

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 Aleksandry Sęk
pt. „Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez
niskocząsteczkowe związki syntetyczne pochodzenia roślinnego”

Rozprawa doktorska Aleksandry Sęk pt. „Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe związki syntetyczne pochodzenia roślinnego” to obszerne opracowanie, które mogłoby być podstawą do ubiegania się z powodzeniem nie o jeden, a o dwa doktoraty. Być może Doktorantka czuła się zobowiązana do wypełnienia wysokich wymagań obu promotorów: profesora Adama Szewczyka i profesora Tomasza Bauera. Z zadania tego wywiązała się znakomicie.

Autorka jako pierwsza zidentyfikowała i scharakteryzowała kanały potasowe typu mitoBK_{Ca} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego (HBE). Ponadto, w celu poszerzenia możliwości badawczych, wykorzystwała stabilną linię komórek HEK293 z wbudowaną do mitochondriów izoformą katalityczną (VEDEC) kanału mitoBK_{Ca} z kardiomiocytów. Model ten różnił się od komórek HBE m.in. nieobecnością podjednostek regulatorowych badanego kanału. Kanały jonowe typu BK_{Ca} zostały następnie dokładnie scharakteryzowane dzięki zastosowaniu techniki patch-clamp. Ze względu na znaną z wcześniejszych badań, ważną rolę aktywacji kanałów mitoBK_{Ca} w kardio- i neuroprotekcji, Autorka zbadała wpływ kilkunastu związków chemicznych na aktywność kanałów BK_{Ca} w dwóch ww. modelach doświadczalnych. Prace z Jej udziałem będą z pewnością przydatne w analizie etiologii niektórych chorób układu oddechowego.

W pierwszym etapie badań Autorka udowodniła, że rejestrowane metodą patch-clamp prądy jonowe to efekt otwarć kanału potasowego typu mitoBK_{Ca}. Świadczy o tym przewodnictwo jednostkowe rzędu 290 pS (w obecności 150 mM roztworu KCl po obu stronach skrawka błony), podatność na wysokie stężenie jonów Ca²⁺, całkowite hamowanie aktywności kanału przez 1 μM paksylinę, inhibitor kanałów mitoBK_{Ca} oraz w nieco mniejszym stopniu przez inny inhibitor, iberiotoksynę, z drugiej strony aktywacja kanału po zastosowaniu

znanego aktywatora, NS11021. Wprawdzie Autorka nie sprawdzała selektywności kanału, ale skład roztworów po obu stronach błony pozwolił na przepływ głównie prądów potasowych.

Ponadto, stosując technikę PCR i RT-qPCR, Doktorantka wykazała transkrypcję podjednostek katalitycznych α i podjednostek regulatorowych $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału BK_{Ca} w komórkach HBE. W celu sprawdzenia komórkowej lokalizacji podjednostek tworzących kanał zastosowała technikę Western blot. Potwierdzeniem wyników uzyskanych metodą patch-clamp na izolowanych mitoplastach było zidentyfikowanie podjednostek α i β kanału mitoBK_{Ca} we frakcji mitochondrialnej komórek HBE. Dodatkowo, Doktorantka zbadała efekt aktywacji kanałów mitoBK_{Ca} w nienaruszonych komórkach HBE. Aktywacja tych kanałów, w tym przypadku po dodaniu NS11021, powinna spowodować depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, co rzeczywiście miało miejsce, a zostało zarejestrowane dzięki zastosowaniu sondy fluorescencyjnej JC10 w cytometrii przepływowej. Inny typ badań przyżyciowych polegał na pokazaniu, że po dodaniu wspomnianego aktywatora kanałów BK_{Ca} wyraźnie wzrasta poziom oddychania mierzony zużyciem tlenu. Efekt ten był prawie całkowicie znoszony przez paksylinę.

Niemal wszystkie wymienione wyżej typy eksperymentów były następnie powtórzone przez Doktorantkę na linii komórkowej HEK293-BK-DEC, w której mitochondriach wyrażona została izoforma (VEDEC) podjednostki α kanału mitoBK_{Ca} nieobecnego natywnie w komórkach HEK293. Pomiarы wykonane techniką patch-clamp pozwoliły stwierdzić, że zaimplementowane do komórek HEK293 białko pełni funkcję kanału typu mitoBK_{Ca}. Świadczyło o tym typowe przewodnictwo, zależność o stężenia jonów wapnia oraz całkowita inhibicja prądów po zastosowaniu paksyliny. Różnice w stosunku do komórek HBE to zwiększone prawdopodobieństwo otwarć kanału, większa gęstość powierzchniowa kanałów oraz brak istotnej aktywacji przez NS11021. Ten ostatni wynik był zapewne spowodowany wysoką aktywnością, bliską nasycenia, kanałów nietraktowanych aktywatorem.

Stosując znakowanie immunofluorescencyjne, Autorka rozprawy wykazała obecność wariantu podjednostki α kanału BK_{Ca} m.in. w mitochondriach. Tak jak w przypadku poprzedniego modelu, zastosowano techniki PCR oraz Western blot w celu sprawdzenia obecności podjednostki katalitycznej kanału w mitochondriach linii komórkowej HEK293-BK_DEC. Eksperymenty te potwierdziły jednoznacznie ekspresję wprowadzonego genu w mitochondriach tych komórek. Konsekwencją obecności i wysokiej aktywności badanego kanału było zwiększenie szybkości oddychania w komórkach HEK293-BK_DEC w stosunku

do kontrolnych komórek HEK293, co Autorka wykazała prezentując wyniki pomiarów z użyciem oksygrafu.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to ważny przyczynek do poznania mechanizmów funkcjonowania kanałów jonowych typu mitoBK_{Ca} w mitochondriach komórek nabłonka oskrzelowego. Dołączenie wyników badań z zastosowaniem linii komórkowej HEK293-BK_DEC pozwoliło na uzyskanie cennych informacji dotyczących funkcjonowania samej podjednostki VEDEC zawierającej por kanału. Ponadto porównanie wyników z obu modeli eksperymentalnych rzuciło nowe światło na rolę podjednostek regulatorowych β .

