

Lublin, 10 września 2018 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Grzegorza Zająca**  
**pt. „Badania spektroskopowe chiralnych ksantofili oraz ich supramolekularnych**  
**agregatów”**

Barwniki karotenoidowe, włączając ksantofile, stanowią klasę związków naturalnych pełniących wiele istotnych funkcji biologicznych, wśród których ochrona przed destrukcją oksydacyjną cząsteczek oraz struktur występujących w żywych organizmach wydaje się najważniejsza, a przynajmniej przyciągająca szczególną uwagę środowiska naukowego. Wiele chorób nękających naszą cywilizację, łączy się z niedoborem karotenoidów w diecie, a co za tym idzie w organizmie, jako że na drodze ewolucji biologicznej człowiek utracił zdolność samodzielnej biosyntezy tych związków. Reprezentatywnym przykładem takiego przypadku jest związana z wiekiem degeneracja fotoreceptorów w plamce żółtej siatkówki oka (AMD, age-related macular degeneration, ang.), wykazano bowiem relację kauzatywną pomiędzy obniżonym poziomem luteiny oraz zeaksantyny a przypadkami występowania tego poważnego schorzenia. Okazuje się, iż nie tylko samo występowanie ale również formy organizacji molekularnej

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1  
20-031 Lublin  
tel. (81) 537 62 50  
fax (81) 537 61 91  
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



karotenoidów wpływają istotnie na pełnione przez nie funkcje fizjologiczne. Jak wykazują wyniki badań, kantaksantyna, barwnik karotenoidowy o strukturze podobnej do badanej w ramach pracy doktorskiej astaksantyny, przenika barierę krew-siatkówka formując agregaty cząsteczkowe odpowiedzialne za nieodwracalne uszkodzenia siatkówki i utratę wzroku. Zjawisko formowania supramolekularnych struktur ksantofilowych jest jednym z centralnych wyzwań badawczych podejmowanych w ramach rozprawy. Takie formy organizacyjne mogą mieć również istotny wpływ na aktywność biologiczną ksantofili w błonach biologicznych oraz funkcjonalnych kompleksach barwnikowo-białkowych, w tym również w aparacie fotosyntetycznym roślin. W świetle powyższych uwag, tematykę rozprawy doktorskiej postrzegam nie tylko jako aktualną oraz interesującą ale również bardzo ważną.

Praca doktorska mgr. Grzegorza Zająca wykonana została pod kierunkiem Pani Profesor Małgorzaty Barańskiej, w renomowanym Zespole Obrazowania Ramanowskiego, Zakładu Fizyki Chemicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 141 stronach standardowego maszynopisu, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. W ramach zwięzłego, półstronicowego rozdziału pierwszego sformułowane zostały cele pracy doktorskiej. Fakt, iż zwykle rozdział prezentujący zakładane cele redagowany jest w momencie ukończenia wszystkich badań, umożliwił przedstawienie zarówno celów początkowych jak i tych, które pojawiły się w trakcie procesu badawczego. Okazało się, że odkryty w trakcie prowadzonych badań efekt wzmocnienia rezonansowego sygnału ramanowskiej aktywności optycznej, przez agregację badanych chromoforów (AIRROA), a w zasadzie próba wyjaśnienia natury tego zjawiska, stanowić mogło ambitne, śmiałe oraz bardzo wartościowe wyzwanie badawcze. Po czyniących zadość wymaganiom formalnym streszczeniach, w języku polskim i angielskim, prezentowanym jako rozdziały 2. oraz 3., Autor zamieszcza wstęp teoretyczny, jako rozdział 4., mający charakter zestawienia zwięzłych przeglądów monograficznych odnoszących się do poszczególnych aspektów prowadzonych badań. Poszczególne podrozdziały tego rozdziału poświęcone zostały zarówno obiektowi badań czyli właściwościom strukturalnym oraz spektroskopowym ksantofili, w tym również w formie zagregowanej, jak i technikom badawczym, w szczególności stosunkowo mniej rozpowszechnionym wariantom spektroskopii ramanowskiej z zastosowaniem światła



