

Prof. dr hab. Maria Filek
Instytut Fizjologii Roślin PAN
im. Franciszka Górskiego
w Krakowie

INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN
im. Franciszka Górskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
30-239 Kraków, ul. Niezapominajek 21
tel. (12) 425 18 33 fax (12) 425 18 44
NIP 677-22-12-521 Regon 356730350

Kraków, 28.11.2016

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Brankiewicz pt. „Wpływ reaktywnych form tlenu na indukcję sygnałów bioelektrycznych u wątrobowca *Concephalum conicum*” wykonanej w Zakładzie Biofizyki UMCS w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Trębacza.

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska mgr Wioletty Brankiewicz porusza interesujące zagadnienia z zakresu mechanizmu indukcji stresu oksydacyjnego i roli reaktywnych form tlenu w komórkach, a także zjawisk bioelektrycznych, zaangażowanych w procesy określane jako „sygnalizacja wewnątrz- i międzykomórkowa”. Oba procesy nie są dotąd w pełni poznane, szczególnie u roślin. Zatem eksperymenty przeprowadzone przez Doktorantkę, pozwalające określić wpływ wybranych RFT na generowanie zmian elektrycznych zachodzących na powierzchni błon komórkowych, mogą przyczynić się do wyjaśnienia początkowych etapów reakcji włączonych w mechanizm komunikacji komórkowej, w warunkach stresowych. Podjęcie tematyki, zaproponowanej w tytule rozprawy, wymagało od Doktorantki zarówno zapoznania się z bogatą i nadal aktualizowaną literaturą naukową, jak również opanowania precyzyjnych technik z zakresu elektrofizjologii. Pozwoliło to na rejestrację i interpretację zmian związanych z aktywacją/deaktywacją białkowych kanałów jonowych jak również na opis efektów modyfikacji struktury lipidów błonowych, poprzez reaktywne formy tlenu.

Recenzja szczegółowa

Praca liczy 134 strony maszynopisu wraz z 79 rysunkami i 37 tabelami. Rysunki przedstawiają głównie dokumentację uzyskanych wyników, ale Autorka zamieszcza również ilustracje badanych struktur biologicznych i schematy zastosowanych technik pomiarowych, obrazujących opisywane zagadnienia. W rozprawie znajduje się dodatkowo wykaz najważniejszych skrótów, co bardzo ułatwia czytanie poszczególnych rozdziałów dysertacji. Spis literatury zawiera prawidłowo dobrane 143 pozycje, głównie z ostatnich lat. Doktorantka wskazuje również na wcześniejsze doniesienia literaturowe, stanowiące podstawę rozwoju technik elektrofizjologii roślin. Główne rozdziały dysertacji zatytułowano, jako Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Bibliografia, jest to, zatem typowy układ dla prac doktorskich.

W pierwszym podrozdziale **Wstępu** Doktorantka opisuje znaczenie sygnałów elektrycznych w procesach fizjologicznych roślin, rozpoczynając od rysu historycznego badań w tym zakresie, fizykochemicznych zależności określających właściwości błony komórkowej oraz występowania możliwych typów sygnałów elektrycznych. W następnym przedstawia główne składniki lipidowe błon oraz ich strukturę i możliwości funkcjonalne w komórkach. Kolejny, bardzo obszerny, podrozdział Doktorantka przeznaczyła na szczegółowy opis procesów transportu przez błony biologiczne, koncentrując się na wnikliwej charakterystyce kanałów jonowych: potasowych, wapniowych, anionowych oraz akwaporyn – odpowiedzialnych przede wszystkim za transport wody. Przedstawiła również budowę i znaczenie fizjologiczne pomp jonowych, głównie wapniowej i protonowej. Wstęp zamyka podrozdział dotyczący roli reaktywnych form tlenu, jako chemicznych pośredników w sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej, oraz zdolność komórek do ich generowania w chloroplastach i mitochondriach. Zwróciła również uwagę na produkcję w peroksysomach nadtlenu wodoru, jednego z ważnych składowych RFT. Zatem w rozdziale Wstęp mgr Wioletta Brankiewicz zawarła wszystkie treści biologiczne, które stanowiły przesłankę do podjętej przez Nią problematyki badawczej, zawartej w tytule rozprawy naukowej. Tematyka podrozdziałów zaprezentowana została w logicznej kolejności a cały rozdział napisany jest przystępnym językiem naukowym, bogato ilustrowany rysunkami, obrazującymi treści zawarte w podrozdziałach. Świadczy to, iż Doktorantka w pełni zaangażowała się, aby jak najlepiej poznać i następnie zaprezentować teoretyczne podstaw badanych przez Nią zagadnień biologicznych.