Dysponując dobrze zdefiniowanymi modelami doświadczalnymi, Doktorantka podjęła się żmudnej analizy wpływu różnorodnych substancji na aktywność kanałów typu mitoBK_{Ca}. W pierwszym etapie analizie poddała związki z grupy flawonoidów, głównie naringeninę i jej pochodne. Wybór tej grupy związków spowodowany był wcześniejszymi doniesieniami o aktywacyjnej roli naringeniny w stosunku do kanałów mitoBK_{Ca} z fibroblastów skóry i komórek endotelialnych. Efektu takiego nie stwierdzono w stosunku do kanałów badanych w niniejszej pracy. Następnie Doktorantka poddała szczegółowej analizie wpływ siedmiu pochodnych naringeniny na aktywność kanałów mitoBK_{Ca} z komórek HBE oraz mitoBK_DEC wyrażonych w komórkach HEK293. Żaden z tych związków nie wywołał ochronnego efektu w stosunku do czynników wywołujących apoptozę lub nekrozę. Wręcz przeciwnie, kilka z tych związków zwiększało liczbę komórek, które uległy uszkodzeniu. Jedną z przebadanych substancji, 7-O-prenylo-naringenina spowodowała wprowadzić istotną aktywację badanych kanałów, jednak nie miało to istotnego wpływu na cytoprotekcję.

Inną grupą przetestowanych związków należących do flawonoidów pochodzenia roślinnego były antocyjany. Doktorantka zbadała wpływ 3-glukozydu malwidyny, 3-glukozydu peonidyny oraz 3-glikozydu petunidyny na aktywność kanałów mitoBK_{Ca}. Autorka wykazała, że żaden z tych związków nie wpływał na przeżywalność komórek HBE, mimo że jeden z nich 3-glukozyd petunidyny hamował aktywność kanału mitoBK_{Ca} w mikromolowych stężeniach.

Ostatnia część eksperymentów miała na celu przebadanie ośmiu związków będących pochodnymi paksyliny, efektywnego inhibitora kanałów BK_{Ca}. Tu wybór padł na komórki HEK293-BK_DEC jako na obiekt badań. Wynikało to zapewne z potrzeby zbadania wpływu tych substancji na por kanału, a nie na jego podjednostki regulatorowe.

Badania techniką patch-clamp wykazały znacznie mniejszy potencjał inhibicyjny pochodnych paksyliny w stosunku do samej paksyliny. Owszem, kilka przebadanych alkaloidów: weratryna, homotropina i chlorowoderek semperwiryny powodowały wyraźny

spadek prawdopodobieństwa otwarcia kanałów mitoBK_{Ca}, ale dopiero w stężeniach rzędu 30 μM, a więc 30-krotnie wyższych niż w przypadku paksyliny. Ponadto, 3 spośród 8 przebadanych związków: jerwina, pristimerina i chlorowodorek semperwiryny wykazały toksyczny wpływ na komórki HEK293-BK_DEC indukując apoptozę i nekrozę. Tak więc, żadna z pochodnych paksyliny nie okazała się równie skutecznym bądź lepszym inhibitorem niż paksylina. Mimo braku spektakularnego sukcesu w tej części badań, Doktorantka wykazała, jak należy dokładnie i kompleksowo przeprowadzać badania przesiewowe potencjalnych inhibitorów bądź aktywatorów kanałów jonowych. Stawką tego typu pomiarów było wskazanie potencjalnego leku/leków na schorzenia z udziałem kanałów jonowych typu mitoBK_{Ca}. Z drugiej strony, porównanie struktury chemicznej paksyliny i jej pochodnych może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu molekularnego procesu inhibicji badanego kanału, co jest niewątpliwie ważnym osiągnięciem.

Formalna strona rozprawy nie budzi większych zastrzeżeń. Praca jest obszerna, liczy 189 stron. Zawiera 76 rycin, z czego w sekcji Wyniki jest ich aż 63, co świadczy o szerokim zakresie przeprowadzonych badań. Jakość tych rycin jest na ogół bardzo dobra. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym opisującym w sposób zwięzły złożone zagadnienia. Pracę poprzedza *Indeks skrótów* liczący prawie 5 stron. Po nim następuje zwięzłe *Streszczenie w języku polskim* oraz w języku angielskim. *Wstęp* to 24-stronicowe wprowadzenie do tematyki poruszanej w rozprawie. Autorka omawia w nim kolejno budowę i funkcje komórek nabłonka oskrzelowego – jednego z obiektów badań, budowę i funkcje mitochondriów ze szczególnym uwzględnieniem transportu jonów i roli strumieni jonowych w regulacji procesów oddechowych. W dalszej części przedstawia charakterystykę kanałów potasowych funkcjonujących w mitochondriach, by następnie skupić się na kanale mitoBK_{Ca} - jego strukturze, regulacji, farmakologii i funkcji w mitochondriach. Kolejne podrozdziały *Wstępu* zawierają charakterystykę związków chemicznych, pochodnych naringeniny oraz pochodnych paksyliny będących przedmiotem badań Doktorantki. *Wstęp* napisany jest hierarchicznie - od zagadnień ogólnych do szczegółowych i stanowi doskonałe tło dla *Założeń i celu badań* przedstawionych w kolejnej sekcji. Rozdział *Materiał i metody* odzwierciedla szeroki wachlarz stosowanych metod i złożoność pracy. Wystarczy podać, że Autorka opisuje w nim co najmniej 13 skomplikowanych technik badawczych, takich jak patch-clamp, izolacja RNA, synteza cDNA, PCR, RT-qPCR, Western blot, elektroforeza, immunolokalizacja, cytometria przepływowa i wiele innych. Na szczególne podkreślenie zasługuje znakomite opanowanie tych technik przez Doktorantkę. Szeroki zakres rozprawy wynikać musiał z niezawodności stosowanych metod,

co pozwoliło na ich rutynowe stosowanie. Z drugiej strony, budzi respekt zgromadzenie takiej liczby precyzyjnych aparatów w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych.

