



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

dr hab. Dariusz Latowski

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Dyby

pt.: „Strukturalno-funkcjonalne modyfikacje membran komórek pszenicy

w układach naturalnych i modelowych w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego

działaniem mykotoksyny (zearalenonu)”

Promotorem jest Pani Prof. dr hab. Maria Filek

Promotorem pomocniczym jest Pani dr Elżbieta Rudolphi-Skórska

1. Podstawa prawna: uchwała nr 45/WGB/2019 Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie z dnia 29 maja 2019 r. dotycząca przygotowania poniższej recenzji.

2. Ogólna ocena

Rozprawę doktorską Pani mgr Barbary Dyby oceniam jako bardzo dobrą i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego UP o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

3. Uzasadnienie oceny

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Dyby zawiera w sobie dwa bardzo istotnie w nauce aspekty – aspekt poznawczy i wspierający znaczenie tego pierwszego, aspekt praktyczny. Podjęta tematyka badawcza mieści się w zakresie tzw. badań podstawowych a praca służy poznaniu mechanizmu działania jednej z najbardziej toksycznych mykotoksyn, tj. zearalenonu. Toksyna ta produkowana przez wiele grzybów z rodzaju *Fusarium* z jednej strony jest szkodliwa dla ludzi i wielu zwierząt gospodarczych, takich jak trzoda chlewna, drób czy małe i duże przeżuwacze, a z drugiej przyczynia się do powstania strat w uprawach takich roślin jak kukurydza, pszenica, owies, soja, sezam czy ryż. Jak zaznacza Autorka pracy, poznanie mechanizmu działania zearalenonu pozwoliłoby na opracowanie metody, możliwie nieinwazyjnej dla roślin i środowiska, ograniczającej efekty działania tej toksyny, a tym samym minimalizującej, a może nawet eliminującej, znaczne straty gospodarcze w uprawach roślin i hodowli zwierząt, ostatecznie obniżając ryzyko obecności tej toksyny w produktach spożywanych przez człowieka. Docenić należy fakt, że Doktorantka nie tylko

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48 (12) 664 6536

tel.kom +48 662 180 994

email:dariuszlatowski@gmail.com

zakłada, że dokonana analiza mechanizmu działania zearalenonu pozwoli na opracowanie metody ograniczającej, czy eliminującej straty, ale sama w pracy proponuje podstawy takiej metody, opartej na ochronnym działaniu jednego z brassinosteroidów, tj. 24-epibrassinolidzie (EBR), i co więcej: dokonuje weryfikacji zasadności tych podstaw. Zatem tematyka pracy badawczej Pani mgr Barbary Dyby, zwieńczona ocenianą rozprawą doktorską, została ukształtowana tak, aby skupiała się wokół problemu, którego rozwiązanie nie tylko poszerza wiedzę, ale jednocześnie czyni tę wiedzę przydatną w gospodarce i nadaje jej wysoki potencjał aplikacyjny w bardzo istotnych ekonomicznie i zdrowotnie aspektach.

Wszystko to decyduje o mojej bardzo wysokiej ocenie doboru tematyki badawczej Doktorantki. Wysoko oceniam również sprecyzowanie celu badań. Został on osadzony na dotychczasowych przesłankach wskazujących mechanizm działania zearalenonu. Pozornie wydawać by się mogło, że ograniczenie badań tylko do ujętego w pracy aspektu strukturalno-funkcjonalnych modyfikacji błon komórkowych w warunkach stresu oksydacyjnego, który badana mykotoksyna wywołuje, niesie niebezpieczeństwo poznania badanego problemu jedynie w uproszczonym zakresie. W rzeczywistości natomiast, szczególnie po zapoznaniu się z pięknie opracowanym modelem eksperymentalnym i zaawansowanym i bogatym warsztatem metodycznym, okazuje się że właśnie to pozorne ograniczenie zakresu badań staje się ich atutem, świadczy o doskonałym rozumieniu istoty działania zearalenonu i ostatecznie pozwala na dokładną realizację postawionego celu w szeroko pojętej złożoności sekwencji powiązań badanej mykotoksyny z generowaniem stresu oksydacyjnego i jego wpływu na błony biologiczne, a wszystko to wraz z weryfikacją potencjału ochronnego 24-epibrassinolidu (EBR) i zastosowaniem dwóch odmian pszenicy wykazujących odmienną wrażliwość na stres oksydacyjny. Zatem precyzja zdefiniowania celu badawczego, szczególnie w odniesieniu do jego istotności i weryfikacji założeń pod względem potencjału aplikacyjnego, świadczy o obszernej wiedzy Doktorantki w zakresie poruszanej tematyki i zasługuje na wysokie uznanie.

