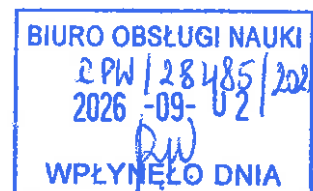


Gdańsk, 28 sierpnia 2026

Prof. dr hab. Jacek Piosik
Pracownia Biofizyki,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk
Tel.: +48 58 523 6311
E-mail: jacek.piosik@ug.edu.pl



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Dąbrowskiej-Hulki
pt.: „Rola mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w fizjologii i uszkodzeniach
komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie”**

Oceniana praca została wykonana w Katedrze Fizyki i Biofizyki, Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Promotorem niniejszej pracy jest prof. dr hab. Piotr Bednarczyk, natomiast dr Agnieszka Łukasik pełni funkcję promotora pomocniczego.

Prowadzone od wielu lat badania statystyczne i analizy meta statystyczne wykazują istotny wpływ różnych czynników środowiskowych na zdrowie i jakość życia analizowanych populacji. Wśród tych czynników dieta oraz zanieczyszczenie środowiska wydają się najbardziej istotne. Przyczyny zanieczyszczeń środowiska naturalnego mogą mieć podłoże naturalne ale także antropogeniczne. Naturalne, takie jak erupcje wulkanów, trzęsienia ziemi, naturalne pożary, tsunami czy uderzenia meteorytów są w zasadzie w dużym stopniu poza możliwością kontroli ludzi. Natomiast antropogeniczne, takie jak zanieczyszczenia wód, powietrza, gleby, niszczenie siedlisk i krajobrazu, wprowadzanie gatunków inwazyjnych i wiele innych są skutkiem działalności ludzkiej: nieustającej urbanizacji, rozwoju przemysłu i monokulturowego rolnictwa, czy też rabunkowej eksploatacji zasobów naturalnych. Skutki działania populacji ludzkiej stały się już globalnym problemem, a jednym z najbardziej istotnych wydaje się zanieczyszczenie powietrza. Produkty spalania paliw, dymy przemysłowe, pyły powstające podczas transportu czy działalności budowlanej powodują powstanie cząstek zawieszonych w powietrzu o różnej średnicy składających się na pyły miejskie (PM). Te z kolei w interakcji z wodą często tworzą smog miejski, szczególnie nasilający się w sezonie grzewczym. Problem ten dotyka wielu, jeśli nie zdecydowanej większości, dużych miast polskich. Ale, co ciekawe, nie tylko tych największych miast, ale też zurbanizowanych „obwarzanków” miejskich, czy też często małych, samodzielnych ośrodków miejskich. Jaskrawym przykładem takiej sytuacji jest metropolia krakowska, gdzie pomimo ogromnych wysiłków i nakładów finansowych w samym Krakowie sytuacja smogowa poprawia się bardzo powoli, właśnie na skutek wpływu generowanych zanieczyszczeń powietrza przez ośrodki podmiejskie wchodzące w skład „obwarzanka” miejskiego. W zależności od średnicy pyły miejskie można sklasyfikować jako gruboziarniste - PM₁₀, drobnoziarniste – PM_{2,5} oraz

