



Dr hab. Iwona Ciereszko, prof. UwB
Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Uniwersytet w Białymstoku
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ivana Jajić, doktoranta w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Oxidative stress and changes in thylakoid membrane fluidity during barley leaf senescence”

Rozprawa doktorska mgr Ivana Jajić, wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Kazimierza Strzałki, dotyczy zagadnień związanych z modyfikacją płynności błon tylakoidów w chloroplastach oraz produkcją i rolą reaktywnych form tlenu podczas procesu starzenia liści rośliny uprawnej – jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.).

Oceniana rozprawa doktorska to cykl trzech monotematycznych publikacji, zaopatrzonej streszczeniem oraz kilkustronicowym wprowadzeniem; dwie publikacje oryginalne opublikowano w czasopiśmie *Journal of Plant Physiology* (IF 2014 - 2,557) a pracę przeglądową - w *Plants* (Open Acces). Wszystkie artykuły są pracami zespołowymi, nazwisko Doktoranta umieszczone jest na pierwszym miejscu, co wskazuje na znaczącą/wiodącą rolę mgr Ivana Jajić; jak wynika z oświadczeń współautorów, Doktorant był głównym wykonawcą, przygotowywał także manuskrypty do druku.

Praca przeglądowa "Senescence, stress and reactive oxygen species" (autorstwa Jajić I, Sarna T. i Strzałka K.) opublikowana w 2015 roku w *Plants* (4: 393-411) jest publikacją ciekawą, dobrze napisaną i zawiera obszerny przegląd aktualnej literatury wprowadzający w dziedzinę naukowych zainteresowań Doktoranta. Proces starzenia liści jest ważnym momentem prowadzącym do zakończenia cyklu życiowego zbóż, jest jednym z czynników warunkujących produktywność roślin, dlatego też budzi w ostatnich latach zainteresowanie wielu badaczy. W pracy trafnie uwzględniono najważniejsze i najnowsze pozycje piśmiennictwa na temat roli reaktywnych form tlenu (ROS) podczas procesu starzenia liści różnych roślin, także starzenia indukowanego stresowymi czynnikami środowiskowymi. Opisano ponadto metody pomiarów

produkcji ROS, uwzględniając najnowsze techniki badawcze. Zaproponowano schematy obrazujące wytwarzanie ROS w komórce roślinnej oraz przedstawiające funkcje przypisywane ROS podczas starzenia i warunków stresowych w liściach roślin. Zgodnie z oświadczeniami współautorów, Doktorant napisał pracę samodzielnie, kierując się sugestiami/poradami prof. K. Strzałki i prof. T. Sarny.

Praca oryginalna zatytułowana "EPR spin labelling measurements of thylakoid membrane fluidity during barley leaf senescence" (autorstwa Jajić I., Wiśniewska-Becker A., Sarna T., Jemiola-Rzemińska M., Strzałka K.) została opublikowana w 2014 roku w *Journal of Plant Physiology* (171: 1046-53). Przeprowadzono analizę właściwości fizycznych/ zmian strukturalnych błon tylakoidów, izolowanych z chloroplastów, podczas procesu starzenia liści jęczmienia. Należy podkreślić, że dotychczas badano przede wszystkim modyfikacje błon komórkowych, natomiast właściwości błon tylakoidów w trakcie dojrzewania i starzenia liści były mało poznane. Badania prowadzono podczas naturalnie zachodzącego starzenia, w drugim liściu źdźbła jęczmienia, w okresie od 14 do 36 dni od wysiania nasion; dodatkowo zbadano zmiany zachodzące podczas indukowanego procesu starzenia, który przyspieszano przetrzymując rośliny w ciemności. Właściwości izolowanych błon tylakoidów badano przy użyciu techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) i znakowania/ pułapkowania spinowego; jako znaczników spinowych używano pochodnych kwasu stearynowego (5-SASL, 5-DOXYL-stearic acid, free radical oraz 16-SASL). Stosowane znaczniki spinowe pozwoliły na analizę struktury błon na różnych głębokościach warstwy fosfolipidowej, w pobliżu zewnętrznej powierzchni (5-SASL) oraz w części środkowej membrany (16-SASL). Z krzywych nasycenia znaczników spinowych i widm EPR wyliczono ponadto parametry transportu/ dyfuzji tlenu. Należy podkreślić nowatorskie zastosowanie technik pomiarowych, i podejście, do badania procesu starzenia liści. Uzyskane wyniki wskazały na istotny wzrost płynności błony tylakoidowej podczas procesu starzenia się liści jęczmienia, zwłaszcza u roślin starszych, uprawianych ponad 27 dni od wysiania. Wzrastał także parametr transportu tlenu, $W(x)$, sugerując łatwiejszą dyfuzję tlenu przez błony. Zmianom obserwowanym w błonach tylakoidów towarzyszyły klasyczne symptomy starzenia liści a mianowicie spadek zawartości chlorofilu, karotenoidów i białek. Stosując technikę HPLC oznaczono w błonach tylakoidów, oprócz chlorofilu a i b także β -karoten, luteinę, wiolaksantynę i neoksantynę; większość oznaczonych barwników nie zmieniała się istotnie (w stosunku do całkowitej zawartości chlorofilu), natomiast wraz ze starzeniem liści wzrastał poziom β -karotenu. Okazało się, że podczas starzenia naturalnego i stymulowanego

