



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
dr hab. Dariusz Latowski

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Majewskiej

pt. „Zaburzenia procesu fotosyntezy jako istotny element fitotoksyczności diklofenaku”

Promotorem jest Pani dr hab. Anna Aksmann, prof. UG

1. Podstawa prawna: pismo Pani prof. dr. hab. Joanny N. Izdebskiej, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 11 października 2024 roku dotyczące przygotowania poniższej recenzji.

2. Ogólna ocena

Rozprawę doktorską Pani mgr Moniki Majewskiej oceniam jako bardzo dobrą i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

3. Ocena szczegółowa – najmocniejsze i najsłabsze strony pracy

Na uznanie zasługuje już sama, oryginalna i ważna a zarazem dobrze uzasadniona, tematyka badań obejmująca hamujący wpływ niesteroidowego leku przeciwzapalnego, diklofenaku, na jasną fazę fotosyntezy. W debatach na temat zanieczyszczenia środowiska mówi się wiele o lekach, szczególnie antybiotykach, ale względnie mało uwagi poświęca się wpływowi tych leków na rośliny, z uwzględnieniem ich wpływu na fotosyntezę – podstawę produkcji pierwotnej biomasy na Ziemi. Doceniam zainteresowanie Doktorantki wspomnianą tematyką. Doceniam też, że zainteresowania te, które są zwieńczone ocenianą pracą doktorską, oparte są na solidnych fundamentach analizy danych literaturowych, które wskazują, że toksyczny wpływ diklofenaku na fotoautotrofy może być przejawem zaburzenia jasnej fazy fotosyntezy, choć bez podania mechanizmu, który by to zaburzenie mógł wywoływać. W takiej perspektywie zasadnym jest cel jaki Doktorantka wyznaczyła swoim badaniom, czyli poznanie tego mechanizmu.

Rozprawa doktorska opiera się na trzech, spójnych publikacjach eksperymentalnych, z których dwie ukazały się w bardzo prestiżowych czasopismach. Poza istotnym wkładem naukowym osiągnięć doktoratu we współczesny stan wiedzy z zakresu ekotoksykologii, fizjologii, biochemii i genetyki roślin przedstawione do oceny prace wskazują wzorowy przebieg rozwoju dojrzałości naukowej

Doktorantki. Pierwsza praca stanowi znakomite wprowadzenie w tematykę badań, z opracowaniem modelu badawczego z *Chlamydomonas reinhardtii*, doborem stężeń badanych substancji i zwróceniem uwagi na najistotniejsze parametry wpływu tych substancji. Parametry te zostały wybrane zgodnie z doświadczeniem eksperckim zespołu naukowego, w którym Doktorantka realizowała badania. W drugiej pracy opracowany model zostaje udoskonalony, a badane parametry są bardziej różnorodne i wykorzystując szerszy wachlarz metod obejmują w większym stopniu, niż w pracy pierwszej, poziom molekularny, konsekwentnie dążąc do próby wyjaśnienia tego, co zaobserwowano w pierwszej publikacji. Z kolei w trzeciej pracy Doktorantka skupia się na korelacji analiz wydajności aparatu fotostatycznego z efektem diklofenaku na morfologią wyizolowanych chloroplastów. Badania prowadzono, więc zarówno na *C. reinhardtii* należącym do zielenic jak i chloroplastach szpinaku, jako przedstawicieli roślin naczyniowych. Jest to i zaleta i wada rozprawy. Zaleta, bo poszerza perspektywę wpływu badanego związku na przedstawicieli dwóch ważnych grup fotoautotrofów, co jest wartościowe, bo pozwala na analizę porównawczą wyników badań i zwiększa znaczenie poznawcze wyników. Wada, bo niejako skutkuje zaburzeniem spójności ujętych w rozprawie badań pod względem analizowanego organizmu. Należy przy tym podkreślić, że spójność ocenianych prac jest mimo to bardzo dobrze zachowana m. in. przez badany związek i analizowane parametry fotosyntezy. Ciekawi mnie, jednak dlaczego w ostatnim etapie badań nie zdecydowano się na analizę wpływu diklofenaku na chloroplasty *C. reinhardtii* zamiast na chloroplasty szpinaku.

Streszczenie rozprawy jest napisane bardzo dobrze. Znakomicie oddaje istotę wszystkich trzech publikacji i jest skupione przede wszystkim na tych aspektach tych publikacji, które były wykonywane przez Doktorantkę samodzielnie i są ujęte w tytule rozprawy. Jediną uwagą krytyczną, która nasunęła mi się w trakcie recenzowania jest sugestia, że w przyszłości wskazane byłoby bardziej precyzyjne przestrzeganie spójności wniosków i wartości podawanych w poszczególnych publikacjach i streszczeniu do rozprawy doktorskiej. Mam tu na myśli np. hamowanie wydzielania tlenu w obecności diklofenaku i atrazyny. W pierwszej publikacji wskazano, że pod wpływem diklofenaku hamowanie fotosyntetycznej produkcji tlenu wynosi 30% a pod wpływem atrazyny 40%, podczas, gdy w streszczeniu rozprawy napisano „W przypadku obydwu substancji intensywność fotosyntezy, szacowana na podstawie ilości produkowanego przez komórki tlenu, spadła o około 40%.”

Wstępy wszystkich publikacji bardzo dobrze wprowadzają w tematykę badawczą zarówno w zakresie ogólnym poruszanego tematu jak i w poszczególnych aspektach każdej z prac. Wstęp pierwszej publikacji zawiera również bardzo dobrze osadzone w danych literaturowych uzasadnienie wyboru *C. reinhardtii* jako organizmu modelowego do badań wpływu diklofenaku na organizm i z zastosowaniem atrazyny jako substancji referencyjnej. Nieco intrygująco brzmi wskazanie, że jednym z mechanizmów działania toksycznego diklofenaku na komórki zwierzęce jest blokowanie niektórych kanałów kationowych, których analogi znaleziono również w komórkach roślin i glonów. Fragment ten zostaje podsumowany stwierdzeniem, że świadczy to o tym, że zwierzęta i rośliny mają

receptory i przemiany metaboliczne, poprzez które diklofenak może działać na te organizmy toksycznie. Jest to w zasadzie jedyna jasno postawiona w tej publikacji hipoteza badawcza, ale niestety nie weryfikowana bezpośrednio eksperymentami zrealizowanymi w tej pracy, bo żaden z opisanych w tej pracy eksperymentów nie dotyczył bezpośrednio wpływu diklofenaku na kanały kationowe, czy szlaki metaboliczne wspólne dla roślin i zwierząt. Powrót do tego wątku w dyskusji omawianej pracy ponownie intryguje ale jednocześnie wznosi dyskusje na wyższy poziom wskazując interesujące kierunki dalszych badań, związanych właśnie z wpływem diklofenaku na kanały wapniowe, a szczególnie na kanały podobne do receptorów glutaminianu (GLR) i poprzez nie na funkcjonowanie fotosystemu II. To bardzo wartościowe spostrzeżenia. Ciekaw jestem, czy Doktorantka zna aktualny stan wiedzy w tym zakresie, na ile to co opisano w dyskusji publikacji nr. 1 pod kątem wpływu diklofenaku na PSII poprzez GLR i zaburzenia poziomu wapnia było weryfikowane przez innych autorów, a jeśli było, co te badania wykazały. Mimo wszystko we wstępie publikacji nr 1 właściwej byłoby konkretniej wskazać cel i tym samym hipotezę badawczą weryfikowaną w ramach tej publikacji. W moim odczuciu wstęp publikacji pierwszej byłby lepszy, gdyby wyraźnie odróżnić podane wartościowe informacje ogólne od dobrze sprecyzowanej hipotezy roboczej lub dobrze skonkretyzowanego celu badawczego. Na uwagę zasługuje fakt, że powyższe uwagi mają charakter bardziej dydaktyczny niż merytoryczny, a przede wszystkim istotne jest to, że w streszczeniu rozprawy doktorskiej ten aspekt nie budzi żadnych zastrzeżeń – cel i hipoteza robocza będące przedmiotem publikacji nr 1 są ujęte wzorowo.

Niewątpliwym atutem publikacji nr 1 jest:

- opracowanie układu do badań wpływu diklofenaku na fluorescencyjnie monitorowane działanie aparatu fotosyntetycznego *C. reinhardtii*;
- wyznaczenie wartości stężeń diklofenaku hamujących wzrost populacji glonów *C. reinhardtii* w tym wartości EC50;
- wnikliwa analiza wpływu diklofenaku na wydajność i stan aparatu fotosyntetycznego modelowej zielnicy;
- dokonanie analizy porównawczej skutków wpływu atrazyny, której mechanizm oddziaływania na aparat fotosyntetyczny jest znany, ze skutkami wpływu diklofenaku i stwierdzenie na tej podstawie, że diklofenak najprawdopodobniej wpływa bezpośrednio na centra reakcji PSII;
- wykazanie, że zarówno diklofenak jak i atrazyna wywołują wzmożoną produkcję nadtlenu wodoru w komórkach glonów, przy czym efekt działania atrazyny w tym względzie jest silniejszy niż diklofenaku oraz, że diklofenak w przeciwieństwie do atrazyny nie zwiększa istotnie aktywności peroksydazy askorbinianowej.

Nie jest dla mnie do końca jasne, na jakiej podstawie Doktorantka ogranicza aktywność peroksydazy askorbinianowej tylko do chloroplastu, skoro wiadomo, że enzym ten funkcjonuje także w innych przedziałach komórki, a ostatnio, tj. w 2023 roku, przypisano mu nawet nowe funkcje biologiczne.

Jest to dla mnie o tyle interesujące, że staje się podstawą do stwierdzenia, że „produkcja H₂O₂ pod wpływem diklofenaku nie zachodzi, tak jak ma to miejsce w przypadku działania atrazyny, głównie w chloroplastach”. Moim zdaniem na podstawie wyników opisany w ramach publikacji nr 1 nie można wyciągnąć takiego wniosku.

Uważam też, że pewnym nadużyciem interpretacyjnym w publikacji nr 1, przywołanym również w streszczeniu rozprawy, jest powiązanie wzrostu niefotochemicznego wygaszania fluorescencji, który obserwowano w *C. reinhardtii* pod wpływem diklofenaku z cyklem ksantofilowym ze względu na wzrost poziomu karotenoidów. Napisano „Ponadto można było przypuszczać, że w rozpraszaniu nadmiaru energii wzbudzenia brał udział cykl ksantofilowy (Demmig -Adams i in., 1996), o czym świadczył pośrednio wzrost zawartości karotenoidów w komórkach poddanych działaniu DF.” Sam wzrost zawartości karotenoidów nie wskazuje, nawet pośrednio, na to że w rozpraszaniu nadmiaru energii wzbudzenia bierze udział cykl ksantofilowy – powinno się dokonać analizy porównawczej zawartości barwników cyklu ksantofilowego, czyli zeaksantyny i anteraksantyny względem wiolaksantyny i składowych NPQ w kontroli i glonach traktowanych diklofenakiem.

Na podstawie oświadczeń do publikacji nr 1 nie jestem w stanie precyzyjnie stwierdzić, które doświadczenia dotyczące diklofenaku były realizowane przez Doktorantkę, ponieważ dwie pozostałe Autorki, które wykonywały eksperymenty opisane w tej pracy również nie sprecyzowały dokładnie jakie badania były przez nie realizowane. W mojej ocenie, uwzględniając fakt, że Doktorantka jest pierwszą autorką publikacji zakładam, że miała ona rolę wiodącej badaczki zarówno w badaniach z atrazyną, jak i diklofenakiem. W przyszłości, jednak lepiej doprecyzować tego typu informacje.

Publikacja nr 2 jest bardzo dobrą kontynuacją badań zrealizowanych i opisanych w pracy nr 1. Opracowany model zostaje udoskonalony o zastosowanie warunków hodowli pozwalających na uzyskanie synchronicznej populacji *C. reinhardtii*, w której wszystkie komórki znajdują się w tej samej fazie rozwojowej. Dzięki tej synchronizacji potraktowanie hodowli zarówno atrazyną jak i diklofenakiem na początku cyklu komórkowego pozwoliło na przeanalizowanie wpływu badanych substancji na poziomie pojedynczej komórki i zaobserwowanie wczesnych efektów ich działania.

Do najważniejszych osiągnięć opisanych w publikacji nr 2 a związanych z badaniami zrealizowanymi wg. oświadczenia przez Doktorantkę zaliczam:

- wykazanie zmian w poziomie chlorofili a i b skorelowanych z ekspresją badanych genów, w obecności testowanych substancji;
- wykazanie, poprzez profesjonalną analizę parametrów krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu a, że chociaż obie substancje szybko przenikają do komórek i docierają do chloroplastu, to mechanizm ich działania na aparat fotosyntetyczny i skutki zaburzenia funkcji tego aparatu są odmienne;
- jednoznaczne potwierdzenie niższej toksyczności diklofenaku od atrazyny na hamowanie fotosyntezy.

Ponadto istotny wkład tej publikacji w rozwój badań w omawianym temacie dostrzegam w:

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

- wykazaniu zróżnicowanego wpływu atrazyny i diklofenaku na ekspresję wybranych genów, w tym kodujących enzymy odpowiedzialne za neutralizację reaktywnych form tlenu, których podwyższona ekspresja jest uważana za marker stresu oksydacyjnego tj. *FSD1* kodujący żelazową dysmutazę ponadtlenkową (Fe-SOD), *MSD3* kodujący manganową dysmutazę ponadtlenkową (Mn-SOD) oraz *APX1* kodujący peroksydazę askorbinianową (APX);

- wykazaniu różnicy w objętości komórek, które były istotnie znacząco większe po traktowaniu diklofenakiem – wynik tej zinterpretowano, moim zdaniem bardzo słusznie, że diklofenak, w przypadku badanej zielenicy, może być czynnikiem hamującym podziały komórkowe podobnie jak w przypadku komórek ssaków. Wniosek ten nie wpisuje się ściśle w temat rozprawy, bo wykracza poza fotosyntezę, ale zwraca uwagę na szeroki horyzont znaczenia prowadzonych badań, w których Doktorantka uczestniczyła.

W przypadku badań opisanych w publikacji nr 2 ponownie wracam do pytanie dotyczącego utożsamiania peroksydazy askorbinianowej z chloroplastami. W tej publikacji wskazano już wprawdzie cytację, dotyczącą lokalizacji komórkowej tego enzymu w *C. reinhardtii*, ale choćby w świetle tej cytacji zastanawia mnie dlaczego do analiz wybrano gen *APX1*, który zgodnie z moją wiedzą może być zlokalizowany nie tylko w chloroplastach ale też w mitochondriach, zamiast genu *CrAPX4*, którego specyficzna lokalizacja w chloroplastach jest bardziej prawdopodobna.

Ciekawi mnie również, jak Doktorantka interpretuje fakt, że w komórkach traktowanych diklofenakiem poziom transkryptów genów kodujących Mn-SOD obniżył się, a poziom transkryptu genu kodującego Fe-SOD wzrósł, ale dopiero po kilku godzinach. Czy można ten wynik wiązać z udziałem poszczególnych organelli w odpowiedzi na działanie diklofenaku?

Publikacja nr 3 stanowi koronny dowód na wnikliwość i konsekwencje badawczą Pani mgr Moniki Majewskiej. W pewnym sensie publikacja ta w bardzo szeroki sposób nawiązuje do nurtującego mnie wątku, czy wyniki dotyczące APX świadczą tylko o poziomie i aktywności tego enzymu w chloroplastach, czy może też w innych przedziałach komórkowych. W ostatniej pracy Pani mgr Monika Majewska w badaniach wpływu diklofenaku na fotosyntezę dąży do eliminacji wszystkiego, co jest poza chloroplastem i szerokie spektrum badania prowadzi na chloroplastach wyizolowanych ze szpinaku. Pociąga to za sobą różne konsekwencje, jak np. konieczność zmiany dawki badanego związku. Niemniej jednak wybraną ścieżkę poznawczą można uznać za właściwą, choć może jednak te badania powinny być poprzedzone badaniami z wykorzystaniem chloroplastów *C. reinhardtii*. Ponadto, w wędrówce intelektualnej po meandrach doktoratu Pani mgr Moniki Majewskiej przyzwyczaiłem się już, że obok diklofenaku testowana była atrazyna. W tej części badań już jej nie zastosowano. Nie uważam, by zastosowanie atrazyny było w publikacji nr 3 konieczne, ale choć cały eksperyment byłby zapewne bardzo czasochłonny, to jednocześnie pozostaje ciekawość o to jakie wywołałyby skutki w chloroplastach szpinaku w porównaniu do skutków wywoływanych przez diklofenak.

Istotne osiągnięcia zaprezentowane w publikacji nr 3 i wpisujące się w doktorat Pani mgr Moniki Majewskiej to, w mojej ocenie:

- wykazanie, że zmiany w wydajności aparatu fotosyntetycznego szpinaku mają taki sam charakter jak te uzyskane dla całych komórek zielenicy *C. reinhardtii*, choć siła oddziaływania na chloroplasty wydaje się słabsza niż w przypadku całych komórek zielenicy, co można uznać za dowód na to, że toksyczne działanie diklofenaku na komórki obejmuje szkodliwy wpływ na fotosyntezę, ale z pewnością nie jest to jedyny mechanizm toksycznego działania tej substancji na cały organizm autofototrofa;
- udowodnienie, że diklofenak wpływa na strukturę chloroplastów, choć ten wpływ zaobserwowano niestety przy stężeniach wyższych niż, te z zakresu, który pierwotnie testowano do ustalenia dawki EC50
- wykazanie, że szkodliwe działanie diklofenaku na aparat fotosyntetyczny polega na jego niespecyficzej interakcji z błonami fotosyntetycznymi, skutkującej ich degradacją, zakłóceniem funkcjonowania łańcucha transportu elektronów i w konsekwencji obniżeniem wydajności fotosyntezy.

4. Wniosek końcowy

Rozprawa Pani mgr Moniki Majewskiej zatytułowana: „Zaburzenia procesu fotosyntezy jako istotny element fitotoksyczności diklofenaku” przygotowana pod opieką Pani Promotor, dr hab. Anny Aksmann, prof. UG, spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.)." tj.:

- stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego jakim jest przybliżenie molekularnego mechanizmu wpływu niesteroidowego leku przeciwzapalnego, diklofenaku, na jasną fazę fotosyntezy;
- prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne i specjalistyczną w zakresie fotosyntezy;
- świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na wszystkich jej etapach, od formułowania hipotez i planowania badań, po interpretację wyników i wyciąganie wniosków (Art. 13 pkt.1).

Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Majewskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

5. Wniosek o wyróżnienie pracy wraz z uzasadnieniem

Ponadto, zgodnie z Regulaminem Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UG wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Majewskiej.

Wyróżniający charakter rozprawy dostrzegam w następujących elementach:

- wyniki badań zostały opublikowane w trzech czasopismach o wysokiej punktacji;
- w każdej z tych opublikowanych prac Doktorantka jest pierwszą autorką;
- opublikowane prace bardzo dobrze dokumentują zarówno przebieg badań zrealizowanych w ramach danej publikacji, ale też bardzo właściwy, konsekwentny rozwój naukowy Doktorantki. Mimo, iż jak wskazują oświadczenia, Doktorantka nie wykorzystywała samodzielnie wszystkich stosowanych w omawianych publikacjach metod, co uważam za zrozumiałe, to musiała się z nimi zapoznać, choćby po to by właściwie interpretować wyniki, analizować je jako całość i wreszcie opisać we wspomnianych publikacjach. Drugim przejawem wzorowego rozwoju naukowego Doktorantki jest, w moim odczuciu, nabycie umiejętności zdobywania finansowania swoich badań. Badania w ramach ostatniej pracy były zrealizowane już w ramach własnego projektu badawczego Pani mgr Moniki Majewskiej.

Jarosław Skowalski