



Katowice, 25 sierpnia 2024 r.

Prof. dr hab. Maria Augustyniak
maria.augustyniak@us.edu.pl

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja pracy doktorskiej mgr **Magdaleny Joanny Winkiel**
pt. „Charakterystyka działania wybranych glikoalkaloidów z rodziny *Solanaceae* na kluczowe
procesy metaboliczne u chrząszcza *Tenebrio molitor*”

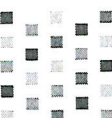
wykonana pod kierunkiem promotora
prof. UAM dr hab. Małgorzaty Słocińskiej

oraz promotora pomocniczego
dra Szymona Chowańskiego

w Zakładzie Fizjologii i Biologii Zwierząt
Instytutu Biologii Eksperymentalnej, Wydziału Biologii UAM

1

Kierując się zapisami zawartymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), w niniejszej recenzji skupiłam się przede wszystkim na ocenie ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki zaprezentowanej w rozprawie doktorskiej, umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz oryginalności rozwiązania problemu badawczego.



Przedmiot recenzji

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o spójny tematycznie zbiór publikacji i manuskryptów złożonych do wydawnictw. Opracowanie liczy 138 stron i jest podzielone na dwie główne części. Część pierwsza, napisana w języku polskim, stanowi wprowadzenie zawierające wykaz prac wchodzących w skład rozprawy, wykaz pozostałych prac Kandydatki, informacje o finansowaniu badań oraz szereg podrozdziałów, o typowym dla badawczych prac naukowych układzie i treści, stanowiących zwięzłe opracowanie manuskryptów stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Część pierwsza zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim oraz schemat badań, który dobrze dokumentuje spójność tematyczną przeprowadzonych eksperymentów. Część druga zawiera kopie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia Kandydatki oraz współautorów o zakresie wykonanych prac i autorskim wkładzie w powstawanie publikacji lub manuskryptów.

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora są cztery prace. Pierwsza to artykuł opublikowany w czasopiśmie *Metabolites*. Druga praca, w chwili złożenia rozprawy doktorskiej była przesłana do *Scientific Reports* i obecnie jest już opublikowana. Prace trzecia i czwarta zostały dołączone jako kopie manuskryptów, złożonych odpowiednio do *Insect Science* i *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Manuskrypty te oczekują na recenzje i decyzje wydawnicze. Wszystkie prace to pozycje wieloautorskie, lecz, co warto uznać – we wszystkich mgr Magdalena Winkiel jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Ponieważ decyzje wydawnicze w sprawie manuskryptów oczekujących na publikację są jeszcze nieznanne, w dalszej części recenzji skupię się na ocenie znaczenia problematyki badawczej i wartości merytorycznej całej rozprawy, poświęcając jednocześnie nieco więcej uwagi manuskryptom oczekującym na decyzje.

Znaczenie problematyki badawczej i ocena ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki

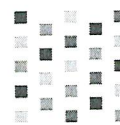
Podjęta przez Panią mgr Magdalenę Winkiel tematyka jest aktualna i wiąże się z rosnącą świadomością społeczeństw w zakresie używania chemicznych środków ochrony roślin oraz konsekwencji ich nadużywania dla środowiska, ekosystemów, bioróżnorodności i zdrowia ludzkiego. Jak czytamy na stronach Parlamentu Unii Europejskiej, przepisy w zakresie stosowania pestycydów są żywo dyskutowane, a ważnym wątkiem tych dyskusji jest szczególna dbałość o ochronę zdrowia ludzkiego, ochronę środowiska i bioróżnorodności. Między innymi, w ramach inicjatyw „od pola do stołu” oraz „różnorodność biologiczna” prowadzone są działania zmierzające do zmniejszenia użycia pestycydów chemicznych do 50%, do roku 2030. Strategie te, aczkolwiek bezdyskusyjne w kontekście stanu środowiska i zdrowia ludzi, stawiają przed agronomią i nauką poważne wyzwania, których priorytetem jest opracowanie i wdrożenie na szeroką skalę metod