ciemnością procesy zachodzące w błonach tylakoidów mogą mieć różną intensywność. W opinii recenzenta ten aspekt badań wydaje się być ciekawy i warty dalszych analiz/porównań, zwłaszcza że w warunkach naturalnych czynniki stresowe często powodują przyspieszenie dojrzewania i starzenia roślin. Doktorant, wraz z współautorami, stwierdził, że wzrost płynności błon i wskaźnika transportu tlenu oraz prawdopodobne obniżenie aktywności cyklu ksantofilowego, chroniącego aparat fotosyntetyczny, mogą świadczyć o większej podatności błon tylakoidów na uszkodzenia spowodowane nadmierną produkcją wolnych rodników. Wątek ten był kontynuowany w kolejnej, ostatniej z cyklu pracy zatytułowanej "Changes in production of reactive oxygen species in illuminated thylakoids isolated during development and senescence of barley" (autorstwa Jajić I., Sarna T., Szewczyk G., Strzałka K.), która została opublikowana w 2015 roku w *Journal of Plant Physiology* (184: 49-56). Doktorant, wraz z współautorami, zastosował nowoczesne techniki do pomiaru produkcji/zawartości wybranych reaktywnych form tlenu w izolowanych błonach tylakoidów. Poziom nadtlenu wodoru oznaczono dwoma metodami: za pomocą pułapkowania spinowego EPR (z POBN, α -(4-pirydylo-1-tlenek)-*N*-tert-butylnitronu) oraz fluorogenu *N*-acetylo-3,7-dihydroksy-fenoksa-zyny (Amplex Red). Poziom anionorodnika ponadtlenu oznaczano z użyciem metody pułapkowania spinowego EPR (z DMPO, *N*-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny) a wytwarzanie tlenu singletowego oznaczano na podstawie zmian luminescencji. Określano także aktywność fotosyntetycznego transportu elektronów (PET) w izolowanych błonach tylakoidów oraz poziom peroksydacji lipidów błon w trakcie procesu starzenia liści jęczmienia. Uzyskane wyniki świadczyły o zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru oraz anionorodnika ponadtlenu w trakcie przechodzenia liścia z fazy dojrzałej do starzenia (ok. od 25 do 29 dnia od wysiania), wzrastała wówczas peroksydacja lipidów a spadała zawartość chlorofilu, natomiast nie zmieniało się wytwarzanie tlenu singletowego ani aktywność fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Następnie, po 29 dniach od wysiania, poziom nadtlenu wodoru oraz anionorodnika ponadtlenu spadał; po kolejnych dziesięciu dniach ponownie wzrastała zawartość nadtlenu wodoru w tylakoidach. Wzmoczone generowanie anionorodnika ponadtlenu oraz nadtlenu wodoru, jak wskazuje Doktorant, było skorelowane ze wzrostem płynności błon tylakoidów, obserwowanym we wcześniejszych badaniach. Doktorant, wraz z współautorami, zaproponował schemat kolejności zdarzeń zachodzących w błonach tylakoidów podczas dojrzewania i starzenia się liści jęczmienia, zasugerował także sygnałną rolę nadtlenu wodoru w procesie starzenia.

Generalnie, w ocenie opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej recenzent ma ułatwione zadanie, gdyż przed drukiem przeszły już one weryfikację specjalistów/recenzentów. Prace oryginalne zawierają ciekawe wyniki związane z niewystarczająco dotychczas zbadanymi zmianami w błonach tylakoidów podczas starzenia liści. Rozdziały prac opisujące materiał i metody zawierają wiele informacji wymaganych do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. Dobór metod jest właściwy, stosowano nowoczesne techniki badań a spektrum metod badawczych jest wystarczające dla rozprawy doktorskiej. Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy są pracami zespołowymi, co pokazuje, że Doktorant potrafi sprawnie pracować w zespole badawczym. Nazwisko Doktoranta umieszczone jest zawsze na pierwszym miejscu wskazując na wiodącą rolę mgr Ivana Jajić, co potwierdzają oświadczenia wszystkich współautorów publikacji.

Rozprawa doktorska poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz niepublikowanym wstępem (w jęz. angielskim), którego rolą powinno być nadanie rozprawie, składającej się z kilku publikacji, ogólnego/spójnego charakteru. Wprowadzenie do rozprawy jest w miarę rzeczowo napisane i prezentuje tezy rozprawy, jednak pozostawia pewien niedosyt informacyjny. Materiał roślinny, przynajmniej w opinii fizjologa roślin, mógłby być scharakteryzowany (np. podane podstawowe parametry wzrostowe) lub zilustrowany, a przynajmniej należałoby powołać się na własne badania wstępne lub badania innych współpracowników (np. daczego wybrano takie a nie inne liście jęczmienia do analiz, na jakim podłożu uprawiano jęczmień, w jakim okresie/porze roku). Nie powinno się umieszczać we wprowadzeniu do rozprawy rycin z prac już opublikowanych (zwłaszcza nie powołując się na te prace) – dotyczy to Fig. 1 (czyli Fig. 6 z *J. Plant Physiol.* 2014), Fig. 3 (Fig.6 – *J. Plant Physiol.* 2015) oraz Fig. 4 (Fig. 10 – *J. Plant Physiol.* 2015). Ponadto brakuje numeracji stron a w początkowym zestawieniu prac wchodzących w skład rozprawy podano nieprawidłowy rok wydania trzeciej pracy. W danym wariantcie eksperymentalnym nie oznaczono aktywności antyoksydacyjnej, przynajmniej pilotażowo, wybranych antyoksydantów enzymatycznych (i ich ewentualnych zmian podczas starzenia liści). Zabrakło także solidnego podsumowania i wskazania/ zasugerowania jakiego typu badania powinny być kontynuowane w najbliższej przyszłości w celu wyjaśnienia i lepszego zrozumienia zmian biochemicznych czy biofizycznych zachodzących w starzejących się liściach zbóż (oraz które aspekty mogłyby mieć znaczenie aplikacyjne). Wydaje się, że powinna być też w większym stopniu cytowana literatura dotycząca zmian biochemicznych w plastydach/chloroplastach zachodzących podczas procesu starzenia się liści jęczmienia – brakuje prac polskich zespołów

badających podobny materiał pod kątem starzenia, np. Sobieszczuk-Nowicka i wsp. 2015 (Amino Acids 47: 825-38), Żelisko, Jackowski 2004 (J. Plant Physiol. 161:1157-70).

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej można uznać, że Doktorant opanował metodykę badań w dziedzinie nowoczesnej biofizyki, fizjologii i biochemii roślin oraz wykazał się dobrą znajomością terminologii naukowej. Potrafił poprawnie zaplanować doświadczenia oraz prawidłowo zinterpretować i przedyskutować ich rezultaty (z najnowszymi danymi z literatury światowej). Mgr Ivan Jajić wydaje się być badaczem o ściśle sprecyzowanych zainteresowaniach naukowych. O doświadczeniu Doktoranta, jako badacza, świadczą również inne prace oryginalne opublikowane w czasopismach angielskojęzycznych, w których jest współautorem (dwie publikacje z 2011 r.); jest również autorem i współautorem ponad 10 doniesień konferencyjnych (w tym wystąpień na konferencjach międzynarodowych).

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że wymienione nieliczne uwagi krytyczne recenzenta nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej mgr Ivana Jajić. Doktorant zrealizował cele stawiane w pracy. Tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna, ważna naukowo, pewne aspekty mało poznane; Doktorant opanował współczesne metody badawcze. Stwierdzam, jako recenzent, że **praca doktorska mgr Ivana Jajić, zatytułowana „Oxidative stress and changes in thylakoid membrane fluidity during barley leaf senescence” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595). Występuję zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Ivana Jajić do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 2015.10.23



Dr hab. Iwona Cierieszko, prof. UwB

