

**Wrocław 10.11.2022**

**Prof. dr hab. inż. Marek Langner**

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Politechnika Wrocławska

ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-270 Wrocław

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Krzysztofa Makucha**

**pt. „Interkalacja wybranych ksantofili do błony lipidowej oraz ich lokalizacja w błonie – badania komputerowe”**

**napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Pasenkiewicz-Gieruli**

### **1. OPINIA OGÓLNA**

Wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej przygotowanej przez mgr. Krzysztofa Makucha zarówno pod względem merytorycznym jak zastosowanego warsztatu badawczego w formie koncepcyjnych modeli doświadczalnych oraz odpowiednio dobranych narzędzi numerycznych pokazują dobrą znajomość analizowanych zagadnień oraz umiejętność formułowania hipotez i wyciągania wniosków z uzyskanych wyników symulacji. Co jest ważne autor pokazuje, że ma świadomość, iż wyniki symulacji komputerowych powinny być konfrontowane z danymi doświadczalnymi. W swojej pracy autor dużą uwagę skupia na konfiguracji i dynamice wiązań wodorowych w obecności interkalujących ksantofili. W rezultacie zaprezentowana praca stanowi istotny przyczynek dla zrozumienia zjawisk zachodzących w interfazie, która jest stosunkowo mało poznanym, ale ważnym dla wielu procesów biologicznych, obszarem dwuwarstwy lipidowej.

### **2. OCENA MERYTORYCZNA**

#### **2.1. Znaczenie podjętej problematyki**

Bezpośrednim przedmiotem rozprawy jest analiza lokalizacji w modelowej dwuwarstwie lipidowej dwóch ksantofili (luteiny i zeaksantyny). Autor w opisie celu pracy wskazuje na ważny fakt, że te dwie strukturalnie podobne substancje hydrofobowe są różnie rozłożone w organizmie człowieka oraz że brak jest korelacji pomiędzy ilością tych substancji w pożywieniu a ich względnym stężeniem w tkankach. Pozornie kwestie te powinny być przedmiotem badań farmakokinetycznych, jednakże możliwe do zastosowania modele koncepcyjne oraz powszechnie stosowane modele doświadczalne są zaprojektowane raczej do egzogennych substancji, dla których nie ma dedykowanych mechanizmów transportu, orz charakteryzujące się tym, że względnie dobrze rozpuszczają w wodzie ( $\log P < 4$ ). Co więcej, ilościowe opisy farmakokinetyczne stosowane dla leków (substancji, które normalnie nie są

obecne w organizmie człowieka) opierają się głównie o transport bierny w poprzek błon biologicznych. Sytuacja jest zupełnie inna i o wiele bardziej złożona w przypadku substancji ważnych dla funkcjonowania organizmu, ale przez niego nie wytwarzanych (mikroelementy i witaminy). Dla takich substancji w organizmie istnieją procesy, którą zapewniają absorpcję z pożywienia oraz dystrybucję w organizmie. Często procesy te wspomagane są przez endogenne białka globularne czy transportery błonowe. Sytuację taką doskonale ilustrują „hydrofilowe” witaminy, takie jak konieczne dla życia witamina C czy witamina B<sub>12</sub>, których dystrybucja jest wspomagana transporterami SVCT w przypadku witaminy C czy czynnikiem wewnętrznym, haptokoryną oraz transkobalaminą w przypadku witaminy B<sub>12</sub>. Analiza biodystrybucji i absorpcji tych substancji wymaga zupełnie innego podejścia niż to stosowane dla substancji umiarkowanie hydrofobowych. W przypadku substancji silnie hydrofobowych ( $\log P > 5$ ), jak te analizowane w pracy czy witamina D<sub>3</sub>, sytuacja wygląda jeszcze inaczej. Molekuły takie nie mają zdolności pokonania bariery fazy wodnej. Brak rozpuszczalności takich substancji w wodzie powoduje, że są one w organizmie nieustannie zintegrowane ze strukturami błonowymi, gdzie także zlokalizowane są ich cele molekularne. Ich biodystrybucja jest możliwa tylko dzięki współdziałaniu nanostruktur (lipoprotein czy ciałek lipidowych), czasami tylko w procesie tym uczestniczą dedykowane białka surowicy. Transport substancji hydrofobowych w organizmie jest stosunkowo słabo opisany a ich dystrybucja i sortowanie w komórce wymaga uwzględnienia dynamiki błon endoplazmatycznych. Jednym z ważniejszych zagadnień wymagających wyjaśnienia jest wskazanie jakie są mechanizmy molekularne sortowania substancji hydrofobowych w komórce. Aby opisać mechanistycznie takie procesy konieczne jest poznanie zachowania się substancji hydrofobowych w środowisku dwuwarstwy lipidowej. Poznanie korelacji pomiędzy strukturą chemiczną substancji hydrofobowych a ich lokalizacją w dwuwarstwie lipidowej jest konieczne ale prawdopodobnie nie wystarczające, aby możliwe było opisanie dynamiki dystrybucji takich substancji w komórce. W trakcie takiej dystrybucji zarówno wewnątrz dwuwarstwy lipidowej jak i interfeza odgrywają ważną rolę. Zaprezentowane w pracy wyniki są cennym przyczynkiem w drodze do opisanego zachowania się substancji hydrofobowych w dwuwarstwie lipidowej oraz jakie znaczenie ma ich struktura chemiczna.

