

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Agnieszki Wal** zatytułowanej „Funkcje reaktywnych form tlenu i azotu w pułapce dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*) podczas rozwoju i trawienia pokarmu” wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. Urszuli Krasuskiej, prof. SGGW i dr Pawła Staszka

Zjawisko mięsożerności w świecie roślin wykształcało się szereg razy, wśród przedstawicieli różnych taksonów, dostarczając odmiennych rozwiązań w zakresie budowy i funkcjonowania organów pułapkowych. Ta osobliwa strategia adaptacyjna wykształcona w toku ewolucji w odpowiedzi na deficyty substancji odżywczych wymaga precyzyjnego skoordynowania procesów rozwojowych, prowadzących do wykształcenia wyspecjalizowanych pułapek, skutecznego wabienia ofiar, dekompozycji ich ciał w toku procesów trawiennych, dróg wchłaniania uwolnionych składników odżywczych i ich dystrybucji w organizmie roślinnym. Wykształcane na końcach nerwu blaszek liściowych, charakterystyczne pułapki dzbaneczników (*Nepenthes* sp.) są wysoce wyspecjalizowanymi organami, których struktura podporządkowana jest stojącym przed nimi zadaniom, wabieniu, chwytaniu, trawieniu pokarmu i wchłanianiu uwolnionych z niego substancji odżywczych. Kluczową rolę w trawieniu pokarmu odgrywa ciecz trawienna wypełniająca wnętrze dzbanka i zaopatrywana przez komórki strefy gruczołowej w enzymy trawienne oraz inne związki o aktywności biologicznej. Zsynchronizowane działanie enzymów trawiennych oraz wchłanianie produktów dekompozycji pokarmu podlega regulacji. Zrozumienie jej mechanizmu wymaga zidentyfikowania zaangażowanych w nią czynników i opisanie interakcji pomiędzy nimi. Wiedza ta jest wciąż fragmentaryczna. W tym kontekście podjęcie przez Panią mgr Agnieszkę Wal badań nad rolą aktywnych form tlenu i azotu w pułapce dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*) podczas rozwoju i trawienia pokarmu było decyzją w pełni uzasadnioną.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Wal składa się z cyklu czterech prac opublikowanych w latach 2022-2025 w recenzowanych czasopismach międzynarodowych, posiadających tzw. współczynnik wpływu (impact factor). Badania oraz zagadnienia opisane w rozprawie dotyczą funkcji reaktywnych form tlenu (RFT) oraz reaktywnych form azotu (RNS) w procesie trawienia pokarmu w pułapkach rośliny mięsożernej, dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*). Prace zostały opatrzone wspólnym komentarzem autorskim w języku polskim. Ta część rozprawy składa się z wprowadzenia, prezentacji celów naukowych opisywanych badań, sformułowania hipotez badawczych, scharakteryzowania metodyki i wykorzystanych w badaniach układów doświadczalnych, opisanie i dyskusji wyników. Całość omówienia zamykają podsumowanie i wnioski oraz obszerna bibliografia. Do rozprawy dołączono również streszczenia w językach polskim i angielskim, oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w jej skład.

W skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Wal wchodzi cztery, tematycznie spójne, artykuły naukowe.

- ROS and RNS alterations in the digestive fluid of *Nepenthes x ventrata* trap at different developmental stages. Wal A., Staszek P., Pakula B., Paradowska M., Krasuska U. *Plants* 2022, 11(23), 3304.
- Do reactive oxygen and nitrogen species have a similar effect on digestive processes in carnivorous *Nepenthes* plants and humans? Krasuska U., Wal A., Staszek P., Ciacka K., Gniazdowska A. *Biology* 2023, 12(10), 1356.
- Nitric oxide action in the digestive fluid of *Nepenthes x ventrata* is linked to the modulation of ROS level. Wal A., Piekarniak M., Staszek P., Chodór K., Bieniek J., Gniazdowska A., Krasuska U. *Plant Physiology and Biochemistry* 2024, 216, 109088.
- Nitric oxide stimulates digestion modifying the nutrient composition of the traps' fluid of *Nepenthes x ventrata*. Wal A., Staszek P., Gniazdowska A., Chrastný V., Šípková A., Bieniek J., Krasuska U. *Plant Science* 2025, 358:112558.

