



dr hab. Mirosław Nakonieczny, prof. UŚ

Katowice, 16.08.2019.

[mirosław.nakonieczny@us.edu.pl](mailto:mirosław.nakonieczny@us.edu.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Walkowiak-Nowickiej  
„Aktywność fizjologiczna peptydów jamamarinu i alloferonu oraz ich peptydomimetyków  
u chrząszcza *Tenebrio molitor* L”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Walkowiak-Nowickiej została wykonana Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod promotorskim nadzorem prof. dr. hab. Grzegorza Rosińskiego. Manuskrypt składa się z sześciu kanonicznych rozdziałów zamieszczanych w tego typu opracowaniach: Wstępu, Celów pracy, Materiałów i Metod, Wyników oraz Dyskusji. Całość kończy krótki, zwięzły rozdział „Podsumowanie i wnioski” oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. W przypadku włączenia tabel i rycin (wydruków fotografii) do zasadniczych rozdziałów manuskryptu zbędnym wydaje się ponowny spis rycin i tabel, jeśli nie zawiera on przekierowania do strony manuskryptu. Ostatni rozdział to „Bibliografia” zawierająca wszystkie cytowane publikacje w liczbie 165. Bardzo celną inicjatywą są: spis zastosowanych w manuskrypcie skrótów, co ułatwia czytanie tekstu, jak i dołączenie do manuskryptu cyfrowej wersji wykonanych fotografii spod mikroskopu, które pozwalają na bardziej precyzyjną analizę uzyskanych przez doktorantkę obrazów zmian w strukturze układu rozrodczego i immunologicznego wybranego modelu badawczego – *Tenebrio molitor*. Praca napisana w całości w języku polskim (oprócz anglojęzycznego, dwustronicowego streszczenia) jest przykładem użycia poprawnej polszczyzny i co należy podkreślić, prawie że nie zawiera skrótów myślowych, laboratoryjnego żargonu i kalek językowych, tak częstych w polskiej nowomowie młodych adeptów nauki. Edycja manuskryptu także nie budzi zastrzeżeń, jest przejrzysta i konsekwentna. Reasumując, z formalnego punktu widzenia, treść przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej w pełni odpowiada jej tytułowi.

Oceniana rozprawa doktorska została zawarta przez doktorantkę na 123 stronach manuskryptu o dobrze zbalansowanych proporcjach objętości poszczególnych rozdziałów. Znajdujemy w niej merytorycznie cenną, krótką informację o wybranych do badań dwu owadzych hormonach: jamamarinie i alloferonie – oligopeptydach wyizolowanych po raz pierwszy odpowiednio z ćmy *Antheraea yamamai* i muchówki *Calliphora vicina*. Pozwala ona na powiązanie raczej hermetycznej wiedzy o tych biologicznie czynnych związkach z innymi, bardziej powszechnie znanymi hormonami owadów, w czym z pewnością pomagają wcześniejsze podrozdziały wstępu. W rozdziale tym doktorantka daje także przejrzystą definicję oraz podstawową informację o peptydomimetykach. Jest to o tyle istotne, że zasadniczym elementem układu doświadczalnego zaproponowanego w pracy jest nie tylko testowanie obu oligopeptydów, ale wykorzystanie wzbogaconych o reszty kwasów tłuszczowych pochodnych jamamarinu i alloferonu.

Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach  
ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice  
tel. 32 359 11 74, fax 32 258 77 37





Podrozdział o budowie i funkcji układu rozrodczego samic *T. molitor* jak i oogenezie i embriogenezie u tego gatunku sensownie zamyka część wstępną dysertacji, jednoznacznie wskazując na podmiot badawczy doktorantki.