W części *Wyniki* Autorka przestawiła krok po kroku rezultaty przeprowadzonych eksperymentów. Zostały one zilustrowane za pomocą rycin przedstawiających wybrane zapisy uzyskane techniką patch-clamp oraz diagramy podsumowujące wyniki uzyskane w trakcie kilku powtórzeń. Każdy podrozdział kończy się krótkim podsumowaniem omawianych wyników. Jest to bardzo pomocne. Moim zdaniem, wyniki dotyczące wpływu poszczególnych grup związków chemicznych na aktywność kanałów mitoBK_{Ca} mogłyby być przedstawione w postaci tabel. Umożliwiłoby to lepsze ich porównanie. Analiza statystyczna wyników nie budzi moich zastrzeżeń.

Rozdział *Dyskusja* jest, w mojej ocenie, dobrym przykładem jak należy pisać tego typu podsumowania. Po krótkim rysie historycznym, Autorka przedstawia uzyskane przez siebie wyniki na tle doniesień literaturowych. Przedstawia przekonujące interpretacje otrzymanych rezultatów. Tu szczególnie chciałbym zwrócić uwagę na interpretację eksperymentów metodą patch-clamp z zastosowaniem iberiotoksyny i jonów wapnia raz z jednej raz z drugiej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej. Autorka wnioskuje na tej podstawie na temat topologii podjednostek α kanału, a szczególnie położenia domen wiążących ww. substancje. Doktorantka, na podstawie własnych wyników, przypisuje nieobecność podjednostek regulatorowych β w komórkach HEK293-BK_DEC różnicom w aktywacji badanych kanałów w stosunku do tych z komórek HBE. Ponadto, Autorka podkreśla stwierdzoną przez siebie ekspresję genu kodującego podjednostkę VEDEC nie tylko w mitochondriach, jak dotychczas sądzono, ale też w błonie plazmatycznej i błonach siateczki śródplazmatycznej. Tu akurat w przypadku układu heterologicznego, jakim są komórki HEK293 zalecałbym ostrożność.

W tak obszernym opracowaniu trudno było ustrzec się stosunkowo mało istotnych błędów. Poniżej przedstawiam ich skróconą listę.

We *Wstępie*, str. 18 Autorka stwierdza: „...błony biologiczne składają się z tych samych dwóch podstawowych budulców: lipidów i białek”. Brak wzmianki o oligosacharydach w błonach plazmatycznych.

W podrozdziale 1.2. str. 19 zdanie: „Większość komórek eukariotycznych posiada podobny skład jonowy w cytoplazmie...” nie dotyczy np. komórek roślinnych. Zdanie to powinno zatem brzmieć: Większość komórek eukariotycznych **zwierząt** posiada podobny skład jonowy w cytoplazmie...”.

Wyraźne zawężenie informacji do komórek zwierzęcych pozwoliłoby uniknąć kolejnych nieprecyzyjnych stwierdzeń, jak np. „...transport aktywny, z udziałem pomp,

zachodzi z wykorzystaniem energii... ATP” (str. 19). Nie tylko ATP. Podobnie „Na⁺-K⁺-ATPaza nie jest obecna w „zdecydowanej większości komórek eukariotycznych” (str. 20).

W wielu miejscach rozprawy Autorka używa błędnie terminu „ilość” zamiast „liczba” w odniesieniu do obiektów policzalnych.

Fotografie komórek na Rycinie 10 są zbyt małe. Nie widać szczegółów.

Rycina 14 – kolory słupków są niemal identyczne. To samo dotyczy ryciny 25 B.

Rycina 20 – brak zaznaczonego wyniku dla „1 μM NS1619 + 1 μM pax”. Powinno być tak jak na Ryc. 19.

Strona 163 - stwierdzenie „...łańcuch oddechowy zwiększa swoją aktywność **w celu...**” wymaga korekty.

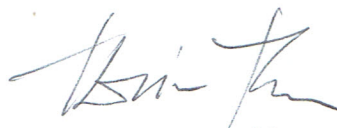
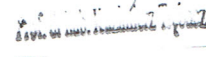
W rozdziale *Bibliografia* Autorka konsekwentnie stosuje zasadę podawania tylko jednego nazwiska współautora cytowanej pracy wraz z dodatkiem „et al.” w przypadku, gdy liczba współautorów jest większa niż dwóch. Uważam to za niefortunne. Podobnie jak używanie wielkich liter we wszystkich słowach w przypadku niektórych tytułów artykułów. Tu akurat zabrakło konsekwencji.

Powyższe uwagi nie wpływają na wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy. Dziwiłbym się, gdyby nie było błędów w tak obszernym opracowaniu.

Podsumowując, stwierdzam z całym przekonaniem, że rozprawa doktorska Aleksandry Sęk 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).

Ze względu na wysoką jakość rozprawy i znaczenie zaprezentowanych wyników wnoszę o wyróżnienie Autorki stosowną nagrodą.

Lublin, 18 listopada 2022 r.