Innym związanym z tematem pracy zagadnieniem jest możliwość opisanego oddziaływania substancji pozornie hydrofilowych jak witamina C a dwuwarstwą lipidową oraz wytłumaczenie w jaki sposób substancje takie przenikają przez barierę dwuwarstwy lipidowej.

Możliwość charakteryzacji interfezy z punktu widzenia organizacji wody czy struktury i dynamiki wiązań wodorowych jest fundamentalna dla zrozumienia mechanizmów ukierunkowanej dystrybucji substancji hydrofobowych i pozornie hydrofilowych w komórce. Powiedziawszy to wszystko stwierdzam, że tematyka pracy doskonale wpisuje się i stanowi istotny wkład obszarów badań, które dotyczą do tej pory słabo opisanych procesów tj. jak dynamika i lokalizacja substancji silnie hydrofobowych w błonie.

### **2.3. Struktura rozprawy**

Rozprawa mgr. Krzysztofa Makucha liczy 104 strony. Rozprawa składa się ze Wstępu (17 stron), Metod (6 stron), Wyników (40 stron), Dyskusji z Podsumowaniem (9 stron), Bibliografii (119 pozycji) oraz kilka pomniejszych rozdziałów o charakterze pomocniczym.

We wstępie autor w sposób zadowalający opisuje znaczenie i rodzaj obowiązujących modeli błon biologicznych. Chociaż opis ten jest nie do końca kompletny. Zabrakło mi chociaż

pobieżnego przedstawienia zjawisk odpowiedzialnych za dystrybucję substancji hydrofobowych w komórce. Następnie szczegółowo i zgodnie ze sztuką autor opisuje lipidowy model doświadczalny błon biologicznych. W kolejnym logicznym kroku uzasadnia wybór błony lipidowej uformowanej z POPC, jak modelowego środowiska błonowego dla analizowanych substancji. Takie uproszczenie jest wystarczające, aby analizować procesy w obszarze interfazy. Następnie autor opisuje znaczenie biologiczne i systematykę karenoidów. W rozdziale tym można znaleźć skąpe informacje na temat ich biodystrybucji. Brak jest jednak odniesienia do mechanizmów transportu substancji hydrofobowych w organizmie. Pomimo, że jak pisałem wcześniej, wyniki prezentowanej pracy doktorskiej mogą mieć znaczenie dla zrozumienia tych procesów. Wstęp zakończony jest wzmianką na temat doniesień literaturowych dotyczących lokalizacji ksantofili w błonie literaturowej.

## **2.2. Metodyka badawcza**

Wszystkie badania zaprezentowane w pracy wykonano wykorzystując metody komputerowe, dobrane w taki sposób, aby można było analizować zarówno aspekty strukturalne jak i energetyczne badanych układów molekularnych. W celu przeprowadzenia analiz skonstruowano układy symulacyjne zgodnie z powszechnie uznanymi zasadami. Wyczerpująco opisano warunki symulacji i szczegółowo opisano doświadczenia symulacyjne zaplanowane tak aby można było zbadać zachowanie się luteiny i zeaksantyny w dwuwarstwie POPC, biorąc pod uwagę zarówno zmiany konformacyjne cząsteczki interkalującej jak i jej oddziaływania z cząsteczkami wody i lipidów. Ważnym aspektem pracy jest uwzględnienie dynamiki wszystkich elementów układu co pozwoliło na porównanie różnych sekwencji stanów energetycznych analizowanych procesów.

## **Wyniki**

Oddziaływanie luteiny i zeaksantyny analizowane były na podstawie doświadczeń numerycznych. Pierwsze i szeroko opisane doświadczenie polegało na analizie interkalacji cząsteczki do błony lipidowej. W wyniku tego doświadczenia opisano charakter i dynamikę wiązań wodorowych, dehydratację molekuly oraz wywołaną jej interkalacją reorganizację dwuwarstwy lipidowej. W doświadczeniach tym, zgodnie z wybraną metodologią, określano także lokalizację luteiny analizując nie tylko zaangażowane cząsteczki lipidowe, ale także wymuszone zmiany konformacyjne interkalującej molekuly. Określono także w jaki sposób otoczenie molekuly wpływa na jej konformację i energetykę. W tym celu porównano symulację zachowania się luteiny w próżni, wodzie i błonie POPC. W wyniku takiej analizy uzyskano energię swobodną interkalacji.