Planując swój panel badawczy doktorantka dokonała kilku istotnych i trafnych wyborów. Wybrała nie tylko dwa oligopeptydy, na temat których wiedza jest stosunkowo niewielka, to na dodatek są to związki biologicznie czynne, dla których w kilku (cytowanych) eksperymentach wykazano już istotne działanie, zarówno stymulujące jak i inhibujące, na różnorodne funkcje u ssaków. Tym samym praca, która w swojej koncepcji eksperymentu wykonana jest na modelu badawczym – *Tenebrio*, nawiązuje do szeroko propagowanej idei wykorzystania związków biologicznie czynnych izolowanych z bezkręgowców w potencjalnych postępowaniach terapeutycznych dla człowieka. Przedstawione w niej wyniki, mimo wszystko uzyskane w eksperymencie na owadach, mogą mieć w przyszłości brzemiennie skutki także w naukach medycznych. Patrząc na przedstawioną dysertację z tej perspektywy praca nabiera dodatkowego, jakże ważnego wymiaru. Dodatkowo doktorantka zwraca we wstępie uwagę na jeszcze jeden ważny aspekt swoich badań – wykorzystanie obu związków i ich pochodnych, jako specyficznych gatunkowo bioinsektycydów, co jest szczególnie ważne w świetle kroczącej porażki tradycyjnych związków chemicznych używanych w walce ze szkodnikami ze względu na nabywanie przez nie coraz większej odporności. Stąd też te dwa ważne, wyartykułowane przez doktorantkę we wstępie, przesłania wydają się być ważnym elementem koncepcyjnym pracy, które w pełni upoważniają do podjęcia tego typu badań. W tym kontekście postawione przez autorkę cele pracy, na które (co należy jednoznacznie stwierdzić) autorka daje jednoznaczną odpowiedź we wnioskach, można uznać za cele robocze. Szkoda, że w rozdziale „Dyskusja” autorka zbyt powściągliwie podeszła do wyciągania wniosków, ewentualnie postawienia hipotez, które można wyciągnąć na podstawie uzyskanych wyników a nawiązujących do dwóch wyżej wspomnianych idei. Tym samym autorka nie postawiła kolejnych hipotez badawczych, które z całą pewnością w przyszłości można byłoby przetestować wykorzystując oba oligopeptydy.

Autorka, cytując liczne źródła, podkreśla, że w wielu przypadkach wyniki badań dla obu oligopeptydów są wysoce niewystraszające i często niejednoznaczne, czego przyczynę można upatrywać w zależnościach między dawką a uzyskanym efektem biologicznym, czy też specyficznością gatunkową, na których badano oba związki. Stąd też dla całego eksperymentu kluczową była decyzja o wybraniu trzech różnych ich stężeń w zakresie od  $10^{-5}$  do  $10^{-13}$  M. Tym samym autorka uzyskała możliwość przetestowania zależności między dawką a wywołanym efektem. Dodatkową wartością pracy jest jednoczesne przetestowanie odpowiednio 4 dla alloferonu i 1 dla jamamarinu peptymimetyków – co w nawiązaniu do podanych we wstępie danych literaturowych o zróżnicowanym efekcie działania pochodnych związków biologicznie czynnych w porównaniu z substancją wyjściową, pozwoliło autorce od razu na przetestowanie skutków biologicznych po ich intoksykacji u testowanych owadów i porównania wyników z tymi uzyskanymi dla peptydów natywnych.

Cały zaproponowany w pracy układ eksperymentalny jest klarowny i jednoznaczny. Doktorantka w pełni wykorzystwała długoletnie doświadczenie profesora Rosińskiego i jego zespołu w badaniach różnorodnych hormonów i ich mimetyków na funkcje biologiczne różnych gatunków owadów, a głównie u najczęściej







wykorzystywanego w zespole modelu badawczego jakim jest *T. molitor*. Wykorzystane przez doktorantkę metody dobrze świadczą o opanowaniu warsztatu badawczego jakim dysponuje zespół, co powinno charakteryzować każdego przyszłego doktora. Doktorantka dobrze wykorzystwała klasyczne metody badawcze stosowane w tego typu badaniach, zarówno te związane z mikroskopią świetlną, analizami enzymatycznymi jak i biotestami, w tym przypadku hemocytowym, stosunkowo trudnym ze względu na umiejętność sprawnej klasyfikacji analizowanych hemocytów, co wiąże się z nabyciem pewnego doświadczenia. Doktorantka zastosowała także metody stosowane w biologii molekularnej – łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), jak i jej odmianę, real-time PCR. Szkoda tylko, że uzyskane tymi metodami wyniki zostały nieomal pominięte w dyskusji i końcowych wnioskach. Zastosowana analiza statystyczna uzyskanych wyników jest dobrana poprawnie i w pełni wystarczająca, aczkolwiek szkoda, że doktorantka nie dokonała jeszcze kilku interesujących korelacji uzyskanych wyników, nie tylko między stężeniami dla zastosowanych oligopeptydów i ich analogów, ale np. między owizpozycją i wylegalnością. Być może należało się zastanowić nad celowością zastosowania mikroskopii elektronowej do analizy nabłonka folikularnego owarioli, jeśli było uzasadnione podejrzenie o wywołaniu przez oba peptydy zmian w tej strukturze.

