

prof. dr hab. Kazimierz Trębacz
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki,
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Ocena rozprawy doktorskiej Rafała Pawła Kampy
pt. „Flawonoidy kardioprotekcyjne: nowe regulatory mitochondrialnych
kanałów potasowych”**

Praca doktorska mgr. Rafała Kampy jest udaną próbą odpowiedzi na pytanie dotyczące roli wybranych flawonoidów i ich pochodnych w regulacji aktywności kanałów jonowych typu mitoBK_{Ca} zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Znaczenie tych badań polega na prześledzeniu istotnych etapów mechanizmu kardioprotekcji związanej ze stosowaniem diety wzbogaconej o te flawonoidy. Oprócz badań aktywności kanałów mitoBK_{Ca} wykonanych techniką patch-clamp, Autor badał zmiany potencjału elektrycznego wewnętrznej błony mitochondrialnej stosując cytometrię przepływową po dodaniu sondy fluorescencyjnej, JC-10. Zaprezentował też wyniki pomiarów poziomu oddychania komórkowego uzyskane za pomocą oksygrafu oraz testów przeżywalności i zdolności do migracji komórek. Szczególnie interesujące wyniki uzyskał Autor po zastosowaniu kwercetyny, co skłoniło Go do rozszerzenia badań o techniki biologii molekularnej, m.in. analizę ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki badanego kanału jonowego. Badania przeprowadzone zostały na linii ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego EA.hy926. Wybór tej linii komórkowej był istotny w kontekście badań zjawiska kardioprotekcji. Podsumowując założenia pracy, należy pochwalić zarówno wybór flawonoidów, odpowiedniej linii komórkowej jak i metod badawczych do realizacji ambitnych celów.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki uzyskane po zastosowaniu naringeniny i kwercetyny. Naringenina powodowała znaczny wzrost prawdopodobieństwa otwarć kanałów mitoBK_{Ca}, a efekt ten był zależny od stężenia jonów Ca²⁺ w otoczeniu kanału. Naringenina nie wpływała znacząco na potencjał membranowy wewnętrznej błony mitochondrialnej, natomiast wykazywała własności cytoprotekcyjne w teście apoptozy wywołanej przez TNF- α wraz z cykloheksymidem. W kolejnych etapach badań Autor

zastosował pochodne naringeniny: naringeninę-TPP⁺, chalkon naringeniny i pochodną cukrową: 6-C-glukozyd naringeniny. Bardzo ciekawy, moim zdaniem, choć trudny do interpretacji wynik dały eksperymenty z naringeniną-TPP⁺. Założeniem tego eksperymentu było sprawdzenie, w jaki sposób dołączenie do naringeniny dodatniego jonu TPP⁺ wpływa na badane parametry. Zabieg ten miał spowodować gromadzenie naringeniny-TPP⁺ w macierzy mitochondrialnej. Dość niespodziewanie, naringenina-TPP⁺ obniżała, a w stężeniach rzędu 10 μM wręcz hamowała aktywność kanału mitoBK_{Ca}, z drugiej strony wykazywała znacznie lepsze parametry cytoprotekcyjne niż czysta naringenina. Chętnie dowiedziałbym się od Autora pracy jak można interpretować tę pozorną sprzeczność: blokada kanału mitoBK_{Ca} - cytoprotekcja. W rozdziale „Dyskusja” nie znalazłem próby odpowiedzi na to pytanie.

Luteolina nie wykazywała istotnego wpływu na aktywność kanałów mitoBK_{Ca} ani na poziom apoptozy i nekrozy badanych komórek. Zbliżone wyniki otrzymano po zastosowaniu cyjanidyny.

Najbardziej interesujące wyniki uzyskał Doktorant po zastosowaniu kwercetyny. Już w stężeniu 3 μM powodowała ona znaczną aktywację badanego kanału. Co szczególnie istotne, kwercetyna uniemożliwiała blokadę kanału mitoBK_{Ca} przez paksylinę – inhibitor tego typu kanałów. Zinterpretowano to jako związanie kwercetyny z kanałem w miejscu oddziaływania paksyliny. Starając się dociec jaki jest mechanizm molekularny efektu znoszenia inhibicji paksyliną przez kwercetynę, Autor zastosował izoramnetynę – metylową pochodną kwercetyny, różniącą się jednym podstawnikiem. W tym przypadku „osłona” przed paksyliną nie miała miejsca, co wskazuje na kluczową rolę w tym procesie grupy OH w pierścieniu B kwercetyny.

Aby odpowiedzieć na pytanie: czy kwercetyna, oprócz bezpośredniego oddziaływania z kanałem mitoBK_{Ca}, wpływa również na ekspresję genów poszczególnych jednostek tego kanału przeprowadzono analizę RT-qPCR. Wykazano, że kwercetyna na ogół obniża poziom ekspresji genów podjednostek kanału, z wyjątkiem podjednostki regulatorowej β3. Jest to niewątpliwie ciekawy wynik otwierający dyskusję na temat krótko- i długofalowych skutków stosowania kwercetyny.