Łączny IF tych prac wynosi 19,6. Wysokość punktacji, według ministerialnej listy czasopism punktowanych z 2024 roku, wynosi 340pkt. W trzech, spośród czterech artykułów wchodzących w skład rozprawy Doktorantka jest pierwszą autorką. Ponadto, we wszystkich publikacjach pełni ona rolę autorki korespondencyjnej (przy czym w artykułach opublikowanych w *Plant Physiology and Biochemistry* i *Plant Science* dzieli funkcję autorki do korespondencji z Panią prof. Urszulą Krasuską). Jedną spośród czterech publikacji składających się na osiągnięcie naukowe jest praca przeglądową, pozostałe mają charakter eksperymentalny. Rola Doktorantki w powstanie poszczególnych prac różniła się, w zależności od charakteru pracy. Zaangażowanie w powstanie pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Biology* polegało na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, napisaniu jej fragmentu oraz edycji manuskryptu. Udział Doktorantki w powstaniu publikacji stanowiących raporty z własnych badań eksperymentalnych, które ukazały się w czasopismach *Plants*, *Plant Physiology and Biochemistry* i *Plant Science*, polegał na wykonaniu analiz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, pomiarów

aktywności enzymów oraz szeregu metabolitów w cieczy trawiennej dzbanecznika, analiz mikroskopowych i molekularnych, ukierunkowanych na oznaczenie ekspresji genów. Ponadto, we wszystkich publikacjach, Doktorantka uczestniczyła w przygotowaniu manuskryptów i interpretacji wyników.

Według przedstawionego przez Panią mgr Agnieszkę Wal oświadczenia, jej udział w powstaniu poszczególnych publikacji wynosi od 40% lub 50%. Zatem istotny, indywidualny wkład w badania naukowe, a zazwyczaj wiodąca rola Doktorantki w powstaniu wszystkich prac nie budzi wątpliwości. Tym samym rozprawa doktorska wypełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.).

Ocena merytoryczna

W badaniach nad obecnością RNS w cieczy trawiennej i ich rolę w trawieniu pokarmu zwierzęcego wykorzystywano dwa modele eksperymentalne. Rolą pierwszego z nich, tzw. modelu „rozwojowego” było rejestrowanie zmian zachodzących w trakcie poszczególnych etapów cyklu rozwojowego liścia pułapkowego oraz wykrywanie zmian badanych parametrów w konsekwencji podania i trawienia pokarmu. Podejście uwzględniające dynamikę rozwojową badanego organu było uzasadnione koniecznością wykrycia ważnych, dla celów projektu, parametrów, które mogły mieć charakter przejściowy, specyficzny dla konkretnych faz rozwoju liścia pułapkowego. Specyfiką drugiego modelu eksperymentalnego, tzw. „modelu z donorem NO_x”, było modyfikowanie składu cieczy trawiennej w liściu pułapkowym poprzez dodawanie do niej źródła NO_x i HCl. Tego drugiego związku dodawano w celu utrzymania stałego, zależnego od etapu trawienia, odczynu cieczy trawiennej. Zastosowanie w projekcie modelu „z donorem NO_x” pozwoliło na opisanie roli RNS w procesie trawienia pokarmu.

Wykorzystując model „rozwojowy” wykazano obecność zarówno ROS jak i RNS w cieczy trawiennej dzbanecznika, przy czym w odniesieniu do RNS było to pierwsze doniesienie o obecności tych substancji w liściach pułapkowych, nie tylko dzbanecznika, lecz i wszystkich roślin mięsożernych. O ile produkcja ROS, reprezentowanych przez O₂⁻, najwyższe wartości przyjmowała w młodych, nieotwartych pułapkach, to poziomy RNS osiągały maksima w dojrzałych pułapkach. Wprowadzenie pokarmu do pułapek było powiązane z jednoczesnym wzrostem emisji NO, znaczącym spadkiem stężenia ONOO⁻ i O₂⁻, przy osiągnięciu maksymalnej zdolności do neutralizowania ROS. Istotną rolę w tym procesie mogą odgrywać, znane z silnych właściwości antyoksydacyjnych, związki fenolowe, których maksimum obserwowano w dojrzałych pułapkach, a których zawartość spadała po podaniu pokarmu. Można podejrzewać, że wskutek reakcji z ROS. Te dane wskazują, że proces trawienia pokarmu wymaga regulacji poziomów ROS i RNS w cieczy trawiennej. **Czy regulacja poziomu ROS w cieczy trawiennej ma charakter enzymatyczny czy nieenzymatyczny? Jakie enzymy antyoksydacyjne mogłyby być zaangażowane w ten proces?**

