

## **„Zaburzenia procesu fotosyntezy jako istotny element fitotoksyczności diklofenaku”** **mgr Monika Majewska**

Działalność człowieka przyczynia się do wzrastającego zanieczyszczenia środowiska substancjami biologicznie czynnymi, wśród których coraz większą uwagę poświęca się substancjom leczniczym i ich metabolitom. Do najpowszechniej wykrywanych w środowisku zanieczyszczeń farmaceutycznych należą antybiotyki, leki regulujące gospodarkę lipidową, leki hormonalne, leki przeciwpadaczkowe i beta-blokery oraz niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). NLPZ, dostępne bez recepty, są powszechnie stosowane w medycynie i weterynarii w celu złagodzenia stanu zapalnego i uśmierzenia bólu, a ich ilość w środowisku stale wzrasta. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje diklofenak (DCF), który ze względu na częste wykrywanie w systemach śluzowodnych (McGettigan i Henry, 2013), nieskuteczne usuwanie przez oczyszczalnie ścieków (Zhang i in., 2008), powolną degradację w środowisku (Fent i in., 2006; Wu i in., 2015) oraz nie w pełni poznany wpływ na organizmy nie docelowe, w 2013 roku został umieszczony przez Komisję Europejską na liście substancji podlegających monitoringowi (Dyrektywa 2013/39/EU). Jako że DCF jest stosowany od lat przez ludzi, jego wpływ na ssaki jest dobrze poznany. DCF jest słabym kwasem działającym poprzez hamowanie cyklooksygenaz (COX-1 i COX-2) biorących udział w syntezie prostaglandyn z kwasu arachidonowego (Bácsi i in., 2016). Do niepożądanych skutków DCF obserwowanych w organizmach ssaków należy zaliczyć m.in. powikłania żołądkowo-jelitowe, neurotoksyczność, kardiotoxyczność, hepatotoksyczność, nefrotoksyczność, hematotoksyczność, genotoksyczność, teratogenność, złamania kości i alergię skórne (Sathishkumar i in., 2021). Z kolei wiedza na temat wpływu DCF na rośliny jest bardzo ograniczona. Pojawiają się doniesienia o jego fitotoksyczności oraz o jego wysokiej szkodliwości w porównaniu z innymi lekami przeciwzapalnymi (np. kwasem acetylosalicylowym czy ibuprofenem). Dostępne dane literaturowe pozwalają przypuszczać, że jedną z przyczyn fitotoksyczności DCF są zaburzenia zależnej od światła fazy fotosyntezy, co zostało wskazane w kilku pracach (Hájková i in., 2019; Kummerová i in., 2016; Vannini i in., 2018). Opublikowane dotychczas wyniki badań nie wskazywały jednak dokładnie przyczyny obserwowanych zaburzeń, co stało się inspiracją i dobrą bazą do badań opisanych w ramach tej pracy doktorskiej.

Celem badań było poznanie mechanizmu hamowania zależnej od światła fazy fotosyntezy pod wpływem DCF, poprzez szczegółową analizę zmian zachodzących w aparacie fotosyntetycznym narażonym na tę substancję. Do badań wykorzystano jednokomórkową zielenicę *Chlamydomonas reinhardtii*, modelowy organizm do badania podstawowych zagadnień biologii komórki, biologii molekularnej oraz badań toksykologicznych, a także

szpinak warzywny (*Spinacia oleracea*), popularny w badaniach nad fotosyntezą. Aby wskazać prawdopodobny mechanizm działania DCF, postanowiono wykorzystać substancję referencyjną o dokładnie poznanym wpływie na aparat fotosyntetyczny, tj. na atrazynę (ATR). ATR jest triazynowym herbicydem, który hamuje fotosyntezę poprzez wiązanie się z miejscem wiązania plastochinonu B białka D1, blokując przenoszenie energii wzbudzenia z PSII do centrum reakcji PSI, co w konsekwencji prowadzi do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) i uszkodzeń oksydacyjnych w komórce.

W pierwszym etapie badań (**Majewska i in. 2018**) oszacowano efektywne stężenie badanych substancji, powodujące 50% hamowanie wzrostu ( $EC_{50}$ ) populacji glonów *C. reinhardtii*, które wyniosło odpowiednio 421,35  $\mu\text{M}$  dla DCF (134,0 mg/L) i 0.360  $\mu\text{M}$  (77.6mg/L) dla ATR. Następnie, po 24 godzinach ekspozycji na toksykanty, zbadano ich wpływ na komórki zielenicy. W przypadku obydwu substancji intensywność fotosyntezy, szacowana na podstawie ilości produkowanego przez komórki tlenu, spadła o około 40%. Ponieważ pomiar ten daje jedynie ogólny obraz przebiegu procesu fotosyntezy, w następnej kolejności wykonano analizę krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo* (test OJIP), która dostarczyła szczegółowych informacji o wydajności i stanie aparatu fotosyntetycznego. Wykazano, że ATR spowodowała zmniejszenie prawdopodobieństwa przeniesienia elektronu poza  $Q_A$  ( $\psi_0$ ) oraz spadek maksymalnej wydajności transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym ( $\phi E_0$ ), co było zgodne z doniesieniami, że mechanizmem jej działania jest blokowanie przepływu elektronów poza fotosystemem II (PSII). DCF natomiast wydawał się wpływać bezpośrednio na centra reakcji PSII, ponieważ zaobserwowano spadek maksymalnej wydajności kwantowej pierwotnych reakcji fotochemicznych ( $\phi P_0$ ) oraz wzrost niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia ( $\phi D_0$ ). Dodatkowo frakcja aktywnych centrów reakcji PSII ( $RC_M$ ) była znacznie mniejsza niż w kontroli, ale strumień energii przepływający przez jedno aktywne RC (*ang. reaction center*), w szczególności absorpcja energii (ABS/RC), pułapkowanie energii ( $TR_0/RC$ ), transport elektronów ( $ET_0/RC$ ,  $RE_0/RC$ ) oraz niefotochemiczne rozpraszanie energii ( $DI_0/RC$ ) wzrósł. Sugerowało to, że niektóre RC zostały przekształcone w „ciche” centra reakcji, rozpraszające nadmiar absorbowanej energii w postaci ciepła (Krüger i in., 1997; Strasser i in., 2004), natomiast te RC, które pozostały aktywne, funkcjonowały prawidłowo. 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.

Skutkiem zaburzeń fotosyntetycznego transportu elektronów jest często nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT) i związany z tym stres oksydacyjny (Czarnocka i Karpiński, 2008). Rzeczywiście, zarówno DCF jak i ATR spowodowały wzmożoną produkcję nadtlenu wodoru w komórkach glonów, przy czym efekt działania ATR był znacznie silniejszy (**Majewska i in. 2018**). Co ciekawe, aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX), enzymu odpowiedzialnego za rozkład nadtlenu wodoru w chloroplastach, wzrosła jedynie w przypadku komórek traktowanych ATR, co jest zgodne z opisywanym mechanizmem działania tej substancji. Wzrostu aktywności APX nie zaobserwowano w komórkach *C. reinhardtii* potraktowanych DCF, co pozwalało sądzić, że to nie chloroplast był głównym źródłem nadprodukcji nadtlenu wodoru w tych warunkach, a mechanizm zaburzeń fotosyntezy indukowanych DCF wymagał dalszych badań.

Wyniki uzyskane w pierwszym etapie badań (**Majewska i in. 2018**) były obrazem zmian obserwowanych w populacji *C. reinhardtii*, w której komórki znajdują się na różnym etapie rozwoju. Co więcej, obserwowane zmiany dotyczyły komórek eksponowanych na substancje badane przez 24 godziny, co nie pozwoliło stwierdzić, jak szybko pojawiają się efekty toksyczne. Z tego względu w kolejnych eksperymentach (**Majewska i in. 2021**) postanowiono wykorzystać synchroniczną populację tej zielenicy, w której wszystkie komórki znajdują się w tej samej fazie rozwojowej i pobierać próby w krótkich odstępach czasowych. Zsynchronizowaną populację zoospor potraktowano zatem na początku cyklu komórkowego DCF i ATR w stężeniach wyznaczonych w poprzednich badaniach (**Majewska i in., 2018**), a następnie pobierano próby do analiz co godzinę. Dzięki temu możliwe było przeanalizowanie wpływu DCF i ATR na poziomie pojedynczej komórki i zaobserwowanie wczesnych efektów ich działania. Zbadano m.in. poziom transkryptów genów kodujących enzymy odpowiedzialne za neutralizację reaktywnych form tlenu w chloroplastach, których podwyższona ekspresja jest uważana za marker stresu oksydacyjnego (Chankova i in., 2014): FSD1 kodujący żelazową dysmutazę ponadtlenukową (Fe-SOD), MSD3 kodujący manganową dysmutazę ponadtlenukową (Mn-SOD) oraz APX1 kodujący peroksydazę askorbinianową (APX). Ekspozycja komórek na ATR już po pierwszej godzinie po potraktowaniu spowodowała wzrost poziomu transkryptów wszystkich tych genów, natomiast w komórkach traktowanych DCF poziom transkryptów genów kodujących APX i Mn-SOD spadł, a poziom transkryptu genu kodującego Fe-SOD wzrósł, ale dopiero po kilku godzinach i w dużo mniejszym stopniu, niż w przypadku ATR. Było to zgodne z wnioskami wysuniętymi w poprzedniej pracy (**Majewska i in., 2018**), że produkcja RFT w chloroplastach narażonym na DCF nie jest główną przyczyną fitotoksycznego działania DCF w komórkach roślinnych. Świadczyć o tym może też fakt, że ilość chlorofilu *a* i