Strona formalna pracy doktorskiej mgr. Rafała Kampy nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa jest napisana zwięzłym naukowym językiem. Jest dziełem

obszernym, łącznie liczy 167 stron. Układ rozprawy jest typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. We „Wstępie” Autor przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zagadnień będących podstawą przeprowadzonych badań. Warto podkreślić logiczną kolejność podrozdziałów i unikanie informacji zbędnych, niezwiązanych z tematem badań. Tekst ilustrowany jest czytelnymi rycinami. Założenia i cel rozprawy zostały przedstawione w sposób logiczny, a kolejne eksperymenty są konsekwencją wyników uzyskiwanych w poprzednich badaniach. W rozdziale „Materiały i metody” omówiono w sposób szczegółowy badane substancje, użytą linię komórkową i stosowane metody pomiarowe. Godny podkreślenia jest właściwy dobór metod badawczych, ich różnorodność i wysoki stopień zaawansowania technicznego.

Rozdział „Wyniki” przedstawia szczegółowy opis uzyskiwanych rezultatów. W opisie tym można znaleźć krótkie określenie celu wykonania konkretnych eksperymentów oraz wstępną interpretację uzyskiwanych wyników. Ryciny dokumentujące otrzymywane wyniki są czytelne i poprawne pod względem edytorskim. Opracowanie statystyczne nie budzi moich zastrzeżeń.

W rozdziale „Dyskusja” Autor porównuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi z literatury. Nie we wszystkich przypadkach mógł dokonywać takiego porównania, albowiem część wyników stanowi absolutne novum. Autor na ogół podejmuje próby interpretacji uzyskanych przez siebie wyników. Zapewne z ostrożności nie próbował interpretować wyników pozornie kontrowersyjnych, jak np. wspomnianego przypadku efektów podania naringeniny-TPP⁺. Taka ostrożność świadczy o dużym doświadczeniu w redagowaniu artykułów naukowych, choć akurat w przypadku rozprawy doktorskiej nawet interpretacje o charakterze spekulacji mogłyby znaleźć miejsce. Wyniki i ich interpretacje podsumowuje rozdział 6. „Wnioski”. Zawiera on oprócz tradycyjnie sformułowanych konkluzji z przeprowadzonych eksperymentów tabelę, która w sposób poglądowy podsumowuje uzyskane wyniki.

Podsumowanie pracy stanowi „Streszczenie w języku polskim” i w języku angielskim.

W rozdziale „Spis publikacji” Autor przytacza dane bibliograficzne publikacji związanych bezpośrednio z rozprawą dokorską, których jest współautorem. Wymienia też pozostałe publikacje ze swoim udziałem. Jakość i liczba tych publikacji świadczą o pracowitości Autora i Jego zaangażowaniu w pracę naukową.

Rozprawę kończy wykaz bibliografii obejmujący imponującą liczbę 267 pozycji.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam krótką listę niedociągnięć.

Strona 12 powinno być „enzym przecinający” zamiast „enzym przecinające”;

Strony 12, 13 brak objaśnień kilku skrótów, m.in. TASK-3, TWIK;

Strona 19, sformułowanie „Wynika to z powodu” wymaga poprawy;

Strona 33 „Badania dowiodły ograniczeniu...” raczej „ograniczenia”;

Strona 44, Rycina 9, schemat w środku ryciny przedstawia „mitoplast zassany do pipety pomiarowej”, tymczasem widać tam wyraźnie łatkę błony a nie cały mitoplast.

Nie jest dla mnie jasna konfiguracja zastosowana w badaniach patch-clamp. Wbrew temu co przedstawiono na rycinie 9, Autor pisze na stronie 44: „Następnie pojedynczy mitoplast zasysano szklaną pipetą...”, co wskazywałoby na konfigurację „mitoplast-attached” będącą odpowiednikiem konfiguracji „cell-attached”, z drugiej strony w dalszych częściach pracy mowa jest o skrawkach. Czy rzeczywiście były to izolowane skrawki błony, a jeśli tak to w jaki sposób je uzyskiwano i w jakiej były konfiguracji mitoplast-attached, inside-out czy outside-out?

W opisie składu roztworów w pipecie i w medium nie znalazłem informacji w jaki sposób określano i jak uzyskiwano ich odpowiedni potencjał osmotyczny.

Strona 46 powinno być „...barwinka DNA...” zamiast „...barwniku DNA...”;

Strona 50, podrozdział 3.8.2, brak należytych objaśnień wzoru na końcu podrozdziału: (OD260), Factor (50);

Strony 110, 115 sformułowania „Aby potwierdzić ...”, „Dla potwierdzenia ...” w odniesieniu do celu wykonania eksperymentu są niefortunne;

Strona 127 stwierdzenie „... w celu jego otwarcia” w przypadku kanału zatrąca o teleologię;

W uzupełnieniu pytań postawionych w toku recenzji, miałbym jeszcze kilka kolejnych:

Prawdopodobieństwo otwarć badanych kanałów wykazuje znaczny rozrzut w warunkach kontrolnych od kilkunastu do prawie 70%, czy jest to typowe dla kanałów mitoBK_{Ca}?

Z jakiego powodu nie analizowano zmian przewodnictwa jednostkowego kanału po podaniu flawonoidów? Na przykład na stronie 102, na rycinie 51 wyraźnie widać prądy o różnym przewodnictwie? Czy był to inny kanał niż mitoBK_{Ca}, czy stan podprzewodnictwa (ang. subconductance) tego kanału?

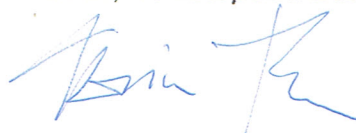
Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Rafała Kampy jest pracą znakomitą. Autor uzyskał bardzo ciekawe rezultaty mające charakter odkryć naukowych o znaczeniu poznawczym, ale także o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym. O wadze tych odkryć świadczy między innymi to, że większość z tych wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach naukowych, bądź jest w fazie przygotowania do publikacji. Ponadto, uzyskane wyniki otwierają szerokie pole do dalszych badań.

Stwierdzam z całą stanowczością, że rozprawa doktorska Rafała Kampy spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) oraz w załączniku nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13. 04. 2018 r.

Ze względu na wysoką jakość rozprawy i znaczenie zaprezentowanych wyników wnoszę o nagrodzenie jej Autora stosowną nagrodą.

Lublin, 15 listopada 2021 r.





Poznań, 17.11.2021

dr hab. Małgorzata Słocińska
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt
Wydział Biologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Rafała Pawła Kampy
pt. "Flawonoidy kardioprotekcyjne – nowe regulatory mitochondrialnych kanałów potasowych"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Rafała Pawła Kampy została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Piotra Bednarczyka, prof. SGGW, w ramach wsparcia finansowego przyznanego przez NCN dla projektów OPUS oraz ETIUDA. Celem pracy było scharakteryzowanie wpływu wybranych flawonoidów kardioprotekcyjnych na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego jonami wapnia mitoBKCa z zastosowaniem metody patch-clamp, a także metod biochemicznych i technik molekularnych. Do realizacji tego celu wykorzystano ludzką linię komórek śródbłónka naczyniowego EA.hy926.

W dobie rozwoju chorób cywilizacyjnych, jakimi niewątpliwie są choroby sercowo-naczyniowo powodowane przez stres, używki i niezdrowy styl życia, poszukiwanie nowych metod leczenia oraz skutecznych i specyficznych leków, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, nie powodujących skutków ubocznych wydaje się kluczowym wyzwaniem. Same flawonoidy to znane od lat substancje pochodzenia roślinnego o właściwościach antyoksydacyjnych. Jednak ich wpływ na mitochondria, szczególnie na biorące udział w cytoprotekcji, mitochondrialne kanały potasowe nie został do tej pory wyjaśniony. Podjęty zatem przez pana mgr. Rafała Kampę temat jest szczególnie interesujący, a uzyskane wyniki posiadają duży potencjał aplikacyjny.

Na podstawie dostępnej literatury Doktorant wyselekcjonował flawonoidy o możliwie największym potencjale cytoprotekcyjnym i badał ich wpływ - w różnych stężeniach i warunkach (m.in. zmieniającego się stężenie jonów wapnia czy przyłożonego napięcia) na aktywność kanału potasowego mitoBKCa, a także oddychanie mitochondriów, potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, migrację komórek, możliwość indukowania apoptozy i nekrozy, a także na ekspresję genów kodujących i poziomu białka podjednostek kanału mitoBKCa dla najsilniejszego



zdefiniowanego aktywatora tego kanału – kwercytiny. Autor realizując projekt musiał zatem posiadać znajomość wielu metod badawczych i technik laboratoryjnych takich jak: prowadzenie hodowli komórkowej, izolacja mitochondriów, preparacja mitoplastów, badanie aktywności kanałów metodą patch-clamp, pomiary metodą cytometrii przepływowej, izolacja RNA, PCR w czasie rzeczywistym, czy identyfikacja białek metodą western blot.

