



ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 21 listopada 2016 r.

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Augustyńskiej pt. „The influence of selected carotenoids on mesomorphic phase behaviour of model membranes”**

Dwuwarstwy lipidowe stanowią szczególną formę organizacji supramolekularnej, która odgrywa fundamentalną rolę w żywych organizmach, stanowiąc podstawę błon oddzielających żywe komórki od środowiska zewnętrznego. Membrany lipidowe są również zasadniczym elementem strukturalnym, konstytuującym istotne z punktu widzenia funkcjonowania żywych organizmów organelle oraz kompartmenty subkomórkowe. Istotnym czynnikiem wpływającym na własności strukturalne oraz dynamiczne lipidów w membranach stanowi obecność w nich komponentów białkowych. Z drugiej jednak strony, natura wypracowała na drodze ewolucji biologicznej szereg innych mechanizmów modułujących własności fizyczne błon. Wśród mechanizmów tych poczesne miejsce zajmuje synteza cząsteczek, które lokalizując się w membranach w sposób znaczący modyfikują ich własności fizyczne. Do klasy tych związków zaliczyć możemy sterole ale również karotenoidy, obecne zarówno w błonach biologicznych organizmów prokariotycznych, roślinnych jak i zwierzęcych. Niezwykle interesującemu oraz ważnemu, moim zdaniem, problemowi wpływu karotenoidów na własności fizyczne dwuwarstw lipidowych poświęcona została rozprawa doktorska pani mgr Dominiki Augustyńskiej.

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



Praca doktorska mgr. Dominiki Augustyńskiej wykonana została pod kierunkiem prof. Kazimierza Strzałki, światowego eksperta w obszarze związanym z badaniami karotenoidów, przy współdziałaniu dr Małgorzaty Jemioły-Rzemińskiej, w charakterze promotora pomocniczego. Prace badawcze związane z realizacją projektu doktorskiego realizowane były zarówno na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego jak i na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku angielskim, na 104 stronach maszynopisu, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. W części wstępnej (Introduction), prezentowanej jako rozdział 1., Autorka wprowadza czytelnika w podstawowe zagadnienia związane ze strukturą oraz funkcją biomembran (podrozdział 1.1) oraz właściwościami barwników karotenoidowych (podrozdział 1.2). Jako odrębny podrozdział tej części wstępnej (1.3), przedstawione zostały motywacje, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań oraz sformułowane zostały szczegółowe cele projektu doktorskiego. W ramach rozdziału 2. zaprezentowane zostały, w sposób szczegółowy, zastosowane materiały laboratoryjne, wykorzystana aparatura pomiarowa oraz opisane procedury eksperymentalne związane z preparatyką próbek oraz prowadzonymi analizami. W mojej ocenie, precyzja zawartych w tej części rozprawy opisów umożliwia praktycznie odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów. W tej części swojej recenzji chciałbym wyrazić opinię, iż zaprojektowane oraz przeprowadzone przez Doktorantkę porównawcze badania z wykorzystaniem techniki mikrokalorymetrycznej (DSC), umożliwiającej wgląd we właściwości dynamiczne modelowych membran lipidowych, oraz z wykorzystaniem metody obrazowania oraz spektroskopii sił, w oparciu o mikroskopię sił atomowych (AFM), stwarzają unikalne możliwości analizy wpływu modyfikatorów z klasy karotenoidów na własności dynamiczne, strukturalne oraz mechaniczne dwuwarstw lipidowych. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej wysokim poziomie naukowym, jest prezentacja wyników eksperymentów, w ramach rozdziału 3. (Results). Podstruktura rozdziału tego odpowiada poszczególnym, realizowanym zadaniom badawczym. Podrozdział 3.1 zawiera opisy eksperymentów związanych z kalorymetrycznymi badaniami przejść fazowych w zawiesinie liposomów formowanych z syntetycznego lipidu dipalmitoylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz liposomów modyfikowanych obecnością w fazie lipidowej  $\beta$ -karotenu oraz zeaksantyny - polarnej pochodnej tego barwnika ( $\beta, \beta$ -karoten-3,3'-