W publikacji z 2024 roku Doktorantka wykazała, że podanie pokarmu powoduje znaczny wzrost tempa produkcji O_2^- w cieczy trawiennej. Efekt ten utrzymywał się do 4 dnia po karmieniu, a suplementacja donorem NO_x obniżała produkcję tej ROS, jednak dopiero po czterech dniach od karmienia. Jednocześnie stężenia H_2O_2 w cieczy trawiennej pozostawały niskie i nie ulegały znacznym zmianom w okresie następującym po podaniu pokarmu. Może to sugerować, że konwersja O_2^- do H_2O_2 zachodzi z niewielką lub wręcz śladową efektywnością. Być może O_2^- jest efektywnie wymiatany, funkcjonują mechanizmy chroniące przed niekontrolowanym utlenianiem tej ROS. Świadczyć o tym może wzrost zdolności redukującej w cieczy trawiennej obserwowany w warunkach kontrolnych od drugiego dnia po karmieniu a w obecności donora NO_x już po pierwszym dniu. **Jakie mechanizmy mogą być zaangażowane w te procesy?** Pośrednio, o znaczeniu ochrony antyoksydacyjnej podczas dekompozycji pokarmu i pobierania substancji odżywczych może świadczyć spadek stężenia tlenu w cieczy trawiennej następujący w początkowej fazie trawienia oraz cztery dni po podaniu pokarmu.

Wzrost zawartości NO, następujący w cieczy trawiennej po podaniu pokarmu do pułapki, nie dowodzi jeszcze regulacyjnej roli tej substancji w procesie trawienia. Aby wykazać je zaangażowanie w procesie trawienia pokarmu w liściach pułapkowych wymagane było zastosowanie techniki pozwalającej na eksperymentalne regulowanie jej poziomu w cieczy trawiennej. W tym celu wykorzystano model „z donorem NO_x ” pozwalający na eksperymentalne zwiększenie zawartości NO. Porównując profile elektroforetyczne białek dostarczanych z pokarmem do pułapek kontrolnych i traktowanych donorem NO_x dowiedziono, że eksperymentalne zwiększenie zawartości NO w cieczy trawiennej zwiększa intensywność procesów trawiennych, przyspieszając degradację białek pochodzących z pokarmu. Przyspieszenie procesów trawiennych było konsekwencją zwiększenia aktywności proteolitycznej następującej po podaniu NO_x . Wysokość tego parametru korelowała z wysokim stężeniem NO. Skutkiem podania źródła NO_x był także wzrost tempa pozyskiwania składników odżywczych z cieczy trawiennej. Prawidłowość ta dotyczyła zwłaszcza NH_4^+ . Wzrost stężenia tych jonów zaobserwowano pierwszego dnia po karmieniu z suplementacją NO_x . Po dwóch dniach, w tym wariantcie eksperymentalnym, stężenia jonów amonowych obniżały się do poziomu niekarmionej kontroli. Pod nieobecność źródła NO, okres pobierania NH_4^+ z cieczy trawiennej wydłużał się do czterech dni. **Czy zdaniem Doktorantki wzrost wydajności pobierania NH_4^+ z cieczy trawiennej, następujący pod wpływem NO, jest prostą konsekwencją szybszej dekompozycji pokarmu, czy wchodzi tu w grę inny, niezależny mechanizm?**

Stymulujący wpływ NO na aktywność enzymów trawiennych w liściach pułapkowych może być następstwem zależnych od NO modyfikacji struktury białek obecnych w dostarczonym pokarmie lub enzymów trawiennych wydzielanych w strefie gruczołowej liścia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka po raz pierwszy wykryła w liściach dzbanecznika obecność białek zawierających 3-NT, a także białek z grupami karbonyłowymi. Jednak na obecnym etapie badań nie jest jasny mechanizm

leżący u podstaw stymulującego działania NO na procesy trawienne. W pracy zawarto informację, że zmiany posttranslacyjne enzymów wywołane przez RNS mogą obniżać ich aktywność (np. peroksydaz) lub przeciwnie, zwiększać ją (proteazy, np. katepsyna). Czy wiadomo od czego zależy kierunek zmian aktywności białka następujący wskutek S-nitrozacji lub nitrowania?