*b* w komórkach obniżyła się dopiero po 7 godzinach po potraktowaniu DCF, w odróżnieniu od komórek traktowanych ATR, która wywołała taki efekt już po 1 godzinie. Silna nadprodukcja RFT w chloroplastach komórek eksponowanych na ATR mogła doprowadzić do utlenienia cząsteczek barwników i zniszczenia ich struktury (Nguyen i in., 2021), natomiast w przypadku DCF efekt ten pojawiał się dużo później i był znacznie słabszy.

Niezwykle ważnym elementem powyższych badań była analiza parametrów krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo*, która pozwoliła wykazać, że zakłócenia fotosyntetycznego transportu elektronów, prowadzące do nadmiernej produkcji RFT wskutek działania ATR oraz przekształcenia niektórych centrów reakcji w „radiatory” niefotochemicznego rozpraszania energii w komórkach potraktowanych DCF były widoczne już po 1 godzinie ekspozycji. Oznacza to, że obydwie substancje szybko przenikają do komórek i docierają do chloroplastu, jednak sposób ich działania na aparat fotosyntetyczny i jego skutki są odmienne. Na tym etapie można było już stwierdzić, że chociaż DCF nie wpływa na fotosyntezę tak silnie jak ATR, to jednak jego hamujący wpływ na aparat fotosyntetyczny jest również znaczący i warty dalszych badań. Ponieważ opisane powyżej eksperymenty były prowadzone na całych komórkach zielenic, uzyskane wyniki były sumą wszystkich procesów biochemicznych zachodzących w tych komórkach, co może prowadzić do mylnej interpretacji części wyników. Jest to szczególnie istotne ze względu na podobieństwa między procesami fotosyntezy i oddychania, chociażby dlatego, że oba procesy wykorzystują łańcuch transportu elektronów i wytwarzają energię w postaci ATP. Ponadto udowodniona jest ścisła współpraca chloroplastów z mitochondriami, zapewniająca nie tylko optymalne funkcjonowanie komórki w stanie „fizjologicznym”, ale również pozwalająca niwelować skutki zaburzenia metabolizmu energetycznego w warunkach stresowych (Kromer, 2003; Raghavendra i Padmasree, 2003). Aby zatem oddzielić wpływ DCF na fotosyntezę od jego wpływu na inne organelle komórkowe, zwłaszcza mitochondria, na których funkcjonowanie DCF może mieć negatywny wpływ (Gómez-Lechón i in., 2003; Syed i in., 2016) zdecydowano się przeprowadzić dalsze badania na wyizolowanych chloroplastach i tylakoidach szpinaku warzywnego (*Spinacia oleracea*), jako że jest to obecnie uznany model w badaniach fotosyntetycznych.

W tej serii eksperymentów (Majewska i in., 2024) chloroplasty i tylakoidy izolowane z komórek szpinaku poddano działaniu różnych stężeń DCF (od 125 do 4000  $\mu\text{M}$ ), a następnie, po 15 minutach inkubacji, przeanalizowano parametry krzywej indukcji i wygaszania fluorescencji chlorofilu *a in vivo*. Wykazano, że zmiany w wydajności aparatu fotosyntetycznego szpinaku miały taki sam charakter jak te uzyskane dla całych komórek zielenicy *C. reinhardtii* (Majewska i in., 2018, 2021), a różnice w fitotoksyczności tej