diol). W części badań stosowana była jeszcze bardziej polarna pochodna  $\beta$ -karotenu, wiolaksantyna (5,6,5',6'-diepoksy-5,6,5',6'-tetrahydro- $\beta,\beta$ -karoten-3,3'-diol). Dobór barwników w tego typu badaniach wydaje się szczególnie istotny wobec faktu, iż to właśnie obecności grup polarnych przypisuje się rolę determinantów lokalizacji oraz orientacji karotenoidów w błonach. W kolejnych podrozdziałach zamieszczone zostały opisy eksperymentów przeprowadzonych z zastosowaniem techniki AFM, ukierunkowanych na analizy własności strukturalnych liposomów (3.2), zależności temperaturowych sił adhezji (3.3) oraz wpływu siły podchodzenia sondy AFM na jej adhezję do powierzchni liposomów. Dyskusja wyników zaprezentowana została w ramach rozdziału 4. zatytułowanego „Discussion”. W mojej ocenie, dyskusja wyników, choć zwięzła (zredagowana na 8. stronach maszynopisu), obejmuje wszelkie aspekty przeprowadzonych eksperymentów oraz odwołuje się do wszystkich ważniejszych uzyskanych wyników. Przeprowadzona została w oparciu o aktualną wiedzę dotyczącą modyfikacji właściwości strukturalnych oraz dynamicznych dwuwarstw lipidowych przez karotenoidy, reprezentowaną w bogatym, cytowanym w rozprawie piśmiennictwie (130 pozycji). Co więcej, nowe rezultaty uzyskane w ramach projektu doktorskiego istotnie poszerzają wiedzę w tym obszarze nauki. Fakt ten znajduje odzwierciedlenie w rozdziale 5., „Conclusions”, w ramach którego sformułowane zostały w formie punktów zasadnicze wnioski. W pełni podzielam zdanie Doktorantki co do wskazania najważniejszych rezultatów pracy doktorskiej, wyartykułowanych w ramach tego zestawienia. W mojej ocenie, na szczególne podkreślenie zasługują następujące wyniki:

1. Wykazanie, że obecność  $\beta$ -karotenu w fazie lipidowej sprzyja transformacji liposomów w planarne wielo-dwuwarstwy lipidowe na podłożu stałym.
2. Wykazanie, iż wszystkie badane karotenoidy, w szczególności zaś ksantofile, wpływają istotnie na modyfikację parametrów mechanicznych błon lipidowych, wzmacniając ich strukturę i podnosząc wytrzymałość na destrukcję mechaniczną.
3. Obserwacja, płynąca bezpośrednio z analiz zależności adhezji sondy AFM do powierzchni liposomów od siły podchodzenia, wskazująca na domenową kompozycję dwuwarstw lipidowych modyfikowanych karotenoidami.
4. Szczególnie interesująca obserwacja związana z występowaniem bifurkacji właściwości adhezyjnych powierzchni liposomów w warunkach zmiennej temperatury. Zjawisko to



zaobserwowane w przypadku membran formowanych z czystego lipidu, stawało się bardziej wyraziste w przypadku obecności  $\beta$ -karotenu w fazie lipidowej, jednakże nieomalże zanikało w obecności karotenoidów polarnych: zeaksantyny oraz wiolaksantyny. Wynik ten wskazuje na szczególny potencjał ksantofili w modyfikacji własności mechanicznych błon lipidowych, sugerując potencjalne, doniosłe znaczenie fizjologiczne.