ultra drobne – PM_{0,1}, na które składają się cząstki o średnicy poniżej 100 nm. W zależności od swojej średnicy cząstki PM mogą osiadać w różnych odcinkach układu oddechowego. Tendencja jest taka, że te największe osadzają się najwyżej, głównie w nosie, gardle i tchawicy, natomiast te mniejsze trafiają głównie do oskrzeli, oskrzelików oraz do pęcherzyków płucnych. Ekspozycja poszczególnych odcinków układu oddechowego na PM może prowadzić, i niestety zazwyczaj prowadzi, do nasilenia się negatywnych objawów takich jak kaszel, podrażnienie dróg oddechowych czy też nasilenia objawów astmy. Długotrwała ekspozycja na PM może powodować dalej idące niekorzystne dla zdrowia konsekwencje, jak uszkodzenia organów układu oddechowego, rozwoju miażdżycy, zawałów serca czy nawet uszkodzeń wielonarządowych. Istotnym celem cząstek PM, ale też pierwszą ważną barierą chroniącą przed ich działaniem są komórki nabłonka oddechowego. Po ekspozycji na PM są one narażone na zaburzenia gospodarki jonowej, stres oksydacyjny, co w konsekwencji prowadzić może do rozwinęcia stanu zapalnego i uszkodzeń komórek. W samych komórkach najbardziej narażone na stres oksydacyjny są mitochondria. I właśnie mitochondrialne kanały potasowe o dużym przewodnictwie aktywowane przez wapń (BK_{CA}) oraz ich potencjalna rola w fizjologii i przy uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez PM, jak i modulowanie ich aktywności przez wybrane związki biologicznie czynne stanowią główne cele badań przedstawionych w niniejszym opracowaniu. Prezentowana rozprawa doktorska ma typowy układ dla tego rodzaju publikacji. Składa się z następujących głównych działów: „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Spis publikacji naukowych i wskaźniki naukometryczne” i „Bibliografia”. Całość poprzedzona jest „Streszczeniem” w języku polskim i angielskim oraz „Indeksem skrótów” – niezwykle pomocnym w trakcie czytania pracy. Praca zajmuje 162 strony formatu A4.

Liczący 40 stron „Wstęp” podzielony jest na 5 głównych działów, które z kolei podzielone są na szczegółowe podrozdziały. W pierwszej części szczegółowo zostały opisane PM, ich charakterystyka i wpływ na układ oddechowy człowieka, oraz wywoływane przez nie uszkodzenia komórek. Następnie Autorka szczegółowo opisuje budowę i funkcję nabłonka oddechowego, po czym płynnie przechodzi do szczegółowego opisu mitochondriów, ich budowy i funkcji, oraz ich uszkodzeń powodowanych przez PM. Następnie znajdujemy w pracy szczegółowo opisane kanały jonowe ze szczególnym uwzględnieniem BK_{CA}. Bardzo ciekawym podrozdziałem tej części pracy jest „Cytoprotekcja”, w którym Doktorantka opisuje różne klasy związków pochodzenia naturalnego posiadające zdolności ochrony komórek przed różnymi czynnikami, a szczególnie skutkami stresu oksydacyjnego. Nie mniej jednak Autorka skupiła się na bardzo szczegółowym opisie naturalnie występujących w różnych roślinach polifenoli: kwercetyny i izoramnetyny. Te dwa związki, które mają zbliżoną strukturę chemiczną, od lat znane są ze swej aktywności biologicznej, której rezultatem jest redukcja stanów zapalnych poprzez, między innymi, ich działanie antyoksydacyjne. Ostatnim akcentem „Wstępu” jest opis roli kanału mitoBK_{CA} w potencjalnej cytoprotekcji różnych typów komórek. W mojej ocenie całość tego

interesującego rozdziału napisana jest szczegółowo, a przy tym w sposób przystępny i jasny nakreśla aktualną problematykę badawczą oraz podstawy do rozwiązania niektórych wątków badawczych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

„Cel pracy” – kolejny dział tej dysertacji doktorskiej - zawiera hipotezy badawcze oraz ogólny, a potem niezwykle szczegółowy opis przedsięwzięć badawczych mających na celu weryfikację postawionych hipotez. Co prawda, pierwsza z hipotez mówiąca o ważnej roli kanału BK_{CA} w fizjologii komórek nabłonka oddechowego jest szeroka i dość lakoniczna. Druga część hipotezy badawczej jest już bardziej precyzyjna. Nie mniej jednak w powiązaniu z opisem ogólnym, a potem bardzo szczegółowym poszczególnych celów częściowych, sytuacja zostaje w pełni wyjaśniona i czytelnik dokładnie i precyzyjnie zostaje poinformowany o celach podjętych badań.

17 stronicowy dział **„Materiały i metody”** zawiera bardzo szczegółowy opis zastosowanych w badaniach materiałów, instrumentów oraz metod badawczych. Niezwykle pomocna w ich ocenie jest zawarta dokumentacja fotograficzna i graficzna, która pozwala na precyzyjny ogląd zastosowanych metod. Nie ulega wątpliwości, że ten szczegółowy opis jest na tyle precyzyjny, że możliwy do powtórzenia w innych specjalistycznych laboratoriach badawczych. Jedyne wątpliwości może mieć czytelnik po przeczytaniu podrozdziału „Analiza statystyczna”, w której jest dość mało precyzyjny opis metodyki mówiący o zastosowaniu jednoczynnikowej statystyki ANOVA dla grup o różnej wariancji. Stąd prosty wniosek, że zastosowana została statystyka nieparametryczna. Pytanie: dokładnie jaka i jakie testy Post-Hoc zostały wykorzystane do tych analiz?