Do dysertacji załączony jest wykaz prac opublikowanych w trakcie realizacji doktoratu, z tego w trzech pracach przedstawiono wyniki z badań nad wpływem flawonoidów na kanał mitoBKCa. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że są to wyniki opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, IF 6.52; *Experimental Dermatology*, IF 3.96, a Doktorant w dwóch z nich jest pierwszym autorem, w trzeciej, *Molecules*, IF 4.4 jego wkład w pracę jest równy z udziałem dr Anny Kicińskiej. Świadczy to o umiejętności Doktoranta do pisania prac naukowych, prezentowania i analizowania otrzymanych w trakcie badań wyników. Pan Rafał Kampa jest także współautorem w 4 innych publikacjach, skupiających się wokół tematyki aktywności i funkcji mitochondrialnych kanałów potasowych oraz współautorem rozdziału książki *Mitochondrial Medicine. Methods in Molecular Biology*, w którym opisano zastosowanie techniki patch-clamp w badaniu aktywności kanałów wewnętrznej błony mitochondrialnej. Dwie kolejne publikacje są obecnie w przygotowaniu.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi obszerne opracowanie tematu przedstawione na 167 stronach. Praca zawiera wszystkie niezbędne rozdziały, które są charakterystyczne dla prac eksperymentalnych (Wprowadzenie, Materiały i metody, Założenia i cele pracy, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w j. polskim i j. angielskim). Proporcje poszczególnych rozdziałów są właściwe, opis wyników i dyskusja zajmują ponad połowę pracy. W pracy doktorskiej znajduje się 8 tabel i 68 rycin, w tym rysunki własne Autora oraz spis zawartych w tekście licznych skrótów. Rozprawę kończy spis literatury, który obejmuje 267 prac, w większości są to oryginalne i najnowsze publikacje, wykorzystane głównie we wstępie i dyskusji. Praca napisana jest bardzo jasno z nielicznymi sformułowaniami potocznymi (np. str. 42, szybkie i wolne wirowanie), lub nieprecyzyjnymi (np. str. 16 – „energia syntetyzowana w mitochondriach” - energii nie można produkować, można zamieniać rodzaje energii), czy błędami edytorskimi, (interpunkcyjne, literówki). Format pracy jest przejrzysty, jasny i przyjazny dla czytelnika. To co zwraca uwagę to brak akapitów w całej pracy, być może wynikający z błędu podczas jej formatowania.

We *Wprowadzeniu* Doktorant bazując na wielu materiałach źródłowych wprowadza czytelnika krok po kroku w tematykę pracy, przedstawia aktualne dane dotyczące budowy i funkcji mitochondriów, a także roli tych organelli w chorobach układu sercowo-naczyniowego ze szczególnym uwzględnieniem mitochondrialnych kanałów potasowych regulowanych jonami wapnia. W drugiej części rozdziału Autor skupia się na właściwościach i funkcjach flawonoidów wykorzystanych do

przeprowadzenia badań, takich jak naringenina i jej pochodne, luteolina (po raz pierwszy badano jej wpływ na kanał mitoBKCa w tej pracy), cyjanidyna, kwercytyna opisanych w literaturze jako związki o potencjale kardioprotekcyjnym. Z przedstawionych we *Wprowadzeniu* treści wyłania się jasno cel pracy przedstawiony w rozdziale *Założenia i cel rozprawy*, w którym zostają sformułowane: cele główne tj. pomiary elektrofizjologiczne aktywności kanału mitoBKCa w obecności flawonoidów metodą patch-clamp i towarzyszące tym regulacjom zmiany biochemiczne i fizjologiczne mitochondriów, zostają sformułowane także cele szczegółowe.

W rozdziale *Materiały i metody* scharakteryzowane zostały przez Autora wykorzystane w badaniach substancje chemiczne tj. flawonoidy kardioprotekcyjne, modulatory kanału mitoBKCa (niezbędne do określenia aktywności kanału) oraz pozostałe substancje tj. FCCP- rozpręgacz mitochondriów i cykloheksymid - czynnik indukcji apoptozy. Ponadto opisany został model badawczy czyli komórki śródbłonka naczyniowego oraz kolejne zastosowane w pracy metody, w tym izolacja mitochondriów, mitoplastów, pomiary elektrofizjologiczne, pomiar potencjału błonowego metodą cytometrii przepływowej, oksygraficzny pomiar oddychania komórkowego, ocena przeżywalności i migracji komórek, ocena poziomu ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym, a także poziomu białek metodą Western blot przy użyciu specyficznych przeciwciał oraz analizy statystyczne. Ta część pracy opisana jest w jasny, zrozumiały sposób, dodatkowo przy opisie niektórych metod, opatrzona schematami obrazującymi poszczególne etapy eksperymentu. Sugerowałabym jedynie by w opisie Tabel co do zastosowanych przeciwciał (Tab. 7) i sekwencji starterów dla analizowanych genów (Tab. 9) przypomnieć czytelnikowi czego dotyczą skróty. Prosiłabym także Doktoranta o odpowiedź na kilka pytań:

- Czy aplikowane stężenia flawonoidów oraz modulatorów mitoBKCa były dobrane na podstawie doniesień literaturowych, czy też ilość podawanych substancji określano eksperymentalnie? Jak jest uzasadnienie tak dobranych stężeń?
- Z czego wynikają różnice w czasie inkubacji flawonoidów i modulatorów kanału mitoBKCa z komórkami śródbłonka w różnych typach eksperymentów: np. jeden punkt pomiarowy 1.5 h dla analizy potencjału błonowego, kilka punktów pomiarowych dla apoptozy czy 12 h dla zbadania poziomu ekspresji genów kodujących i białek kanału mitoBKCa?
- Czy do pomiarów oddychania komórkowego stosowano substraty oddechowe? Czy wiadomo (z literatury lub obserwacji) jak flawonoidy mogą oddziaływać na parametry bioenergetyczne tj. kontrola oddechowa (KO), indeks ADP/O czy aktywność białka rozpręgającego (UCP)? Czy możliwa jest kooperacja między białkiem UCP, a kanałem mitoBKCa?

Rozdział *Wyniki* przedstawiony jest w dwóch wydzielonych podrozdziałach. W pierwszym z nich Autor przedstawia właściwości biochemiczne i farmakologiczne kanału mitoBKCa w komórkach śródbłónka, w warunkach kontrolnych, określone na podstawie aktywności (prawdopodobieństwa otwarć) kanału w obecności aktywatora (NS11021), inhibitora (paksyliny) i modulatora (wapń,). I tu moje pytanie:

- *Czy właściwości mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca - mitoKBCa z linii komórek śródbłónka naczyniowego hodowanych w wysokim stężeniu glukozy (4.5 g/l) różnią się od tych pochodzących z komórek śródbłónka hodowanych w niskim stężeniu glukozy? (1 g/l)*

Kolejny podrozdział dotyczy już regulacji kanału mitoBKCa przez flawonoidy. Autor opisuje wpływ wyselekcjonowanych substancji na aktywność kanału, potencjał błonowy mitochondriów, przeżywalność komórek, właściwości cytoprotekcyjne i udział flawonoidów w migracji komórek. *Wyniki* opisane są w staranny i zwięzły sposób, opatrzone licznymi rycinami i fotografiami. Choć zdjęcia obrazujące migrację komórek czy wskazujące na cytoprotekcyjny efekt flawonoidów są czytelne, to powiększenie ich rozmiaru wzmocniłoby ten rodzaj dokumentacji wyników.

Dla kwercytyny, która wykazywała wyjątkowo silny wpływ na aktywację mitoBKCa analizowano dodatkowo poziom białka kanału mitoBKCa i jego jednostek regulatorowych oraz ekspresję genów kodujących podjednostki kanału. W przypadku tego flawonoidu wykonano także pomiar zużycia tlenu przez komórki śródbłónka. W tym miejscu chciałby zapytać:

- *Dlaczego wpływ innych wyselekcjonowanych substancji kardioprotekcyjnych wykorzystywanych w pracy nie był badany pod kątem zmian w poziomie oddychania komórkowego?*

Na uwagę zasługuje podjęcie przez Doktoranta dodatkowych badań w których wykorzystano flawonoid strukturalnie podobny do kwercytyny - izoramentynę, gdzie grupa hydroksylowa w pozycji 3' pierścienia kwercytyny zastąpiona została grupą metoksyłową. Otrzymane wyniki wskazują na kluczową funkcję grupy OH kwercytyny w aktywacji kanału mitoKBCa oraz braku blokowania przez paksylinę.

W rozdziale *Dyskusja*, Doktorant, po krótkim wstępie omawia i dyskutuje w kontekście dostępnej literatury udział flawonoidów w cytoprotekcji oraz modulowaniu przewodnictwa kanału mitoBKCa, potencjału błony mitochondrialnej i oddychania komórkowego, indukcji procesów apoptozy, nekrozy oraz wpływu flawonoidów na migrację komórek. We wstępie do tego rozdziału (str. 119) bardziej precyzyjne byłoby zdanie „flawonoidy kardioprotekcyjne i pochodne naringeniny.”

Rozdział *Dyskusja* pokazuje dojrzałość Autora, który sprawnie porusza się w obszarze tematyki, której praca dotyczy i w wyważony sposób omawia otrzymane przez siebie wyniki badań nad wpływem flawonoidów na kanał mitoBKCa oraz towarzyszące temu zmiany w metabolizmie i fizjologii mitochondriów z badaniami na innych modelach badawczych np. glejeka i fibroblastów skóry. Autor dyskutuje także wpływ flawonoidów na plazmatyczny kanał BKCa i jego rolę w funkcjonowaniu neuronów, łagodzeniu stanów zapalnych, hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych czy rozkurczaniu mięśni gładkich tętnic. Uwypuklone zostają przez Doktoranta różnice w aktywności flawonoidów na cytoplazmatyczny i mitochondrialny kanał potasowy, przykładowo już 3 μM kwercytyna, flawononoid o największej aktywności na mitoBKCa i największym potencjale kardioprotekcyjnym w takich stężeniach nie aktywuje cytoplazmatycznego kanału mitoBKCa. Stężenia 30 μM , które go aktywują w mitochondriach indukują już nekrozę.

W nawiązaniu do tej części pracy i wątku wspomnianego w *Dyskusji* chciałbym zapytać:

- *Jakie jest zdanie Doktoranta dotyczące oddziaływania flawonoidów na mitoBKCa w warunkach in vivo (czyli w warunkach odzwierciedlających przyjmowania flawonoidów np. w postaci leków)? Jaki wpływ na aktywność kanału mogą mieć metabolity pośrednie flawonoidów czy środowisko wewnątrzkomórkowe?*

I dalej:

- *W technice patch-clamp zastosowanej w pracy flawonoidy podawano z wykorzystaniem systemu perfuzyjnego bezpośrednio oddziałując na kanał. Jak mogłaby wyglądać aktywność kanału mitoBKCa gdyby najpierw inkubowano badane substancje z komórkami, a następnie badano metodą patch-clamp badano jego aktywność?*

Podsumowując tą część pracy, brakuje mi zamykających *Dyskusję* rozważań Autora, które spinałoby wszystkie elementy dysertacji oraz pokazywały perspektywę dalszych badań nad wpływem związków pochodzenia roślinnego na mitochondrialne kanały potasowe czy potencjalnego wykorzystania tych substancji w zapobieganiu i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

Streszczenie w zwarty sposób opisuje całokształt badań. W części *Bibliografia* znajduje się bogaty dobór różnorodnych publikacji, co świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktoranta w obszarze, którym się zajmuje. W niektórych pozycjach literaturowych brakuje jednak stron, np. pozycja 122, 146, 170, 174, 193.



Największe osiągnięcia przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej to:

- Zidentyfikowanie i scharakteryzowanie po raz pierwszy nowych aktywatorów kanału mitoBKCa – flawonoidów: naringeniny i kwercytyny
- Wykazanie silnego cytoprotekcyjnego efektu działania kwercytyny oraz wpływu tego flawonoidu na mitochondrialny potencjał błonowy, oddychanie i migrację komórek śródbłónka naczyńowego oraz ekspresję genów i poziom białka kanału mitoBKCa
- Wykazanie po raz pierwszy przy wykorzystaniu metody patch-clamp interakcji między kwercytyną, a paksyliną
- Wykazanie ochronnego działania naringeniny przed apoptozą i nekrozą komórek
- Wykazanie, że luteolina i cyjanidyna aktywują kanał mitoBKCa w warunkach zredukowanych

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską pana mgr. Rafała Kampy oceniam bardzo wysoko. Jest opracowaniem opartym na oryginalnych wynikach, zawierającym elementy nowości naukowej, opublikowanym w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Postawione cele badawcze zostały przez Doktoranta zrealizowane i pieczołowicie opisane. Praca doktorska wskazuje na bogaty warsztat badawczy Autora oraz ogólną i specjalistyczną wiedzę. Drobne błędy i niedociągnięcia w tekście nie wpływają na pozytywną ocenę merytoryczną całego projektu.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) oraz załącznika nr. 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenia mgr. Rafała Kampy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką merytoryczną wartość pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

dr hab. Małgorzata Słocińska, prof. UAM

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Pawła Kampy zatytułowanej:

„Flawonoidy kardioprotekcyjne: nowe regulatory mitochondrialnych kanałów potasowych”

wykonanej pod kierunkiem Dr hab. n. farm. Piotra Bednarczyka, Prof. SGGW w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Neckiego PAN w Warszawie.

Obserwowane zaburzenia pracy serca i układu krążenia są często wynikiem upośledzenia funkcji mitochondrialnych, prowadzących do powstawania szeregu zmian chorobowych w tym zmian o charakterze miażdżycowym czy poważnych zmian niewydolnościowych. Wyniki badań w ostatnim okresie wskazują na aktywny udział mitochondriów w procesie apoptozy, co często jest punktem wyjścia do poszukiwań nowych mechanizmów cytoprotekcyjnych. Publikowane badania pokazują, że traktowanie chociażby tkanki mięśnia sercowego aktywatorami kanałów potasowych zwiększa przeżywalność tych komórek podczas niedotlenienia/reperfuzji. Pomimo intensywnych poszukiwań, dokładny mechanizm cytoprotekcji z udziałem jonów potasu pozostaje nadal niewyjaśniony, a substancje pochodzenia roślinnego stają się obecnie potencjalnym obiektem zainteresowania jako naturalne regulatory mitochondrialnych kanałów potasowych. Jednakże na chwilę obecną nie ma danych literaturowych o ich bezpośrednim oddziaływaniu z mitochondrialnymi kanałami potasowymi, w tym z kanałem mitoBKCa. Aktywacja tego właśnie kanału przez flawonoidy może okazać się więc nową, mitochondrialną ścieżką indukującą procesy związane z zjawiskiem kardioprotekcji, na przykład w komórkach śródbłonna naczyniowego.

