



**UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE**  
**UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN**  
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
**KATEDRA ANATOMII ZWIERZĄT**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL ANATOMY**



Olsztyn, 23.05.2022r.

Dr hab. n. wet. Zenon Pidsudko, prof. UWM  
**Katedra Anatomii Zwierząt,**  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**RECENZJA**

Rozprawy doktorskiej lek. wet. Sylwii Mozel wykonanej w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UP w Lublinie

Tytuł pracy:

„Ekspresja receptorów purynowych P2X2 w centralnym i obwodowym układzie nerwowym świni domowej”

**Promotor: Prof. dr hab. Marcin B. Arciszewski**

Promotor pomocniczy: Dr Małgorzata Matysek

Podstawę prawną wykonania niniejszej recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 31 marca 2022 r.

Dotychczasowe badania nad ekspresją receptorów P2X2 koncentrowały się w dominującej większości na zwierzętach laboratoryjnych (szczur, mysz, kavia domowa), podczas gdy doniesienia dotyczące dużych ssaków domowych były sporadyczne. Istnieje więc spore zapotrzebowanie na przeprowadzenie badań neuroanatomicznych, wyjaśniające różnice gatunkowe zależne w mechanizmach neurotransmisji lub neuromodulacji. Dodatkowo niektóre gatunki zwierząt domowych (np. świnia) są coraz częściej wykorzystywane jako jeden z modeli doświadczalnych nadających się do badań symulacyjnych nad układem nerwowym człowieka,

głównie ze względu na duże podobieństwo neuroanatomiczne, neurofizjologiczne, biochemiczne czy też genetyczne. Uzasadnionym więc wydaje się prześledzenie i dokładne ustalenie schematu ekspresji receptorów P2X2 w neuronach centralnego oraz obwodowego układu nerwowego świni. Wyniki takich badań mogą stanowić fundamenty do wyjaśnienia niektórych mechanizmów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych, a tym samym przyczynić się do ustalenia skutecznej terapii tych schorzeń zarówno u człowieka, jak i u zwierząt.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada układ typowy dla tego rodzaju opracowań z następującymi po sobie rozdziałami: *Streszczenie*, *Wykaz skrótów*, *Wstęp*, *Cel badań*, *Materiał i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski* oraz *Piśmiennictwo*. Obejmuje 124 strony maszynopisu, 19 rycin, na które składają się wykresy oraz ryciny zawierające kolorowe fotografie (do takiego połączenia wykresów i rycin odniosę się w Uwagach dotyczących rozprawy doktorskiej) oraz 1 tabeli. W pracy Doktorantka powołuje się na dane zaczerpnięte z obszernego, obejmującego 217 pozycji piśmiennictwa, w przeważającej mierze anglojęzycznego. Należy zaznaczyć, że piśmiennictwo zostało starannie i adekwatnie dobrane, a kluczowe pozycje obejmują prace zawierające najbardziej aktualne, w kontekście prezentowanej tematyki.

Badania wykonano za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie, na podstawie zgody o nr 30/2015 z dnia 26.05. Kopia decyzji LKE powinna zostać załączona do niniejszej rozprawy w formie załącznika, którego niestety zabrakło w opracowaniu.

Doktorantka na stronie 10-tej załączyła wykaz stosowanych w rozprawie skrótów, co czyni jej odbiór, w moim odczuciu, łatwiejszym. Małym zastrzeżeniem jest, że raz tworzy skrót od nazw angielskich a przy innym skrócie od nazw polskich. Należałoby się zdecydować na jeden sposób tworzenia nazw skrótów.

We *Wstępie* Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat wielopoziomowej struktury układu nerwowego obejmująca przede wszystkim elementy ośrodkowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego (ang. peripheral nervous system; PNS) warunkujące prawidłową kontrolę nad wszystkimi kluczowymi procesami życiowymi, uwzględniając oddychanie, krążenie, pobieranie pokarmu i jego trawienie, a także rozmnażanie. Omówiła też zagadnienia dotyczące roli i funkcji neuronów wchodzących w skład łuków nerwowych obecnych w poszczególnych piętrach ujętego całościowo układu nerwowego. Opisała, iż komórki nerwowe swoją czynność wykonują poprzez szeroki wachlarz różnorodnych związków biologicznie aktywnych, z których większość pełni rolę

neurotransmitterów i neuromodulatorów. Dodatkowo wykazała, iż układ ten jest jeszcze bardziej skomplikowany, bowiem neurotransmitery oraz neuropeptydy działają również na inne komórki poprzez liczne receptory. Tym samym neurony same w sobie mogą pełnić rolę regulującą wobec innych neuronów, zarówno stymulując, jak i hamując ich aktywność.

Doktorantka szczegółowo zebrała i opisała dane dotyczące zewnątrzkomórkowego adenozy-5'-trifosforan (ATP) - jednego z neurotransmitterów obecnych w szerokiej populacji różnego typu neuronów i na dziś wiadomo, że ATP po przetransportowaniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może pełnić liczne funkcje, między innymi cząsteczki sygnałowej w układzie nerwowym. ATP zewnątrzkomórkowy jest nukleotydem purynowym i jego główną rolą jest pełnienie funkcji szybkiego neuroprzekaźnika oraz neuromodulatora. ATP może być przechowywany w pęcherzykach synaptycznych wraz z innymi neurotransmiterami i uwalniany w efekcie odpowiedzi synaptycznej. Wiadomym jest również, iż działanie ATP zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych uwarunkowane jest jego połączeniem z purynoreceptorami.

Purynoreceptory można podzielić na dwie zasadnicze grupy tj. P1 oraz P2. Receptory P1 aktywowane są przez adenozyne i można do nich zaliczyć cztery podtypy: A1, A2A, A2B oraz A3. Z kolei purynoreceptory P2 zostały podzielone na dwie główne rodziny, czyli receptory P2Y oraz P2X. Receptory należące grupy P2X cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem, gdyż występują w szerokiej gamie narządów i układów, takich jak: układ krwionośny, oddechowy, obwodowy układ nerwowy, czy też układ mięśniowy.

Jedną z najpowszechniej występujących izoform należących do rodziny receptorów P2X jest podjednostka P2X2. Pojedynczy receptor P2X2 jest polipeptydem zbudowanym z 471 aminokwasów. Izofорма P2X2 (jak każda z podjednostek należących do rodziny P2X) zbudowana jest z dwóch transbłonowych domen (TM1 oraz TM2), pętli zewnątrzkomórkowej oraz wewnątrzkomórkowego końca N- i C-. Koniec C podjednostki P2X2 zawiera 113 aminokwasów, co czyni go drugim co do długości w całej rodzinie receptorów. Receptory P2X2 występują zarówno w centralnym, jak i obwodowym układzie nerwowym. W centralnym układzie nerwowym ekspresję receptorów P2X2 stwierdzono między innymi w hipokampie, korze mózgowej, ciele migdałowatym, wzgórzu czy też podwzgórzu. Natomiast obecność receptorów P2X2 w obwodowym układzie nerwowym stwierdzono między innymi w jelitowym układzie nerwowym. Powszechne występowanie podjednostki P2X2 w różnorodnych populacjach neuronów czyni ją niezwykle interesującym obiektem badań i doprowadziło do zidentyfikowania procesów fizjologicznych, jak i patologicznych, w które zaangażowane są te receptory. Stwierdzono, że receptory P2X2 powiązane są między innymi

z odczuwaniem smaku, ponieważ oddziałują na nerwy związane z kubkami smakowymi. Dodatkowo, w narządzie przedsionkowo-śliznowym ATP aktywując receptory P2X<sub>2</sub>, reguluje wrażliwość na dźwięki.

Powyższe opisane przez Doktorantkę wyniki badań podkreślają istotność kontynuowania i poszerzania prac badawczych nad receptorami P2X<sub>2</sub>, które wciąż w niewielkim stopniu zostały zgłębione. Poruszane problemy zatem w sposób logiczny korespondują z podjętą przez Doktorantkę tematyką badawczą a zapoznanie się z nimi ułatwia czytanie kolejnych części rozprawy.

W rozdziale *Cel badań* Kandydatka przedstawiła uzasadnienie oraz cele uwzględniające wszystkie aspekty podjętych przez Nią badań.

Doktorantka przeprowadziła badania na materiale badawczym pochodzącym w sumie od 5 niedojrzałych płciowo świń (3 samcach i 2 samicach). W rozdziale *Materiał i metody* szczegółowo omówiła sposób postępowania ze zwierzętami oraz sposób pobierania i utrwalania materiału badawczego. W dalszej części tego rozdziału zostały omówione metody dotyczące badań immunohistochemicznych oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników. Zabrakło opracowania i zamieszczenia na początku tego rozdziału schematu, który byłby bardzo pomocny w szybkiej orientacji w zakresie układu doświadczalnego.

Uzyskane rezultaty badań zostały wyczerpująco opisane w rozdziale *Wyniki*. Należy zaznaczyć, że recenzowana rozprawa mogłaby być przygotowana bardziej starannie pod względem graficznym. Prezentowane fotografie, jak również wykresy ilustrują co prawda uzyskane rezultaty, ale np. dodatkowe zamieszczenie na początku tego rozdziału tabel z podaniem poszczególnych odcinków badanych obszarów wraz z podziałem uwzględniającym wielkości neuronów i umieszczenie poszczególnych populacji neuronalnych znacznie ułatwiłyby lekturę tej części.

Wyniki badań zostały omówione i poddane wszechstronnej analizie w rozdziale *Dyskusja*.

Rozprawę zamyka krótki rozdział *Wnioski*. Należy zaznaczyć, że wszystkie założenia pracy zostały zrealizowane, aczkolwiek zabrakło krótkiego podsumowania, które powinno się znaleźć a rozdział powinien zostać nazwany **Podsumowanie i wnioski**. W rozdziale tym Kandydatka zawarła siedem wniosków mających pełną podstawę w wynikach badań, aczkolwiek wniosek szósty i siódmy w opinii recenzenta są sformułowane zbyt ogólnie.

Reasumując należy stwierdzić, że przedłożona do oceny praca lekarza weterynarii Sylwii Mozel spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Napisana jest

przejrzyście, poprawnym językiem polskim. Zastosowana nowoczesna metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach i zasadniczo nie wzbudza wątpliwości.

### Uwagi

Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia. Nie umniejszają one wartości merytorycznej pracy, powinny jednak, moim zdaniem, zostać uwzględnione i poprawione przed opublikowaniem jej oraz uwzględnione w przypadku projektowania w przyszłości doświadczeń o podobnym charakterze.

1. Na stronie 17 przy opisie rdzenia kręgowego Kandydatka używa terminu korzenie grzbietowe i korzenie brzuszne a powinno zostać użyte określenie korzenie dogrzbietowe i dobrzuszne;
2. Strona 26: w ilości zwierząt do badań Kandydatka pisze „użyto 5 świń, różnej płci (3 samce, 2 samce)” a powinno być 3 samce, 2 samice. Szkoda, że Kandydatka nie użyła homologicznej grupy zwierząt np. 5 samców lub 5 samic unikając w ten sposób wystąpienia ewentualnych różnic w kodowaniu chemicznym neuronów związanych z płcią zwierząt;
  - a. W punkcie 6.2 Autorka napisała” W celu premedykacji każdemu zwierzęciu podano domięśniowo Stresnil (Stresnil, Janssen Pharmaceutica N.V., Belgia) – a powinno być podana substancja czynna – azaperon, a nie nazwa preparatu;
3. Strona 27: Punkt 6.3. został nazwany: „Wykonanie preparatów kriostatowych”, lepiej użyć określenia preparatów mrożeniowych. Dalej Kandydatka pisze „Po kilkudniowym płukaniu w sacharozie pobrane tkanki zostały otoczone medium mrożeniowym (Tissue-Tek ® O.C.T.TM, Sakura, Holandia), a następnie zostały wykonane seryjne skrawki mrożeniowe o grubości 10 µm, przy użyciu kriostatu (HM525NX, Thermo Shandon Ltd, Wielka Brytania). Co piąty skrawek został umieszczony na szkiełku podstawowym (Superfrost ® Plus, Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Niemcy) i był przechowywany w temperaturze -70°C do czasu późniejszych barwień immunofluorescencyjnych”. Taki sposób krojenia i nakładania skrawków na szkiełka podstawowe budzi wątpliwości u recenzenta, gdyż praktycznie uniemożliwiłoby uchwycenie wszystkich neuronów określanych jako małych (wielkość do 30 µm) a nawet średnich (30-50 µm). Należało pobierać wszystkie skrawki seryjne, nakładać je na szkiełka podstawowe i następnie liczyć neurony w co 3 albo 4 skrawku, co dawałoby pewność, iż zostaną uchwycone i policzone neurony z każdej populacji neuronalnej. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii!