substancji zależały od dawki oraz tego, czy narażone zostały całe chloroplasty, czy same błony tylakoidów. Najniższe zastosowane stężenie DCF (250  $\mu\text{M}$ ), którym potraktowano chloroplasty, miało stosunkowo niewielki wpływ na parametry fluorescencji chlorofilu *a in vivo*. Wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych ( $\phi\text{P0}$ ), prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu poza QA ( $\psi\text{0}$ ) oraz maksymalna wydajność kwantowa transportu elektronów ( $\phi\text{E0}$ ) spadła w porównaniu do kontroli o około 5%. Przy najwyższym zastosowanym stężeniu DCF (4000  $\mu\text{M}$ ) wartości tych parametrów zostały obniżone od 15 do 20%. Natomiast kwantowa wydajność niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia ( $\phi\text{D0}$ ) wzrosła od 5 % do 25% w zależności od zastosowanego stężenia DCF. Stwierdzono też, że frakcja aktywnych centrów reakcji PSII (RCM) zmniejszała się od 5% do 20% wraz ze wzrostem stężenia DCF. Niemniej jednak te RC, które pozostały aktywne, wydawały się funkcjonować prawidłowo, ponieważ absorpcja energii świetlnej, jej pułapkowanie i transport elektronów przez jedno aktywne RC nie wykazały istotnych zmian, z wyjątkiem około 30% wzrostu niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia. Uzyskane wyniki wykazały, że izolowane chloroplasty wykazują stosunkowo niską wrażliwość na DCF w porównaniu z nienaruszonymi komórkami *C. reinhardtii* (Majewska i in. 2018, 2021, 2024). Mogło to wynikać z faktu, że nie tylko sam chloroplast, ale również mitochondria są narażone na DCF, co przyczynia się do zwiększonej toksyczności tego związku w całych komórkach. Inna koncepcja, przedstawiona w pracy Hájková i in. (2019) zakładała, że DCF nie przekracza bariery, jaką jest błona chloroplastów, a co za tym idzie, nie może wywołać znaczącego zaburzenia funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Aby zweryfikować to założenie postanowiono zbadać wyizolowane chloroplasty za pomocą mikroskopii konfokalnej, jako że bezpośrednia wizualizacja oddziaływań DCF z chloroplastami nie została dotychczas opisana w literaturze. Badanie wykazało, że po 15 minutach ekspozycji jedynie najniższe stężenie DCF stosowane w eksperymentach (125  $\mu\text{M}$ ) nie spowodowało istotnych zmian w strukturze chloroplastów. Chloroplasty narażone na DCF w stężeniu 1000  $\mu\text{M}$  stały się nieregularne, grana wydawały się zdeorganizowane i wykazywały znacznie słabszą fluorescencję. Natomiast przy stężeniu najwyższym (4000  $\mu\text{M}$ ) otoczki chloroplastów zostały wyraźnie uszkodzone, uwalniając stronę na zewnątrz i otwierając możliwość bezpośrednich interakcji DCF–tylakoidy (Majewska i in., 2024).

W dalszej części badań postanowiono zatem umożliwić cząsteczkom DCF bezpośrednią interakcję z elementami fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, przeprowadzając eksperymenty z wyizolowanymi tylakoidami szpinaku. Zgodnie z oczekiwaniami, tylakoidy były bardziej wrażliwe na DCF niż chloroplasty. Gdy zostały one potraktowane DCF w

najwyższym stężeniu (4000  $\mu\text{M}$ ) wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych ( $\phi\text{P0}$ ), prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu poza QA ( $\psi\text{0}$ ) oraz maksymalna wydajność kwantowa transportu elektronów ( $\phi\text{E0}$ ) spadła, w porównaniu do kontroli, odpowiednio o 70, 80 i 30%, a kwantowa wydajność niefotochemicznego rozpraszania energii wzbudzenia ( $\phi\text{D0}$ ) wzrosła o 250%. Frakcja aktywnych centrów reakcji PSII zmniejszała się wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia DCF, od 20% w stężeniu 1000  $\mu\text{M}$  do 90% w 4000  $\mu\text{M}$ , a wartości parametrów dla specyficznych przepływów energii przez jedno centrum reakcji wzrastały znacząco. Wyniki, zarówno w przypadku badań na chloroplastach jak i tylakoidach, wskazały na przekształcanie niektórych centrów reakcji w radiatory energii. Co istotne, brak specyficznej interakcji z konkretnym elementem łańcucha transportu elektronów oraz degradacja błony chloroplastów wskazywały jednoznacznie na niespecyficzne oddziaływanie leku na błony aparatu fotosyntetycznego. Lipofilność wielu NLPZ jest jednym z najważniejszych czynników stojących za ich toksycznym działaniem (Ferreira Marlene Lu i in., 2005; Giraud i in., 1999; Tomisato i in., 2004) i można stwierdzić, że tak samo jest w przypadku DCF.