Niektóre nieprecyzyjne określenia powinny być jednak zamienione, jak np. str. 45 i 51 - „substancje drobocząsteczkowe” - na „małocząsteczkowe” czy też str. 31 – „skład mieszanki fitosteroli” – na „mieszanina”, gdyż takich zwrotów używa się w fizykochemii. Ponadto zdanie na str. 19 (R.1.1.2) „....W stanie spoczynku różnica potencjałów może przyjąć wartości od -50 do -200 mV, z wewnątrz elektroujemnym w stosunku do powierzchni”...- jest zbyt dużym skrótem myślowym i powinno być bardziej rozwinięte.

Opisując **Cel pracy**, Doktorantka w sposób bardzo precyzyjny i jasny przedstawiła najistotniejsze przesłanki naukowe, wynikające z wcześniejszych doniesień literaturowych, które skłoniły Ją do podjęcia badań w tej trudnej metodycznie i dotąd nie w pełni poznanej tematyce, jaką jest zagadnienie możliwości indukcji sygnałów elektrycznych poprzez reaktywne formy tlenu. Jako obiekt biologiczny wybrała wątrobowiec *Conocephalum conicum*, którego zdolność do indukcji sygnałów elektrycznych pod wpływem biotycznych i abiotycznych czynników stresowych była wcześniej wykazana w Zakładzie Biofizyki UMCS w Lublinie. Jako czynniki potencjalnie generujące potencjały czynnościowe zastosowała nadtlenek wodoru – najbardziej stabilną formę RFT oraz labilny, bardziej reaktywny rodnik hydroksylowy. Celem przewodnim podjętych badań było zaproponowanie modelu modyfikowania transportu jonowego poprzez RFT, co mogłoby stanowić ważny element w poznaniu mechanizmu przekazywania sygnałów elektrycznych u roślin poddanych działaniu stresu oksydacyjnego.

Material i metody

W rozdziale tym Autorka bardzo dokładnie opisała budowę anatomiczną wątrobowca *Conocephalum conicum*, oraz przedstawiła metodykę jego pozyskiwania ze środowiska naturalnego, a także prowadzenia hodowli w warunkach laboratoryjnych. Materiał badawczy stanowiły również indywidualne lipidy z grupy galaktozylogliceroli (mono- i di-pochodne), jako istotne składowe błon chloroplastowych i mitochondrialnych u roślin, zatem występujące w organellach, które są szczególnie poddawane działaniu RFT. Przy charakterystyce lipidów Doktorantka powinna jednak podać, oprócz hydrofilowej budowy cząsteczki (jedna lub dwie grupy cukrowe, – co przedstawiła), również skład kwasów tłuszczowych, odpowiedzialnych za hydrofobowe własności lipidów. Znacząca zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do nasyconych, charakteryzująca roślinne galaktozyloglicerone może mieć wpływ na stabilność i trwałość „czarnych błon” wywarzanych z tych lipidów przez Doktorantkę w modelowych eksperymentach. Ważne jest również podanie firmy, która dostarcza lub syntezuje dany odczynnik (co Autorka zaznaczyła w tekście, ale bez wskazania odpowiedniego wytwórcy). Odnosi się to również do, wykorzystanego w badaniach, nadtlenu wodoru. Ponadto, prezentując wybór stosowanych RFT, Autorka powinna opisać metodę uzyskiwania rodnika hydroksylowego. Sposób inicjacji tego rodnika można wprawdzie wywnioskować z tekstu zamieszczonego przy opisie wyników, jednakże zwyczajowo informacja ta powinna być zamieszczona w rozdziale opisującym metodykę doświadczeń. Natomiast bardzo szczegółowo i precyzyjnie zostały przedstawione przez Autorkę zastosowane przez Nią techniki elektrofizjologiczne tj mikroelektrodowa oraz czarnych błon lipidowych (BLM). Wskazuje to, iż wykorzystana w pracy aparatura pomiarowa jest doskonale poznana przez Panią mgr Wioletę Brankiewicz zarówno od strony teoretycznych założeń, wynikających z kryteriów fizykochemicznych, jak i z możliwości zastosowań praktycznych. Przedstawiony opis wskazuje na znakomite przygotowanie Doktorantki do prawidłowego przeprowadzania eksperymentów, założonych w celu pracy, oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Wyniki

Prezentację wyników Autorka rozpoczęła od eksperymentów, w których badała wpływ różnych stężeń nadtlenu wodoru, w zakresie od 11 mM do 1 M, na propagację potencjałów czynnościowych u wątrobowca. Uzyskane dane przedstawiła w formie rysunków obrazujących kształt i ilość sygnałów elektrycznych, na podstawie, których wyliczyła wielkość amplitudy poszczególnych sygnałów (w mM) i umieściła te wartości w tabelach. Jest to bardzo dogodny dla czytelnika przekaz gdyż można równocześnie konfrontować obraz poszczególnych rejestracji wyników z dokładnie wyliczonymi parametrami interesujących zmiennych. Na podstawie tych eksperymentów Doktorantka wybrała do dalszych analiz stężenie nadtlenu wodoru wynoszące 15 mM, gdyż przy takim stężeniu uzyskiwała najefektywniejszą odpowiedź rośliny w postaci serii potencjałów czynnościowych. Dalsze eksperymenty dotyczyły wpływu pojedynczych, lub

podanych w kombinacji, inhibitorów kanałów jonowych. We wszystkich zastosowanych układach, podanie inhibitorów do roztworu standardowego niwelowało w znaczący sposób wielkość amplitudy potencjałów czynnościowych, w stosunku do rejestracji, jakie były wykonane dla roślin traktowanych jedynie nadtlenkiem wodoru. Całkowitym brakiem reakcji bioelektrycznej rośliny charakteryzował się układ zawierający mieszaninę inhibitora kanałów anionowych, potasowych (zależnych od napięcia) oraz wapniowych.

W kolejnych eksperymentach Doktorantka badała udział rodnika hydroksylowego (uzyskiwanego w reakcji CuCl_2 z kwasem askorbinowym), na inicjację potencjałów czynnościowych. W podrozdziale 4.1.4 napisała, iż podanie do roztworu pojedynczo zarówno CuCl_2 jak i kwasu askorbinowego (asc) (w zakresie 1, 2, 3, 5 i 10 mM) nie generowało potencjałów czynnościowych. Nie jest jednak jednoznaczne czy w eksperymentach, w których stosowane były równocześnie oba czynniki odpowiedzialne za powstawanie rodnika hydroksylowego ich stężenia były równe molowo i odpowiadające koncentracji podanej przed skrótem Cu/asc. Krótka wzmianka o przygotowaniu mieszanin tych substancji pomogłaby w jednoznacznym zrozumieniu prezentowanych skrótów stężeń. Jest to tym bardziej ważne, iż prezentowane rejestracje sygnałów elektrycznych w znaczący sposób zależały od podanego stężenia mieszaniny Cu/asc. Dopiero w następnym rozdziale (4.1.4.2), opisującym wpływ obecności inhibitorów kanałów jonowych na modyfikację amplitudy potencjałów czynnościowych, jest wspomniane, że „...wybrano 5 mM stężenie askorbinianu i CuCl_2 ...”, z czego można wnioskować, iż Autorka stosowała równo molowy skład mieszaniny Cu/asc również we wcześniejszych analizach. Interesującym wynikiem przeprowadzonych badań jest wykazany brak specyficznej reakcji bioelektrycznej rodnika hydroksylowego w obecności sumy wybranych inhibitorów kanałów jonowych, podobnie jak w przypadku dodania H_2O_2 . A także, zróżnicowanie wysokości amplitudy generowanej depolaryzacji błony, zarówno w zależności od typu użytego inhibitora jak i badanej reaktywnej formy tlenu.

Uważam, że przedstawienie wyników (w r. 4.1.5 pt. „Podsumowanie wyników”) w formie wykresów oraz tabel, w których zestawiono zmiany wielkości amplitud generowanych potencjałów czynnościowych, a także zmiany średniej wysokości depolaryzacji fali, w zależności do badanych stężeń H_2O_2 i rodnika wodorotlenowego, w sposób jasny i przejrzysty obrazuje udział RFT w aktywacji kanałów jonowych u wątrobowca. Wybór przez Autorkę takiego układu prezentacji wyników, który stanowi spójny przegląd kolejnych etapów przeprowadzonych eksperymentów, jest bardzo trafny. Pozwala jednoznacznie wnioskować na temat zróżnicowania w reakcjach bioelektrycznych pomiędzy H_2O_2 i rodnikiem hydroksylowym oraz wskazuje na podobieństwa/różnice w aktywacji poszczególnych kanałów jonowych. Jeszcze lepsze porównanie pomiędzy reakcją obu badanych RFT można by uzyskać przedstawiając bezpośrednio skalę stężeń rodnika hydroksylowego, nie pośrednio (poprzez stężenia roztworu Cu/asc). Przy przygotowaniu publikacji z uzyskanych wyników sugeruję, aby istotne statystycznie zmiany zaznaczyć już na wykresach, jako gwiazdki lub litery. Ponadto, wykaz

stosowanych metod statystycznych umieszcza się zwykle w rozdziale Materiał i metody po opisie, stosowanych w pracy, technik badawczych.

Kolejną grupę eksperymentów przeprowadziła Doktorantka dla dwuwarstw lipidowych przygotowanych z mono- oraz di-galaktozyloglicerydów, jako układach modelowych dla natywnych błon komórkowych (głównie chloroplastów). Wyznaczone, techniką BLM, parametry fizykochemiczne takich struktur tj. charakterystyka prądowo-napięciowa oraz wartości oporu właściwego, pozwoliły Autorce ocenić subtelne różnice pomiędzy właściwościami membran zawierającymi jedynie MGDG i DGDG, jakie wystąpiły pod wpływem nadtlenu wodoru. Wskazują one na, zależny od stężenia H_2O_2 , wzrost przepuszczalności błon w domenach błonowych zawierających galaktolipidy. Interesujące, jednakże trudne technicznie, byłoby wyznaczenie podobnych zależności fizykochemicznych dla badanych układów modelowych w obecności rodnika hydroksylowego.

Dyskusję Doktorantka podzieliła na dwa podrozdziały, odpowiadające dwóm głównym cyklom eksperymentów tj. 1) wpływ RFT na zmiany potencjału błonowego generowanego u wątrobowca oraz 2) wpływ RFT na strukturę modelowej dwuwarstwy galaktolipidów. W obu podrozdziałach zamieściła krótki wstęp, w którym przedstawiła, w zwięzły sposób, wyniki prac innych badaczy dotyczące podobnych zagadnień, uzyskane dla innych roślin, komórek (protoplastów). Następnie omówiła wyniki uzyskanych przez siebie eksperymentów. Za szczególne osiągnięcie Doktorantki uważam, na co zwraca uwagę również Autorka, ewidentne wykazanie wpływu RFT na pracę kanałów jonowych u wątrobowca, tj. u rośliny, u której dotąd nie przeprowadzono tego typu badań. Wykazanie, iż również rodnik hydroksylowy może, podobnie jak cząsteczki nadtlenu wodoru, wpływać na pracę kanałów jonowych, których szybkość aktywacji jest często porównywana z szybkością aktywacji reakcji enzymatycznych, uważam za ważny wynik badań Doktorantki. Zagadnienia podrozdziału pierwszego konkluduje, iż pomimo wykazania działania obu badanych RFT na aktywację kanałów jonowych, jednak z uwagi na zbyt duże działanie ogólne RFT, trudno jest określić specyficzności ich reakcji na poszczególny kanał. Ostrożność w formułowaniu daleko idących wniosków bardzo dobrze świadczy o Doktorantce, jako o Młodym Naukowcu, który w sposób „wyważony” i z dużą rozważą przedstawia swoje osiągnięcia. Jednakże, sugeruję, aby w przyszłości Doktorantka podjęła z większą odwagą próbę przedstawienia możliwych schematów reakcji zachodzących w badanych układach eksperymentalnych tym bardziej, iż pozwalają na to Jej wiedza teoretyczna oraz doświadczenie w praktycznym wykorzystaniu technik elektrofizjologii.

W drugim podrozdziale Doktorantka, dyskutując wyniki eksperymentów wykonanych w układach modelowych stwierdza, że stosowane przez Nią stężenia nadtlenu wodoru nie powodują peroksydacji lipidów frakcji MGDG i MGDG. Obie frakcje, występujące głównie w błonach chloroplastów roślin, zwykle zawierają w swoich cząsteczkach większe ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych, niż nasyconych. Powinny być zatem bardziej podatne na utleniające działanie RFT. Wykazanie przez Doktorantkę wpływu nadtlenu wodoru na wzrost

przepuszczalności modelowej membrany lipidowej uważam za interesujący wynik. Wskazuje na możliwość udziału tej chemicznej „substancji sygnałowej”, również w modyfikacji własności strukturalnych błon, szczególnie tych, zawierających cukrowe pochodne lipidów. Konfrontując wyniki obu cykli eksperymentów Doktorantka stwierdza, iż w badanym zakresie stężeń, reaktywne formy tlenu wykazują głównie działanie aktywujące pracę kanałów jonowych, nie wpływając na peroksydację lipidów błonowych.

Wnioski końcowe badań zostały bardzo ostrożnie sformułowane i przedstawione w dwóch punktach. Sądzę, że Doktorantka mogłaby w tym rozdziale wypunktować również wnioski podsumowujące wyniki poszczególnych etapów eksperymentów, składających się na dwa wiodące problemy poruszane w dysertacji tj, generowanie sygnałów elektrycznych oraz rola galaktolipidów w reakcjach indukowanych przez RFT. Podsumowaniem efektów wszystkich eksperymentów byłby wniosek zawarty w końcowym fragmencie rozdziału Dyskusja.

Przedstawione w recenzji uwagi są w większości dyskusyjne i nie umniejszają znaczenia naukowego przedstawionej dysertacji. Uważam, iż uzyskane przez mgr Wiolettę Brankiewicz wyniki niewątpliwie przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat funkcji RFT nie tylko, jako cząsteczek inicjujących stres oksydacyjny, ale jako ważnych elementów mechanizmu komunikacji komórkowej.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr. Wioletty Brankiewicz spełnia wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Fidele