Bardzo wysoko oceniam również złożony i bardzo ładnie zaplanowany model eksperymentalny zastosowany w pracy. Jako jego prototyp można wskazać układ typu „czarnej skrzynki”. Funkcję „czarnej skrzynki” w tym modelu pełni albo tkanka roślinna, albo układ modelowy, oparty na wyizolowanych z tej tkanki lipidach. „Skrzynka”, jak to zwykle w tego typu układach bywa, nie jest w pełni czarna, ma też cechy „skrzynki białej”, gdyż Doktoranta wie przykładowo, że dysponuje tkanką kalusową z roślin o różnej wrażliwości na stres oksydacyjny, a układy modelowe posiadają zdefiniowany *a priori* skład lipidowy. To oczywiście ogromne atuty, bo w badaniach istotne jest, aby opracować model jak najlepiej zdefiniowany, czyli jak najbardziej odpowiadający „białej skrzynce”, co jak wiadomo w naukach biologicznych jest nie lada wyzwaniem. Sygnałami na wejściu „skrzynki” były:

- ozonowanie, jako czynnik różnicujący stan „skrzynki” – próbki ozonowane traktowane są jako poddane stresowi oksydacyjnemu;

- zearalenon, jako nadrzędny badany czynnik generujący stres oksydacyjny;
- 24-epibrassinolidu (EBR), stosowany w celu weryfikacji jego zdolności „osłonowych” wobec stresu oksydacyjnego.

Sygnałami na wyjściu „skrzynki” były liczne badane parametry, takie jak:

- przyrost biomasy tkanki kalusowej;
- analiza poziomu stresu oksydacyjnego monitorowana aktywnością wybranych enzymów antyoksydacyjnych i stężeniem wybranych molekularnych wskaźników stresu.

W sumie tkanka kalusowa analizowana była z wykorzystaniem ponad 15 różnych typów sygnałów wyjściowych, a dodatkowo sprawdzano w niej poziom cząsteczek podawanych jako sygnał wejściowy, czyli zawartość zearalenonu i EBR.

Badano również, jak sygnały na wejściu wpływają na poziom wybranych grup lipidów, takich jak fosfolipidy i glikolipidy z podziałem tych ostatnich na mono- i digalaktozyloglicerole.

Należy również wspomnieć, że te dwie grupy lipidów, tj. fosfo- i glikolipidy, były także izolowane z tkanki kalusowej, z każdego z wariantów eksperymentu i wykorzystywane do tworzenia drugiego rodzaju „skrzynki”, czyli tzw. jednoskładnikowych układów modelowych, czyli monowarstw lipidowych. Analiza składu lipidowego kalusa, jako sygnału wyjściowego pierwszego typu „skrzynki”, dostarczyła informacji opisującej skład drugiego rodzaju „skrzynki” będącej pochodną tej pierwszej i jednocześnie dającej Eksperymentatorce możliwość wniknięcia na głębszy poziom badań, czyli fizykochemiczną charakterystykę monowarstw lipidowych zbudowanych z lipidów pochodzących z doskonale scharakteryzowanych pod względem fizjologiczno-biochemicznym „skrzynek” pierwszego typu, czyli kalusów dwóch odmian pszenicy. Piszę o tym dlatego, że ten powyższy zarys idei prac pokazuje umiejętność perfekcyjnego planowania eksperymentu, gdzie każdy z etapów jest krokiem w wędrówce prowadzącej do możliwie najpełniejszego poznania badanej rzeczywistości. Plan eksperymentów, postawiona hipoteza badawcza wraz z celami i ogromem prac wykonanych w czasie ich realizacji pozwalają mi uznać rozprawę doktorską Pani mgr Barbary Dyby za wyróżniającą.

