



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 24 października 2023 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Olgi Krzysztyńskiej-Kulety
pt. „Wpływ promieniowania widzialnego na zależną od melanopsyny
odpowieź komórkową”**

W kategoriach paradoksu oceniać można obecny stan naszej aktywności naukowej, w którym prowadzone są już badania nad konstrukcją sztucznej, bionicznej siatkówki dla osób niewidzących, a jednocześnie nasza wiedza dotycząca właściwości funkcjonalnych naturalnej siatkówki oka człowieka jest dalece niepełna. Wiele obszarów tej niepewności łączy się z molekularnym szlakiem transdukcji sygnału po absorpcji światła przez melanopsynę, fotoreceptor wrażliwy na światło niebieskie, zlokalizowany w warstwie komórek zwojowych, w znacznym oddaleniu od jednolitej warstwy czopków i pręcików, podstawowych fotoreceptorów aparatu widzenia człowieka. Pewnym usprawiedliwieniem może być tu fakt, iż fotoreceptory melanopsynowe odkryte zostały stosunkowo niedawno, bo pod koniec XX w. i wiedza o nich oraz mechanizmach molekularnych bezpośrednio związanych z ich

funkcjonowaniem stanowi ciągle otwarte wyzwanie poznawcze. Tej właśnie tematyki dotyczy bezpośrednio praca doktorska pani mgr Olgi Krzyszyńskiej-Kulety, wobec czego oceniam ją nie tylko jako aktualną i interesującą, ale również bardzo ważną. Znaczenie prowadzonych badań wynika również z faktu, iż postuluje się, że melanopsyna jest fotoreceptorem odpowiedzialnym za regulację rytmu okołodobowego człowieka.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem pana prof. dra hab. Tadeusza Sarny. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 116 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o prosty i przejrzysty układ. Po podziękowaniach, spisie treści oraz obszernym wykazie skrótów, zamieszczone zostały nacechowane wyjątkowym ładunkiem „informatywności” streszczenia zredagowane w językach polskim oraz angielskim. Cztery pierwsze rozdziały zredagowane zostały na zasadzie przeglądu literaturowego wprowadzającego czytelnika w zagadnienia związane bezpośrednio z budową oka ludzkiego, ze szczególnym uwzględnieniem siatkówki (rozdział 1.), budową białek fotoreceptorowych (rozdział 2.), zależnościami pomiędzy fotoreceptorami (rozdział 3.) oraz związane ze światłem, w aspektach zarówno fizycznych jak i fizjologiczno-funkcjonalnych (rozdział 4.). Cele pracy doktorskiej, zarówno ten strategiczny jak i cele cząstkowe, sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału 5. Według koncepcji projektu doktorskiego, naczelnym oczekiwanym rezultatem było poznanie właściwości oraz szlaku molekularnego transdukcji sygnału ludzkiej melanopsyny w układzie modelowym *in vitro*, opierającym się na ludzkich komórkach HEK293 z ekspresją białka fotoreceptora. Wobec faktu, iż nieznana pozostaje struktura krystalograficzna melanopsyny, zaś jej znikome ilości w układach naturalnych uniemożliwiają prowadzenie bezpośrednich badań oraz izolacji, podzielam w pełni zdanie Doktorantki, iż zastosowane podejście jest co najmniej bardzo obiecujące. W ramach rozdziału 6. pt. „Materiały i metody” przedstawione zostały szczegóły prowadzonych badań eksperymentalnych, w zgodzie ze standardami obowiązującymi w tego typu

opracowaniach. Rozdział 7. pt. „Wyniki” zredagowany został w oparciu o podstrukturę odpowiadającą kolejnym zadaniom badawczym projektu doktorskiego. Były to, między innymi, badania wpływu promieniowania elektromagnetycznego o różnej długości fali na przeżywalność komórek, odpowiedź na poziomie diacylogliceroli, wpływ na poziom ekspresji mRNA i białek dla melanopsyny, białka FOS oraz izoform fosfolipazy C i kinazy białkowej C potencjalnie zaangażowanych w szlaku przekazywania sygnału molekularnego po fotoaktywacji melanopsyny. Wyniki omawiane były bezpośrednio w miejscu ich prezentacji oraz poddane wieloaspektowej dyskusji, w kontekście dotychczasowej wiedzy, w ramach rozdziału 8. pt. „Dyskusja”. Główne, według Doktorantki, osiągnięcia pracy zestawione zostały w ramach krótkiego rozdziału 9. pt. „Wnioski”. W mojej opinii, wśród tych rezultatów niezmiernie cenne jest określenie widma czynnościowego aktywności melanopsyny ludzkiej w oparciu o wiele parametrów fizjologicznych i wskaźników, włączając poziom ekspresji mRNA, poziom melanopsyny oraz markerowego białka FOS. Okazuje się, iż ludzka melanopsyna wykazuje szczytową aktywność przy ekspozycji na światło niebieskie o długości 485 nm i widmo czynnościowe w sposób bardzo ostry maleje przy przejściu do obszaru bardziej długofalowego. Bardzo interesujące są również, w mojej opinii, wyniki wskazujące na fototoksyczność melanopsyny, w szczególności w odpowiedzi na stosunkowo długą ekspozycję na światło niebieskie. Większość z nas pracujących przy komputerach bądź wpatrzonych w ekrany telefonów komórkowych stwarza właśnie doskonałe warunki do takiej długotrwałej ekspozycji. Rozprawę zamyka zestawienie 163. pozycji cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału 10. pt. „Spis literatury”.