Wnikanie luteiny do dwuwarstwy lipidowej zostało przeanalizowane bardzo szczegółowo oddzielnie dla łącznika izoprenoidowego luteiny oraz dla obu jej pierścieni. Następnie porównano orientację luteiny i zeaksantyny w dwuwarstwie lipidowej analizując szczegółowo konformacje pierścieni i ich znaczenie dla lokalizacji każdej z molekuł w duwarstwie lipidowej.

Troszkę mnie drażni tytuł rozdziału 8.2.3.2 „Oddziaływania grup niepolarnych”. Ja rozumiem efekt hydrofobowy jako konsekwencję braku oddziaływania z wodą. Efekt hydrofobowy jest głównym czynnikiem powodującym, że dwuwarstwa lipidowa powstaje. Nie ma w tym przypadku konieczności istnieniach oddziaływań (jak już to większość z nich jest oddziaływaniami odpychającymi). Przedstawiony wykres pokazuje odległości, które nie muszą wskazywać na oddziaływania bezpośrednio pomiędzy analizowanymi molekułami. Podobnie

na stronie 76 autor używa mglistego pojęcia niekorzystnych oddziaływań wody, które to oddziaływania powodują wnikanie luteiny do błony.

Cennym elementem pracy jest zaproponowanie algorytmu do analizy czasów życia wiązań wodorowych oraz uzyskane przy jego pomocy analizy. Jednakże prezentowane na stronie 73 dopasowanie krzywych zaniku wiązań wodorowych funkcjami eksponencjalnymi nie nazywałbym modelem, ponieważ brak jest propozycji wyjaśnienia takiego dopasowania.

W rezultacie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano cechy strukturalne, które powodują, że luteina i zeaksantyna mogą różnie układać się dwuwarstwie lipidowej co może przyczyniać się do różnic w ich biodystrybucji. Jest to moim zdaniem wynik ważny.

W dyskusji autor omawia swoje wyniki w odniesieniu do danych doświadczalnych powołując się na publikację Grudziński i in. 2017. Ograniczenie się do tego cytowania nie jest korzystne dla jasności przekazu. Korzystne by było dodanie chociażby pobieżnej informacji dotyczącej cytowanego doświadczenia.

## **2.6. Język i formalna strona rozprawy**

Praca, pod względem edycyjnym, jest starannie i precyzyjnie napisana. Autorowi przytrafiły się tylko niewielkie potknięcia na przykład to, że Rozdział 5.8 i Rozdział 5.11 mają takie same tytuły.

Literatura wykorzystania do zilustrowania przedstawionych opisów jest dobrana w taki sposób, że wszystkie ważne dla pracy zagadnienia są wsparte stosownymi materiałami źródłowymi. Moim zdaniem ważne jest, że prezentowane badania przedstawione zostały w kontekście badań prowadzonych przez Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki co spowodowało, że polskie publikacje stanowią około 20% wszystkich cytowań.

## **2.7. Dodatkowe zapytania**

1) W rozdziale 5.11 na stronie 22 opisane jest wchłanianie i biodystrybucja karotenoidów u człowieka. Interesującą kwestią jest to jakie może być podłoże molekularne specyficzności luteiny do wybranych tkanek? Jest to odmienne zachowanie niż to ma miejsce w przypadku innych egzogennych substancji silnie hydrofobowych, które odkładają się głównie w tkance tłuszczowej.

2) Jaką wartość mają wyniki doświadczeń numerycznych, które nie mogą być przeprowadzone w rzeczywistych układach molekularnych? Chodzi głównie o interkalację hydrofobowych ksantofili z wody do błony lipidowej. Przecież substancje takie w wodzie się nie rozpuszczają.

## **Wniosek**

Przedstawione w recenzji uwagi i zapytania nie zmieniają mojej generalnie pozytywnej opinii o pracy. W mojej opinii przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska spełnia ustawowe kryteria (art. 13, ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późn. zm.) tj.:

– stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest proces wbudowywania się luteiny i zeaksantyny w dwuwarstwę lipidową przez co

- wykazuje ogólną wiedzę mgr. w dyscyplinie nauk biologicznych
- potwierdza umiejętność mgr. do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.

Do najważniejszych **walorów** recenzowanej rozprawy zaliczyć należy:

- ważność i aktualność podjętego tematu,
- bardzo dużą przejrzystość pracy oraz uporządkowany i spójny wywód naukowy,
- solidne ramy metodologiczne, w tym właściwy dobór metod badawczych i ich dokładny opis,
- przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych na poziomie nie odbiegającym od standardów światowych,
- umiejętność formułowania samodzielnych wniosków.

Reasumując, stwierdzam że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Makucha pt. **„Interkalacja wybranych ksantofili do błony lipidowej oraz ich lokalizacja w błonie – badania komputerowe”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w w/w ustawie i na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.



prof. dr hab. inż. Marek Langner