Warszawa, 22.11.2022

Dr hab. Joanna Cymerys-Bulenda
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Sęk
pod tytułem:
„Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe
związki syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego”**

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Sęk pt. „Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe związki syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego” została zrealizowana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz w Pracowni Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w ramach interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM. Interdyscyplinarne studia doktoranckie „TRI-BIO-CHEM” prowadzone przez trzy jednostki partnerskie (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego) w ramach Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowane były ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, POWR.03.02.00-00-I007/16-00 (POWER 2014-2020). Promotorami w tym przewodzie doktorskim byli Prof. dr hab. Adam Szewczyk z Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie oraz Prof. dr hab. Tomasz Bauer z Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Praca ma postać bardzo obszernej monografii (189 stron), opracowanej zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Autorka przyjęła klasyczny układ opracowania, dzieląc je na: Wstęp, Założenia i cele, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski oraz Spis literatury. Podjęta tematyka badawcza, bez wątpienia, wpisuje się w aktualne trendy badawcze, nasilenie opracowań jej poświęconych można obserwować zwłaszcza w ostatnich latach, świadczy o tym

liczba prac zacytowanych przez autorkę. Ponad 50% wszystkich publikacji stanowią pozycje z lat 2012-2022 (137 pozycji). Rozprawa zawiera streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Na końcu opracowania Doktorantka zamieściła listę prac własnych, opublikowanych w latach 2018-2022, w liczbie 9 publikacji naukowych (6 prac doświadczalnych i 3 prace przeglądowe). Doktorantka podaje, że jest pierwszym autorem dwóch prac doświadczalnych obejmujących tematykę prezentowanej rozprawy doktorskiej (jednej opublikowanej i drugiej w przygotowaniu) oraz współautorem 6 pozostałych prac. Wykaz ten stanowi dodatkową informację dla recenzenta, ważną dla oceny osobistego wkładu mgr Aleksandry Sęk w dokonania naukowe wieloosobowego zespołu badaczy, prowadzących konsekwentne wielokierunkowe badania właściwości elektrofizjologicznych i farmakologicznych kanałów mitochondrialnych.

Tytuł rozprawy doktorskiej sformułowany jest poprawnie i odzwierciedla cel badań zrealizowanych przez Panią mgr Aleksandrę Sęk.

Na część teoretyczną rozprawy doktorskiej (Wstęp) składa się sześć podrozdziałów. W pierwszej części Autorka przedstawiła ogólną charakterystykę komórek nabłonka dolnych dróg oddechowych, jako komórek modelowych w prezentowanych doświadczeniach. Następnie opisała rolę jonów potasu w metabolizmie komórki i dokonała przeglądu piśmiennictwa dotyczącego budowy i funkcji mitochondriów, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia transportu jonów potasu w tych organellach. W czwartym podrozdziale, dla mnie szczególnie interesującym, Doktorantka przedstawiła rolę mitochondrialnych kanałów potasowych jaką odgrywają w procesach cytoprotekcji i śmierci komórkowej. Następnie opisała charakterystykę kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanym jonami wapnia (kanał BK_{Ca}), w ostatnim podrozdziale zaś, skupiła się na opisie właściwości i funkcji modulatorów mitochondrialnych kanałów potasowych - niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia naturalnego.

Wstęp do przedmiotowej pracy doktorskiej napisany został prawidłowo pod względem merytorycznym i staranności językowej. Jego treść i forma świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki.

Cel badawczy, który przyjęła Doktorantka w rozprawie doktorskiej (strona 43), jest interesujący, warty podjęcia naukowego wysiłku, badań i analiz. Szczególne zainteresowanie mitochondrialnymi kanałami potasowymi, wynika z roli jaką odgrywają w procesach cytoprotekcji i śmierci komórkowej. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele różnych

mitochondrialnych kanałów potasowych, pełniących kluczową rolę ochronną w komórkach tkanek narażonych na uszkodzenia, min.: neuronach, fibroblastach, keratynocytach, kardiomiocytach czy komórkach śródbłona. Dodatkowo istotnym elementem badań, mających na celu poznanie mechanizmów cytoprotekcji i śmierci komórki, stało się poszukiwanie nowych aktywatorów i inhibitorów mitochondrialnych kanałów potasowych, które mogą być zaangażowane w wyżej wymienione mechanizmy.

Biorąc pod uwagę opisany przez Doktorantkę aktualny stan wiedzy, a w szczególności wskazanie jej braku w przypadku innych tkanek bezpośrednio poddawanych wpływowi czynników uszkodzających, takich jak komórki nabłonka oskrzelowego, uważam że Doktorantka podjęła się wartościowego wyzwania, w pełni uzasadniającego poświęcenie mu pracy na poziomie doktoratu. Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu zidentyfikowanie mitochondrialnego kanału potasowego w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego (HBE), porównanie aktywności endogennie występującego mitochondrialnego kanału potasowego z egzogennym kanałem (izoformą VEDEC kanału potasowego), wprowadzonego do wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek, niewykazujących jego obecności (ludzkie embrionalne komórki nerki, HEK293). Dodatkowo zbadanie wpływu związków pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego, będących pochodnymi naringeniny oraz paksyliny (inhibitor kanału potasowego) na aktywność pochodzącego endogennie i egzogennie mitochondrialnego kanału potasowego.

Rozdział Materiały i metody zawiera szczegółowy opis użytych materiałów i technik badawczych, umożliwiających ich wykonanie w warunkach laboratoryjnych, z zachowaniem porównywanych parametrów. Doświadczenia zostały przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych, różniących się obecnością mitochondrialnego białka kanałowego (BK_{Ca}) - ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego (HBE), charakteryzujących się występowaniem endogennego kanału BK_{Ca} oraz ludzkich embrionalnych komórek nerki 293 (HEK293), które nie wykazują ekspresji tego kanału, do których drogą transfekcji został wprowadzony gen kodujący izoformę VEDEC kanału BK_{Ca}. Związki niskocząsteczkowe, których wpływ na mitochondrialny kanał BK_{Ca} i BK_DEC, doktorantka badała w niniejszej rozprawie, antocyjany, pochodne naringeniny oraz związki o strukturze zbliżonej do paksyliny zostały pogrupowane i przejrzysto opisane w Tabeli 1-3.

Podstawową metodą badawczą zastosowaną przez Doktorantkę była technika elektrofizjologiczna *patch-clamp*, umożliwiająca identyfikację mitochondrialnych kanałów potasowych oraz zbadanie wpływu związków niskocząsteczkowych na ich aktywność. W celu

wykonania pomiarów elektrofizjologicznych z wykorzystaniem techniki stabilizacji skrawka błony, umożliwiających ocenę przepływu jonów przez pojedynczy kanał jonowy, doktorantka przeprowadzała izolację mitochondriów z komórek badanych linii komórkowych i preparację mitoplastów. Dodatkowa identyfikacja i charakterystyka kanałów potasowych BK_{Ca} pochodzących z linii komórkowej HBE oraz kanału mitoBK_DEC z komórek HEK293-BK_DEC wykonana została z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, obejmujących analizę poziomu ekspresji genów kodujących podjednostki kanału (RT-qPCR) oraz analizę białek budujących kanał (metoda Western blot), a także technik wizualizacji z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (barwienie immunofluorescencyjne). Przeprowadzono także oznaczanie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (ocena wpływu modulatorów kanału na potencjał błony), przy użyciu cytometrii przepływowej. Ponadto, Doktorantka wykonała analizę oddychania komórkowego, w obecności modulatorów kanału BK_{Ca}, wykorzystując dwie techniki laboratoryjne – pomiar szybkości zużycia tlenu z wykorzystaniem oksygrafu oraz urządzenia Seahorse. Oceniała również przeżywalność komórek z wykorzystaniem metody umożliwiającej zbadanie odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Ten krótki opis wskazuje na bogaty warsztat badawczy wykorzystywany przez Doktorantkę w prowadzonych badaniach, warto to podkreślić i pochwalić. Bardzo przydatne jest zamieszczenie, w tym rozdziale, Tabel i Rycin, które ułatwiają zrozumienie wykonanych doświadczeń.

W rozdziale **Wyniki** mgr Aleksandra Sęk przedstawiła uzyskane wyniki przeprowadzonych badań w postaci opisowej oraz graficznej, na licznych Rycinach (62 ryciny). Podkreślić należy, że jest to główna i najobszerniejsza (83 strony) część pracy doktorskiej. W niej Doktorantka dokładnie omówiła otrzymane wyniki i starannie je udokumentowała. Przystudiowanie wszystkich opisanych wyników i wielowątkowych analiz, nie było zadaniem łatwym. Bardzo przydatne okazało się zamieszczenie w ramach rozdziału „podsumowań” każdego podrozdziału, ułatwią one usystematyzowanie opisanych wyników badań.

Dodatkowo, niezwykle pomocna okazała się wzorcowo napisana **Dyskusja** (20 stron), w której Doktorantka skomentowała poszczególne obszary badań i uzyskane w nich wyniki. Następnie poddała je analizie w oparciu o dane z obszernie cytowanej literatury światowej. Krytyczna ocena wyników badań własnych i piśmiennictwa świadczy o wszechstronnej znajomości tematu i bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Rozprawa doktorska kończy się sześcioma **Wnioskami**, które odpowiadają uzyskanym wynikom i ściśle korelują z założonym celem pracy. Chciałabym w tym miejscu podkreślić zaledwie niektóre wyniki i wnioski opisane w monografii mgr Aleksandry Sęk, które uznałam za bardzo interesujące i ważne dla dalszych badań poznawczych, jak i praktycznych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, po raz pierwszy, zidentyfikowano i scharakteryzowano mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami Ca^{2+} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. Dodatkowo, zdefiniowana przez Doktorantkę aktywność kontrolna kanału potasowego BK_{Ca} posłużyła jako model badawczy w poszukiwaniu nowych modulatorów kanału. Udowodniono, że ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK293) stanowią przydatny i wiarygodny model badawczy do transfekcji plazmidem zawierającym gen kodujący VEDEC izoformę kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ oraz scharakteryzowano elektrofizjologicznie i farmakologicznie kanał mitoBK-DEC z nowej linii komórkowej HEK293- BK_DEC . Opisano, po raz pierwszy, że chalkon 4', 5, 7 –tri-O-metylo-naringeniny blokuje aktywność obu badanych kanałów $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ zarówno z komórek HBE jak i HEK293- BK_DEC i może być potencjalnym nowym inhibitorem kanałów potasowych. Wykazano, również po raz pierwszy, że pochodne naringeniny różniące się grupami funkcyjnymi wykazują różne efekty na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych, na przykład pochodna naringeniny - flawonoid 7-O-prenylo-naringenina aktywuje kanał występujący zarówno endogennie ($\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$) w komórkach HBE jak i egzogennie (mitoBK_DEC) w komórkach HEK293- BK_DEC . I wreszcie również po raz pierwszy, zbadano i opisano, działanie związków o strukturze zbliżonej do paksyliny (inhibitora kanałów potasowych) na aktywność kanału mitoBK_DEC .

Pod względem merytorycznym praca zasługuje na wysoką ocenę, niemniej jednak chciałabym przedstawić pewne **zastrzeżenia**, część z nich może mieć charakter dyskusyjny.

- Główna uwaga dotyczy analizy obecności i lokalizacji podjednostki α kanału BK_{Ca} przeprowadzonej za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego i wizualizacji w mikroskopie konfokalnym. Doktorantka wyznakowała fluorescencyjnie mitochondria (barwniki MitoRed), siateczkę śródplazmatyczną (anty-P4HB), błonę komórkową (anty-ATPaza $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$) oraz tworzącą por kanału BK_{Ca} podjednostkę α (anty-slo1). Białym kwadratem zaznaczyła miejsce występowania nałożonej fluorescencji podjednostki α kanału BK_{Ca} z opisanym powyżej elementem komórkowym, czyli tzw. kolokalizację. Analiza nałożenia wyznakowanych obrazów dała podstawę do

wysunięcia przez Doktorantkę wniosku o występowaniu podjednostki α , zarówno w mitochondriach jak i w siateczce śródplazmatycznej oraz błonie komórkowej.

Uważam, że na podstawie przedstawionych przez Doktorantkę zdjęć (Rycina 33), których jakość powinna być poprawiona, trudno jednoznacznie stwierdzić o zajściu kolokalizacji. Warto byłoby, przedstawić miejsce nałożenia fluorescencji również w postaci histogramu lub fluorogramu i podać współczynnik korelacji.

Czy Doktorantka może wyjaśnić dokładniej, jakie parametry zastosowała do określenia, czy dwa wyznakowane fluorescencyjnie elementy są kolokalizowane? Z jakiego testu (rozszerzenia) programu ImageJ korzystała i czy próbowała ustalić współczynnik korelacji? A także ile zdjęć analizowała w każdym eksperymencie?

Praca jest napisana bardzo dobrym i dojrzałym językiem naukowym, a brak poważnych błędów składniowych zasługuje na szczególną pochwałę. Znalazłam jedynie drobne błędy interpunkcyjne oraz pewne niezręczności językowe, na przykład użycie sformułowania „komórki wysiewano” w kilku miejscach rozprawy (strona 61, 66, 70), jest według mnie nie najlepsze. Lepiej pisać: „zakładano hodowlę komórek o gęstości” lub „zawiesinę komórek o gęstości x/ml przenoszono na”.

W trakcie analizy rozprawy doktorskiej nasunęły mi się również następujące pytania do Pani mgr Aleksandry Sęk: Czy Doktorantka może wyjaśnić zasadność stosowania hodowli komórkowych pomiędzy 6 a 25 pasażem, w przypadku komórek nabłonka oskrzelowego oraz pomiędzy pasażem 4 a 25, w przypadku embrionalnych komórek nerki. Czy sprawdzane były linie komórkowe o wyższych pasażach? Czy w przypadku linii transfekowanej HEK293-BK-DEC obserwowano różnice w ekspresji kanału BK_{Ca} pomiędzy pasażami?

Podsumowując, wymienione powyżej sugestie i uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej opinii o pracy. Pragnę podkreślić, że Pani mgr Aleksandra Sęk bardzo dobrze wywiązała się z postawionego zadania, wykonując pionierskie badania, przy użyciu różnorodnych metod badawczych, gwarantujących uzyskanie wiarygodnych wyników. Doktorantka umiejętnie dostrzegła i wypełniła lukę badawczą, a podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał aplikacyjny. Opublikowanie części wyników rozprawy doktorskiej w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports*, jest również godne podkreślenia w recenzji rozprawy Pani mgr Aleksandry Sęk.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Sęk, pt. „Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe związki syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego” spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych, 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).

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i **dopuszczenie mgr Aleksandry Sęk do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Ponadto, uwzględniając oryginalny i nowatorski charakter wykonanych badań, **wnioskuję o wyróżnienie pracy** stosowną nagrodę.


Dr hab. Joanna Cymerys-Bulenda

Prof. UAM dr hab. Małgorzata Wojtkowska

Poznań, 30.11.2022

Wydział Biologii UAM

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Sęk

„Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe związki syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego”

wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Adama Szewczyka z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz Prof. dr hab. Tomasza Bauera z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Kanały potasowe występują w większości rodzajów komórek eukariotycznych i stanowią najliczniejszą rodzinę białek błonowych, których rolą jest zachowanie homeostazy jonowej zarówno w komórkach pobudliwych jak neurony i kardiomiocyty oraz niepobudliwych. Dotychczas zidentyfikowane i scharakteryzowane kanały potasowe pozwalają na ich klasyfikację pod względem struktury, lokalizacji oraz sposobu regulacji aktywności. Jednym z rodzajów kanałów potasowych są mitochondrialne kanały potasowe. Uważa się, że aktywacja kanałów potasowych zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadzi do uruchomienia mechanizmów cytoprotekcyjnych. Zatem, w kontekście fundamentalnego znaczenia kanałów potasowych w organizmach żywych kluczowym jest podejmowanie badań nad ich charakterystyką.

W ramach przedstawionej rozprawy Doktorantka podjęła się zidentyfikowania mitochondrialnego kanału potasowego o dużej aktywności regulowanego wapniem mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego (HBE) oraz charakterystyki izoformy VEDEC tego kanału uzyskanej w wyniku transfekcji komórek jej pierwotnie pozbawionych (HEK293). Uzyskane modele mitochondrialnego kanału potasowego o pochodzeniu endogennym mitoBK_{Ca} oraz jego egzogennej izoformy VEDEC zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, umożliwiającej przedstawienie charakterystyki elektrofizjologicznej kanału oraz efektu oddziaływania znanych oraz nowych modulatorów syntetycznych oraz pochodzenia roślinnego na aktywność kanałów mitoBK_{Ca}. Poszukiwanie nowych modulatorów kanałów podnosi aspekt aplikacyjności niniejszej pracy doktorskiej bowiem może przyczynić się w przyszłości do rozwoju nowych strategii terapeutycznych chorób niedokrwiennych.

Recenzowana rozprawa doktorska ma postać obszernej monografii i składa się z typowych dla prac eksperymentalnych części, a całość opracowana jest starannie i zrozumiale. Wstęp stanowi dobre wprowadzenie w tematykę pracy. Znajdujemy w nim charakterystykę mitochondrialnych kanałów potasowych uwzględniającą najnowsze dane literaturowe oraz przegląd niskocząsteczkowych związków syntetycznych oraz pochodzenia roślinnego pomocny w rozumieniu części zawierającej wyniki. W części „Wstępu” poświęconej udziałowi mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji oraz śmierci komórkowej, Doktorantka pisze o efekcie działania inhibitora kanału Kv1.3 powodującej selektywną śmierć komórek nowotworowych przewlekłej białaczki limfocytowej B, nie wpływając na komórki zdrowe. Chciałabym poznać zdanie Doktorantki na pytanie dlaczego inhibitor Kv1.3 wywołuje efekt cytotoksyczny jedynie w komórkach nowotworowych? Czy podobne efekty selektywnego niszczenia komórek nowotworowych uzyskano również w przypadku badania innych rodzajów kanałów potasowych?

Założenia i cele pracy sformułowane są zrozumiale. Część pracy „Materiały i Metody” rozpoczyna się od spisu niskocząsteczkowych związków chemicznych wykorzystywanych w prezentowanych wynikach badań. W tej części zabrakło mi wyjaśnienia, które ze związków wykorzystano w niniejszej pracy po raz pierwszy i w jaki sposób zostały one wyselekcjonowane? Czy w wyborze nowych związków do modulowania aktywności kanałów posłużono się programami umożliwiającymi symulację efektu ich oddziaływania na badane kanały potasowe? Ponieważ w tej samej części pracy, zdjęcia prezentujące komórki linii HEK293 i komórki po transfekcji (HEK293-BK_DEC) (Rys.10) różnią się, chciałabym zapytać, czy obecność podjednostki VEDEC wywołuje różnicę we wzroście komórek po transfekcji względem kontroli? Już podczas czytania części „Materiały i Metody” zwróciłam szczególną uwagę na bogactwo i różnorodność wykorzystanych technik i metod badawczych. Wymienię dla przykładu kilka: pomiary elektrofizjologiczne wykorzystujące technikę *patch-clamp*, analizy oddychania komórkowego z wykorzystaniem elektrody tlenowej Clarka oraz Seahorse, metody biologii molekularnej w tym, analizę poziomu ekspresji genu metodą RT-PCR, a także mikroskopia oraz metody badania białek jak western blot i immunodetekcja.

W pierwszej części wyników Doktorantka przedstawiła charakterystykę funkcjonalną mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego. Wyniki te po raz pierwszy wskazują na obecność mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego co wskazuje na nowatorstwo przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Analizy stanowiące podstawę tego osiągnięcia oparte są na technice *patch-clamp*, umożliwiającej wyznaczenie takich

parametrów jak przewodnictwo kanału, zależność prądowo-napięciowa, średnie czasy otwarć, regulacja aktywności kanału przez zmiany stężenia jonów wapnia, oraz wpływ modulatorów. Doktorantka wyróżniła dwa rodzaje aktywności kanałowej mitoBK_{Ca} w tych samych warunkach doświadczalnych zwanej dalej kontrolnej ($286,2 \pm 5,5$ pS) i zwiększonej ($287,8 \pm 2,8$ pS). Obie te aktywności kanału są tożsame z charakterystyką mitoBK_{Ca}, bowiem są wrażliwe na inhibitor paksylinę, zmiany stężenia jonów wapnia oraz zmianą aktywności w zależności od napięcia wykazując wyższe prawdopodobieństwo otwarć przy dodatnich potencjałach. Wrażliwość na taki aktywator jak NS11021 była jednak różna dla obu populacji kanałów do czego nieco później sformułuję pytanie. W dalszej części wyników następuje charakterystyka biochemiczna mitoBK_{Ca}. Wyniki pochodzące z analiz RT-PCR, wskazują na obecność genów kodujących podjednostki α , $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału mitoBK_{Ca}, co znalazło potwierdzenie na poziomie białek o masie odpowiednio 120, 27 i 24 kDa (Ryc.25). Mając jednak na uwadze identyfikację kanału w dwóch populacjach pojawia się pytanie czy dwie aktywności kanału mogą wynikać z ich odmiennej budowy? czego na podstawie zastosowanych metod badawczych nie możemy rozstrząsać. Mam również na uwadze fakt odmiennej odpowiedzi obu populacji kanału na wspomniany aktywator NS11021, co również pokazują wyniki z cytometrii przepływowej, wywołujące różny efekt tego modulatora na potencjał wewnątrz błonowy (Rycina 26). Jakie badania zaproponowałaby Doktorantka, aby lepiej scharakteryzować obie populacje kanałów potasowych pod względem ich struktury?

Druga część rozprawy doktorskiej dotyczyła analizy biofizycznej izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca} linii komórkowej HEK293-BK_DEC do czego została zastosowana podobna do mitoBK_{Ca} komórek HBE metodyka badań. Uzyskane wartości wyznaczonych parametrów dla mitoBK_{Ca} w linii komórkowej HEK293-BK_DEC pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi i nie pozostawiają wątpliwości co do funkcjonalnej tożsamości analizowanego kanału potasowego. Doktorantka wykazała, że aktywność kanału potasowego, jest zależna od napięcia, a jego przewodnictwo wynosi $288,9 \pm 4,2$ pS, a więc jest podobne do wyznaczonej aktywności mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. Jednak kanał BK_DEC w komórkach transfekowanych charakteryzuje się aktywnością kilku kanałów w analizowanym fragmencie błony. W mojej ocenie zabrakło tu analiz kontrolnych na komórkach HEK293 z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, które wykonane w tych samych warunkach doświadczalnych wykluczyłyby obecność endogennej izoformy tego białka kanałowego. Tym bardziej, że przedstawione wyniki z obrazowania za pomocą mikroskopii konfokalnej (Ryc.33) sugerują lokalizację produktu ekspresji izoformy VEDEC poza mitochondriami również w siateczce endoplazmatycznej oraz błonie komórkowej.