Ocena formalnej strony rozprawy prowadzi do wniosku, iż analizowana praca doktorska jest opracowaniem przygotowanym z należytą dbałością o precyzję sformułowań, staranną edycję tekstu oraz szatę graficzną. Sugerowałbym jedynie Autorce w Jej przyszłej aktywności, aby opisy szczegółowe w ramach bardzo estetycznych grafik przedstawiane były większym rozmiarem czcionki, tak aby można je było przeczytać bez dodatkowego stosowania lupy. Wyjątek stanowi tu Ryc. 2 na str. 55 gdzie opisy zamieszczone zostały, w moim odczuciu, w sposób umożliwiający

wygodną analizę obrazów. Z początku, trochę mylący wydawał mi się zabieg, w ramach którego wprowadzono dwie numeracje grafik: osobną dla rysunków i osobną dla tzw. rycin. Poza powyższymi uwagami, mógłbym zaproponować Doktorantce stosunkowo niewiele innych drobnych korekt tekstu. Oto ich krótka lista:

1. Str. 7., 9. wiersz od dołu: „natomiastna na” proponuję zamienić na „natomiast na”
2. Str. 7., 6. wiersz od dołu: „naświelana” w miejsce „naświtlana”
3. Str. 37, Rys. 4.: W opisie osi rzędnych widma (Absorbancja) można usunąć jednostki
4. Str. 38., 6. Wiersz od góry: jednostki molowego współczynnika ekstynkcji powinny być $M^{-1}cm^{-1}$ zamiast mol^{-1}/cm^{-1}
5. Opisy osi rzędnych w wielu prezentowanych wynikach badań fluorescencji (np. na str. 70, 73, 74, 83, 89) powinny brzmieć „Intensywność fluorescencji” raczej niż „Fluorescencja”, w myśl zasady: wielkości fizyczne nie zjawiska”.

Tak interesujące oraz nacechowane elementami nowatorskimi opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Olgi Krzysztyńskiej-Kulety, ożywia również ciekawość poznawczą. Przejawem tego są sformułowane poniżej pytania:

1. Bardzo interesującą jest, w moim odczuciu, obserwacja raportowana w rozprawie, zgodnie z którą melanopsyna wykazuje pewną fototoksyczność w stosunku do komórek. Spodziewać by się można, iż chromofor retinalu związany ze środowiskiem białkowym opsyny wykorzystywał będzie energię wzbudzenia elektronowego na rekonfigurację molekularną z formy 11-*cis* na całkowicie-*trans*, bądź rozpraszał energię na sposób termiczny przekazując ją do otoczenia białkowego. Możliwe wydaje się również, że pewna frakcja cząsteczek retinalu opuszcza środowisko białkowe, wówczas pochłaniając promieniowane niebieskie pełnił może rolę fotouczulacza. Obie frakcje

barwników, związana oraz niezwiązana z opsyną, powinny charakteryzować się nieco innymi widmami. Zastanawiam się czy wykonywane analizy widm czynnościowych, prowadzone z różnymi intensywnościami światła o odpowiedniej długości fali, nie wykazałyby różnic widmowych diagnostycznych dla różnych puli bądź konfiguracji molekularnej retinalu?

2. Ciekaw jestem czy było może prowadzone obrazowanie pojedynczych komórek HEK293 z ekspresją melanopsyny, z większą rozdzielczością, w oparciu o fluorescencję retinalu? Wydaje się, że badania tego typu mogłyby pokazać kompartmenty komórek, w których zlokalizowane są melanopsyny. Może informacje o lokalizacji fotouczulaczy pomogłyby zrozumieć obserwowaną wysoką wrażliwość komórek na światło niebieskie, szczególnie przy długotrwałej ekspozycji? Ciekaw jestem zdania Doktorantki na ten temat.
3. W komórkach zwojowych siatkówki człowieka, w których lokalizuje się preferencyjnie melanopsyna, obserwuje się pewną obecność barwników ksantofilowych, które pełnić mogą rolę naturalnych antyoksydantów, pomijając fakt, iż największe stężenie luteiny i zeaksantyny w siatkówce człowieka obserwuje się w centralnej części zewnętrznej warstwy spłotowatej. Ciekaw jestem czy w przypadku komórek HEK293 spodziewać się można obecności w błonach komórkowych podobnych bądź innych związków pełniących potencjalnie podobne funkcje antyoksydacyjne. Wydaje się, iż ich obecność bądź brak modulować może w sposób istotny odpowiedź fizjologiczną na stosowane światło niebieskie. Ciekaw jestem opinii Doktorantki na ten temat.

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Olga Krzyszyńska-Kuleta przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie oryginalnych wyników precyzyjnie zaprojektowanych oraz zrealizowanych w zgodzie z najwyższymi standardami badań eksperymentalnych. Doktorantka jest współautorką artykułów naukowych w międzynarodowych czasopismach specjalistycznych, dotyczących zarówno tematyki bezpośrednio związanej z projektem doktorskim jak i innych. Wskazuje to na Jej ścieżkę rozwoju, w ramach której doskonalila swój warsztat naukowy w ramach różnych projektów z obszaru biofizyki oraz biologii molekularnej.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Olgę Krzyszyńską-Kuletę rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych, interesujących oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164 poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Olgi Krzyszyńskiej-Kulety do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