alternatywnych w celu ochrony plonów. Wśród kilku obiecujących metod biologicznych, na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie naturalnych produktów pochodzenia roślinnego, takich jak wyciągi i ekstrakty, bogatych w aktywne związki wpływające na kondycję agrofagów. W ten nurt poszukiwań dobrze wpisują się badania przedstawione przez Kandydatkę w rozprawie doktorskiej. Dlatego uważam, że tematyka podjęta przez Panią Magdalenę Winkiel jest ważna i ma istotne znaczenie nie tylko z naukowego punktu widzenia lecz także praktycznego.

Treść przedstawionej do oceny przez Kandydatkę rozprawy wskazuje na dobrą znajomość tematu potencjalnego zastosowania wybranych glikoalkaloidów jako bioinsektycydów. W polskojęzycznym wstępie jak również w manuskryptach, Pani Magdalena Winkiel pokrótce przedstawiła najważniejsze informacje zachęcające do stosowania alternatywnych metod ochrony roślin, z naciskiem na wykorzystanie produktów naturalnych, pochodzenia roślinnego. Omówiła interesującą ją grupę związków, skupiając się głównie na chakoninie (CHA), solaninie (SOL) i tomatynie (TOM), wskazując jednocześnie luki w wiedzy w zakresie ich dystrybucji w tkankach oraz oddziaływania na kluczowe procesy metaboliczne owadów. Informacje te dały podstawę do sformułowania celów badawczych i zaprojektowania eksperymentów. Opisy procedur eksperymentalnych oraz metod badawczych dają dobre wyobrażenie o zakresie wykonanych prac i jednocześnie potwierdzają dużą wiedzę Kandydatki. Opracowanie wyników i ich prezentacja są bardzo precyzyjne, miejscami być może nazbyt precyzyjne, i są wykonane zgodnie ze standardami. Jakkolwiek mam pewne sugestie, które przedstawiam w dalszej części recenzji, a które, być może, pomogłyby w interpretacji wyników i sformułowaniu ostatecznych wniosków. Dyskusja przeprowadzona jest w oparciu o, zasadniczo, dobrze dobrane piśmiennictwo i spełnia standardy naukowe. Aczkolwiek w tej kwestii mam również kilka przemyśleń i rad, które przedstawię w kolejnej części recenzji.

Warto podkreślić, że Pani Magdalena Winkiel, poza pracami włączonymi do rozprawy doktorskiej, jest współautorką pięciu innych publikacji, opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach, o sumarycznym IF wynoszącym 26,3 (640 pkt wg listy MNiSW). Część z tych prac powiązana jest z tematem rozprawy doktorskiej, w tym artykuł przeglądowy, którego pierwszym autorem jest Kandydatka. Te osiągnięcia również wspierają moje przekonanie o posiadaniu przez Panią Winkiel bogatej wiedzy teoretycznej.

Informacje przedstawione w manuskrypcie są mocno skoncentrowane na związkach pochodzenia roślinnego o potencjalnym znaczeniu dla opracowania nowych, skutecznych i bezpieczniejszych dla środowiska bioinsektycydów. Być może zabrakło we wstępie nieco szerszego tła, prezentującego informacje na temat innych metod biologicznych, które są obiecujące w ochronie upraw. Dlatego chętnie poznam opinię Kandydatki na temat znaczenia tych metod, ich ograniczeń oraz szans na szerokie zastosowanie w przyszłości.





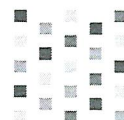
Mam też drobną uwagę odnośnie użycia terminu „szkodniki” w odniesieniu do owadów niepożądanych w agrokulturach. Zdaję sobie sprawę, że termin ten jest powszechnie używany i poprawny, podobnie jak termin „owady pożyteczne”. Jakkolwiek, termin „szkodniki” ma pejoratywne zabarwienie i osobiście jestem propagatorem bardziej ekologicznego podejścia, wskazującego na ich niepożądany charakter w uprawach – agrofagi, owady szkodliwe dla upraw lub owady niepożądane. Doceniam zatem to, że w niektórych zdaniach Doktorantka stosuje określenie „organizmy wyrządzające szkody”.

Podsumowanie

Oceniając treść rozprawy doktorskiej stwierdzam, że ogólna wiedza teoretyczna Kandydatki w zakresie: oddziaływania glikoalkaloidów na owady, ich dystrybucji, wpływu na wybrane procesy metaboliczne i detoksykacyjne oraz poziom substratów energetycznych jest dobra, aktualna i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Ocena umiejętności prowadzenia pracy naukowej

Jednym z ważnych elementów prowadzenia pracy naukowej jest umiejętność pozyskiwania środków na badania. W tym zakresie należy docenić fakt zdobycia przez Kandydatkę dwóch małych grantów, finansowanych z projektów „Inicjatywa doskonałości – Uczelnia badawcza” i „Uniwersytet Jutra”, przyznawanych przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Choć prawdopodobnie były to małe projekty, to jednak wymagały przygotowania dokumentacji i przekonujących opisów planowanych badań. Równie ważną kompetencją naukowca jest umiejętność pracy w zespole i dążność do nawiązywania kontaktów z naukowcami z całego świata. Wszystkie prace włączone do dysertacji Pani Magdaleny Winkiel są wieloautorskie i obejmują zarówno pracowników UAM jak i naukowców z zagranicy, co pośrednio potwierdza posiadanie takich kompetencji. Wkład autorski Doktorantki w badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej nie budzi żadnych wątpliwości. Analiza oświadczeń Kandydatki oraz współautorów wskazuje na dominujący udział Pani Winkiel w badaniach, obejmujący etapy: planowania, pozyskiwania funduszy, prowadzenia eksperymentów, zbierania materiałów i wykonania oznaczeń, jak również opracowania oraz interpretacji wyników, wizualizacji danych, pisania manuskryptów oraz korespondencji z redakcjami czasopism. Jednocześnie doktorantka otrzymała wsparcie w zakresie przygotowania części próbek, wykonania niektórych oznaczeń, nadzorowania całości prac oraz wprowadzenia korekt do manuskryptów. Tak znaczący wkład Kandydatki w badania potwierdza Jej duże umiejętności do prowadzenia badań naukowych.





Część metodologiczna została przygotowana w sposób profesjonalny. Zarówno we wstępie jak i w manuskryptach zawarto wszystkie niezbędne informacje. Całość badań stanowi spójny model, z poprawnie dobranymi i szczegółowo opisanymi metodami.

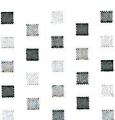
W tej części recenzji mam uwagę odnośnie opracowania wyników. Ponieważ wszystkie eksperymenty były zaplanowane w podobny sposób (badano te same substancje, stężenia, czas ekspozycji, tkanki), byłoby bardzo korzystne gdyby Kandydatka pokusiła się o przeprowadzenie wspólnego dla wszystkich parametrów opracowania statystycznego. Sądzę, że takie opracowanie mogłoby znaleźć się w części wstępnej i dałoby podstawę do generalizacji wszystkich wyników i statystycznego poparcia wyciągniętych wniosków. Sądzę, że przeprowadzenie analizy efektów głównych oraz interakcji, a także analiza PCA (lub choć zbadanie korelacji między badanymi parametrami) dodałoby wartości całej pracy. Chciałabym poznać opinię Kandydatki w tej kwestii.

Kolejne pytanie związane jest ze sposobem podania GA jakim była iniekcja. Przyznam, że w przypadku badania substancji o potencjalnym zastosowaniu jako bioinsektycydy nie jest to popularny schemat postępowania. Myślę, że większość recenzentów czytających manuskrypty pyta lub zapyta o tą kwestię. Doktorantka wyjaśniła w pracy powody zastosowania takiej drogi ekspozycji na GA oraz podała potencjalne korzyści jakie chciała osiągnąć. Jakkolwiek, chciałabym aby Kandydatka pokrótce przedstawiła prawdopodobne losy GA w przypadku innej ekspozycji – oprysku lub podania drogą pokarmową. Jakie czynniki mogą ograniczać przedostawanie się badanych substancji do organizmu, tym samym zmniejszając ich stężenie w tkankach? Istnieją przypuszczenia, że mikrobiota jelitowa może, przynajmniej u myszy, metabolizować GA, w tym CHA, SOL i TOM, ograniczając wchłanianie i narażenie na te związki. Czy Kandydatka mogłaby zaproponować schemat doświadczenia, który pozwoliłby sprawdzić znaczenie mikrobioty jelitowej u owadów w omawianym aspekcie? Jak należałoby zaplanować eksperymenty aby opisać zależności pomiędzy dawką GA podaną w pokarmie a stężeniem w jelitach i następnie w tkankach?

5

Podsumowanie

Stwierdzam, że mgr Magdalena Winkiel posiadała bardzo dobre umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Potrafi zidentyfikować i przedstawić problem badawczy, sformułować cele, zaplanować doświadczenia i dobrać właściwe metody, a następnie opracować wyniki i poddać je dyskusji. Przedstawione powyżej uwagi oraz pytania są jedynie motywem do podjęcia dyskusji naukowej i rozbudzenia wyobraźni badaczki, jaką niewątpliwie już jest Pani Magdalena Winkiel.

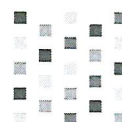




Oryginalność rozwiązania problemu badawczego i wartość merytoryczna rozprawy

W pierwszym artykule włączonym do rozprawy doktorskiej Pani Magdalena Winkiel skupia się na ocenie oddziaływania wybranych glikoalkaloidów (GA) oraz ekstraktu z liści pomidora na metabolizm lipidów u *Tenebrio molitor*. We wstępie doktorantka zarysowuje problem badawczy, przedstawiając garść informacji na temat przemian lipidów w organizmie owadów oraz efektów działania wybranych GA u kilku, powszechnie badanych, gatunków owadów. Praca ta prezentuje nowe informacje w zakresie zmian stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, trójglicerydów, steroli i estrów a także aktywności wybranych enzymów związanych z przemianami lipidów. Dzięki zastosowaniu oryginalnego schematu doświadczenia możliwe było śledzenie zmian wybranych parametrów w zależności od ściśle określonej dawki (zastosowano iniekcję) i stężenia (badano dwa stężenia) oraz rodzaju GA, czasu ekspozycji (próby pobierano po 2 i 24 godzinach), typu tkanki (analizy wykonano w hemolimfie i ciele tłuszczowym). Szczególnie wysoko cenię zaplanowanie pomiarów w punktach czasowych, ponieważ dało to szansę na prowadzenie rozważań w zakresie dynamiki przemian i dystrybucji. Takie podejście jest stosunkowo rzadkie w tego typu badaniach. Eksperyment został zaprojektowany i przeprowadzony zgodnie ze standardami obowiązującymi w nauce. W efekcie analiz otrzymano pokazną porcję danych, których opracowanie i interpretacja zapewne wymagały sporego wysiłku. Doktorantka dołożyła starań by przedstawić wyniki przejrzysto i poradziła sobie z tym zadaniem całkiem dobrze. Jak pisałam powyżej, przy tak dużym zbiorze danych warto rozważyć wykonanie analizy PCA lub analizę efektów głównych, co wzmocniłoby wyciągnięte wnioski. Dyskusja jest profesjonalna i pełna ciekawych wątków. Szczególnie zainteresowała mnie, ostrożnie wysunięta przez Kandydatkę, hipoteza powstawania kanałów w błonach komórkowych przy wyższym stężeniu GA oraz zmiany płynności błony przy niższym stężeniu GA. Czy Doktorantka mogłaby nieco rozwinąć ten wątek?

W drugiej pracy Pani Winkiel przeanalizowała dystrybucję GA w tkankach *T. molitor*. Projekt eksperymentów był podobny do poprzedniego. Badano SOL i CHA w jednym stężeniu a pomiary wykonano w hemolimfie, jelicie i pozostałościach ciała larw (zawierających głównie ciało tłuszczowe), po 0,5, 1,5, 8 i 24 godzinach od iniekcji. Wstęp dobrze uzasadnia konieczność podjęcia badań. Cel pracy jest nowatorski i pozwala na pogłębienie wiedzy w zakresie dystrybucji, metabolizmu i tempa eliminacji GA z ciała larw *T. molitor*. Założenia tej pracy postrzegam za bardzo wartościowe i byłoby niezwykle korzystnie gdyby Doktorantka uzupełniła model i dodała inną, poza iniekcją, drogę narażenia – na przykład podanie GA wraz z pokarmem. Dostarczyłoby to unikalnych, kompleksowych wyników, które miałyby szansę stworzyć solidny pomost między Jej badaniami a badaniami innych autorów, stosujących głównie ekspozycję wraz z pokarmem. Rozumiem jednak ograniczenia co do obszerności planowanych badań i możliwości ich wykonania. Tak więc tę sugestię przedstawiam raczej jako inspirację do przyszłych badań. Dyskusja



przeprowadzona jest prawidłowo i jest powiązana z możliwą aktywnością enzymów detoksykacyjnych i ich dominującym znaczeniem w ciele tłuszczowym. W tej części pracy poruszony jest również wątek udziału mikroorganizmów w procesie przemian GA. W moim odczuciu, wątek ten mógłby być nieco bardziej rozwinięty i połączony z rozważaniami na temat różnic w sposobie podania – iniekcja a droga pokarmowa. W badaniu nie stwierdzono obecności produktów hydrolizy GA. Przypuszczenie jakoby larwy *T. molitor* posiadały specyficzne glikozydazy, które nie metabolizują GA jest ciekawe. Mogłoby to być powiązane z wysoką specjalizacją gatunku w zakresie rodzaju konsumowanego pokarmu, co, zwłaszcza w kontekście nadrzędnego celu pracy, jest bardzo cenne. Jakkolwiek, przeżywalność larw nie była istotnie obniżona, co – jak pisze Doktorantka – zachęca do rozważań na temat użytej dawki i czasu prowadzenia obserwacji, lecz również – jak sadzę – sposobu ekspozycji na GA.

Trzecia pozycja wchodząca w zbiór prac stanowiących podstawę do nadania stopnia doktora to manuskrypt złożony do Insect Sciences i opisujący efekty oddziaływania GA na glikolizę, cykl Krebsa i β -oksydację kwasów tłuszczowych u *T. molitor*. Schemat eksperymentu był spójny z poprzednimi, lecz badanymi parametrami był poziom ekspresji oraz aktywność enzymów zaangażowanych we wzmiankowane szlaki metaboliczne, a także poziom węglowodanów i wybranych aminokwasów. Ważnym osiągnięciem tej pracy jest stwierdzenie, że GA mogą zaburzać metabolizm energetyczny u *T. molitor* w zależności od rodzaju testowanej substancji, czasu oraz badanej tkanki. Opis materiałów i metod, ponownie, nie budzi zastrzeżeń a projekt badań jest oryginalny. Sposób opracowania wyników jest taki sam jak w poprzednio omawianych pracach. Ponownie, widzę uzasadnienie do przeprowadzenia analizy efektów głównych. W całej pracy odczuwam pewien niedosyt w kwestii odwołania się do wyników wcześniejszych prac prowadzonych przez Kandydatkę – zarówno we wstępie jak i w dyskusji. Część informacji zawartych w dyskusji (na przykład informacje o zasobach substratów energetycznych u owadów lub syntezie aminokwasów) ma charakter bardzo ogólny i lepiej nadaje się do wstępu. Również w dyskusji opisy uzyskanych wyników są zbyt obszerne. Przesunięcie lub pominięcie tych informacji uczyniłoby dyskusję bardziej spójną i skoncentrowaną na uzyskanych wynikach. Co ciekawe, w tym eksperymencie nie wykryto niektórych aminokwasów, które są uznawane jako niezbędne dla rozwoju larw. Autorka wiąże ten wynik z możliwością ich występowania w innych niż analizowane tkanki. Wydaje mi się to mało prawdopodobne i dość spekulatywne. Aczkolwiek, być może Autorka posiada argumenty, które mogą poprzeć tą hipotezę.