„Wyniki” to najbardziej obszerny, 42 stronicowy rozdział niniejszej pracy. Przedstawione są w kolejności postawionych szczegółowych celów częściowych tej dysertacji w rozdziale „Cel pracy”. Stanowi to bardzo logiczne rozwiązanie, ponieważ czytelnik może zestawiać każdy częściowy cel pracy oraz wyniki weryfikujące jego osiągnięcie. Nie mniej jednak, początkowo dla biofizyka mogłoby wydawać się szalenie nielogiczne dlaczego Autorka zaczyna od bardzo szczegółowych i precyzyjnych badań nie znając ich skutku końcowego – wpływu na żywotność badanych komórek. Ale ta wątpliwość została rozwiana na stronie 108 pracy, gdzie Autorka wyjaśniła, że właśnie na początku swoich badań w ramach przygotowania pracy doktorskiej przeprowadziła testy żywotności komórek, które były podstawą podjęcia kolejnych szczegółowych badań biofizycznych. Dlatego też najpierw zostały przedstawione wyniki wpływu wybranych inhibitorów i blokerów kanału BK_{CA} w komórkach nabłonka oskrzelowego linii HBE WT. Wyniki wskazują też na wpływ dwóch wybranych i podobnych strukturalnie polifenoli, kwercetyny i izoramnetyny, na aktywność tych kanałów. Okazało się, że pierwszy z nich jest aktywatorem mitoBK_{CA}, natomiast drugi związek nie ma wpływu na aktywność tych kanałów. Wyniki kolejnego cyklu eksperymentów wskazują, że kwercetyna wzmacnia zużycie tlenu przez komórki linii HBE WT, natomiast nie zauważono takiego wpływu podobnej strukturalnie izoramnetyny. Zastosowanie kontroli z syntetycznym aktywatorem mitoBK_{CA} (NS11021) potwierdziło prawidłową interpretację

uzyskanych wyników. Następne przedstawione wyniki wskazały bezsprzecznie na rolę kwercetyny w depolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej w przeciwieństwie do izoramnetyny. Potwierdziło to po raz kolejny rolę kwercetyny w aktywacji mitoBK_{CA}. Kolejnym etapem pracy było sprawdzenia wpływu cząstek PM na komórki nabłonka oddechowego. W tym celu Doktorantka wybrała cząstki o średnicy ok. 4 μ m. Eksperymentalnie dobrany też został 24h czas ekspozycji komórek na PM. Po tym czasie ekspozycji okazało się, że PM obniżają poziom oddychania komórek HBE WT o ponad 60%. Kwercetyna o stężeniu 1 i 3 μ M nie powodowała odwrócenia tego zjawiska. Autorka próbowała też zastosować kwercetynę o wyższym stężeniu ale bez oczekiwanych rezultatów. Prosiłbym o więcej szczegółów dotyczących niepowodzenia przy zastosowaniu 10 μ M kwercetyny. Kolejnym etapem badań było sprawdzenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach oraz mitochondriach po ekspozycji na PM. Okazało się, że PM wpływają na generowanie wyższego stężenia RFT w komórkach linii HBE WT. Kwercetyna i izoramnetyna natomiast działają antyoksydacyjnie na poziomie komórkowym, natomiast jedynie kwercetyna obniża poziom RFT w mitochondriach. Te odkrycia dokonane przez Doktorantkę zapewne skłoniły ją do rozszerzenia swoich badań na poziom tkanki. Wykorzystując pomiary przelnastonkowego oporu elektrycznego (TEER) wykazała, że kwercetyna w przeciwieństwie do izoramnetyny zwiększa poziom TEER, a co za tym idzie szczelność monowarstwy komórek nabłonka oddechowego. Co więcej, stosując syntetyczny aktywator kanału mitoBK_{CA} (NS11021) oraz jego inhibitor (penitrem A) w inteligentnie dobranych sekwencjach dodawania badanych substancji bezsprzecznie wykazała, że właśnie kanały mitoBK_{CA} są odpowiedzialne za uszczelnienie nabłonka oddechowego w wyniku ich aktywacji przez kwercetynę.

W celu potwierdzenia istotnej roli kanałów mitoBK_{CA} w ochronie komórek nabłonka oskrzelowego przed uszkodzeniami wywołanymi przez PM Doktorantka przeprowadziła lustrzany cykl doświadczeń opisanych wcześniej na komórkach linii HBE WT wykorzystując nowo opracowaną linię komórek nabłonka oddechowego HBE $\Delta\alpha$ BK pozbawionych kanałów mitoBK_{CA}. Autorka wykonała serię eksperymentów, których wyniki jednoznacznie wskazały na brak kanałów mitoBK_{CA} w błonie plazmatycznej oraz wewnętrznej mitochondrialnej komórek linii HBE $\Delta\alpha$ BK, natomiast ciekawym spostrzeżeniem było zarejestrowanie „dużych prądów o niskiej kinetyce” w ok 7% analizowanych mitoplastów. Te badania nie były jednak kontynuowane. Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego odstąpiła od dalszych badań tego fenomenu i w jaki sposób może zinterpretować zaobserwowane zmiany w przypadku mitoplastów. Kolejne wyniki wskazały jednak, że analizowane komórki linii HBE $\Delta\alpha$ BK nie zużywają więcej tlenu nawet jeśli stosuje się kwercetynę w szerokim zakresie stężeń lub syntetyczny aktywator kanałów mitoBK_{CA} – NS11021. Bardzo ciekawe są natomiast analizy całkowitego poziomu RFT w komórkach linii HBE $\Delta\alpha$ BK. Okazało się, że zarówno kwercetyna jak i izoramnetyna nieznacznie obniżają poziom RTF w tych komórkach, co wskazuje na istnienie innego mechanizmu aktywności antyoksydacyjnej tych związków niezwiązanego z kanałami mitoBK_{CA}. Obydwa

analizowane polifenole wykazały również aktywność antyoksydacyjną manifestującą się obniżeniem mitochondrialnego poziomu RFT wywołanego przez PM, zarówno w komórkach linii HBE WT, jak i HBE $\Delta\alpha$ BK. To również potwierdzałoby inny, alternatywny mechanizm ich aktywności antyoksydacyjnej. Badania dotyczące przeżywalności komórek w obecności PM i wpływu badanych polifenoli na różne istotne parametry życiowe komórek obu testowanych linii było ostatnim etapem prezentacji uzyskanych wyników. Doktorantka wykazała w teście apoptoza – nekroza, że kwercetyna wpływa na obniżenie poziomu apoptozy spowodowanej przez PM w komórkach HBE WT. Nie znalazłem jednak wyników podobnego eksperymentu dla linii HBE $\Delta\alpha$ BK. Dlaczego? Autorka wykonała natomiast taką analizę badając poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w obydwu liniach komórkowych, która nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic. W teście przeżywalności mierzonej za pomocą barwienia Trypan Blue wpływ kwercetyny na obniżenie aktywności oksydacyjnej wywołanej przez PM był zauważalny, ale nieistotny statystycznie. Nie zaobserwowano natomiast takich właściwości antyoksydacyjnych izoramnetyny w tym teście. Pomiary elektrycznego oporu przez nabłonkowy (TEER) wykazały różnicę pomiędzy badanymi liniami komórkowymi na korzyść linii HBE WT, co wskazuje na istotność kanałów mitoBK_{CA} w utrzymaniu „szczelności” nabłonka oddechowego. Istotność tych kanałów dla utrzymania poziomu oddychania komórkowego wykazała Autorka porównując wyniki obu linii komórkowych. Na to zjawisko wpływu nie miał mierzony potencjał błony mitochondrialnej, natomiast spore różnice Autorka wykazała w pomiarach aktywności kompleksu IV łańcucha oddechowego na korzyść komórek linii HBE WT. Następnie Doktorantka udowodniła doświadczalnie, że na poziom oddychania komórkowego nie wpływa różnica w liczbie mitochondriów – w komórkach obydwu linii była porównywalna. Istotne różnice zauważyła jednak w poziomie białek kompleksów łańcucha oddechowego, co mogłoby wskazywać na wyższy poziom oddychania komórkowego w komórkach linii HBE WT w porównaniu do linii HBE $\Delta\alpha$ BK z delecją kanałów jonowych.