Dwuwątkowy rozdział „Dyskusja” jest bogaty w analizę swoich wyników na tle podobnych, uzyskanych przez innych badaczy. Ma jednak dwa istotne braki. Brak w niej przedyskutowania swoich wyników uzyskanych dla analizy ekspresji genu witellogeniny, tym bardziej, że piśmiennictwo na ten temat jest bardzo bogate. Zbyt słabe jest także wyartykułowanie swoich wyników w kontekście dwu idei zaprezentowanych we wstępie – alloferon i jamamarin jako cząsteczki biologicznie aktywne w medycynie oraz jak biopestycydy. Jedno końcowe zdanie na ten temat uważam za wysoce niewystraszające. Doktorantce zabrakło pewności siebie, aby spróbować interpolować uzyskane wyniki na inne dziedziny nauk przyrodniczych niż tylko biologia owadów. Natomiast w rozdziale tym bardzo cenne są sumujące uzyskane wyniki tabele zbiorcze – od 5 do 9. Szkoda, że w takiej postaci tabelarycznej na tle własnych wyników nie zostały przedstawione dane z innych, cytowanych publikacji – byłaby to pełna infografika analizowanego problemu.

Podsumowując przedstawione przez doktorantkę wyniki, można stwierdzić, że doktorantka wykazała:

- immunomodulujące działanie alloferonu i jamamarinu, i ich pochodnych na liczebność hemocytów *T. molitor*, jak i na dynamikę ich apoptozy oraz aktywność oksydazy polifenolowej i procesu nodulacji,;
- gonadotropowe właściwości obu związków na objętość oocytów terminalnych, proces owulacji i owipozycji;
- działanie embriotoksyczne na rozwój embrionalny tego gatunku;
- zwiększenie ekspresji genu witellogeniny w tkance ciała tłuszczowego i jajnika.

Lektura dostarczonego manuskryptu pozwala także na wniesienie kilku uwag, zarówno o charakterze merytorycznym jak i technicznym.

Do tych pierwszych można zaliczyć niedomówienia wynikające z często bardzo skrótowego opisu zastosowanych metod. Nie wszystko co jest oczywiste dla autorki, jest oczywiste dla czytającego, a problem





się pogłębia, gdybyśmy na podstawie opisu z tego rozdziału chcieli odtworzyć cały eksperyment. Pierwszą wątpliwość budzi liczba osobników w pojemniku hodowlanym, kiedy istotne są uwagi na temat stosunku samców do samic jako 1:1 oraz zapobieganiu kanibalizmowi – w takim razie informacja o pojemności (powierzchni) pojemnika i zagęszczeniu osobników wydaje się być kluczowa. Kolejne pytanie dotyczy podrozdziału „Synteza peptydów i analogów”, który sugeruje udział doktorantki w tym procesie. Jednak ostatni akapit stawia tutaj znak zapytania. Istotnym jest także pytanie, czy synteza analogów była uzgadniana i robiona na zamówienie, ze względu na interesujące doktorantkę ich potencjalne właściwości biologiczne (mowa o analogach). Mając na uwadze rycinę 2 doktorantka mogła jednoznacznie zadeklarować w rozdziale M&M udział w konkretnych etapach projektowania i syntezy analogów. Najczęściej w opisie metodyk brakuje informacji o liczbie powtórzeń, które były podstawą do obliczeń lub wykonywania dokumentacji fotograficznej, jak w przypadku biotestu hemocytowego, morfologii jajnika czy liczby osobników do oceny aktywności oksydazowej. W tym ostatnim przypadku jest tylko informacja o powtórzeniach technicznych – 3 na osobnika. Inne pytanie, które można postawić to, czy do oceny zmian jajnika, nabłonka folikularnego, gdzie jak sama doktorantka pisze „były oceniane” została zastosowana jakaś skwantyfikowana skala porównawcza? Interesującym jest, dlaczego w procedurze badawczej liczbę składanych jaj analizowano dla samic iniekowanych oligopeptydami w 1 dniu życia imago, a dla oszacowania rozwoju embrionalnego i wylęgłości iniekowano samice 4 dniowe. Zastosowanie takiej samej procedury iniekcji pozwoliłoby skorelować owipozycję z wylęgłością dla poszczególnych związków i ich stężeń. Na stronie 50 w opisie Indeksu apoptycznego dla C16-jamamarinu powinno być 12,5% dla stężenia  $10^{-9}$  M (jest  $10^{-5}$  M) – w tabeli 4 wartości są wpisane poprawnie. W opisie rycin 15, 16, 17, 18 oraz 20 i 21 jak i 31 i 32, jeśli na rycinach jest zaznaczone odchylenie standardowe powinna być informacja o N z którego to odchylenie policzono. Ponadto dla ryciny 16 skopiowano z podpisu z ryciny 14 „alloferon”, powinien być „jamamarin”. Co oznacza wpis dla ryciny 33 i 34 – „współczynnik korelacji r Pearsona”? Należało go podać lub zaznaczyć istotność lub jej brak. W rycinach tych należało także podać liczbę jaj wziętych do analizy, ponieważ oznaczenie osi Y nie daje nam żadnego punktu odniesienia.

Doktorantka w rozdziale opisującym użyte metodyki wskazała na zastosowanie do swoich analiz metody PCR. Nie ma żadnej informacji na temat produktów uzyskanych dzięki tej metodzie, a które to poddano zsekwencjonowaniu. Jaki był wynik porównania uzyskanego produktu z publicznymi bazami danych o których doktorantka wspomina. Proszę także podać, co leżało u podstaw wyboru genów syntaksyny i białka rybosomalnego 13a jako genów referencyjnych dla witellogeniny.

Oddzielną sprawą jest zastosowany sposób cytowania. Autorka używa rzadko stosowanego schematu – pisanie w tekście tylko pierwszego nazwiska, jeśli autorów było dwu lub wielu. Brak dodatkowych oznaczeń przy dacie powoduje, że część wieloautorskich publikacji z tego samego roku, kiedy pierwszy autor jest ten sam, jest nie do odróżnienia w spisie literatury. Tylko z kontekstu cytowania można się domyślić o którą publikację doktorantce w konkretnym przypadku chodzi – np. Kuczer i in. 2013 albo Kim (dwa różnych autorów!) 2008. Także zbyt częste wydaje się powtarzanie tej samej cytacji publikacji wiele razy w tym samym akapicie, jak np. na stronie 21-22. Brak jest także w wykazie cytacji Sorrentino i wsp. (2002), czy Rosiński, 2011.







Z nielicznych błędów stylistycznych, to: skrót od *species* – sp. lub spp. (dla liczby mnogiej) przy nazwie rodzajowej nie pisze się w kursywie, podobnie nie pisze się w kursywie nazw łacińskich wyższych kategorii systematycznych niż rodzaj. Na stronie 24 doktorantka użyła zwrotu „...pierwszego instaru diapauzujących...”, raczej powinno być stadium, angielskie słowo „Instar” nie weszło jeszcze do języka polskiego i jest przykładem naukowego żargonu. Innym błędem jest określenie przedziału składanych dziennie jaj (strona 32) od 0 do 15 – nie można złożyć 0 jaj. Elementy, które mogłyby poprawić i tak bardzo dobrą edycję tekstu to zbędne użycie powiększonej i wyfuszczonyj czcionki do podpisów rycin i nagłówków tabel – raczej stosuje się zabieg odwrotny, mniejsza czcionka i interlinia.

Wnioski końcowe.

Oceniana rozprawa doktorska, mimo także uwag krytycznych, które w żaden sposób nie podważają całego projektu badawczego i jego wartości merytorycznej, a raczej wskazują na potknięcia i niedomówienia, daje wszelkie podstawy ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych. Doktorantka wykazała się umiejętnością sformułowania ciekawego tematu badawczego, powiązania w jedną całość kilku problemów badawczych na różnym poziomie organizacyjnym organizmu, dla których próbuje znaleźć wspólny mianownik. Konkludując, można stwierdzić, że wyniki w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a autorka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej, jak i udowodniła posiadanie umiejętności prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim (Dz. U. 2018, poz. 261) i zgodnie z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 roku – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1669) stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2017, poz. 1789) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie kandydatki na stopień doktora, mgr Karoliny Walkowiak-Nowickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Katowice, 16.08.2018 r.



