



Lublin, 6 listopada 2020 r.

KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

dr hab. Justyna Widomska, prof. UM w Lublinie

Recenzja pracy doktorskiej mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej, zatytułowanej „Interakcje pochodnej kwercetyny - lenzozydu A β z błonami i ich korelacje z biologicznymi efektami na komórki” wykonanej w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie.

Stres oksydacyjny wymieniany jest jako jeden z wielu czynników rozwoju schorzeń cywilizacyjnych w tym cukrzyca, nadciśnienia tętniczego, chorób nowotworowych oraz chorób neurodegeneracyjnych. Istotnym elementem w walce ze stresem oksydacyjnym są antyoksydanty, w tym flawonoidy. Flawonoidy należą do związków o cechach leczniczych, które wykazują działanie prewencyjne w przypadku wielu schorzeń. Ponadto, intensyfikacja badań nad antyoksydantami egzogennymi nie słabnie i poszukiwane są nadal nowe związki oraz ich źródła, a także badane są antyoksydacyjne właściwości tych związków w kierunku zapobiegania lub ograniczania rozwoju wyżej wymienionych chorób. Lenzozyd A β będący pochodną kwercetyny jest związkiem z grupy flawonoidów nowo wyizolowanym z nadziemnych części soczewicy jadalnej. Istnieje mało publikacji naukowych na temat tego związku flawonoidowego, oraz jego właściwości przeciwutleniających. Zatem ze zrozumiałych względów flawonoidowi: lenzozydowi A β poświęcona jest rozprawa doktorska mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej, zatytułowana „Interakcje pochodnej kwercetyny-lenzozydu A β z błonami i ich korelacje z biologicznymi efektami na komórki”. Praca ta została wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem promotor – dr hab. Bożeny Pawlikowskiej-Pawłęgi, prof. UMCS.

Recenzowana rozprawa doktorska ma tradycyjny układ i składa się z kilku wyraźnie wydzielonych rozdziałów: wstępu, opisu wykorzystanych w pracy metod pomiarowych, wyników badań i dyskusji, obszernego wykazu cytowanej literatury oraz spisu rycin. Na końcu rozprawy znajduje się wykaz opublikowanych prac, których współautorem jest Doktorantka. Dodatkowo został zamieszczony wykaz wystąpień mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, a także wykaz grantów i projektów badawczych w których Doktorantka brała udział. Bardzo wysoko oceniam dorobek naukowy Doktorantki. Na dorobek naukowy mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej składają się 4 oryginalne prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (sumaryczny impact factor wynosi 16.92) oraz 5 publikacji bez impact factor. Rozprawa doktorska mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej jest napisana poprawną polszczyzną, logicznie, przejrzysto zredagowana oraz zilustrowana 71 rycinami, 2 tabelami które mają swoje odnośniki w tekście. Piśmiennictwo wykorzystano w sposób prawidłowy. Literaturę stanowi 330 pozycji piśmienniczych, cytowanych w kolejności alfabetycznej. We wstępie do rozprawy Doktorantka w sposób obszerny odniosła się do grupy związków jakimi są flawonoidy. Opisała ich budowę, podział oraz biologiczną aktywność w tym ich właściwości antyoksydacyjne, a także zastosowanie w profilaktyce i terapii chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych oraz cukrzyca. Dodatkowo Doktorantka poświęciła sporą

część wstępu na charakterystykę błon komórkowych, w tym jej głównych składników: białek i lipidów. Cel pracy został jasno sformułowany. Autorka rozprawy doktorskiej podjęła się realizacji następujących zadań:

- określenie wpływu badanego flawonoidy jakim był lenzozyd A β na właściwości fizyczne modelowych błon lipidowych,
- określenie oddziaływania lenzozydu A β z lipidowymi oraz białkowymi składnikami komórek linii prawidłowych oraz nowotworowych.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody”, mieszczącym się na 16 stronach rozprawy, Doktorantka opisuje preparatykę modelowych błon lipidowych wykorzystanych w badaniach oraz zastosowane metody badawcze. Na uwagę zasługują szeroki wachlarz metod badawczych z jakich skorzystała mgr Justyna Helena Kapral-Piotrowska podczas realizowania niniejszej rozprawy doktorskiej. Opanowanie tylu zaawansowanych metod badawczych jest imponujące. Metodami badawczymi z których Doktorantka skorzystała realizując swój cel naukowy były: spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), jądrowy rezonans magnetyczny (NMR), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), technika patch-clamp, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM). Wyniki i ich dyskusja, opisane na 98 stronach, to najważniejsza część rozprawy doktorskiej. Pierwsze dwa podrozdziały 4.1 oraz 4.2 dotyczą badań interakcji lenzozyd A β z białkami i lipidami przy użyciu spektroskopii FTIR. Wynikiem absorpcji światła w zakresie podczerwieni przez cząsteczki fosfolipidu DPPC był analizowany zbiór pasm drgań normalnych w zakresie od 3700 do 900 cm⁻¹, otrzymany dla czystego lipidu DPPC oraz DPPC z lenzozydem A β . Otrzymane wyniki badań FTIR dla DPPC oraz DPPC z lenzozydem A β wykazały wzrost hydratacji błon lipidowych, co wskazywało na wiązanie się tych cząsteczek z hydrofilową częścią membrany wiązaniami wodorowymi, powodując wzrost stężenia cząsteczek wody w tym rejonie, co jest związane z rozsunieniem głów polarnych fosfolipidów przez cząsteczki lenzozydu. Dodatkowo lokalizacja lenzozydu A β w rejonie głów polarnych fosfolipidu DPPC oraz równoległa orientacja w stosunku do płaszczyzny błony zostały potwierdzone przez Doktorantkę w badaniach FLIM (podrozdział 4.4). Ważnym wynikiem tej pracy jest obliczony kąt pomiędzy kierunkiem wektora dipolowego momentu przejścia a normalną do płaszczyzny błony, który wyniósł 58.9±1.2°, wskazujący na równoległą orientację cząsteczki lenzozydu A β do płaszczyzny błony. Burzenie uporządkowania cząsteczek wody przez badany flawonoid było obserwowane także na termogramach uzyskanych w wyniku pomiarów mikrokalorymetrycznych olbrzymich jednowarstwowych liposomów DPPC- lenzozyd A β poprzez zanik przedprzejścia. Kolejne pomiary z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni FTIR dotyczyły linii komórek raka szyjki macicy (HeLa), raka krętni (Hep-2) oraz prawidłowych fibroblastów skóry (HSF) bez obecności lenzozydu A β oraz z dodatkiem lenzozydu A β . Dodanie flawonoidu do linii komórkowych spowodowało zwiększone przyłączanie cząsteczek wody za pomocą wiązań wodorowych przez komórki linii Hep-2 (po 48h inkubacji) oraz HSF (po 24h oraz 48 h inkubacji). Natomiast dla linii komórkowych HeLa (po 24h oraz 48 h inkubacji) oraz linii Hep-2 (po 24 h inkubacji) obserwowano zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez komórki. Badany lenzozyd A β w sposób odmienny oddziaływał na poziomie molekularnym z komórkami linii nowotworowych (HeLa i Hep-2) oraz linii prawidłowych (HSF). Doktorantka w kolejnych badaniach pokazała, że lenzozyd wpływa nie tylko na właściwości fizyczne dwuwarstwy lipidowej ale także oddziałuje z białkami błony, co było widoczne w analizach amidu I widm FTIR w komórkach linii HeLa, Hep-2 oraz HSF inkubowanych z lenozydem A β oraz w badaniach wykorzystujących technikę patch-clamp, które wykazały zwiększane prawdopodobieństwo otwierania się w kanałów potasowych w komórkach lini HSF z badanym flawonoidem. Ostatnim etapem badań było sprawdzeniem cytotoksyczności lenzozyd A β w stosunku do komórek

prawidłowych i komórek nowotworowych. Badany flawonoid w niewielki stopniu obniżał przeżywalność komórek, co świadczy o jego niskiej cytotoksyczności. Zmiany parametrów morfometrycznych, ultrastruktury obserwowano jedynie w przypadku komórek nowotworowych z hodowli *in vitro* pod działaniem lenzozynu A β . Takich zmian w morfologii komórek Doktorantka nie obserwowała w przypadku fibroblastów inkubowanych z badanym flawonoidem. Dodatkowo, mgr Justyna Helena Kapral-Piotrowska wykazała, że lenzozyn A β w komórkach nowotworowych w hodowli *in vitro* indukuje stres oksydacyjny. Natomiast w komórkach linii prawidłowej inkubowanej z flawonoidem obserwowano efekt odwrotny i działanie antyutleniające. Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące, że dodawanie niektórych związków, w tym kwercetyny, do pożywek stosowanych do hodowli komórek *in vitro* prowadzi do wytwarzania znacznych ilości nadtlenu wodoru. A zatem, jak wspomina o tym Autorka na str. 31, w zależności od typu komórki oraz warunków prowadzenia hodowli komórkowej flawonoid może działać jako antyoksydant lub prooksydant. Myślę, że ten kierunek badań jest ważny i może być w przyszłości pogłębiany przez mgr Justynę Helenę Kapral-Piotrowską. Wnioski zamieszczone na str. 179-180, zostały jasno sformułowane przez Doktorantkę i odnoszą się do wyznaczonych celów. Jako recenzent muszę jednak zwrócić uwagę na drobne nieścisłości oraz błędy edytorskie, które pojawiły się podczas pisania niniejszej pracy, nie mające wpływu na zasadniczą ocenę pracy.

1. str. 20: Zamiast „fitoterapia” powinno być „fitoterapia”
2. str. 40 Ryc. 4: Należałoby dodać w podpisie do rysunku jaki model błony komórkowej znajduje się na rycinie 4. Współczesne badania wskazują, że struktura błon komórkowych nie jest całkowicie homogenna tak jak na Ryc. 4 ale heterogeniczna, złożona z dwóch faz: tzw. „fazy cieczy uporządkowanej”, na którą składają się sfingolipidowo-cholesterolowe mikrodomeny oraz z „fazy cieczy nieuporządkowanej” utworzonej głównie przez glicerofosfolipidy. Autorka rozprawy wspomina o heterogeniczności błon komórkowych na str. 52.
3. str. 41: Doktorantka w rozprawie na początku podrozdziału 1.6.1. pisze, że lipidy charakteryzują słabą rozpuszczalnością w wodzie i dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach niepolarnych i to jest prawda oraz że „jest to związane z obecnością w ich strukturze kwasów tłuszczowych zbudowanych z długich, nierozgałęzionych łańcuchów węglowodorowych, o parzystej liczbie atomów węgla (od 14 do 24). Łańcuchy alkilowe mogą być nasycone lub nienasycone i zawierać jedno lub kilka wiązań podwójnych” Cytowany fragment dotyczy raczej fosfolipidów należących do szerokiej grupy lipidów czyli związków o zróżnicowanej budowie.
4. str. 45: Doktorantka nie definiuje tzw. parametru upakowania S, decydującego o rodzaju struktur agregacyjnych. Należałoby tę definicję umieścić w rozprawie.
5. str.46-47 oraz Ryc. 8: Według nomenklatury V. Luzzatiego grecką małą litera umieszczoną w indeksie dolnym oznacza się krótkozasięgowe uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych lipidów w dwuwarstwie lipidowej, a znak „prim” przy greckiej literze w indeksie dolnym oznacza, iż długa oś symetrii molekuly lipidu jest nachylona do płaszczyzny dwuwarstwy. Zatem w opisie przemian fazowych w układzie DPPC-woda w podrozdziale 1.6.5. greckie symbole powinny być indeksami dolnymi, brakuje też dla ścisłości znaków „prim” przy fazie L β oraz P β . Na Ryc. 8 należałoby zgodnie z klasyfikacją Luzzatiego narysować molekuly lipidów ułożone pod kątem do stycznej do powierzchni dwuwarstwy w przypadku fazy żelu L β .
6. str. 58., Ryc. 15: Zamiast „metoda zamrażania-rozmrażania” powinno być „metoda zamrażania-rozmrażania”.
7. Str. 66., III. Materiały i Metody: Zastosowane procedury statystyczne powinny zostać przedstawione bardziej szczegółowo w rozdziale III jako odrębny podrozdział. Przywołano je w sposób skrótowy w rozdziale III oraz w podpisach do rycin. Nie zamieszczono informacji na

temat zastosowanego testu normalności wymaganego do analizy istotności różnic testem t-Studenta oraz testem Anova.

8. str.72: w wzorze zamiast „F||” powinno być „F|”
9. str. 81., Ryc.17 oraz str.82 Ryc. 18: zamiast „liczba falowa [cm-1]” powinno być „ liczba falowa [cm⁻¹]”.

Podsumowując, te drobne nieścisłości i niedociągnięcia nie mają wpływu na ocenę rozprawy doktorskiej mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej, którą uważam za bardzo wartościową. Podsumowując, badania przeprowadzone podczas realizacji rozprawy doktorskiej wnoszą nową wiedzę na temat wpływu lenzozyd Aβ na błony komórkowe. Praca zawiera wiele ważnych i nowych rezultatów dotyczących wpływu pochodnej kwercetyny na strukturę błon modelowych oraz komórkowych. Dlatego z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, iż rozprawa całkowicie spełnia wymogi odpowiadające warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 64, poz. 595, ze zm.). W oparciu o powyższe, wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie zwracam się do Rady naukowej Instytutu Nauk Biologicznych z wnioskiem o wyróżnienie powyższej pracy doktorskiej. Rozprawę doktorską mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej uważam za wyróżniającą z uwagi zarówno na wybór nowego, nie badanego dotąd związku flawonoidowego oraz oryginalność i bogactwo uzyskanych wyników badań wpływu tego związku na błony biologiczne. Dlatego biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Justyna Wicińska