroli i regulacji czynności kurczliwej narządów wewnętrznych oraz regulacji poziomu podstawowych składników energetycznych w narządach decydujących o homeostazie przemian metabolicznych. Czytelność opisów wzmacnia tabela, gdzie znaleźć można syntetyczne wskazanie przykładowych białek aktywowanych przez białka G sprzężone z receptorami muskarynowymi (mAChRs). Taka konstrukcja wstępu pozwoliła Doktorantowi na jednoznaczne sprecyzowanie celu nadrzędnego i zadań szczegółowych podejmowanych dla jego realizacji. Pozytywnie odbieram szczegółowość przedstawienia strukturalno-funkcjonalnych zależności w receptorach w oparciu o najnowsze piśmiennictwo.

W odniesieniu do tej części rozprawy moje uwagi są następujące:

str. 9 – w zdaniu: „U zwierząt wyższych dystrybucja acetylocholin w organizmie jest daleko szersza niż tylko ograniczona do układu nerwowego” termin dystrybucja jest mało zrozumiały” Bardziej adekwatny wydaje się termin „rozmieszczenie”. Poza tym, nie znam naukowej definicji dla terminu „zwierzęta wyższe”

str. 10 – sposób cytowania i cytowane prace. Pojawiają się w pracy (na szczęście rzadko) cytowania podręczników lub monografii, gdzie cytowany jest edytor lub Autor podręcznika, czego w rozprawie naukowej powinno się unikać. W tym przypadku w ostatnim zdaniu tej strony cytowany jest podręcznik Nation (2002), w którym odpowiedni tekst zaczerpnięto z rozdziału Breer et al., 1987 innej książki (*Molecular entomology*) edytowanej przez A.R. Lissa.

Proponuję, by w przypadku cytowania do konkretnego fragmentu tekstu więcej jak jednej publikacji stosować kolejność chronologiczną, zamiast kolejności alfabetycznej według nazwiska

pierwszego autora danej pracy. Nadmieniam jednak, że w rozprawie nie pojawiało się równocześnie więcej jak trzy cytacje na poparcie jakiegoś stwierdzenia, zaś w znakomitej większości przypadków cytacja jest adekwatna do związanej z nią treści przytaczanej przez Doktoranta.

str. 27-28 – omawiając inaktywację receptorów mAChRs typu A w obecności klasycznych antagonistów, takich jak: atropina, skopolamina czy chinoklidynobenzylan i wspominając niewrażliwość mAChRs typu B na te związki Autor przytacza w Tabeli 2. wartości EC50 wyznaczone dla obu typów receptorów. Należało wyjaśnić co oznacza ten wskaźnik i jak się go wyznacza. Dopiero w części wynikowej, kiedy Autor sam posługuje się tym wskaźnikiem podaje, że jest to wartość odnosząca się do maksymalnej zmiany mierzonego parametru.

str. 29 – czy cytacje: Roller i wsp., 2010 i Zitnan i wsp., 1996 odnoszą się do całego akapitu czy do ostatniego zdania?

str. 30 – niektóre cytowania są zbędne. To co napisał Autor w pierwszym akapicie nie wymaga cytowania. Czytelnik może to odebrać tak że dopiero w 2000 roku wykazano iż naczynie grzbietowe jest głównym naczyniem pulsującym owadów. Cytowane prace dostarczają szczegółowych danych o których doktorant już niczego nie napisał, np. publikacja da Silva et al. (2011). Podobna uwaga dotyczy też czterech cytacji z lat 1997-2011. Poniżej, cytowany jest m.in. Miller, 1997. Ten sam Autor pisał już o tym samym dużo wcześniej, bo w 1985 r. (rozdział w 3 tomie z 13-tomowego dzieła red. Kerkut i Gilbert, *Comprehensive Insect Physiology...*, Pergamon Press).

str. 30 – zwracam uwagę na dwuznaczność użytego sformułowania: „Wyniki uzyskane przez Zornik i wsp. (1999) potwierdzają obserwacje Johnsona i wsp. (1997)..” a więc kto kogo sprawdzał?

str. 31 – Autor pisze, „Jednakże hemocyty nie pełnią tylko funkcji odpornościowych”. Warto uzupełnić to zdanie o informację w jakich fazach rozwoju owada takie zmiany następowały. Dzieje się to podczas linienia. Zhai i Zhao (2012) badali bowiem zmiany zachodzące między przedostatnim i ostatnim stadium larwalnym, kiedy apoptoza makrogranulocytów prowadziła do uwolnienia katepsyny.

We wstępie brakowało mi jasnego odniesienia się do potrzeby przeprowadzenia badań immunocytochemicznych, w celu identyfikacji występowania receptorów muskarynowych ACh w narządach *T. molitor*.

Cel pracy jest przedstawiony jasno i wystarczająco uzasadniony. Towarzyszą mu wyodrębnione zadania szczegółowe, które wyznaczają pewien schemat postępowania i odpowiednie przygotowanie opisu stosowanych metod oraz dobór niezbędnych biotestów. Niezależnie od wyznaczenia zadań badawczych, można było także nakreślić cele szczegółowe. Ułatwiłoby to Autorowi przeprowadzenie dyskusji i przygotowanie końcowych wniosków z pracy. Jako pierwszy z celów szczegółowych powinna się znaleźć identyfikacja, lokalizacja i specyfika receptorów muskarynowych w narządach *T. molitor*. Odpowiednio w kolejnych rozdziałach te zagadnienia należałoby wtedy omawiać jako pierwsze, gdyż stanowią one bazę wyjściową do dalszego poszukiwania odpowiedzi jak oddziałują wybrane substancje chemiczne na kurczliwość mięśniówki narządów wewnętrznych, na hemocyty oraz gospodarowanie substratami energetycznymi przez owada.

Rozdział „Materiał i metody” napisany jest w sposób zwarty. Obejmuje wszystkie niezbędne elementy, dotyczące hodowli owadów, preparatyki owadów w sposób wymagany dla określonego biotestu, metod oznaczania składników budulcowych ciała, analiz chemometrycznych i postępowania w analizach immunocytochemicznych. Podano również sposób opracowania statystycznego wyników.

Dla pełnego zrozumienia postępowania w trakcie wykonywania oznaczeń brakowało mi w niektórych miejscach dodatkowych wyjaśnień, które chętnie widziałbym w tekście rozprawy:

str. 39 – ponieważ opis metody hodowli *T. molitor* ma już „swoje lata” (1979 r.) należało podać nieco więcej szczegółów, takich jak np. wielkość pojemników, przybliżoną liczbę osobników w pojemniku, częstotliwość wymiany pokarmu itp.

str. 40 – w odniesieniu do wybranych do analiz agonistów i antagonistów mAChRs Autor ograniczył się tylko do pokazania ich wzorów strukturalnych. Należało podać nieco więcej informacji o każdym z wybranych związków, gdyż nie są to jedyni agoniści i antagoniści receptorów muskarynowych ACh. Dodatkowe wiadomości na ten temat pojawiają się dopiero w dyskusji.

str. 41 – w podpisie do Ryc. 1 Autor wzmiankuje, że karbachol jest także agonistą nAChRS, ale nie podaje czy dotyczy to tylko ssaków, owadów, czy obu grup zwierząt?

str. 41-42 – brak uzasadnienia dlaczego wybierano do iniekcji wybrane związki w stężeniu 10-4 lub 10-8 M. Jest na to miejsce w „Materiały i metody.” lub w „Dyskusji”. Podobnie, dlaczego w mikroperfuzji przepływ utrzymywano na poziomie 140 μ l/min.

str. 43 – brakuje cytowań Autorów odnoszących się do opracowania metod wypracowanych w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt UAM w Poznaniu. Należało podać więcej szczegółów dotyczących zastosowanego drivera a także przenieść informację dotyczącą programu LARVA i ANALIZA z sekcji 3.6 do sekcji 3.5.

str. 44 – ze schematu pokazanego na Ryc. 2 nie wynika jednoznacznie, czy po końcowym płukaniu powtarzano pomiar na tym samym preparacie. Nie podano jaki jest optymalny i maksymalny czas potrzebny do stabilizacji efektu dla agonisty lub antagonisty?

str. 45 – często mieszane są w tekście terminy „tkanki” i „narządy”. Doktorant pracował głównie analizując procesy w narządach. Czytelnikowi należy się również wyjaśnienie co to są „białe larwy”,

str. 46 – termin: „Całkowity wolny cukier” warto zamienić np. na „całkowita pula wolnych cukrów”; najczęściej jest to glukoza, fruktoza i inne rozpuszczalne cukry proste. (*total free carbohydrates*)

str. 47 – tytuł sekcji „Oznaczanie zawartości lipidu całkowitego w tkance ciała tłuszczowego” lepiej brzmi jako: „Oznaczanie całkowitej puli lipidów w ciele tłuszczowym” (*total lipids*)

str. 48 – należało rozszyfrować skrót : SR-VAD-FMK – nie każdy musi wiedzieć, że nazwa dotyczy skoniugowanego fluorochromu – inhibitora kaspaz o nazwie „sulforhodamine-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone”. Najlepiej dodać ten skrót do listy stosowanych skrótów

str. 50 – analiza statystyczna – Autor pisze, że wyniki podaje jako wartości średnie $\pm$ SEM z określonej liczby powtórzeń (n), podczas gdy na wykresach dla większości wyników podaje wartość 1 odchylenia standardowego. Nie wyjaśnił dlaczego stosował tylko test T Studenta, tym bardziej, że często zestawiane są wyniki z przynajmniej trzech grup: traktowanej samym buforem

lub analizowanego agonisty lub antagonisty. W innym przypadku są to dane dla 2 odcinków czasowych 2h i 22h jako średnie $\pm$ SEM z określonej liczby powtórzeń (n), albo na osi odciętych znajdują się wartości pomiarów analizowanego parametru w odniesieniu do serii stosowanych stężeń. Warto uporządkować te opisy, przynajmniej w wersjach przygotowywanych do druku.

Omówienie wyników badań własnych jest poprawne i przedstawione w formie wydzielonych siedmiu podrozdziałów. W pięciu z nich omówione są odrębnie wyniki badań z biotestów *in vivo* i *in vitro*. W tym przypadku Doktorant zastosował uporządkowaną prezentację wyników, typową dla każdego z biotestów udokumentowaną przez program graficzny na wykresach szczegółowych oraz przykładową wizualizacją rejestrowanych zmian analizowanego parametru zachodzących w różnym czasie po iniekcji farmaceutyku (głównie po 2h i 22 h). Jest to np. aktywność kurczliwa serca, jelita lub jajowodu. Morfologię i żywotność hemocytów omówił w oparciu o badania 5-dniowych larw mącznika, które iniekował badanymi związkami w 2 stężeniach a następnie analizował takie parametry, jak morfologia hemocytów, zdolność do adhezji i zmiany apoptotyczne. Wizualizację umożliwiło równoczesne zastosowanie trzech fluorochromów zaś uzyskane wyniki udokumentował na dwóch planszach z dobrej jakości fotogramami krwinek. Wyniki badań immunodetekcji cholinergicznym receptorów muskarynowych opracował wykorzystując ludzkie przeciwciała mAChRs klasy M2 w brzusznej łańcuszku nerwowym larwy i poczwarki oraz klasy M4 w jelicie poczwarki i imago *T. molitor*. Dla jelita larwy nie udało się Autorowi uzyskać pozytywnego wyniku, być może powodem tego były niewłaściwie dobrane przeciwciała.

Rozdział „Wyniki” bazuje na krótkich opisach, którym towarzyszą liczne wykresy. Są one cytowane w sposób nieciągły, czego np. nie tolerują wydawnictwa naukowe. Dlatego dla zachowania poprawności sugeruję kumulację części wykresów. W opinii recenzenta takie działanie jest sensowne także ze względu na łatwiejszą obserwację zmian danych parametrów opisywanych w tekście.

Str. 52 – końcowe zdanie powinno znaleźć się w dyskusji, gdyż Autor interpretuje a nie omawia wyniki. Dotyczy to również fragmentu wypowiedzi ze str. 77.

Str. 53 – Rys. 3. – proszę o wyjaśnienie, czy w fazie diastazy skurcze są minimalne, czy nie występują, czy obraz w tej fazie rejestruje minimalne zapisy skurczów czy są to artefakty?

str. 54 – (i dalsze) – jako przykładowe proponuję zmiany w prezentowanej dokumentacji graficznej. Można połączyć ryciny 4, 7, 10 i 13 na nowej rycinie 4 w której powinien znaleźć się wykres jednej kontroli z RF (gdyż się powtarza) oraz 4 przykładowe wykresy z zapisami działania odpowiednio katecholu, pilokarpiny, atropiny i skopolaminy. Wyjaśnienie w podpisie ani numeracja lub oznaczenie literą poszczególnych wykresów będzie zbędne, gdyż nazwa związku będzie podana tak jak zrobił to Autor na wykresie. Uniknie się w ten sposób powoływania się w jednym miejscu na rycinę o różnych numeracjach, gdyż nie jest prawidłowe i na pewno tak nie może być przygotowywane w pracach składanych do druku. Zasadą jest, że ryciny się cytują a nie pisze wprost co ona zawiera. Od tego są przecież podpisy objaśniające. Należy więc unikać takich zdań w tekście jak np. „Na rycinach 16, 19, 22 i 25 zamieszczono przykładowe miokardiogramy przedstawiające aktywność kurczliwą serca *in vitro* przed (kontrola) i po (test) aplikacji testowanych substancji farmakologicznych” (str. 58).

str. 54 – (i dalsze) - proponuje również łączenie innych wykresów, które przykładowo analizuję na podstawie Ryc. 4 i 5, prezentujących zmiany w czasie kurczliwości serca w fazie orto- i antydromowej. Skróci się wykres o wspólną legendę i jeden tytuł, zaś czytelnikowi ułatwi śledzenie ewentualnych różnic. W podpisach rycin nie powinno się umieszczać tekstów, które go nie dotyczą (np. o oznakowaniu gwiazdkami istotnych różnic (Ryc. 5), gdy ich nie było. Skumulowanie obu wykresów takie niedogodności zlikwiduje. Należy również wyraźnie zaznaczyć jakie grupy są ze sobą porównywane statystycznie pod względem istotności różnic (jest to uwaga ogólna, która dotyczy także innych par wykresów).

str. 60 – Na wszystkich wykresach, (np. Ryc. 17, 18, 20, 21 i dalsze), w których na osie X oznaczają stężenie, analizowano oddzielne kohorty, a więc nie można takich danych łączyć jedną linią. Powinien to być wykres typu „box and whisker plot”.

str. 61 – Ryc. 21. Pytanie: Czy dla wszystkich analizowanych stężeń zmiana amplitudy była identyczna?

str. 65 – Pytanie: jak wyliczono stężenie $1,25 \times 10^{-6} \text{ M}$ jako EC_{50} ? Jaki zakres Autor uznaje za stężenie farmakologiczne (dla kogo?) i na jakiej podstawie?

str. 66 – Podpis do Ryc. 29: średnia $\pm \text{SEM}$ czy średnia $\pm \text{SD}$?

str. 77 – Autor pisze: „Indukowała ona w tej tkance niewielki wzrost ilości glikogenu o 15 i 7%, odpowiednio po 2 i 24 h od iniekcji w porównaniu do kontroli (Ryc. 44 i 45). Nie są to zmiany statystycznie istotne, a więc nie była to indukcja.

Autor pisze: „skopolamina, tak jak atropina, wywołuje niewielki wzrost zawartości glikogenu (36%) w ciele tłuszczowym po 2 h od iniekcji – pytanie: kiedy Autor uzna, że wzrost przestanie być „niewielki”, ważniejsze jest jaki był poziom istotności.

str. 81 – ostatnie zdanie – Autor sam sobie zaprzecza pisząc, że skopolamina spowodowała spadek zawartości glikogenu w tkance i zaraz wyjaśnia, że różnica nie była istotna.

str. 86 – końcowy akapit – niepotrzebne dublowanie w tekście tych samych danych, które Autor zestawiał poniżej w Tabeli 4.

str. 87 i wcześniejsze – w wielu przypadkach zastanawiałem się jakich grup doświadczalnych dotyczy liczba n w podpisach do wszystkich rycin (np. do danych z Ryc. 54 $n \geq 24$, dla których podano procent (nie liczbę) komórek apoptotycznych w 9 grupach wraz z odchyleniami (jaka jest miara tych odchyleń?)

Rozdział „Dyskusja” nawiązuje tematycznie do poszczególnych podrozdziałów opisujących wyniki i jest bardzo dobrze napisany. Wprowadzenie do dyskusji jest pod względem treści zbliżone do tego, którym Autor rozpoczyna rozdział „Wyniki”. Jest to w pewnym sensie podsumowanie wyników, lecz w tym przypadku wskazujące na istotne elementy regulacyjne, które wynikają z plejotropowego działania testowanych związków biologicznie czynnych. Rozdział ten pokazuje dojrzałość Autora w poszukiwaniach najbardziej prawdopodobnych scenariuszy pozwalających na zrozumienie udziału analizowanych analogów i antagonistów mAChRs, w ich bezpośredniej lub pośredniej kontroli i regulacji analizowanych procesów u mącznika.