Bardzo wysoko oceniam również zastosowany w badaniach warsztat metodyczny. Wyraźnie oddaje on charakter pracy Doktorantki. Cała „opowieść” rozpoczyna się od hodowli dwóch odmian pszenicy. Nasiona trzeba było wysterylizować, posiać i wyhodować rośliny. Rozprawa dowodzi, że Doktorantka dobrze poradziła sobie z tym pierwszym etapem badań. Pszenica hodowana była, aby mogła stać się źródłem kalusa, co mimo iż wymaga zastosowania odmiennych technik niż hodowla wazonowa, również się Doktorantce udało. Kolejne badania prowadzone były z wykorzystaniem wielu metod biochemicznych i biofizycznych, niektórych na bardzo zaawansowanym poziomie, i zawsze z powodzeniem. Otrzymane w pracy wyniki zostały estetycznie i czytelnie zaprezentowane i omówione na ponad 20 stronach, co stanowi ponad 30% objętości całej rozprawy. Po omówieniu

każdego eksperymentu Doktorantka zamieszczała zwięzłe, kilkudzaniowe podsumowanie, co tym bardziej czyniło całą tę część pracy bardzo przejrzystą.

Wysoko oceniam również dyskusję uzyskanych wyników. Stanowi ona ponad 15% objętości autorskiego tekstu i jest napisana jasnym językiem z licznymi i bardzo wnikliwie omawianymi odnośnikami do publikacji innych autorów. W moim odczuciu zaprezentowana przez Doktorantkę dyskusja świadczy o znakomitej umiejętności krytycznej analizy wyników własnych badań, szczególnie w świetle bardzo szerokiej i dogłębnie poznanej przez Autorkę wiedzy literaturowej. Zawarty na końcu rozprawy wykaz literatury liczy około 250, bardzo dobrze dobranych, aktualnych publikacji. Cała rozprawa doktorska wyraźnie wskazuje, że Autorka jest dojrzałą badaczką, świetnie orientującą się w swojej tematyce badawczej i przypuszczalnie dobrze przygotowaną do dalszej samodzielnej pracy naukowej.

Autorski tekst rozprawy doktorskiej kończy wykaz najważniejszych wniosków, które wraz z wynikami i dyskusją wskazują na słuszność postawionych w pracy hipotez i poprawność przyjętych procedur eksperymentalnych. Ostatnim elementem graficznym rozprawy jest, w moim odczuciu, bardzo wartościowy rys. 42 ukazujący schematyczne podsumowanie przeprowadzonych badań i wypływających z nich wniosków. Jest on dowodem kolejnej umiejętności Doktorantki, jaką jest zwięzła, graficzna i jednocześnie przejrzysta prezentacja najważniejszych osiągnięć pracy. Przed wykazem literatury zawarte są jeszcze, dobrze oddające treść rozprawy, streszczenia w języku polskim i angielskim.

4. Uwagi

Cała rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Dyby jest przygotowana bardzo starannie zarówno pod względem logicznego układu treści, jak i opracowania edytorskiego. Bardzo nieliczne błędy, na jakie natrafiłem to np.:

- kilka tzw. literówek np. str. 10 linia 16, str. 14 linia 2 i od dołu 6, str. 15 linia 5 i 12, str. 23 w pełnej nazwie MGDG;
- na str. 7 linia 13 i str. 34 linia 11 od dołu ułamek dziesiętny pisany z kropką zamiast z przecinkiem i choć w tekście taki zapis zdarza się rzadko to niestety jest powszechny w wielu tabelach np. 3–6;
- na str. 9 linia 6 jest nieprawdziwe stwierdzenie, że workowce nie tworzą owocników, a tworzą i to niektóre bardzo oryginalne;
- na str. 10 linia 12 powinno być, moim zdaniem, cytochrom P450, a nie 45P;
- na str. 15 w pierwszej linii wspomniano, że jony żelaza są koenzymem, a powinno być „kofaktorem”, a na str. 48 w tytule podrozdziału 4.2.2.1 zamiast „stężenia” dysmutaz powinna być ich „aktywność”;