Chciałbym również podkreślić wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorce nieliczne modyfikacje i korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 12, 42 oraz inne. Płynna faza ciekłokrystaliczna oznaczana jest jako  $L_{\alpha'}$  powinno zaś być  $L_{\alpha}$ . Indeks „prim” oznacza, iż łańcuchy acylowe zorientowane są w stosunku do osi normalnej do płaszczyzny błony pod pewnym kątem różnym od 0. Ma to miejsce w przypadku fazy  $L_{\beta'}$  oraz  $P_{\beta'}$  ale nie fazy  $L_{\alpha}$  w której łańcuchy acylowe wykonują ze znaczną częstością izomeryzacje *gauche-trans* oraz swobodnie rotują w pewnym stożku,
2. Str. 16, 20, 31: w miejsce określenia właściwości fizykochemicznych w języku angielskim „physical-chemical” proponuję częściej spotykane „physico-chemical”,
3. Siła oddziaływania, liczona na podstawie potencjału Lennarda-Jonesa, prezentowana w ramach Fig. 2.5 na str. 33, nie powinna przecinać osi rzędnych lecz przybliżać się do niej asymptotycznie,
4. Str. 78, 1. wiersz od góry, zamiast „influence the” proponuję „influence on the”.

Tak wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską Pani mgr Dominiki Augustyńskiej, przynosi wiele cennych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być sformułowane poniżej pytania.

1. Według Tabeli 3.1, w zgodzie z większością doniesień literaturowych, główne przejście fazowe błon formowanych z DPPC obserwuje się w temperaturze bliskiej 41 °C. Jednocześnie, termogram prezentowany w ramach Figure 3.1A wskazuje na zachodzenie tego przejścia fazowego w temperaturze bliskiej 42 °C. Czy wybrany został do pokazania przykład niereprezentatywny czy może wykres w górnym panelu przedstawiony został w innej skali temperatury?



2. Bardzo interesujące wydają mi się zależności siły adhezji od odległości sondy AFM od powierzchni liposomów, prezentowane w ramach Figure 3.9 (str. 54). Wyniki analiz wskazują jednoznacznie na wzrost wartości siły adhezji, który wiązać można z obecnością karotenoidów w fazie lipidowej, pomimo stosunkowo niskiego stężenia molowego modyfikatora (1 mol%). Sekwencja natężenia zaobserwowanego efektu wskazuje jednoznacznie na rolę grup polarnych przyłączonych do pierścieni końcowych cząsteczki karotenoidu. Jednocześnie, zauważyć można iż odległość utracenia kontaktu sondy z powierzchnią liposomu przy retrakcji jest największa w przypadku próbek zawierających  $\beta$ -karoten. Czy fakt ten, zdaniem Doktorantki, może być wykorzystany do przewidzenia lokalizacji oraz orientacji barwników w stosunku do fazy lipidowej?
3. Bardzo interesująca obserwacja łączy się również, moim zdaniem, z efektem wpływu karotenoidów na wielkość średniej siły adhezji (dyskutowana na str. 58 dysertacji). Okazuje się, że zeaksantyna obecna w liposomach, powoduje wzrost siły adhezji o czynnik 25, w przypadku małych liposomów (w przedziale wysokości 20-40 nm), oraz o czynnik 45, w przypadku większych liposomów (w przedziale wysokości 40-60 nm). Jednocześnie, rozróżnienia takiego nie obserwuje się w przypadku obecności wiolaksantyny w błonach. W tym przypadku obecność karotenoidu w dwuwarstwach lipidowych skutkuje wzrostem wartości siły adhezji o czynnik 40, bez względu na rozmiary liposomów. Ciekaw jestem jaki może być mechanizm molekularny takiej różnicy? Może część zeaksantyny lokuje się w obszarze międzybłonowym wielodwuwarstw lipidowych a populacja tej frakcji zależy od stopnia krzywizny liposomu?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Dominika Augustyńska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie wyników cyklu pomysłowo zaprojektowanych oraz precyzyjnie wykonanych prac badawczych. Ważna część tych wyników została równoległe ogłoszona w trzech artykułach, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych o międzynarodowym zasięgu (jedna praca w *Acta Biochimica Polonica* oraz dwie prace w *Chemico-Biological Interactions*) We wszystkich opublikowanych



pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Dominikę Augustyńską spełnia zwyczajowe wymagania stawiane w środowisku międzynarodowym przed kandydatami do stopnia naukowego doktora, a tym samym wypełnia 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 znaczna liczba interesujących rezultatów, sprawiają iż pracę doktorską rozpatrywać można w kategoriach wyróżniającej. Gratulując Doktorantce tak interesujących oraz wartościowych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Augustyńskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki