

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Joanny Winkiel
pt. "Charakterystyka działania wybranych glikoalkaloidów z rodziny *Solanaceae* na
kluczowe procesy metaboliczne u chrząszcza *Tenebrio molitor*"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Magdaleny Joanny Winkiel, wykonana została pod kierunkiem Pani prof. UAM dr hab. Małgorzaty Słocińskiej i Pana dr Szymona Chowańskiego pełniącego funkcję promotora pomocniczego, na Wydziale Biologii, w Instytucie Biologii Eksperymentalnej, w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Rozprawa dotyczy określenia wpływu wybranych glikoalkaloidów (GA) - syntetycznej solaniny (SOL), chakoniny (CHA), tomatyny (TOM) oraz ekstraktu z liści pomidora (EXT) aplikowanych za pomocą iniekcji do owada modelowego jakim był mącznik młynarek. Oceniono wpływ GA na metabolizm energetyczny owada poprzez zmiany zawartości lipidów, węglowodanów i aminokwasów. Przeanalizowano także mechanizm zmian ekspresji genów i aktywność enzymatyczną.

Testowane związki aplikowane w dwóch stężeniach – 10^{-8} i 10^{-5} Mola, a analizę ich dystrybucji i efektów wpływu na procesy metaboliczne prowadzono w różnych odstępach czasu po iniekcji. Analizy dotyczyły:

- 1) Oceny dystrybucji glikoalkaloidów poprzez analizę jakościową wybranych glikoalkaloidów (SOL, CHA) w hemolimfie, w jelitach i w ciele tłuszczowym. Oceniono także śmiertelność owadów z uwagi na potencjalnie zastosowanie glikoalkaloidów jako bioinsektycydów.
- 2) Oceniono zawartość lipidów (np. poziom wolnych kwasów tłuszczowych, sterole, estry), węglowodanów (trehaloza, glukoza, glikogen) i aminokwasów (alanina, prolina, walina, leucyna i fenyloalanina)
- 3) Dokonano pomiaru zmian ekspresji genów kodujących kluczowe enzymy szlaków energetycznych oraz głównych białek antyoksydacyjnych
- 4) Dokonano oceny aktywności enzymów szlaków energetycznych, czyli fosfofruktokinazy (PFK), syntazy cytrynianowej (CS), dehydrogenazy hydroksoacylo-CaA (HADH), katalazy (CAT) i dysmutazy podtlenkowej (SOD)

Rozprawę stanowi kompilacja czterech manuskryptów, pierwszy z nich opublikowano w roku 2023 w *Metabolites*, drugi w roku bieżącym (w 2024) w *Scientific Reports*. Kolejne dwie prace wchodzące w skład rozprawy są nadal na etapie recenzjowania, jedna z nich została skierowana do *Insect Science*, druga do *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Prace stanowią spójny tematycznie blok badań koncentrujących się wokół tematu rozprawy. Aktualnie opublikowane manuskrypty obejmują 240 pkt. MNiSW i wartość IF 7,9. Kolejne dwa manuskrypty będące w trakcie procesu recenzji obejmują kolejne 170 punktów MNiSW i wartość IF 6,6. Doktorantka jest we wszystkich manuskryptach autorem wiodącym i korespondencyjnym. Do wszystkich opublikowanych prac i złożonych manuskryptów



załączono oświadczenia współautorów o ich udziale i realizowanych zadaniach w omawianych pracach.

Ocena merytoryczna rozprawy

Praca opublikowana i przedstawiona w zestawieniu pod pozycją drugą zgodnie z jej opisem dotyczyła transportu GA wprowadzonych za pomocą iniekcji. Doktorantka uzasadniła, że iniekcja jest rzadko stosowaną metodą aplikacji ksenobiotyków do ciała owada w przeciwieństwie do stosowania metody pomocniczej, czyli dostarczenie GA wraz z pożywieniem lub w postaci ekstraktu (*bardzo poproszę o wyjaśnienie „podawanie w postaci ekstraktu”, str. 23*). Oceniono wpływ terminu iniekcji na szybkość dystrybucji GA do hemolimfy, tkanki jelita i ostatecznie zmagazynowania ich w ciele tłuszczowym po upływie 0.5, 1.5, 8 i 24 godzinach. W tym miejscu muszę wskazać pewne nieścisłości, które pojawiły się w ogólnym opisie celu rozprawy doktorskiej na stronie 29, gdzie odniesiono się jedynie do dwóch terminów inkubacji, czyli 2 i 24 godziny. Poza tym trudno jest zrozumieć, dlaczego autorka zdecydowała się przydzielić tej pracy numer 2. W badaniach wykorzystano chromatograf sprzężony ze spektrometrią mas, w opisie i oświadczeniach nie znalazłam informacji, kto fizycznie wykonał analizę i interpretację wyników wykorzystując LC-HRMS.

Wyniki dotyczące dystrybucji GA w ciele owada pozwoliły na zaplanowanie kolejnej pracy badawczej opublikowanej jako manuskrypt nr 1, a dotyczący wpływu GA na metabolizm lipidów - poprzez analizę zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, steroli, estrów - oraz ocenę aktywności enzymu beta oksydacji kwasów tłuszczowych (HADH). Zaobserwowano zwiększoną ilość kwasów tłuszczowych w ciele tłuszczowym 24 godziny po iniekcji, przy jednocześnie obserwowanym zmniejszonym stężeniu trójglicerydów (TAG), sugerującym intensywną hydrolizę zaaplikowanych glikoalkaloidów. Stwierdzono także, że obserwowany efekt jest różnicowany w zależności od stężeń i rodzaju glikoalkaloidu.

W pracy przedstawionej jako nr 3 skupiono się na węglowodanach (trehaloza, glukoza, glikogen) i na aminokwasach (alanina, prolina, walina, leucyna i fenyloalanina). Wyniki wskazały, że testowane GA zmieniały stężenie trehalozy w hemolimfie, ale nie zmieniały zawartości trehalozy, glukozy i glikogenu w ciele tłuszczowym. Natomiast w przypadku aminokwasów stwierdzono, że aplikowane TOM i EXT spowodowały, że w hemolimfie ich zawartość była zmniejszona, ale już w ciele tłuszczowym odnotowano ich akumulację. Tego efektu nie zauważono po iniekcji SOL i CHA, co ponownie wskazuje na różnicowany efekt w zależności od typu glikoalkaloidu, od stężenia, od rodzaju tkanki i czasu inkubacji (w tym przypadku to były 2 i 24 godziny). Ten różnicowany efekt objawia się poprzez mechanizm regulacji ekspresji genów kodujących enzymy szlaków metabolicznych oraz włączenie mechanizmów kompensacyjnych objawiających się poprzez wzrost ekspresji PFK, CS, CAT. Kontynuując badania nad detoksykacją aplikowanych GA, Doktorantka wraz z zespołem współautorów opracowała pracę nr 4 dotyczącą aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy CAT i dysmutazy ponadtlenkowej SOD) uruchomianych pod wpływem testowanych GA. Po wstrzyknięciu GA zaobserwowano zwiększoną aktywność SOD w ciele tłuszczowym larw, ale w tkankach jelita ta aktywność była już zmniejszona na rzecz zwiększonej aktywności CAT.

Reasumując, należy przyjąć, że potencjał testowanych GA jako bioinsektycydów jest niewielki, biorąc dodatkowo niewielką obserwowaną śmiertelność larw, a mechanizmy detoksykacji ksenobiotyków u larw są dobrze rozwinięte i wielopoziomowe w zależności od miejsca ich analizy w ciele owada/tkanki,

od czasu jaki upłynął od iniekcji GA, od rodzaju ksenobiotyku i jego stężenia. Interpretacja wyników nie zawsze jest jednoznacznie możliwa i Doktorantka często posługuje się w opisach trybem przypuszczającym. We wszystkich pracach zastosowano jedną metodę aplikacji GA, te same dwa stężenia, co niewątpliwie jest „klamrą spinającą” cały blok tematycznych opisywanych badań, ale mając na uwadze chęć wykazania potencjału testowanych GA jako bioinsektycydów, o którym Doktorantka wspomina w rozprawie, należałoby uwzględnić więcej zmiennych, np. dodatkowe stężenia, różne stadia rozwojowe larw, kolejne metody aplikacji.

W rozprawie Doktorantka umieściła także wykaz opublikowanych pozostałych prac (sztuk 5), wszystkie prace są pracami zespołowymi, ich data publikacji zawiera się w przedziale od 2018-2023r, suma punktów MNiSW to 540, a sumaryczny IF to 22,2.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Dwie prace z czterech składających się na rozprawę doktorską zostały opublikowane, natomiast kolejne dwie dopiero znajdują się w trakcie procesu recenzji, co jest sytuacją trudną do zinterpretowania, jak należy podejść do przedłożonych materiałów. Czy należy przeanalizować jedynie te dwie prace jeszcze nieopublikowane? Czy przedłożenie rozprawy nie powinno mieć miejsca dopiero po publikacji wszystkich manuskryptów? W obecnej formie rozprawa zawiera:

- schemat badań,
- streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim,
- wstęp,
- cel pracy,
- opis materiałów i metod,
- uzyskane wyniki i wnioski oraz
- podsumowanie.

Cały blok merytoryczny zamyka wykaz bibliografii zawierający 26 pozycji. Całość jest niestety, wg mojej opinii, przygotowana zbyt zwięźle, czasami nawet lakonicznie i odnosi się do zagadnień już poznanych i wcześniej opisanych. Mając na uwadze, że rozprawa obejmuje dwa manuskrypty dopiero będące w procesie recenzji, uważam, że należałoby przedstawić temat i badane zagadnienia aktywności enzymatycznej, ekspresji genów i mechanizmów detoksykacji znacznie szerzej. *Cel pracy* zawarty na stronie 29 również nie został sformułowany konkretnie, jest to raczej kompilacja hipotezy badawczej i opisywania co zostało zanalizowane. *Materiały i metody* również powinny zostać przedstawione szerzej, aktualnie jest to zestawienie akapitów, znacznie korzystniej wyglądałby ten rozdział, gdyby odniesiono się do wykorzystywanych metod w konkretnych manuskryptach i w odniesieniu do konkretnych zadań. Proponowany podział w zależności od konkretnego numeru pracy został już uwzględniony podczas omawiania *Wstępu* oraz rozdziału *Wyniki i wnioski*.

Zwięźle przedstawienie wyników jest czasami zaletą, szczególnie jeśli wyniki są jednoznaczne, jednak w tym przypadku tak nie jest, zatem być może forma rozprawy również powinna być bardziej rozbudowana. W obecnej formie część merytoryczna została zawarta na niepełnych 14 stronach.

Przedłożona praca jest częścią mini grantu dla doktorantów w ramach projektu „Inicjatywa doskonałości-Uczelnia badawcza” oraz Grantu doktoranta w ramach projektu „Uniwersytet Jutra”.



W ramach przedstawienia sylwetki Doktorantki nie umieszczono żadnych danych dotyczących Jej aktywności na forum międzynarodowym, prezentowania wyników badań na konferencjach, etc. Poproszę zatem o kilka informacji dotyczących tej kwestii.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Czytając dysertację trudno jest odnieść się to kwestii edytorskiej z uwagi na wspomnianą już lakoniczność i zwięzłość, czasami skromność opisów. W obecnej formie nie znalazłam błędów edytorskich. W dysertacji oprócz wspomnianego Schematu badań nie umieszczono żadnej tabeli, rysunku, zdjęcia. Na stronie 14 umieszczono wykaz stosowanych skrótów, ale analizując wszystkie skróty w przedłożonym tekście można zauważyć, że niektóre skróty pominięto np. MnSOD, HSP70. Podobnie w przypadku metod statystycznych, których w ogóle nie wymieniono lub czasu inkubacji, gdzie na stronie 31 wymieniono, że wynosił on 2 lub 24 godziny, podczas kiedy w jednej z prac czas inkubacji wynosił 30 minut, 1.5 godziny, 8 godzin 24 godziny.

Schemat badań, który został umieszczony na stronie 15 rozprawy jest bardzo dobrym wprowadzeniem to omawianego zagadnienia i ułatwia prześledzenia całego procesu planowania kolejnych etapów badań, chociaż i w tym miejscu wypada mi wyrazić swoją wątpliwość z powodu przypisanej kolejności prac oraz w niewielkim stopniu powielania w kolejnych manuskryptach niektórych zagadnień. Wniosek końcowy umieszczony pod schematem badań jest zbędny, jest to raczej oczywista hipoteza badawcza, dopiero krótki fragment *Podsumowania* zawiera bardziej konkretne stwierdzenia, choć w mojej opinii znacznie korzystniej byłoby przygotowanie wniosków i osiągnięć w formie wypunktowanej, a nie łączenie ich z wynikami.

Takie duże uogólnienia i uproszczenia nie służą klarowności przekazu i stwarzają wrażenie „skromności badań”. Doktorantka powinna w przyszłości poświęcić więcej czasu na przedstawienie swojej aktywności i uzyskanych wyników w sposób odpowiadający rzeczywistości, jest przecież co opisywać.

Wniosek końcowy

Pomimo moich komentarzy dotyczących skromności opisów, ale w oparciu o załączone opublikowane prace i manuskrypty uważam, że Doktorantka posiada umiejętności prowadzenia samodzielnych badań. Posiada również umiejętność pracy zespołowej, co potwierdzają wszystkie opublikowane wcześniej prace. Przedłożona dysertacja oraz oświadczenia współautorów świadczą o opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu pracy naukowej. Trudno jest mi odnieść się do aktywności związanej z prezentowaniem wyników na gremiach krajowych i międzynarodowych, gdyż takich danych nie podano. Oceniana rozprawa dotyczy badań podstawowych, daje podstawy do uznania ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki. Uważam, że spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-2 i art.190 ust.3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku.

Prof. dr hab. Jolanta Kowalska
Poznań, 23.08. 2024 r.