- moim zdaniem lepiej byłoby podpisywać ilustracje jako ryciny, a nie rysunki, bo niektóre z nich to ewidentnie zdjęcia;
- na rys. 23 brak legendy, ale spójność stylistyczna pracy sprawia, że w praktyce nie ma to znaczenia.
- W pracy pojawia się kilkakrotnie, stosowany czasami niepoprawnie w polskim języku, spójnik „i/lub” mający chyba swoje źródło w angielskim „and/or”. W języku polskim stosowanie „i/lub” jest nielogiczne, bo polskie „lub” zawiera w sobie również „i”, tzn. jest spójnikiem łączącym dwa zdania równorzędne oraz dwie części zdania, wskazując, że **przynajmniej** jedna część jest prawdziwa. Dodatkowo język polski ma słowo „albo”, które nie ma swego dosłownego odpowiednika w języku angielskim (stąd „and/or”), a które jest spójnikiem łączącym dwa zdania równorzędne, oraz dwie części zdania, wskazując, że **tylko jedna** część jest prawdziwa – wystarczy więc pisać „lub”, jeśli chcemy wskazać, że możliwe było stosowanie więcej niż jednej opcji równocześnie, choć np. nie zawsze tak było, natomiast gdy chcemy wyraźnie zaznaczyć, że możliwa jest tylko jedna opcja nigdy więcej niż jedna opcja nie była użyć słowa „albo”.
- Niezbyt fortunny jest też tautologiczny zwrot „wzajemne interakcje” np. na stronie 26 – interakcje są zasadniczo wzajemne.
- Ciekawi mnie też, co Doktorantka rozumie przez stwierdzenie, że glutation odpowiada za utrzymanie zredukowanego stanu zeaksantyny (str. 17 linia 5–6).
- Moim zdaniem szkoda, że w pracy nie opisano dokładniej warunków doboru stężenia 24-epibrassinolidu (EBR) i nie zaprezentowano wyników z tego etapu badań. Żałuję również, że po dokonaniu wyboru stężenia nie zaprezentowano efektu działania EBR obecnego w pożywce jako jeden z elementów składowych rys. 20, czyli jego wpływu na przyrost biomasy kalusów.
- Pewien niepokój wzbudził we mnie rys. 21, ukazujący stężenie 24-epibrassinolidu (EBR) w tkankach kalusów traktowanych i nietraktowanych tym fitohormonem. Zawartość EBR w tkance kalusa, która miała styczność z egzogennym EBR, jest niemal dwustukrotnie wyższa niż w nietraktowanych tym hormonem kontrolach! Odnotowane stężenia wydają się więc bardzo dalekie od fizjologicznych. Czy i jakie konsekwencje może mieć ta sytuacja dla roślin, gdyby opracowany układ eksperymentalny przenieść na skalę upraw pszenicy zyskującej wzrost odporności na zearalenon oparty o EBR?

5. Wniosek końcowy

Rozprawa Pani mgr Barbary Dyby pt.: „Strukturalno-funkcjonalne modyfikacje membran komórek pszenicy w układach naturalnych i modelowych w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem mykotoksyny (zearalenonu)”, przygotowana pod opieką Pani Promotor, Prof. dr hab. Marii Filek i Promotor Pomocniczej Pani dr Elżbiety Rudolphi-Skórskiej, spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dn. 20 lipca 2018 (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.)

tj.:

- prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej;
- jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego poznania molekularnych aspektów działania zearalenonu, szczególnie w powiązaniu z wywoływanym przez ten związek stresem oksydacyjnym, a także wykazanie w tym mechanizmie potencjału ochronnego 24-epibrassinolidu (EBR) dla tkanek roślinnych.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę istotny wkład pracy doktorskiej we współczesną wiedzę na temat mechanizmu szkodliwego działania zearalenonu i zaproponowanie sposobu ochrony wobec wspomnianej mykotoksyny, a także poziom i zakres przeprowadzonych badań, wnioskuję o przyjęcie rozprawy Pani mgr Barbary Dyby, dopuszczenia Doktorantki do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych i uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Geograficzno-Biologicznego UP w Krakowie o uznanie pracy doktorskiej za wyróżniającą.

Dariusz Łotowski