Wykazano także, że wprowadzenie NO_x obniżało wytwarzanie O₂⁻ w cieczy trawiennej dzbanecznika, prawdopodobnie poprzez obniżenie aktywności Rboh lub/i POX, następujące na skutek S-nitrozacji lub nitrowania polipeptydów tych enzymów. Jednocześnie, dodanie NO_x zapobiega obniżeniu produkcji niskocząsteczkowych antyoksydantów oraz flawonoidów o aktywności antyoksydacyjnej, która następuje po wprowadzeniu pokarmu do pułapki. Sumarycznym skutkiem zmian następujących na skutek zwiększenia zawartości NO w cieczy trawiennej może być obniżenie tempa produkcji ROS co łagodzi skutki stresu oksydacyjnego.

W pracy opublikowanej w 2025 roku, w czasopiśmie *Plant Science*, Doktorantka doprecyzowała opis mechanizmu leżącego u podstaw stymulującego wpływu NO na tempo trawienia pokarmu w liściach pułapkowych dzbanecznika. Regulacyjny wpływ NO na aktywność enzymów trawiennych manifestował się poprzez zwiększenie poziomu ekspresji genów kodujących enzymy degradujące białka, RNA oraz uwalniające grupy fosforanowe. Zależny od NO wzrost ekspresji genów miał miejsce w strefie gruczołowej liścia pułkowego. Analiza obejmowała pomiar poziomu transkryptów obejmujących proteazy aspartylowe *Nep I* i *Nep II*. Stymulujący efekt suplementacji NO_x na ekspresję genów *Nep I* i *Nep II* odnotowano pierwszego dnia po podaniu pokarmu, jednak zwiększony poziom obydwu transkryptów utrzymywał się w także w drugim, a w wypadku *Nep I*, w trzecim dniu po karmieniu. Eksperymentalne zwiększenie stężenia NO_x w cieczy trawiennej pułapki dzbanecznika powodowało także wzrost ekspresji genu *Pap* kodującego kwaśną fosfatazę oraz RNaz typu S-like. Zwiększony poziom transkryptów kodujących te enzymy wykrywano w tkance liścia pułkowego po upływie jednego dnia od daty karmienia. Obserwowany efekt był znacznie zwiększany przez suplementację NO_x i miał charakter przejściowy. Jest interesujące, że zwiększenie ekspresji genów RNaz następowało po dostarczeniu pokarmu niezawierającego RNA, białka jaja kurzego. **Sugerować to może funkcjonowanie mechanizmu uruchamianego przez dostarczenie pokarmu i synchronizującego ekspresję genów kodujących enzymy trawienne.** Pozwoliłoby to na jednoczesne wydzielanie do cieczy trawiennej koktajlu enzymów o różnej aktywności, pozwalające na sprawne trawienie pokarmu o złożonej naturze chemicznej. Czy dostępna wiedza o działaniu mechanizmu trawiennego u dzbanecznika wspiera tę tezę, czy wręcz przeciwnie?

Z przywołanymi faktami korelują zwiększone aktywności kwaśnych fosfataz oraz przejściowy wzrost stężenia P w cieczy trawiennej. Wzrost stężenia P w soku trawiennych następujący po karmieniu jest przejściowy, ale za to bardzo znacząco stymulowany przez NO. Dodatek donora NO znacznie zwiększał także aktywności kwaśnej fosfatazy. Obserwacje te sugerują, że wywołane przez NO

przyspieszenie pozyskiwania związków odżywczych obejmuje także poprawę wydajności uwalniania fosforu z pokarmu i, jak wskazują wyniki pomiarów całkowitego P w cieczy trawiennej, zwiększenie dostępności tego składnika odżywczego stanowiącego źródło kluczowego makroelementu limitującego wzrost roślin mięsożernych.

Rozpatrywanie roli ROS w trawieniu pokarmu w pułapkach dzbanecznika wymaga uwzględnienia potencjalnego udziału tych substancji w nieenzymatycznym uwalnianiu z niego substancji odżywczych. Zdaniem niektórych autorów, ROS mogą wpływać na trawienie pokarmu w organach pułpkowych roślin mięsożernych poprzez modyfikowanie białek na drodze oksydacyjnej. Tego rodzaju modyfikacje mogą ułatwiać trawienie pokarmu przez proteazy, powodując destabilizację struktury przestrzennej polipeptydów, co może zwiększać dostępność miejsc rozpoznawanych przez enzymy trawienne. Jednak, z drugiej strony, zmiany oksydacyjne mogą utrudniać dezintegrację białek w procesie trawienia jeżeli ich następstwem jest agregacja białek lub powstawanie dodatkowych połączeń pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi. Zmiany te mogą maskować miejsca rozpoznawalne przez proteazy, zmniejszając wydajność dekompozycji białek. Modyfikacje oksydacyjne białek pokarmowych, takie jak karbonylacja, mogą zachodzić po umieszczeniu pokarmu w pułapce ale karbonylowane białka mogą także dostawać się do cieczy trawiennej wraz z pokarmem. Tak sytuacja miała miejsce w układach doświadczalnych stosowanych przez Doktorantkę, gdyż roztwór białka jaj kurzego zawierał liczne białka z grupami karbonylowymi. Jednocześnie, w pewnym zakresie, modyfikacje tego typu były obecne także w pułapkach niekarmionych. W kolejnych dniach po karmieniu zmniejszała się liczba karbonylowanych białek wprowadzanych wraz z pokarmem, co może wskazywać, że są one skutecznie trawione i wchłaniane. **W publikacji z 2025 roku Doktorantka zakłada, że karbonylowane peptydy stymulują aktywność proteolityczną poprzez aktywację proteasomu 20S, co jednak wymaga weryfikacji eksperymentalnej. Ponadto Doktorantka spekuluje o możliwej roli karbonylacji, w regulacji aktywności natywnych białek cieczy trawiennej o czym może świadczyć ich obecność w niekarmionych pułapkach. Postawiona została teza, że wprowadzenie białek karbonylowanych wraz z pokarmem może stanowić sygnał do rozpoczęcia procesu trawienia. W jaki sposób można zweryfikować tą tezę oraz założenie, że karbonylacja rzeczywiście usprawnia trawienie białek?**

Podsumowując należy stwierdzić, że badania zrealizowane przez Panią mgr Agnieszkę Wal dostarczyły nowej wiedzy o regulacji trawienia pokarmu w pułapkach dzbanecznika, w kontekście zaangażowania w ten proces reaktywnych form tlenu i azotu. **Szczególnie istotnym osiągnięciem było zademonstrowanie, że NOx stymuluje aktywność enzymów zaangażowanych w trawienie pokarmu, poprzez zwiększenie poziomu ekspresji kodujących je genów. Dużą wartość poznawczą ma opis relacji pomiędzy RNS i ROS zawarty w publikacjach składających się na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską. Zaletą projektu doktorskiego Pani mgr Agnieszki Wal było kompleksowe ujęcie**

badanego zagadnienia poprzez umieszczenie roli RSN i ROS w szerokim kontekście badawczym obejmującym analizy licznych parametrów biochemicznych cieczy trawiennej takich jak zawartość fenoli, flawonoidów, związków z grupami -SH, skład pierwiastków, czy aktywność peroksydaz. Doktorantka dysponuje także umiejętnością dokonywania syntezy zgromadzonej wiedzy o czym świadczy artykuł przeglądowy włączony do rozprawy oraz dobrze napisany komentarz autorski. Stwierdzam, że mgr Agnieszka Wal wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i doskonalenia warsztatu badawczego w zakresie biologii eksperymentalnej roślin.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wysoko oceniam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oraz stwierdzam, że w pełni spełnia ona wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), w trybie określonym Uchwałą Nr 89-2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku w sprawie uchwalenia Regulaminów przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Dlatego też z pełnym przekonaniem przedkładam wniosek do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Wal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość prowadzonych badań, w tym różnorodność zastosowanych metod badawczych, walory poznawcze uzyskanych wyników opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.



Jarosław Tyburski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 44 55
(2267)

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW

2026 -01- 28

WPLYNĘŁO DNIA -7-

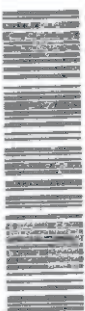


RPL/1809/2026 N
Data: 2026-01-28

Biurowe Obsługi Nauki
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

ul. Nowoursynowska 166

(00)759007734555642353



(00)759007734555642353

(00)759007734555642353



2025

02-787 Warszawa



UNIWERSYTEŃ
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
www.umk.pl



159793 2026-01-22 02 POLECONA

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego
Obsługi Nauki
Nowoursynowska 166