



Toruń, 30.10.2024 r.

dr hab. Emilia Wilmowicz, prof. UMK
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Majewskiej
pt. „Zaburzenia procesu fotosyntezy jako istotny element fitotoksyczności diklofenaku”
wykonanej z Katedrze Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin,
Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem pani dr hab. Anny Aksmann, prof. UG

Praca doktorska Pani mgr Moniki Majewskiej to zwieńczenie podjęcia uzasadnionych badań wnoszących zupełnie nową wiedzę na temat fitotoksyczności substancji farmakologicznie czynnych, które będąc antropogenicznym zanieczyszczeniem środowiska naturalnego prowadzą do jego degradacji. Dysertacja wnosi istotny wkład w zrozumienie niekorzystnego wpływu diklofenaku (DCF) - przedstawiciela niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) - na zaburzenia procesu fotosyntezy. Szczegółowym celem podjętych badań było poznanie wywołanych przez DCF zmian w aparacie fotosyntetycznym, które hamują zależną od światła fazę fotosyntezy.

Ekotoksyczne zanieczyszczenie środowiska aktywnymi substancjami o działaniu leczniczym, zwłaszcza ogólnie dostępnymi NLPZ, nieskutecznie neutralizowanymi przez oczyszczalnie ścieków, wywołuje negatywne skutki u organizmów żywych. W tym kontekście dane dla DCF znane są głównie w odniesieniu do ssaków, a wiedza dotycząca jego wpływu na wzrost i funkcjonowanie roślin jest fragmentaryczna. Zaledwie kilka prac podnosi kwestię wysokiej fitotoksyczności tego leku, wskazując na zaburzenia początkowych etapów fotosyntezy nie tłumacząc jednocześnie przyczyn obserwowanych zaburzeń. Powyższe, a także objęcie DCF dyrektywą Unii Europejskiej (2013/39/EU) dotyczącą substancji podlegających monitoringowi, sprawia, że temat podjęty przez Doktorantkę porusza ważne zagadnienia o charakterze poznawczym, ale także utylitarnym. Zdobyta wiedza może w przyszłości posłużyć do opracowania protokołów toksyczności substancji, które znajdą zastosowanie w testach toksykologicznych pozwalających na ocenę stanu środowiska przyrodniczego.

Warto docenić, że Doktorantka mając na uwadze wielowątkowość wykonywanych badań wybrała do ich realizacji, aż dwa gatunki roślin: zielenicę *Chlamydomonas reinhardtii* oraz szpinak warzywny (*Spinacia oleracea* L.). Zielenica dzięki krótkiemu cyklowi życiowemu, poznanemu genomowi, a także łatwości uzyskania mutantów, stanowi dogodny model eksperymentalny w analizach toksykologicznych, badaniach fizjologicznych, biochemicznych i genetycznych. Z kolei szpinak warzywny znalazł szerokie uznanie w badaniach prowadzonych nad fotosyntezą. *C. reinhardtii* była z powodzeniem wykorzystana we wcześniejszych badaniach zespołu naukowego, który pod kierownictwem pani dr. hab. Anny Aksmann badał rolę białek ELIP w aklimatyzacji komórek zielenicy do antropogenicznych zanieczyszczeń środowiska wodnego, a także opracowania jej synchronicznych kultur (*C. reinhardtii*) jako precyzyjnego narzędzia badawczego do analiz toksykologicznych. Wzrastająca świadomość szkodliwości leków względem organizmów żywych sprawia, że starania nad poznaniem mechanizmów ich działania są przedmiotem intensywnych badań. Dlatego analizy dotyczące zaburzenia procesu fotosyntezy jako istotnego elementu fitotoksyczności DCF uważam za niezwykle cenne i w pełni uzasadnione.

Dysertacja ma formę spójnego tematycznie cyklu artykułów uzupełnionych komentarzem Autorskim, zawierającym zwięzłe, rzeczowe wprowadzenie uzasadniające tematykę podjętych badań, jasno określony cel pracy, omówienie wyników i wyciągniętych na ich podstawie wniosków. W skład cyklu wchodzi trzy publikacje o charakterze eksperymentalnym opublikowane w latach 2018-2024 w liczących się międzynarodowych czasopismach specjalistycznych. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania prac (Impact Factor) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 18.3, a suma punktów MNiSW to 310.

1. Majewska, M., Harshkova, D., Guściora, M., Aksmann, A. 2018. Phytotoxic activity of diclofenac: evaluation using a model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with atrazine as a reference substance. *Chemosphere*, 209, 989-997. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.06.156 (Q1, 140 punktów, IF 8,1)
2. Majewska, M., Harshkova, D., Pokora, W., Baścik-Remisiewicz, A., Tułodziecki, S., Aksmann, A. 2021. Does diclofenac act like a photosynthetic herbicide on green algae? *Chlamydomonas reinhardtii* synchronous culture-based study with atrazine as reference. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 1-10. DOI:10.1016/j.ecoenv.2020.111630 (Q1, 100 punktów, IF 6,2)
3. Majewska, M., Kapusta, M., Aksmann, A. 2024. Diclofenac interacts with photosynthetic apparatus: isolated spinach chloroplasts and thylakoids as a model system. *Plants*, 13(16), 1-13. DOI:10.3390/plants13162189 (Q2, 70 punktów, IF 4,0)

Do realizacji zamierzonych celów Doktorantka wykorzystwała techniki biologii molekularnej, metody biochemiczne i analizy mikroskopowe, które opisała w jasny sposób w opublikowanych pracach. Pozwala to dobrze ocenić biegłość warsztatową Pani mgr Moniki Majewskiej oraz Jej kompetencje w prawidłowym doborze i opanowaniu technik badawczych.

Wyjaśnienie wpływu DCF na fotosyntezę wymagało zastosowania substancji referencyjnej o dobrze znanym mechanizmie działania. Doktorantka wybrała związek z grupy triazyn - atrazynę (ATR), która przyłączając się do miejsca wiązania plastochinonu B w białku D1 blokuje przenoszenie energii wzbudzenia z fotosystemu II (PSII) do centrum reakcji PSI. Pierwszym etapem badań, których wyniki opublikowano w artykule z 2018 r., była optymalizacja stężenia roztworów DCF i ATR, które hamują wzrost populacji glonów w 50% (EC₅₀). Autorka określając ilość produkowanego przez komórki tlenu wykazała, że mimo różnic w efektywności zastosowanych roztworów o różnych stężeniach, oba związki obniżały intensywność fotosyntezy. Jednak w kolejnym etapie doprecyzowała te wyniki określając wydajność funkcjonowania oraz stan aparatu fotosyntetycznego. Wykonując analizę krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a* uzyskała ciekawe wyniki wskazujące na odmienne działanie badanych substancji. Autorka odkryła, że ATR zmniejszając prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu poza QA (ψ_0) oraz wywołując spadek maksymalnej wydajności transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym (ϕ_{E0}), prawdopodobnie blokuje przepływ elektronów poza PSII. Z kolei DCF z jednej strony wywołał spadek maksymalnej wydajności kwantowej pierwotnych reakcji fotochemicznych (ϕ_{P0}), a z drugiej strony spowodował wzrost niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia (ϕ_{D0}), co pozwoliło przypuszczać, że wpływa on bezpośrednio na centra reakcji PSII. Kolejnym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie, że DCF zmniejsza frakcję aktywnych centrów reakcji PSII (RC_M), przy jednoczesnym wzroście strumienia energii przepływającego przez jedno aktywne RC. Stąd sugestia, że część spośród prawidłowo funkcjonujących aktywnych fotochemicznie RC została przekształcona w tzw. ciche centra reakcji odpowiedzialne za rozproszenie nadmiaru absorbowanej energii w postaci ciepła. Jednocześnie obserwowany wzrost zawartości karotenoidów w komórkach traktowanych DCF dał podstawę do przypuszczenia, że w rozpraszaniu nadmiaru energii wzbudzenia i ochronie aparatu fotosyntetycznego bierze udział cykl ksantofilowy. Doktorantka udowodniła, że zastosowanie obydwu toksykantów zaburzyło gospodarkę redoks, co przejawiało się wzmożoną produkcją nadtlenu wodoru (H₂O₂) oraz zmianą aktywności peroksydazy askorbinianowej (APX), która w chloroplastach katalizuje rozkład H₂O₂. Należy jednak zaznaczyć, że o ile efekt wzmożonej produkcji H₂O₂ przez ATR był znacznie silniejszy niż w przypadku DCF, to aktywność APX wzrosła wyłącznie w przypadku komórek traktowanych ATR. Pozwoliło to Autorce wyciągnąć uprawniony wniosek, że chloroplast nie musi być głównym źródłem nadprodukcji H₂O₂ w tych warunkach, a chęć poznania mechanizmu zaburzeń fotosyntezy indukowanych przez DCF wymagała od Doktorantki wytyczenia nowych kierunków badań, które konsekwentnie realizowała w kolejnych etapach. Co więcej, świadomość, że zastosowany model badawczy oraz warunki eksperymentalne (analizy prowadzone po 24 h od momentu podania badanych substancji), pozwoliły jedynie na obserwowanie zmian w komórkach, które znajdują się na różnym etapie rozwoju, bez możliwości stwierdzenia, jak szybko pojawiają się efekty toksyczne, wymogło innego podejścia eksperymentalnego. Dlatego do realizacji badań, których wyniki zamieszczono w pracy opublikowanej w 2021 r. Doktorantka zastosowała synchroniczną populację *C. reinhardtii*, a mając na uwadze uzyskanie pełnego obrazu zachodzących zmian materiał do badań zbierała w krótkich odstępach czasowych. Dzięki temu możliwe było przeanalizowanie wpływu DCF oraz ATR na poziomie pojedynczej komórki i zaobserwowanie wczesnych efektów ich działania. Zmiany ekspresji genów kodujących

enzymy antyoksydacyjne wykazały, że ATR stymuluje ich aktywność transkrypcyjną już w pierwszej godzinie po podaniu, przy czym efekty wywołane przez DCF były odmienne. Co więcej, ATR obniżyła ilość chlorofilu *a* i *b* w komórkach, z kolei po DCF tendencja spadkowa była znacznie mniejsza i pojawiała się dopiero po 7 godzinach. Doktorantka dokonała także analizy krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo* i udowodniła, że zarówno DCF, jak i ATR, wprawdzie wnikają do komórek i docierają do chloroplastu, jednak sposób ich działania jest różny. Atrazyna zakłócając łańcuch transportu elektronów prowadzi do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu, z kolei DCF przekształca niektóre centra reakcji w centra niefotochemicznego rozpraszania energii. Krytyczne odniesienie się Doktorantki do uzyskanych wyników i świadomość, że mogą być one wypadkową wszystkich przemian biochemicznych zachodzących w całych komórkach zielenicy, w tym związanego z łańcuchem transportu elektronów oddychania, sprawiły, że kolejne analizy przeprowadziła na wyizolowanych chloroplastach i tylakoidach szpinaku warzywnego. Pozwoliło to oddzielić wpływ DCF na inne niż chloroplasty organelle, a wyniki przeprowadzonych analiz zaprezentowała w publikacji, która ukazała się w bieżącym roku. Analiza krzywej indukcji i wygaszania chlorofilu *a* liści szpinaku warzywnego potwierdziła, że DCF wpłynął na wydajność aparatu fotosyntetycznego podobnie jak miało to miejsce w całych komórkach *C. reinhardtii*. Mierzone parametry, w tym wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych (ϕP_0), prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu poza QA (ψ_0) i maksymalna wydajność kwantowa transportu elektronów (ϕE_0) spadły, a obserwowany efekt wzrastał wraz z zastosowanym stężeniem roztworu DCF. Podobna zależność dotyczyła także wywołanego przez DCF zmniejszenia frakcji aktywnych centrów reakcji (RC_M). Odnosząc się do poprzednich prac Doktoranta wykazała, że wyizolowane chloroplasty szpinaku warzywnego wykazują niską wrażliwość na DCF w odniesieniu do komórek *C. reinhardtii*. W celu zweryfikowania czy lek ten przekracza błonę chloroplastów wykonała analizy mikroskopowe. Obrazowanie konfokalne wyizolowanych chloroplastów nie wykazało widocznych zmian w strukturze jedynie po DCF w najniższym z zastosowanych stężeń. Ten sam związek w wyższym stężeniu sprawił, że chloroplasty były nieregularne, o zdezorganizowanych granach i emitowały słabszą fluorescencję. Najwyższe stężenie DCF doprowadziło do uszkodzenia błon chloroplastów, co skutkowało uwolnieniem stromy do cytozolu i umożliwiło interakcje DCF z tylakoidami. Warto podkreślić, że były to pionierskie badania wizualizacji oddziaływań DCF z chloroplastami. Zbadanie bezpośredniej interakcji DCF z elementami fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, wymagało przeprowadzenia eksperymentów z wyizolowanymi tylakoidami szpinaku. Obniżające się pod wpływem DCF parametry, w tym wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych (ϕP_0), prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu poza QA (ψ_0) oraz maksymalna wydajność kwantowa transportu elektronów (ϕE_0) wskazywały, że tylakoidy charakteryzują się większą wrażliwością na lek niż chloroplasty. Obserwacje Doktorantki pokazują, że kwantowa wydajność niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia (ϕD_0) po DCF wzrosła, a frakcja aktywnych centrów reakcji PSII zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia zastosowanego roztworu. Wzrosły także wartości parametrów dla specyficznych przepływów energii przez jedno centrum reakcji. Zaprezentowane w tej pracy wyniki dowodzą przekształcania niektórych centrów reakcji w centra rozpraszające nadmiar energii wzbudzenia. Co najważniejsze, zarówno degradacja błony chloroplastów, jak i brak specyficznej interakcji z konkretnym

elementem łańcucha transportu elektronów wskazują na niespecyficzne oddziaływanie leku na błony aparatu fotosyntetycznego.

Wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej mają wysoką wartość poznawczą i wskazują, że wytyczone cele zostały wzorowo osiągnięte. Doktorantka ujawniła nowe fakty na temat szkodliwego działania DCF na aparat fotosyntetyczny, które polega na niespecyficznym interakcji z błonami fotosyntetycznymi, co skutkuje ich degradacją, prowadzi do zakłócenia funkcjonowania łańcucha transportu elektronów i w konsekwencji zmniejsza wydajność fotosyntezy.

Dokonana na podstawie oświadczeń współautorów ocena indywidualnego udziału Doktorantki potwierdza Jej wiedzę i umiejętności prowadzenia pracy naukowej co sprawia, że osiągnięcie oceniam wysoko.

Recenzowana praca spełnia pod względem merytorycznym wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Po zapoznaniu się z dysertacją zgłaszam do dyskusji trzy kwestie:

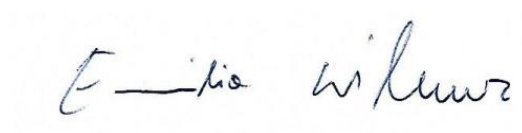
1. Doktorantka badała wpływ pojedynczej substancji na zaburzenia fotosyntezy u roślin, jednak w naturze nie mamy odczynienia z taką sytuacją. Antropogeniczne zanieczyszczenia środowiska obejmują kilka, a czasami kilkanaście leków lub ich pochodnych. Czy Doktorantka wykonała analizy pozwalające na stwierdzenie czy efekty wywołane przez DCF mogą być modulowane przez inne obecne w środowisku NLPZ lub z literatury zna przykłady takowych?
2. Mając na uwadze zastosowanie glonów jako modelu w badaniach toksykologicznych ciekawi mnie czy znane są inne niż DCF leki, których mechanizm działania jest podobny u roślin wyższych oraz glonów?
3. Odpowiedzi testowe glonów pozwalają na wykrycie związków toksycznych, ale z drugiej strony umożliwiają ocenę zagrożenia substancjami biogennymi wywołującymi negatywne efekty. Ciekawi mnie zdanie Doktorantki na ten temat, proszę także o podanie ewentualnych przykładów.

Wniosek końcowy

Dysertacja doktorska pani mgr Moniki Majewskiej stanowi bardzo ważny element działań naukowych zmierzających w kierunku kompleksowego poznania mechanizmu fitotoksyczności antropogenicznych zanieczyszczeń środowiska lekami. Prezentowane wyniki są oryginalne. Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami), 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 późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UG o dopuszczenie Pani mgr Moniki Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały opublikowane aż w trzech publikacjach eksperymentalnych w periodykach naukowych o zasięgu międzynarodowym, co dowodzi wysokiego poziomu naukowego wykonanych badań. W każdej z prac Pani mgr Monika Majewska jest pierwszym autorem. Powyższe jest podstawą do wyróżnienia dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą, o co wnoszę do Szanownego Gremium Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego.

A handwritten signature in black ink, reading "Emilia Wilmowicz". The signature is written in a cursive style with a horizontal line under the first name.

dr hab. Emilia Wilmowicz, prof. UMK