



KATEDRA  
BIOFIZYKI

Lublin, 30 października 2022 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Makucha  
pt. „Interkalacja wybranych ksantofili do błony lipidowej oraz ich lokalizacja  
w błonie – badania komputerowe”**

Karotenoidy, wśród nich polarne ksantofile, stanowią bardzo liczną klasę biomolekuł pełniących wiele ważnych funkcji fizjologicznych. Część z tych funkcji związanych jest bezpośrednio z własnościami fotochemicznymi oraz fotofizycznymi karotenoidów, jednakże wyniki badań wskazują również na ich znaczenie biologiczne w aspekcie stabilizacji struktury białek oraz błon lipidowych. Barwniki ksantofilowe wpływają na właściwości strukturalne oraz dynamiczne dwuwarstw lipidowych, zarówno w obszarze rdzenia hydrofobowego jak i w rejonie głów polarnych, tak więc organizacja molekularna ksantofili w środowisku membranowym, w szczególności lokalizacja oraz orientacja ich molekuł wydaje się mieć zasadnicze znaczenie w pełnieniu funkcji fizjologicznych cząsteczek karotenoidów w błonach biologicznych. Tym właśnie problemom poświęcona została praca doktorska pana mgr. Krzysztofa

Makucha, co czyni ją, moim zdaniem, nie tylko wysoce interesującą, ale również ważną.

Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem pani prof. Marty Pasenkiewicz-Gieruli, w Zakładzie Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, renomowanym ośrodku naukowym realizującym liczne projekty w obszarze biologii oraz chemii obliczeniowej. W ramach projektu doktorskiego zaprojektowano oraz przeprowadzono badania obliczeniowe, z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej (MD) oraz analizy parametrów energetycznych układów z zastosowaniem podejścia opartego na tzw. Umbrella Sampling (US) ksantofili w modelowych dwuwarstwach lipidowych. Wykorzystano również metody chemii kwantowej w celu wyznaczenia wybranych parametrów cząsteczek karotenoidów. Badania zogniskowane były na problemach dotyczących wbudowywania cząsteczek ksantofili do błon lipidowych z fazy wodnej oraz orientacji łańcuchów polienowych w dwuwarstwie. Wybór tych właśnie problemów poznawczych jako zasadniczego celu projektu doktorskiego postrzegam jako wyjątkowo celny oraz cenny. Z jednej strony, badane barwniki ksantofilowe, luteina i zeaksantyna, charakteryzują się stosunkowo zbliżoną strukturą. Z drugiej jednak strony, ksantofile te wykazują różną i wysoce specyficzną lokalizację w wielu układach i strukturach biologicznych, na przykład błonach tylakoidowych aparatu fotosyntetycznego oraz w siatkówce oka ludzkiego. Kontrowersję budzi również problem orientacji ksantofili w błonach, w szczególności w przypadku luteiny. Wyniki wielu badań eksperymentalnych prowadzonych w oparciu o technikę dichroizmu liniowego wskazują na możliwość organizacji błon lipidowo-ksantofilowych, w których luteina przybierać może orientację horyzontalną w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy, oprócz dominującej orientacji wertykalnej (między innymi Sujak i wsp., 1999). Możliwości takiej wydają się przeczyć wyniki badań obliczeniowych ogłoszone przez Landruma i wsp. (2010). Pogłębiona analiza przeprowadzona w ramach rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Makucha, opierająca się na wynikach uzyskanych

w ramach realizacji jego projektu doktorskiego nie tylko potwierdza konkluzje z przeprowadzonych eksperymentów, ale również wyjaśnia, dlaczego w literaturze dotyczącej bezpośrednio tego problemu pojawić się mogły pozorne sprzeczności. Okazuje się bowiem, że istotne znaczenie w kontekście konfiguracji molekularnej luteiny, w szczególności orientacji pierścieni końcowych w stosunku do łańcucha polienowego, ma środowisko błony lipidowej, w której to zanurzona cząsteczka barwnika ksantofilowego tworzy sieć wiązań wodorowych nie tylko z cząsteczkami wody, ale również grupami głów polarnych lipidów. Znaczny ładunek nowości naukowej oraz przedstawienie precyzyjnych determinantów molekularnych odpowiedzialnych za interkalację ksantofili do błony oraz orientację ksantofili w dwuwarstwach lipidowych czyni w moim odbiorze pracę doktorską pana mgr. Krzysztofa Makucha bardzo wartościową. Bardzo wysoko oceniam również przedstawioną rozprawę w aspekcie poprawności formalnej, jakości grafik oraz kunsztu edytorskiego. Praca doktorska zredagowana została w języku polskim, na 104 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o standardowy układ. Zarówno część wstępna, opierająca się na przeglądzie aktualnego piśmiennictwa, jak i część metodyczna, przybliżająca czytelnikowi stosowane techniki obliczeniowe, zredagowane zostały w zgodzie z najwyższymi standardami opracowań naukowych. Moim zdaniem, lektura tych rozdziałów może być polecana studentom i młodym adeptom nauki jako cenne uzupełnienie oraz aktualizacja wiedzy podręcznikowej. Jądro rozprawy stanowi rozdział 8. pt. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odpowiadającą kolejnym realizowanym zadaniom badawczym projektu doktorskiego. Przedstawione wyniki poddane zostały wieloaspektowej dyskusji, w ramach rozdziału 9. oraz podsumowane w ramach krótkiego rozdziału 10.

Tak ważne, wieloaspektowe oraz aktualne opracowanie naukowe, jakim jawi się rozprawa doktorska pana mgr. Krzysztofa Makucha, rozbudza ciekawość poznawczą, rodząc wiele pytań, których sformułowanie nie byłoby możliwe bez wiedzy

płynącej wprost z rezultatów uzyskanych w ramach pracy doktorskiej. Oto wybrane z nich.

1. W jednym z ostatnich projektów badawczych realizowanych w naszej grupie wykazaliśmy, że barwniki ksantofilowe luteina i zeaksantyna obecne w błonach lipidowych ulegają pod wpływem światła izomeryzacji z konfiguracji molekularnej *trans* do *cis* oraz odwrotnie. Jednocześnie pokazaliśmy, że formy *trans* przybierają preferencyjną orientację wertykalną w stosunku do błony w przeciwieństwie do cząsteczek w konfiguracji *cis*, które orientują się równolegle. Ciekaw jestem, czy zdaniem Doktoranta, proces re-izomeryzacji *cis-trans* w przypadku zeaksantyny prowadzi do natychmiastowej reorientacji w błonie podczas gdy w przypadku luteiny, pewna frakcja pozostawałaby zorientowana równolegle?
2. Jeśli mechanizm reorientacji ksantofili w środowisku błon lipidowych związanych z ich foto-izomeryzacją byłby taki jak zaproponowałem powyżej (różny dla luteiny i zeaksantyny) to czy mogłoby to tłumaczyć preferencyjną obecność zeaksantyny w plamce żółtej siatkówki oka człowieka, narażonej na największe intensywności światła i wymagającej wydajnego operowania mechanizmów regulacyjnych i fotoprotekcyjnych? Jak wiadomo proporcja luteiny i zeaksantyny w peryferyjnych rejonach siatkówki człowieka jest odwrócona w stosunku do tej obserwowanej w centralnych rejonach plamki żółtej.

### Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Krzysztof Makuch przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach

precyzyjnie zaprojektowanych oraz systematycznie prowadzonych prac obliczeniowych. Badania te wymagały nie tylko wiedzy i doświadczenia w obszarze dynamiki molekularnej i chemii kwantowej, ale również wiedzy i intuicji w obszarze biofizyki membran oraz stereochemii karotenoidów. Wyniki badań uzyskane w ramach realizacji projektu doktorskiego ogłoszone zostały równolegle w dwóch oryginalnych publikacjach naukowych, w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu.

Moim zdaniem, przedstawiona przez pana mgr. Krzysztofa Makucha rozprawa doktorska zawiera rozwiązania bardzo interesujących, aktualnych i ważnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej istotny postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie pana mgr. Krzysztofa Makucha do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.