Z wielkim zaciekawieniem przeczytałam również część dotyczącą charakterystyki biochemicznej poddanej ekspresji izoformy VEDEC kanału mito BK_{Ca} a linii komórkowej HEK293-BK_DEC. Nie mam wątpliwości co do obecności transkryptu oraz białka tworzącego por kanału BK_{Ca} izoformy VEDEC podjednostki α , w komórkach HEK239-BK_DEC. Zastanawia mnie jedynie część analiz z RT-PCR dla linii HEK293. Na poziomie ekspresji genów w linii nietransfekowanej (Ryc.34) wykazano obecność produktu na wysokości 167 pz., który jak pisze Doktorantka „wskazuje na ekspresję transkryptu genu kodującego podjednostkę α BK_{Ca}”. Produkt reakcji RT-PCR dla linii transfekowanych plazmidem kodującym podjednostkę α wynosi jednak 452 pz. Z kolei na poziomie analiz białkowych w pkt. 4.5.3 obecność podjednostki α stwierdzono, jak można przypuszczać, tylko w linii transfekowanej (Rycina 35). Ta część jest dla mnie niejasna i proszę o jej wyjaśnienie. W dalszej części pracy znajdują się wyniki dotyczące zbadania związku pomiędzy oddychaniem komórkowym, a obecnością kanału mitoBK_DEC wykonane w oparciu o metody z wykorzystaniem elektrody tlenowej Clarka (oksygraf) oraz Seahorse. Analizy przeprowadzone za pomocą obu zastosowanych metod pomiarowych przyniosły porównywalne wyniki, które jednoznacznie wskazały, że obecność kanału mito BK_{Ca} zwiększa szybkość zużycia tlenu. To bardzo cenne wyniki ponieważ wskazują na powiązanie kondycji mitochondriów z obecnością kanału potasowego co potwierdzają dwie, dostępne metody pozwalające określić wartości parametrów bioenergetycznych. Chciałabym zapytać Doktorantkę, jakie inne białka wewnętrznej błony mitochondrialnej mogłyby wywoływać podobny efekt jakim jest zwiększenie zużycia tlenu przez mitochondria? Czy mogą to być białka transportujące inne cząsteczki np. białka? Czy istnieje związek pomiędzy funkcjonowaniem mitochondrialnych kanałów potasowych, a transportem białek przez wewnętrzną błonę mitochondrialną? Doktorantka przedstawiła również wyniki z modulacji aktywności kanału potasowego z komórek nabłonka oskrzelowego oraz wersji kanału BK_DEC. Flawonoidy i ich pochodne wykorzystano w przypadku kanału mitoBK_{Ca} natomiast związki niskocząsteczkowe (pochodne paksyliny) wybrano w przypadku mitoBK_DEC. Wyniki te sugerują, że wybrane flawonoidy wywołują różne efekty na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych co wiąże się z rodzajami grup funkcyjnych zawartymi w modyfikowanych związkach natomiast antocyjany efektu aktywującego nie wykazują. To bardzo cenne wyniki ponieważ po raz pierwszy zostały przedstawione wyniki działania związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC. Związki te wywołują jednak mniejszy efekt na prawdopodobieństwo otwarć kanałów potasowych niż znany efekt hamowania wywoływany przez paksylinę. Dyskusja napisana jest bardzo dobrze z licznym odniesieniem się do aktualnej wiedzy nie budzi moich zastrzeżeń. W wielu miejscach znalazłam sprawną

interpretację uzyskanych wyników w kwestiach, tego wymagających. Dobrze napisana dyskusja wskazuje na dojrzałość naukową młodego badacza, który zdobył wiedzę i doświadczenie na bardzo bogatym warsztacie pracy.

Podsumowując rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr Aleksandrę Sęk prezentuje wysoki poziom merytoryczny i naukowy, a jakość i dobór zastosowanych metod badawczych zasługuje na podkreślenie. W świetle przedstawionych wyników z przekonaniem stwierdzam, że Pani Aleksandra Sęk zrealizowała w pełni założone cele badawcze. Warto podkreślić, że uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki dotyczące identyfikacji kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego wapniem w komórkach nabłonka oskrzelowego zostały opublikowane w *Molecules* w 2021, w której Pani Aleksandra Sęk jest pierwszym autorem. Dodam, że w tematyce rozprawy, Doktorantka jest również współautorem dwóch prac przeglądowych oraz pierwszym autorem w pracy eksperymentalnej będącej w przygotowaniu na temat regulacji mitoBKCa pochodnymi naringeniny. Poza tym współautorstwo w 5 pracach eksperymentalnych oraz pracy przeglądowej spoza tematyki doktoratu, w takich czasopismach jak *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *Molecules* czy *Antioxidants*, wskazuje na sporą wiedzę merytoryczną oraz wysokie zaangażowanie Doktorantki.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Sęk pt. „Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału potasowego przez niskocząsteczkowe związki syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego”, 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), zatem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu im. M. Nenckiego PAN w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandrę Sęk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką wartość rozprawy oraz jej nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.



Małgorzata Wojtkowska