Podsumowując wszystkie przeprowadzone badania można wywnioskować, że szkodliwe działanie DCF na aparat fotosyntetyczny polega na jego niespecyficznej interakcji z błonami fotosyntetycznymi, skutkującej ich degradacją, co prowadzi do zakłócenia funkcjonowania łańcucha transportu elektronów, a to z kolei zmniejsza wydajność fotosyntezy, niezwykle istotnego szlaku metabolicznego roślin. Niespecyficzność oddziaływania DCF na błony biologiczne jest tym bardziej niepokojąca, że sugeruje możliwość analogicznego wpływu omawianej substancji na pozostałe organelle komórkowe. Mając na uwadze, że rośliny są ważnym ogniwem ekosystemów, będącymi pierwotnymi producentami oraz fakt, że ilość substancji leczniczych, w tym DCF, w środowisku stale wzrasta, przeprowadzone badania istotnie poszerzają naszą wiedzę w tym zakresie i zwracają uwagę na wpływ zanieczyszczeń antropogenicznych na organizmy roślinne.

## **Bibliografia**

Bácsi, I., B-Béres, V., Kókai, Z., Gonda, S., Novák, Z., Nagy, S. A., Vasas, G. 2016. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. *Environmental Pollution*, 212, 508–518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.031>

Chankova, S. G., Dimova, E. G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D. V., Yonova, P. A., Yurina, N. P. 2014. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii*

genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 131–137. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2013.11.015>

Czarnocka, W., Karpiński, S. 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.

Demmig-Adams, B., Iii, W. W. A. 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. In *Planta*. 198. 460-470

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z dnia 12 sierpnia 2013 r. zmieniająca dyrektywy 2000/60/WE i 2008/105/WE w odniesieniu do substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. In *Aquatic Toxicology*. 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>

Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L., Matos, C., Reis, S. 2005. Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382, 1256-1264.

Giraud, M. N., Motta, C., Romero, J. J., Bommelaer, G., Lichtenberger, L. M. 1999. Interaction of indomethacin and naproxen with gastric surface-active phospholipids: a possible mechanism for the gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Biochemical pharmacology*, 57, 247-254.

Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Castell, J. V., Jover, R. 2003. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology*, 66, 2155–2167. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2003.08.003>

Hájková, M., Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., Váczi, P. 2019. Diclofenac as an environmental threat: Impact on the photosynthetic processes of *Lemna minor* chloroplasts. *Chemosphere*, 224, 892–899. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.197>

Kromer, S. 2003. Respiration During Photosynthesis. 46, 45–70. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PP.46.060195.000401>

Krüger, G. H. J., Tsimilli-Michael, M., Strasser, R. J. 1997. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiologia Plantarum*, 101, 265–277. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010203.x>

Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., Tříška, J. 2016. Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. *Journal of Hazardous Materials*, 302, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.057>

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 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.156>

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, 111630. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111630>

Majewska, M., Kapusta, M., Aksmann, A. 2024. Diclofenac Interacts with Photosynthetic Apparatus: Isolated Spinach Chloroplasts and Thylakoids as a Model System. *Plants*, 13, 2189. <https://doi.org/10.3390/plants13162189>

McGettigan, P., Henry, D. 2013. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. *PLoS Medicine*, 10, 1001388. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>

Nguyen, T. T., Uthairatanakij, A., Srilaong, V., Laohakunjit, N., Kato, M., Jitareerat, P. 2021. Impact of electron beam irradiation on the chlorophyll degradation and antioxidant capacity of mango fruit. *Applied Biological Chemistry*, 64, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00592-8>

Raghavendra, A. S., Padmasree, K. 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science*, 8, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.015>

Sathishkumar, P., Mohan, K., Meena, R. A. A., Balasubramanian, M., Chitra, L., Ganesan, A. R., Palvannan, T., Brar, S. K., Gu, F. L. 2021. Hazardous impact of diclofenac on mammalian system: Mitigation strategy through green remediation approach. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126135>

Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2004. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Mohanty P, Yunus, Pathre (eds) *Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation*. Taylor and Francis, London, 443–480

Syed, M., Skonberg, C., Hansen, S. H. 2016. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro*, 31, 93–102. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2015.11.020>

Tomisato, W., Tanaka, K. I., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., ... Mizushima, T. 2004. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 323, 1032-1039.

Vannini, A., Paoli, L., Vichi, M., Bačkor, M., Bačkorová, M., Loppi, S. 2018. Toxicity of Diclofenac in the Fern *Azolla filiculoides* and the Lichen *Xanthoria parietina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100, 430–437. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2266-4>

Wu, X., Dodgen, L. K., Conkle, J. L., Gan, J. 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. In *Science of the Total Environment*, 536, 655–666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.129>



Zhang, Y., Geißen, S. U., Gal, C. 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. In *Chemosphere*, 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

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)