Przetawiona do oceny dysertacja wpisuje się w bardzo aktualny nurt prowadzonych obecnie badań opisujących kompleksową i bardzo precyzyjną, analizę regulacji aktywności kanału mitoBKCa przez wybrane związki polifenolowe w tym flawonoidy i antocyjany z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* jak i określenie funkcjonalnych konsekwencji tej regulacji z zastosowaniem nowoczesnych technik biofizycznych, biochemicznych oraz metod biologii molekularnej. Autor postawił sobie za zadanie wiele ambitnych celów w tym w szczególności podjął się prób: 1/ oceny podstawowych właściwości biofizycznych oraz farmakologicznych kanału BKCa obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek śródbłonna naczyniowego linii EA.hy926 (badania regulacji kanału przez jony wapnia oraz znane modulatory: paksylinę i NS11021), 2/ określenia techniką patch-clamp wpływu wybranych do badań polifenoli w tym naringeniny, chalkonu naringeniny, naringeniny-TPP+, 6-C-glukozydu naringeniny, cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny na aktywność kanału mitoBKCa w komórkach śródbłonna linii EA.hy926, 3/ analizy zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w obecności naringeniny i jej pochodnej TPP+ oraz wybranych aglikonów: cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny, z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej JC-10, 4/ pomiaru zmian zużycia tlenu

w komórkach śródbłónka naczyniowego linii EA.hy926 z wykorzystaniem oksygrafu pod wpływem naringeniny oraz kwercetyny, 5/ oceny bezpieczeństwa i toksyczności oraz właściwości protekcyjnych naringeniny, naringeniny-TPP+, cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny w modelu *in vitro* linii komórkowej EA.hy926, 6/ charakterystykę aktywności kanału mitoBKCa, zmian potencjału mitochondriów oraz szybkości oddychania komórek EA.hy926 pod wpływem flawonolu izoramnetyny, 7/ analizę tempa migracji komórek EA.hy926 pod wpływem naringeniny, cyjanidyny, luteoliny oraz kwercetyny w teście zarastania rasy czy gojenia rany (*wound healing*) oraz ostatecznie 8/ oceny wpływu kwercetyny na zmianę ekspresji genów i poziomu białka podjednostek kanału BKCa w mitochondriach komórek śródbłónka naczyniowego komórek EA.hy926. W końcowym etapie uzyskane z badań wyniki Autor poddał ocenie statystycznej w oparciu o zastosowany test t-Studenta oraz wykorzystał jednoczynnikową bądź dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA z testem Tukey'a.

W mojej ocenie praca doktorska Pana mgr Rafała Kampa zawiera właściwie postawione hipotezy badawcze zweryfikowane przy pomocy nowoczesnego warsztatu aparaturowego. Co ważne, przyjęte tezy i uzyskane w ich toku wyniki mają znaczenie nie tylko poznawcze ale i praktyczne szczególnie w kontekście składników żywności funkcjonalnej (suplementy diety), a ich sformułowanie świadczy o oryginalności podjętego tematu. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, mgr Kampa wykazał, że wybrane do analiz związki polifenolowe regulują aktywność mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie (mitoBKCa). Ponadto dowiódł, że regulacja ta ma wpływ na stabilność potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, szybkość oddychania, migrację oraz ochronę komórek przed uszkodzeniem. Oczywiście, wzorowo przeprowadzony eksperyment pozwolił doktorantowi na sformułowanie szeregu właściwie postawionych wniosków podsumowujących przeprowadzoną ocenę regulacji mitochondrialnej przez wybrane do badań związki polifenolowe. Jako nowe aktywatory kanału mitoBKCa wskazał na pochodne flawonolowe, kwercetynę oraz izoramnetynę. Dwa pozostałe związki cyjanidyna i luteolina aktywowały kanał mitoBKCa w warunkach zredukowanych, podczas gdy w warunkach kontrolnych ich rolę określił jako neutralną bądź hamującą. Inne pochodne w tym naringenina-TPP+, chalkon naringeniny oraz 6-C-glukozyd naringeniny uznał jako inhibitory mitochondrialnego kanału BKCa. Na uwagę zasługuje fakt, iż po raz pierwszy, wykorzystując technikę *patch-clamp*, odkryto interakcję pomiędzy kwercetyną, a paksyliną. Po aktywacji kanału mitoBKCa przez kwercetynę, zastosowane białko adaptorowe - paksylina nie hamowała aktywności kanału.