spolaryzowanego kołowo. Z mojej perspektywy takie rozłożenie akcentów wydaje się szczególnie fortunate. Dodatkowo, w ramach rozdziału 4. Doktorant dokonał prezentacji i przeglądu stosowanych w ramach pracy metod obliczeniowych, w tym teorię funkcjonału gęstości (DFT), metody półempiryczne (Zindo/S) oraz podejście dynamiki molekularnej (MD). Użyte w trakcie wykonywania pracy doktorskiej materiały oraz zastosowane procedury, w tym syntezy oraz oczyszczania, opisane zostały w ramach rozdziału 5. pt. „Część eksperymentalna”. Rozdział ten zawiera, ponadto, szczegółową prezentację parametrów pomiarowych, co czyni praktycznie możliwym przeprowadzenie analogicznych badań spektroskopowych, oraz prezentację struktur modelowych astaksantyny, co bardzo ułatwia dalszą lekturę rozprawy w odniesieniu do badań obliczeniowych. Najważniejszym niewątpliwie rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej bardzo wysokim poziomie merytorycznym, jest w mojej ocenie rozdział 6. pt. „Wyniki i dyskusja”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą poszczególne zadania badawcze wykonywane w ramach projektu doktorskiego. W szczególności, zaprezentowane zostały badania oraz analiza wyników uzyskanych dla różnych form supramolekularnych astaksantyny, luteiny oraz dioctanu luteiny, z zastosowaniem elektronowej spektroskopii absorpcyjnej w obszarze UV-Vis, spektroskopii absorpcyjnej dichroizmu kołowego (CD) oraz spektroskopii ramanowskiej aktywności optycznej (ROA). Bardzo cennym uzupełnieniem badań eksperymentalnych okazało się ich skonfrontowanie z wynikami badań obliczeniowych modelowych układów agregatów astaksantyny, typu H oraz J. W ramach tych badań udało się odtworzyć jakościowo większość efektów spektroskopowych towarzyszących procesowi agregacji ksantofili w uwodnionych rozpuszczalnikach organicznych, potwierdzając tym samym poprawność interpretacji prezentowanych w ramach dyskusji wyników.

W pełni podzielam zdanie Doktoranta w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach rozdziału 7. pt. „Podsumowanie”. W moim odczuciu, szczególnie doniosły wynik łączy się z odkryciem wzmocnienia rezonansowej ramanowskiej aktywności optycznej, przy długości fali promieniowania laserowego odpowiadającego pasmu ekscytonowemu agregatów molekularnych ksantofili. Bardzo interesujący wydał mi się również wynik związany z „zapożyczeniem” aktywności optycznej przez cząsteczki rozpuszczalnika oddziałujące z chiralnymi strukturami supramolekularnymi.



Na podkreślenie zasługuje również klarowność języka rozprawy, precyzja sformułowań oraz jej bardzo wysoki poziom edytorski. Mógłbym zaproponować Autorowi dosłownie pojedyncze korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 9., 5. wiersz od dołu, raczej „geometrycznych” niż „geometrycznymi”
2. Str. 14., 4. oraz 5. wiersz od góry, „liczby” brzmi w tym wypadku nieco lepiej niż „ilości”
3. Str. 29., 6. wiersz od dołu, proponuję „od odpowiadających im widm ramanowskich” w miejsce „od odpowiadającym im widmom ramanowskim”
4. Str. 130., 4. wiersz od góry, „takich jak elektronowy” zamiast „takich elektronowy”
5. Str. 131., 11. wiersz od dołu, „przesunięcie położenia” w miejsce „przesunięcie położenie”.

Tak wieloaspektowe oraz obszernie opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską mgr. Grzegorza Zająca, dostarcza wielu ważnych i cennych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Spektakularny wręcz jawi mi się efekt, zaobserwowanej w czasie, spontanicznej zmiany skrętności struktur supramolekularnych typu H1 astaksantyny, uformowanych w mieszaninie DMSO i wody. Demonstruje się to odwróceniem znaku pasm na widmach ECD (Rys. 6.1.6, str. 64). Ciekaw jestem jakie mogą być mechanistyczne oraz energetyczne determinanty tego mechanizmu? Chciałbym ośmielić Doktoranta do spekulacji na ten temat. Ciekawe jest również, dlaczego podobne zmiany nie są obserwowane w przypadku struktur zagregowanych typu H2 tego samego karotenoidu?
2. Występowanie silnego tła pochodzenia fluorescencyjnego stanowi w przypadku rezonansowej spektroskopii ramanowskiej podobną uciążliwość jak pojawianie się intensywnych linii rozpraszania Ramana w przypadku spektroskopii fluorescencyjnej. Ciekawym wydaje mi się efekt selektywnego wpływu agregacji ksantofili na obniżanie poziomu fluorescencji: W przypadku astaksantyny, efekt ten zaobserwowano w przypadku agregatów typu J oraz H2 ale nie struktur



supramolekularnych typu H1 (str. 74, str. 76). Ciekaw jestem jakie mogą być bezpośrednie powody tej interesującej obserwacji?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Grzegorz Zając przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz komplementarnych badań obliczeniowych. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w pięciu artykułach opublikowanych w czasopiśmie specjalistycznym o międzynarodowym zasięgu. Ponadto, Doktorant doskonalił swój warsztat naukowy uczestnicząc w innych projektach badawczych, których wyniki stały się podstawą kolejnych sześciu artykułów. Erudycja, jaką wykazał się mgr Grzegorz Zając przy redagowaniu swojej rozprawy doktorskiej wydaje się w pełni zrozumiałą, uwzględniając fakt, iż jest On współautorem kilku artykułów przeglądowych w wydawnictwach monograficznych (trzy prace).

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Grzegorza Zająca spełnia w pełni warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś bardzo wysoki poziom merytoryczny i ranga odkrywcza uzyskanych wyników pozwalają mi sądzić o tej pracy doktorskiej jako o wyróżniającej. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Grzegorza Zająca do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Jednocześnie, uprzejmie proszę o rozważenie mojego wniosku o uznanie przedstawionej pracy doktorskiej jako wyróżniająca.