4. Strona 28-29: Autorka opisała weryfikacje specyficzności użytych przeciwciał. Standardowo powinna zostać dołączona dokumentacja fotograficzna pokazująca brak immunoreakcji w opisanych procedurach kontrolnych;
5. W rozdziale Wyniki - strona 32 - W opinii recenzenta zamieszczenie tabel z podaniem poszczególnych części badanych obszarów (DRG, jelita cienkie oraz kora śródwęchowa) wraz z podziałem uwzględniających wielkości neuronów i zamieszczenie danych dotyczących poszczególnych populacji neuronalnych znacznie ułatwiłoby lekturę tego rozdziału,
  - a. przy opisie DRG powinno być podkreślone jeszcze raz, iż badania były przeprowadzone tylko w prawych DRG wszystkich odcinków rdzenia kręgowego,
  - b. Ryc. 9. Przedstawia ekspresja receptorów P2X2 w DRG oraz ich współwystępowanie z badanymi substancjami biologicznie czynnymi. Fotografie 9A, 9B, 9C i 9D powinny być wydrukowane w większej rozdzielczości oraz na papierze fotograficznym. Ponadto powinny zostać zmienione proporcje wielkości napisów do rozmiarów fotografii. Napisy są zbyt duże i zaciemniają obraz struktur a zamieszczone fotografie powinny być zdecydowanie większe z uwzględnieniem większego obszaru zwojów DRG. Recenzent zastanawia się dlaczego nie zastosowano skrótu do galaniny, np. często w publikacjach dotyczących tego neuropeptydu używany jest skrót galanina- GAL;
  - c. Ryc. 14. Przedstawia podwójne barwienie IHC jelita cienkiego świni na obecność receptorów P2X2 i wybranych substancji biologicznie czynnych. Fotografie 14A-G powinny być wydrukowane w większej rozdzielczości oraz na papierze fotograficznym. Ponadto powinny zostać zmienione proporcje wielkości napisów do rozmiarów fotografii. Napisy są zbyt duże i zaciemniają obraz struktur a zamieszczone fotografie powinny być zdecydowanie większe z uwzględnieniem większego obszaru zwojów,
  - d. Ryc. 19. Przedstawia ekspresję receptorów P2X2 oraz ich współwystępowanie z wybranymi substancjami biologicznie czynnymi w EC świni domowej. Fotografie powinny być wydrukowane w większej rozdzielczości oraz na papierze fotograficznym a zdjęcie 19D powinno być zdecydowanie większe. Ponadto powinny zostać zmienione proporcje wielkości napisów do rozmiarów fotografii.

6. W rozdziale Piśmiennictwo Doktorantka zamieściła aż 217 pozycji literatury, niestety pewnym utrudnieniem jest brak numeracji kolejnych pozycji cytowanych publikacji, co znacznie ułatwiłoby śledzenie prawidłowości cytowania poszczególnych pozycji artykułów,

- a. Na stronie nr 12 Autorka zacytowała artykuł – Furness, 2006, który niestety nie znalazł się w spisie literatury,
- b. Na stronie 13 została zacytowana publikacja - Pancratov oraz wsp., 2006, która również nie znalazła się w spisie literatury,
- c. Na stronie 21 zacytowano autora Brodmana (1909), podczas gdy powinno być Brodmanna (1909),
- d. Na stronie 84 i kolejnych w rozdziale **Dyskusja** Doktorantka opisuje wyniki badań przeprowadzane na świnie morskiej, a powinna być użyta prawidłowa nomenklatura tego gatunku w języku polskim – kawia domowa.

Przytoczone powyżej uwagi w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Uważam, że doktorantka posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi swoje umiejętności właściwie wykorzystać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki prawidłowo zinterpretować. Powyższe w pełni predysponuje Ją do nadania stopnia doktora nauk weterynaryjnych. Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lekarz weterynarii Sylwii Mozel pt. „Ekspresja receptorów purynowych P2X2 w centralnym i obwodowym układzie nerwowym świni domowej” spełnia warunki stawiane w ustawie z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1699).

Na tej podstawie składam, z pełnym przekonaniem, wniosek do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o nadanie pani lekarz weterynarii Sylwii Mozel stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych. Biorąc pod uwagę znaczenie wykonanych przez Doktorantkę badań w wyjaśnieniu mechanizmów związanych z działaniem purynoreceptorów oraz ustalenie schematu ekspresji receptorów P2X2 w neuronach centralnego oraz obwodowego układu nerwowego świni wnoszę o nagrodzenie recenzowanej pracy stosownym wyróżnieniem.

Z poważaniem

dr hab. Zenon Piskorski, prof. UAM