Doktorant wykazał, że potrafi umiejętnie poruszać się po bardzo odległym tematyce piśmiennictwie, szeroko i rozsądnie wykorzystywanego do uzasadnienia opisywanych mechanizmów działania analizowanych związków. Nie wszystkie, nieraz niespodziewane efekty, można było wytłumaczyć w świetle dostępnego piśmiennictwa, ale w takich warunkach Doktorant informuje, że nie widzi na chwilę obecną możliwości wytłumaczenia zaistniałych zjawisk.

Autor zwraca uwagę na podobieństwa i różnice w działaniach wybranych substancji chemicznych w organizmie ssaka i owada. Przykładowo, antagoniści wywołują odmienne reakcje serca u owadów niż u ssaków (obniżenie aktywności kurczliwej vs tachykardia). Pokazuje także podobieństwa (karbachol) i różnice (atropina) między ssakami i owadami w aktywności kurczliwej jelita.

Warto podkreślić jest również przedstawienie właściwości miotropowych analizowanych substancji czynnych oparte na dogłębnej dyskusji popartej wynikami innych badaczy. Porównania jednoznacznie wskazują na odmienności reakcji miotropowej zależnej od narządu. Przykładem może być, co prawda słabe, pobudzenie aktywności miotropowej jajowodu powodowane także przez obie substancje o działaniu antagonistycznym. Pomocne w śledzeniu wywodów Autora są tabele podsumowujące dokonywane porównania (*nb.* Tabela 6 wymaga uzupełnienia w odniesieniu do skopolaminy i lipidów).

W dyskusji zabrakło elementu zamykającego rozważania Autora, spinającego wszystkie elementy pracy i nawiązujące do celu głównego.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy uznaje:

- Wykazanie zróżnicowanego, narządowo-specyficznego oddziaływania miotropowego agonistów (katechol i pilokarpina) i antagonistów (atropina i skopolamina) mAChRs na wewnątrzpochodną kurczliwość narządów wewnętrznych *T. molitor*: serca, jelita oraz jajowodu, z wyraźnym hamowaniem kurczliwości serca,
- Udowodnienie, że w warunkach *in vitro* miostymulujące działanie analizowanych związków na jelito i jajowód owada jest zależne od stężenia danego związku,
- Wykazanie, że tkankowo-specyficzne oraz czasowo-zależne działanie metabotropowe testowanych agonistów i antagonistów mAChRs w regulacji zawartości glikogenu, lipidów i wolnych cukrów ma charakter pośredni i odbywa się poprzez zmiany zachodzące w układzie neurosekrecyjnym dwóch struktur: *corpora cardiaca/corpora allata*,
- Udowodnienie właściwości hemocytotropowych karbacholu i skopolaminy, które oddziałują na morfologię, adhezję i żywotność hemocytów, prowadząc do nasilenia tempa apoptozy hemocytów. Autor rozprawy widzi w tym przypadku możliwość oddziaływań bezpośrednich i pośrednich również przez układ neurosekrecyjny *corpora cardiaca/corpora allata*,
- W oparciu o wyniki badań immunocytochemicznych wskazanie, że oddziaływanie obu agonistów i antagonistów mAChR typu A na kurczliwość jelita oraz stężenie glikogenu może wynikać z bezpośredniego wpływu na same receptory muskarynowe. Receptory mACh typu B zidentyfikowane w brzuszny łańcuszku nerwowym wskazują raczej na ich działania pośrednie przez ich wpływ na struktury związane z jelitem.

Wnioski - są wyważone i wynikają z przeprowadzonej wcześniej dyskusji wyników. Odczuwam w nich niedosyt elementów interpretacyjnych, szczególnie tam, gdzie agoniści i antagoniści

przejawiają podobne działania. Brakuje mi wniosku wskazującego na niektóre odmienności działania analizowanych związków w organizmie owada i ssaka.

Wnioski końcowe

Zamieszczone w mojej opinii uwagi nie dotyczyły wartości merytorycznej wyników tej pracy. Uznałem jednak potrzebę zasugerowania Autorowi tego na co warto zwrócić uwagę i ulepszyć, zanim prace znajdą się u redaktorów dobrych czasopism. Jest to bowiem bardzo dobry materiał na 2-3 prace naukowe.

Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa daje wszelkie podstawy ubiegania się o stopień doktora nauk przyrodniczych. Doktorant wykazał się umiejętnością doboru właściwego i ciekawego tematu badawczego, potrafił wskazać właściwe cele badań i uzasadnić ich znaczenie dla nauki. Jest bardzo dobrze i wszechstronnie przygotowany do pracy laboratoryjnej; potrafi posługiwać się nowoczesnymi technikami analitycznymi. Cechuje go umiejętność całościowego widzenia problemów, które należy rozwiązać. Doświadczenia są dobrze zaplanowane, wykonane, opracowane, zinterpretowane i zakończone adekwatnymi wnioskami końcowymi. Doktorant ma dużą swobodę w pisaniu rozprawy naukowej.

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Szymona Chowańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Paweł Migula

Katowice, 09.05.2015

Prof. dr hab. Paweł Migula
Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Katowice, 09.05.2015

**Wniosek o wyróżnienie mgr Szymona Chowańskiego za rozprawę doktorską:
"Rola agonistów i antagonistów cholinergiczných receptorów muskarynowych w regulacji
procesów fizjologicznych chrząszcza *Tenebrio molitor* L."**

Oceniając rozprawę doktorską mgr Szymona Chowańskiego uznałem, że ma ona bardzo wysoki poziom merytoryczny. Mimo zawartych w mojej recenzji szczegółowych uwag dotyczących formy pracy uważam, że badania doktoranta przyczyniły się do istotnego postępu w poznaniu oddziaływań agonistów i antagonistów cholinergiczných receptorów muskarynowych na różne procesy fizjologiczne owadów, na przykładzie *T. molitor* a także wykazanie obecności dwóch typów receptorów muskarynowych w różnych narządach wszystkich stadiów rozwojowych tego gatunku owada. Pozwalam sobie przytoczyć najważniejsze nowe dla nauki elementy wynikające z badań wykonanych przez mgr Szymona Chowańskiego:

- Wykazanie zróżnicowanego, narządowo-specyficznego oddziaływania miotropowego agonistów (katechol i pilokarpina) i antagonistów (atropina i skopolamina) mAChRs na wewnątrzpochodną kurczliwość narządów wewnętrznych *T. molitor*: serca, jelita oraz jajowodu, z wyraźnym hamowaniem kurczliwości serca,
- Udowodnienie, że w warunkach *in vitro* miostymulujące działanie analizowanych związków na jelito i jajowód owada jest zależne od stężenia danego związku,
- Wykazanie, że tkankowo-specyficzne oraz czasowo-zależne działanie metabotropowe testowanych agonistów i antagonistów mAChRs w regulacji zawartości glikogenu, lipidów i wolnych cukrów ma charakter pośredni i odbywa się poprzez zmiany zachodzące w układzie neurosekrecyjnym dwóch struktur: *corpora cardiaca/corpora allata*,
- Udowodnienie właściwości hemocytotropowych karbacholu i skopolaminy, które oddziałują na morfologię, adhezję i żywotność hemocytów, prowadząc do nasilenia tempa apoptozy hemocytów. Autor rozprawy widzi w tym przypadku możliwość oddziaływań bezpośrednich i pośrednich również przez układ neurosekrecyjny *corpora cardiaca/corpora allata*,
- W oparciu o wyniki badań immunocytochemicznych wskazanie, że oddziaływanie obu agonistów i antagonistów mAChR typu A na kurczliwość jelita oraz stężenie glikogenu może wynikać z bezpośredniego wpływu na same receptory muskarynowe. Receptory mACh typu B zidentyfikowane w brzusznyńm łańcuszku nerwowym wskazują raczej na ich działania pośrednie przez ich wpływ na struktury związane z jelitem.

Autor tej pracy zasługuje w pełni na wyróżnienie. Uważam, że jest jego rozprawa doktorska jest materiałem kilku artykułów naukowych w liczących się czasopismach naukowych. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu aby w przypadku pozytywnego przebiegu dalszych etapów przewodu doktorskiego rozważyła możliwość uhonorowania jej stosowną nagrodą, zgodnie z wewnętrznym regulaminem Rady.



Prof. dr hab. Paweł Migula