Przedstawione wyniki tej dysertacji doktorskiej wskazują na wysoką jakość badań naukowych prowadzonych w grupie prof. dr hab. Piotra Bednarczyka. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością różnych technik badawczych, poczynając od typowych dla biofizyki kanałów jonowych a kończąc na testach typowych w badaniach z zakresu biologii molekularnej. To wskazuje na interdyscyplinarność prowadzonych studiów. Eksperymenty zostały zaprojektowane bardzo inteligentnie a przedstawione tutaj wyniki nie budzą żadnych wątpliwości. Jednakże piszący te słowa widziałby nieco inny układ tej części pracy jako bardziej logiczny w postaci zestawienia wyników dla badanej linii komórek nabłonka oskrzelowego HBE WT z wynikami dla linii HBE $\Delta\alpha$ BK. Myślę, że dla czytelnika takie zestawienie byłoby korzystniejsze dla zrozumienia trudnej problematyki badawczej, której podjęła się Doktorantka.

Kolejnym etapem analizowanej dysertacji doktorskiej jest **Dyskusja**. Autorka pracy zestawia uzyskane wyniki z dostępną literaturą światową, podkreśla dokonane przez siebie odkrycia naukowe ale też bardzo krytycznie analizuje swoje wyniki. Świadczy to o sporej dojrzałości naukowej Doktorantki. I o ile zestawienie wyników pracy z literaturą nie budzi żadnych moich wątpliwości, o tyle mam niedosyt w kwestii analizy wpływu PM na komórki nabłonka oddechowego i roli badanych polifenoli. Rozumiem, że Autorka nie chciała ulec pokusie możliwej nadinterpretacji swoich wyników, jednak oczekiwałbym nieco głębszych rozważań hipotetycznych. One w pełni mogłyby pokazać potencjał niniejszej pracy. Dlatego prosiłbym aby Autorka dokonała takiej hipotetycznej analizy roli badanych polifenoli na niekorzystne skutki działania PM. Prosiłbym o wskazanie możliwych mechanizmów wpływu kwercetyny i izoramnetyny na obniżenie bezsprzecznie negatywnego wpływu PM na nabłonek oddechowy oraz ewentualną aplikacyjność przeprowadzonych badań.

Podsumowaniem ocenianej pracy są **Wnioski**. Zaprezentowane są w nich odpowiedzi na szczegółowo przedstawione cele pracy. To ułatwia recenzentowi sprawdzenie weryfikacji postawionych celów studiów, co przyznaję, Autorka uzyskała w 100%.

Następnie Doktorantka przedstawiła **Spis publikacji naukowych i wskaźniki naukometryczne**. Wykazała tam, że jest autorką 4 wieloautorskich prac o zasięgu międzynarodowym. W jednej z tych prac pełni funkcję pierwszego autora. Szkoda tylko, że nie przedstawiła szczegółowo swojego udziału w poszczególnych publikacjach naukowych. Doktorantka wykazała również swoją aktywność w uczestnictwie na konferencjach, kursach i szkoleniach, oraz seminariach. Świadczy to u dużym zaangażowaniu na tym etapie pracy naukowej.

Bibliografia zawiera niemal 270 pozycji literaturowych. Świadczy to o bardzo dobrej znajomości literatury z dziedziny prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska stoi na bardzo wysokim poziomie naukowym. Opis wszystkich doświadczeń, wyników, które złożyły się na nowe odkrycia naukowe jest rzetelny. Ich interpretacja jak najbardziej właściwa, choć brakuje nieco spekulacji naukowej. Nie obniża to jednak w żaden sposób poziomu naukowego niniejszej pracy.

Dlatego też stwierdzam że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymogi, zarówno art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 z późniejszymi zmianami), jak również wymogi zwyczajowe stawiane tego rodzaju opracowaniom. Wniosuję do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Dąbrowskiej-Hulki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