Ostatni manuskrypt jest poświęcony ocenie wybranych procesów antyoksydacyjnych u *T. molitor* po ekspozycji na GA. Celem było zbadanie wpływu tych samych jak w poprzednich pracach związków oraz ekstraktu z liści pomidora na ekspresję genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT) oraz aktywność tych enzymów, jak również ekspresję białek



szoku cieplnego (HSP70) i poziom malondialdehydu (MDA). Wstęp tej pracy zawiera sporo podstawowych informacji, które są nieco zbyt obszernie opisane (na przykład kwestie reaktywnych form tlenu, aktywności SOD lub znaczenia HSP). W tej części wystarczające byłoby zasygnalizowanie tematu i odesłanie czytelnika do kilku artykułów przeglądowych. Wydaje mi się również, że byłoby korzystne gdyby Kandydatka silniej nawiązała do wyników poprzednich prac i spróbowała zasygnalizować, że poszukuje zależności między procesami antyoksydacyjnymi a realną zawartością GA w tkankach, zawartością lipidów i innych substratów oraz zmianami w badanych szlakach metabolicznych. Przedstawione we wstępie informacje są poprawne pod względem merytorycznym. W tym miejscu zachęcam jedynie Kandydatkę do takiej rekonstrukcji wstępu, która podkreśli unikalny charakter całości badań i sprawi, że ta część Jej pracy będzie wyraźnie osadzona w kontekście, co może wyróżnić ją od wielu innych prac opisujących procesy antyoksydacyjne u owadów. Również w tym manuskrypcie opis eksperymentów i metod jest bardzo szczegółowy i daje dobre wyobrażenie o zakresie prowadzonych prac. W zakresie konstrukcji eksperymentu jest nowatorski. Także opis wyników jest szczegółowy i, podobnie jak w poprzednich pracach, zasługuje na bardziej syntetyczne opracowanie. Należy jednak podkreślić, że podejście zastosowane przez Panią Magdalenę Winkiel jest w pełni poprawne i stosowane w tego typu pracach. W dyskusji przydatne byłyby także nieco szersze rozważania w kontekście ekspresji/aktywności badanych parametrów a przeżywalności larw, która nie była zaburzona.

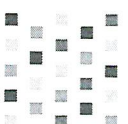
Podsumowanie

Analiza manuskryptów stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora pozwala stwierdzić, że badania prowadzone przez Panią mgr Magdalenę Winkiel dotyczą aktualnych zagadnień naukowych. Ich wartość merytoryczna jest znacząca, a oryginalność rozwiązania problemów badawczych jest widoczna w zakresie projektowania badań, opracowania i interpretacji wyników.

8

Ocena formalna

Pod względem formalnym praca jest przygotowana starannie. Opracowanie zawiera wszystkie potrzebne informacje i napisana jest poprawnym językiem. Drobne błędy interpunkcyjne i edycyjne pozostają bez znaczenia dla wartości merytorycznej całego opracowania.



Wniosek końcowy

Pozytywnie oceniam rozprawę i sędzę, że Kandydatka posiada niezbędną wiedzę, umiejętności i kompetencje do prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny Winkiel, ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie „nauki biologiczne”, do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