Doktorant dodatkowo opisał, że kwercetyna powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondriów w komórkach śródbłónka naczyniowego EA.hy926, zaś naringenina-TPP+ wywołuje jej hiperpolaryzację. Zaobserwował jednocześnie, że zbadane związki, luteolina, cyjanidyna oraz izoramnetyna nie wpływają na zmiany potencjału mitochondriów, a zastosowana kwercetyna przyspiesza oddychanie mitochondriów w komórkach śródbłónka EA.hy926 w sposób zależny od stężenia. W badaniach oceny bezpieczeństwa (cytotoksyczności) dowiódł, iż analizowane flawonoidy nie indukowały śmierci apoptotycznej czy nekrotycznej. Co prawda wyjątek jedynie wykazała kwercetyna w stężeniu 30 μ M, która wywoływała nekrozę, jednakże na niskim poziomie istotności statystycznej. Dodatkowo, mgr

Kampa wykazał, iż trzy z badanych związków flawonoidowych, kwercetyna, naringenina oraz naringenina-TPP+ wpływają na przeżywalność komórek śródbłónka EA.hy926 w warunkach uszkodzenia indukowanego przez TNF- α /cykloheksymid. W toku dalszych bardzo pracochłonnych zadań badawczych doktorant zastosował test zarastania rysy, w którym porównując poszczególne związki uznał, że kwercetyna, luteolina i naringenina przyspieszają proces migracji komórek, natomiast inhibitor kanału mitoBKCa, naringenina-TPP+ w porównaniu do migracji komórek nietraktowanych, spowolniała zarastanie rysy. Końcowym etapem pracy była odpowiedź na pytanie czy kwercetyna wpływa na ekspresję genów oraz poziom białka kanału mitoBKCa oraz jego jednostek regulatorowych, która jednoznacznie wskazała na wzrost ekspresji genu i poziomu białka podjednostki regulatorowej $\beta 3$.

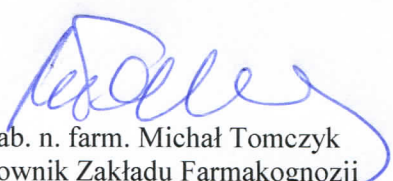
Mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny ocenianej monografii, jej lektura nasunęła kilka uwag i zapytań stwarzając tym samym okazję do dyskusji:

1. Nie odnalazłem w pracy rozwinięcia w dyskusji pewnych aspektów zależności aktywność-struktura SAR (*structure-activity relationship*) badanych związków polifenolowych. Pomimo, iż analiza SAR zdecydowanie powinna być oceniona na podstawie większej liczby badanych związków warto byłoby przynajmniej w ogólnym zakresie pochylić się nad tym zagadnieniem.
2. Pewnym niedociągnięciem jest uznanie cyjanidyny za połączenie flawonoidowe. Cyjanidyna, faktycznie jest formą aglikonową, ale z grupy wielofenolowych pochodnych flawanu, które są bezpośrednio spokrewnione z katechinami czy proantocyjanidinami i zaliczona powinna być do grupy antocyjanidyn, aglikonów antocyjanowych. W tym miejscu również chciałbym zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania obecne w tekście rozprawy, dla przykładu stwierdzenie, iż 6-C-glukozyd naringeniny jest pochodną zawierającą resztę cukrową, skoro w nazwie wymieniona jest już glukoza.
3. Autor rozprawy wspomina również, co zasługuje na podkreślenie, o pewnych bardzo ważnych kwestiach związanych z metabolizmem związków flawonoidowych w kontekście układu kompartmentowego jakim jest żywy organizm (badania w modelu *in vivo*, ocena metabolomiczna w oparciu o techniki wielkoskalowe w tym między innymi analizy LC-MS). Jest to kluczowe zagadnienie, które również w pewnym stopniu zobrazowałyby znacząco badane w pracy zależności.
4. W ocenianej pracy zabrakło mi jednoznacznie, przynajmniej w niewielkim stopniu, wspomnianej kwestii przełożenia uzyskanych wyników na wartość aplikacyjną badanych polifenoli, w kontekście żywności funkcjonalnej i ich aktywności kardioprotekcyjnej.

Lektura dysertacji uprawnia mnie do stwierdzenia, że Autor wykazał się wyjątkową zdolnością w opanowaniu szeregu nowatorskich technik pracy w laboratorium biochemicznym/biologii molekularnej. Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki badań oraz obszerna, zrozumiała, i co ważne dość krytyczna dyskusja potwierdzają dojrzałość badawczą Doktoranta, jak i dociekliwość oraz umiejętność stawiania i rozwiązywania problemów badawczo-naukowych. Przeprowadzony eksperyment wymagał w jego początkowej fazie szczegółowo przemyślanych i postawionych hipotez badawczych.

Ten schemat, jasno postawionych kolejnych etapów badawczych, został zrealizowany bez zarzutu. Strona techniczna rozprawy doktorskiej Pana mgr Rafała Kampy nie budzi moich najmniejszych zastrzeżeń tym bardziej, iż jest przygotowana z zachowaniem klasycznego i bardzo estetycznie przygotowanego układu edytorskiego.

Podsumowując, jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Rafała Kampy spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) oraz Załącznika nr 1 Regulaminu Rady Naukowej z 13 kwietnia 2018 r. Dysertacja jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr. Rafała Kampy do dalszych etapów przewodu doktorskiego rekomendując tym samym do nadania stopnia doktora nauk w dyscyplinie nauki biologiczne.



Dr hab. n. farm. Michał Tomczyk
Kierownik Zakładu Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku