

Lublin, 20 sierpnia 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Barbary Gieroby pt. „Organizacja molekularna oraz aktywność przeciwnowotworowa ksantohumolu w odniesieniu do modelowych błon lipidowych i wybranych linii komórek nowotworowych”

Wobec powagi i skali zagrożenia związanego z chorobami nowotworowymi, aktywność badawcza związana z zapobieganiem, diagnostyką oraz leczeniem tych chorób jawi się obecnie jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się w obszarze nauk biologicznych i medycznych. W aspekcie tym, niezwykle atrakcyjnie postrzegane są naturalne związki o właściwościach przeciwnowotworowych, zaś wyizolowany z szyszek chmielu ksantohumol należy do klasy związków, z którymi łączone są wyjątkowe nadzieje oraz oczekiwania. Z drugiej jednak strony, w kontrze do powszechnych opinii i sądów, dostrzec można brak precyzyjnych badań ukierunkowanych na poznanie mechanizmów molekularnych, na drodze których ksantohumol zapobiegać mógłby rozwojowi komórek nowotworowych w organizmie. Rozprawa doktorska pani mgr Barbary Gieroby wpisuje się precyzyjnie w te oczekiwania, w związku z czym postrzegana być może nie tylko jako aktualna i interesująca ale również bardzo ważna!

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca doktorska mgr Barbary Gieroby wykonana została pod kierunkiem prof. Mariusza Gagosa, w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, przy współudziale dr Marty Arczewskiej w charakterze promotora pomocniczego. Rozprawę stanowi bardzo obszerne opracowanie, przygotowane w języku polskim, na 230 str. standardowego maszynopisu. Rozprawa zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Po spisie treści oraz wykazie skrótów i oznaczeń zamieszczony został kilkunasturowy „Wstęp” wprowadzający w bardzo przystępny sposób w tematykę rozprawy, zakreślając równocześnie obszar badawczy, w ramach którego formułowane mogą być otwarte problemy poznawcze związane z postulowaną aktywnością przeciwnowotworową ksantohumolu. Zarówno te strategiczne jak i szczegółowe cele badawcze sformułowane zostały w ramach następnego rozdziału nazwanego „Założenia i cele pracy”. Kolejna, opisowa część rozprawy, opierająca się na analizie doniesień literaturowych a nazwana „Część teoretyczna” zredagowana została w oparciu o podstrukturę obejmującą sekcje poświęcone właściwościom fizykochemicznym oraz występowaniu, biosyntezie i aktywności biologicznej ksantohumolu, w tym postulowanej aktywności przeciwnowotworowej. Drugim ważnym elementem części opisowej jest rozdział poświęcony strukturalnym, dynamicznym oraz fizjologicznym aspektom błon biologicznych. Rozdziały opisowe przygotowane zostały, w moim odczuciu, ze znaczną troską o zrównoważoną prezentację poszczególnych zagadnień oraz w oparciu o najbardziej aktualną wiedzę, której źródła stanowią najnowsze doniesienia naukowe. W tym miejscu swojej analizy chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na wyjątkowo obszerny dobór materiałów źródłowych uwzględnionych w rozprawie i mający wyraz w wykazie cytowanego piśmiennictwa, zamieszczonym w końcowej części rozprawy i liczącym blisko 400 pozycji! „Część eksperymentalną” rozprawy otwiera rozdział 3., poświęcony prezentacji materiałów, aparatury badawczej oraz procedur pomiarowych. Zawarte w tej części opisy są, w moim odczuciu, na tyle precyzyjne, iż umożliwiają powtórzenie analogicznych eksperymentów. W tym miejscu swojej oceny pracy doktorskiej chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na zastosowanie różnorodnych podejść metodologicznych (obejmujących badania na liniach komórkowych jak i w układach modelowych błon biologicznych) oraz włączenie do badań znacznej liczby nowoczesnych technik badawczych (w tym spektroskopii absorpcyjnej IR oraz techniki warstw



jednocząsteczkowych, wzbogaconej o mikroskopię kąta Brewstera). Tak wieloaspektowe podejście do rozwiązywania problemów badawczych otwiera unikalne możliwości formułowania zaawansowanych oraz złożonych pytań poznawczych. Rozdział 4. rozprawy, zatytułowany „Wyniki badań i dyskusja” zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą poszczególne zadania badawcze realizowane w ramach projektu doktorskiego. Zaznaczyć należy przy tym, iż zaprezentowany cykl badań stanowi, moim zdaniem, spójnie i elegancko zaprojektowany szereg eksperymentów, obejmujących problemy badawcze początkowo bardziej ogólne a następnie szczegółowe, w których problemy poznawcze pojawiające się w poszczególnych częściach stanowią wyzwania badawcze w kolejnych. Przeprowadzone badania dotyczyły więc, między innymi, cytotoksyczności ksantohumolu w stosunku do komórek fibroblastów linii komórkowej NHDF, określanej z zastosowaniem testu MTT w połączeniu z analizami mikroskopowymi zmian na poziomie morfologicznym; przeżywalności komórek prawidłowych fibroblastów oraz komórek nowotworowych piersi (linii komórkowej T47D) i prostaty (linii komórkowej PC-3) z zastosowaniem testu NR, również w połączeniu z analizami morfologicznymi; identyfikacji komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych w oparciu o mikroskopię fluorescencyjną, przy podwójnym barwieniu komórek oranżem akrydynowym i bromkiem etydy; analiz cytometrycznych w oparciu o test Aneksyna V-FITC. W ramach bloku badań spektroskopowych prowadzone były porównawcze badania chemometryczne podstawowych klas biomolekuł w prawidłowych oraz rakowych liniach komórkowych zaś w bloku badań strukturalnych opierających się na technice monowarstw Langmuira, badania lipidowych układów wieloskładnikowych, ukierunkowane na poznanie specyficznych determinantów odpowiedzialnych za oddziaływanie ksantohumolu z membranami biologicznymi. Treści prezentowane w ramach rozdziału 4. zawierały równoległy opis eksperymentów oraz dyskusję uzyskanych wyników. Najważniejsze rezultaty z przeprowadzonych badań uwypuklone zostały również w ramach rozdziału 5. pt. „Podsumowanie” oraz wypunktowane w zestawieniu stanowiącym rozdział 6. pt. „Wnioski”.

W pełni podzielam zdanie Doktorantki w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach tego rozdziału. Szczególnie ważne, moim zdaniem, jest dostarczenie bezpośrednich dowodów na przeciwnowotworową aktywność



ksantohumolu w stosunku do linii komórek rakowych piersi oraz prostaty, przy niskiej cytotoksyczności dla ludzkich komórek prawidłowych. Ponadto, szczególnie ważnym aspektem analizowanej pracy doktorskiej wydaje mi się zaproponowanie konkretnych mechanizmów molekularnych, na drodze których ksantohumol mógłby oddziaływać z membranami, kształtując swoją wysoką aktywność biologiczną.

Na podkreślenie zasługuje również klarowność języka rozprawy oraz jej wyjątkowo wysoki poziom edytorski. Mógłbym zaproponować Autorce jedynie kilka drobnych korekt. Oto ich krótka lista:

1. Str. 13., 5. wiersz od dołu, „kąta” w miejsce „kata”
2. Str. 15., 5. wiersz od góry, proponuję „wstrzykiwaniu” w miejsce „inkorporowaniu”
3. Str. 77., 15. wiersz od góry, proponuję „maksimum wzbudzenia” oraz „maksimum emisji” w miejsce „maksymalne wzbudzenie” oraz „maksymalna emisja”
4. Str. 119., 6. wiersz od dołu, zamiast „9 smoothing points” raczej „wygładzane na 9 punktach”
5. Str. 119, wiersz 5. od dołu oraz poniżej, moim zdaniem chodzi raczej o funkcję przeciwną do drugiej pochodnej niż odwrotną (czyli „minus” a nie „1 przez”)
6. Str. 125., 3. wiersz od góry, zamiast „dane nie potwierdzają się z rezultatami” proponuję „dane nie potwierdzają rezultatów”
7. Str. 177., 6. wiersz od dołu, zamiast „w widmach IR” proponuję „w widmach absorpcji IR”.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Barbary Gieroby, dostarcza wielu nowych oraz cennych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Na str. 118. rozprawy dyskutowana jest interesująca obserwacja wzrostu stosunku intensywności w widmach absorpcji IR, pasm odpowiadających grupom CH_2 oraz CH_3 . Zastanawiam się czy wynik taki nie może, również albo po prostu, być interpretowany jako skutek odpowiedzi komórek na obecność związków egzogennych w postaci biosyntezy lipidów o dłuższych łańcuchach acylowych?



Efekt taki przekładałby się zdecydowanie na modyfikację własności strukturalnych oraz dynamicznych fazy lipidowej, zaburzając tym samym funkcjonalność błon.

2. W obrębie całej rozprawy, pasmo w widmach absorpcyjnych IR w rejonie spektralnym 1730 cm^{-1} przypisywane jest fosfolipidom. W pełni zgadzam się z taką interpretacją, nadmienić jednak chciałbym, że estrowe grupy karbonylowe innych lipidów, leżące na granicy fazy polarnej i niepolarniej dwuwarstw lipidowych, również dają wkład do tego pasma. Nawet wówczas gdy głowy polarne nie posiadają w swojej strukturze grupy fosforanowej, na przykład glikolipidy. Zgadzam się jednak, iż fosfolipidy stanowią dominujący składnik fazy lipidowej błon badanych organizmów, co uzasadniać może zastosowane uproszczenie. W związku z faktem, iż pasmo to odpowiada drganiom rozciągającym grupy karbonylowej, jego położenie ulegać może znacznym przesunięciom w stronę niższych liczb falowych, pod wpływem formowania wiązań wodorowych i praktycznie pokrywać może się z pasmem białkowym amid I. Efekt ten znacznie utrudnia formułowanie wniosków opierających się na analizie intensywności tego pasma, tak jak na przykład na str. 125. Zaznaczyć chciałbym w tym miejscu, że moim zdaniem, Doktorantka zachowała w tym względzie zalecaną, daleko idącą ostrożność.
3. Z zapartym tchem śledziłem, opisane na stronach rozprawy, zmagania Doktorantki z formowaniem oraz badaniem warstw jednocząsteczkowych ksantohumolu na granicy faz woda-powietrze, wobec faktu iż związek ten tworzy monowarstwy, w zasadzie, na granicy stabilności. Analizując izotermę sprężania tego związku, na przykład prezentowaną na Rys. 33. (str. 128), zauważyć można niezerowe ciśnienie powierzchniowe, nawet już na początku eksperymentu, przy średnich powierzchniach molekularnych nieco powyżej 50 Å^2 . Oznaczać to może, iż cząsteczki leżące na powierzchni subfazy już od początku eksperymentu, po odparowaniu rozpuszczalnika, oddziałują pomiędzy sobą zaś wyraźny wzrost ciśnienia powierzchniowego w przedziale powierzchni poniżej 30 Å^2 związany jest



z reorientacją cząsteczek ksantohumolu do pozycji wertykalnej w stosunku do powierzchni membrany. Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktorantki na ten temat.

4. Bardzo interesujący wynik wiąże się, moim zdaniem, z zarejestrowaną znaczącą pod-addytywnością w monowarstwach dwuskładnikowych formowanych z DPPC oraz ksantohumolu (Rys. 41., str. 137.). Stosunkowo niewielki dodatek ksantohumolu skutkuje obniżeniem średniej powierzchni na cząsteczkę w monowarstwie mieszanej o aż o ok. $20 \text{ \AA}^2$ w stosunku do oczekiwanej. Zastanawiam się, czy efekt taki nie oznacza niemal całkowitej eliminacji cząsteczek ksantohumolu z granicy faz, na drodze związania ich z głowami polarnymi lipidów, zakotwiczonymi w subfazie. Mogło by to wskazywać na miejsce i mechanizm wiązania związku przez błony formowane z tego lipidu. Chciałbym zaprosić Doktorantkę do wypowiedzi na ten temat.

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Barbara Gieroba przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w publikacjach, w tym w renomowanym czasopiśmie J. Natural Products. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Barbarę Gierobę spełnia w pełni warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś ważne wyzwania badawcze oraz znaczna liczba oraz waga uzyskanych rezultatów sprawiają, iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie pani mgr Barbary Gieroby do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.