

Katowice, 14.12.2016

Prof. dr hab. Waldemar Karcz
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Brankiewicz pt.: „Wpływ reaktywnych form tlenu na indukcję sygnałów bioelektrycznych u wątrobowca *Conocephalum conicum* L.”, przygotowanej w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Trębacza

Rośliny rosnące w środowisku naturalnym narażone są na działanie abiotycznych i biotycznych czynników stresowych, które mogą hamować wzrost, zaburzać metabolizm lub prowadzić do trwałych uszkodzeń komórek, tkanek czy też organów rośliny. W wyniku ewolucji rośliny wykształciły sieć szybkiej sygnalizacji systemowej, która umożliwia im reagowanie na działanie lokalnych bodźców takich na przykład jak zranienie rośliny, atak patogenów, stres solny, światło o dużym natężeniu, ultrafiolet, wysokie temperatury, chłód, czy też szok osmotyczny. Wspomniana wyżej sygnalizacja systemowa jest złożonym zjawiskiem i zawiera m.in. takie mechanizmy jak zmiany potencjału membranowego i strumieni jonowych oraz falowe zmiany stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) jak i cytoplazmatycznego Ca^{2+} . Kluczem do uaktywnienia sygnalizacji systemowej u roślin wyższych jest komunikacja międzykomórkowa, która jak do tej pory jest słabo poznana.

Badania ostatnich kilku lat pokazały, że z działaniem różnych abiotycznych stresów związana jest samopropagująca się fala reaktywnych form tlenu, która przemieszcza się z uszkodzonej tkanki do całej rośliny z maksymalną prędkością 8.4 cm/min. Coraz więcej danych literaturowych wskazuje, że nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest elementem składowym rozchodzącej się fali RFT.

Mimo licznych badań prowadzonych w ostatnich kilku latach wciąż jest brak odpowiedzi na wiele podstawowych pytań, takich na przykład jak: (1) w jaki sposób jest inicjowana fala RFT i fala cytoplazmatycznego Ca^{2+} , jak obie fale między sobą oddziałują i jak są zintegrowane; (2) jakie są mechanizmy dekodujące rozchodzące się fale RFT i cytoplazmatycznego Ca^{2+} ; (3) dlaczego lokalne traktowanie tkanki egzogennym H_2O_2 nie powoduje powstawania fali RFT i/ albo Ca^{2+} ; (4) jaka jest zależność między falami RFT, Ca^{2+} i systemową sygnalizacją elektryczną.

W nurt badań dotyczących wyżej wspomnianych problemów dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr Wioletty Brankiewicz, której szeroko rozumianym celem jest dostarczenie nowych informacji na temat zależności między działaniem reaktywnych form tlenu a powstawaniem sygnałów bioelektrycznych u *Conocephalum conicum*.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mieści się na 134 stronach, zawiera 79 rysunków i 37 tabel. Spis cytowanej literatury liczy 148 pozycji. Praca ma typowy układ jaki jest przyjęty w rozprawach o charakterze doświadczalnym. Składa się z następujących części: Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Wstęp poprzedzony jest obszernym wykazem najważniejszych skrótów, spisem rysunków i tabel oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

We „Wstępie” Doktorantka, zgodnie z zakresem przeprowadzonych badań, omawia szereg zagadnień w 4 głównych podrozdziałach zatytułowanych odpowiednio: sygnały elektryczne u roślin, budowa błony komórkowej u roślin, transport przez błony biologiczne i reaktywne formy tlenu. We „Wstępie” została uwzględniona odpowiednia literatura – od historycznych pozycji z XVIII wieku – do 2016 roku włącznie. Wstęp jest monograficznym opracowaniem wyżej wspomnianych zagadnień, w którym dużo miejsca poświęcono funkcjonowaniu kanałów jonowych i powstawaniu reaktywnych form tlenu (RFT).

Głównym celem badań podjętych w rozprawie doktorskiej mgr Wioletty Brankiewicz było sprawdzenie czy reaktywne formy tlenu (RFT) wpływają na indukcję sygnałów bioelektrycznych u wątrobowca *Conocephalum conicum*, który charakteryzuje się zdolnością generowania potencjałów czynnościowych. Doktorantka realizuje wyżej wspomniany cel poprzez badanie wpływ różnych stężeń nadtlenu wodoru (H_2O_2) i rodnika hydroksylowego na aktywność transporterów jonowych odpowiedzialnych za powstawanie potencjałów czynnościowych u *Conocephalum conicum* oraz poprzez badanie wpływu H_2O_2 na własności elektryczne błony modelowej.

W rozdziale zatytułowanym „Materiał i Metody” Autorka dokonuje charakterystyki materiału roślinnego oraz opisuje stosowane metody. Jak wynika z treści tego rozdziału

Doktorantka stosuje dwie metody – metodę mikroelektrodową, która od wielu lat z dużym powodzeniem jest stosowana w Zakładzie Biofizyki UMCS, oraz metodę czarnych błon lipidowych. Rozdział „Materiał i Metody” jest napisany jasno i nie budzi wątpliwości.

Rozdział zatytułowany „Wyniki” podzielono na dwa główne podrozdziały, z których pierwszy dotyczy wpływu nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylogowego na sygnały bioelektryczne u wątrobowca *Conocephalum conicum*, natomiast drugi wpływu nadtlenu wodoru na własności elektryczne dwuwarstwy lipidowej złożonej z monogalaktozylodiacylglicerol (MGDG) oraz dwuwarstwy złożonej z digalaktozylodiacylglicerol (DGDG). Prezentacja wyników w tabelach i na rycinach jest klarowna a ich opis wyczerpujący. Statystyczne opracowanie wyników nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka w pełni zrealizowała założone cele badawcze uzyskując interesujące wyniki.

Najważniejsze z nich to wykazanie, że:

- nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylogowy indukują jeden lub serię potencjałów czynnościowych u wątrobowca *Conocephalum conicum*,

- blokery kanałów anionowych i kationowych oraz ich kombinacje nie pozwalają wykazać różnic w jonowym mechanizmie powstawania reakcji bioelektrycznej indukowanej przez nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylogowy u wątrobowca *Conocephalum conicum*.

Wnioski znajdują pełne uzasadnienie w wynikach uzyskanych przez Doktorantkę. Najważniejsze z nich to stwierdzenie, że nadtlenek wodoru jak i rodnik hydroksylogowy wpływają na aktywację kanałów jonowych biorących udział w powstawaniu potencjału czynnościowego u wątrobowca *Conocephalum conicum*. Mimo licznych wyników uzyskane dane nie pozwoliły Autorce pracy wykazać specyficznego działania nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylogowego na badane kanały jonowe. Kolejny ważny wniosek to stwierdzenie, że nadtlenek wodoru nie powoduje peroksydacji mono- i digalaktozylodiacylglicerolu.

Dyskusja została podzielona na dwie główne części, z których każda dotyczy odpowiedniej części wyników. Doktorantka przytacza w niej tylko najbardziej istotne fakty, uzyskane w toku badań, unikając w ten sposób niepotrzebnych powtórzeń. W pierwszej części Dyskusji, dotyczącej wpływu reaktywnych form tlenu na reakcję bioelektryczną wątrobowca, zabrakło, moim zdaniem, odniesienia do danych literaturowych pokazujących jak blokery kanałów jonowych wpływają na potencjał czynnościowy, natomiast w części drugiej, dotyczącej wpływu nadtlenu wodoru na peroksydację badanej błony modelowej, zabrakło odniesienia do danych literaturowych pokazujących wpływ reaktywnych form tlenu na fazę lipidową błon biologicznych.

W trakcie czytania pracy dostrzegłem kilka małoistotnych błędów:

1 – w równaniu Goldmana (str. 20) nie powinno być stałej „z” (wartościowość jonu),

2 – na str. 37 powinno być, że kanały typu SV są zależne od napięcia

3 – w Tab. 6 (str. 66) przy A_{PII} N powinno być równe 4/7

4 – na stronie 88 zamiast 15 mM H₂O₂ powinno być 5 mM Cu/asc.

Uwagi te mają charakter redakcyjny i w żadnym stopniu nie obniżają merytorycznej wartości pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że założony cel pracy Doktorantka w pełni zrealizowała, uzyskując interesujące wyniki, które wnoszą nowe wartości poznawcze w zakresie elektrofizjologii roślin.

Uważam, że przedłożona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej wniosek o dopuszczenie mgr Wioletty Brankiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Waldemar Karcz

