



plus ratio quam vis

dr hab. Hubert Harańczyk
UNIwersytet Jagielloński
Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego
30-348 KRAKÓW,
ul. Prof. Stanisława Łojasiewicza 11, Polska
tel: 48-12- 664-46-14,
fax: 48-12-6644905
e-mail: hubert.haranczyk@uj.edu.pl

Kraków, dnia 25 listopada 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Dominiki Augustyńskiej pt. "The influence of selected carotenoids on mesomorphic phase behaviour of model membranes"

Praca doktorska mgr Dominiki Augustyńskiej wykonana została na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr. hab. Kazimierza Strzałki, wybitnego eksperta w dziedzinie biochemii roślin, autora pionierskich prac poświęconych badaniu roli karotenoidów w błonach biologicznych, oraz promotora pomocniczego, dr Małgorzaty Jemioły-Rzemińskiej, również od lat zajmującej się zblizonymi zagadnieniami, a poświęcona została badaniu wpływu wybranych karotenoidów (β -karotenu, oraz dwóch ksantofili - zeaksantyny oraz wiolaksantyny) na własności fazowe i adhezyjne wielolamelarnych liposomów z DPPC. Jako metody wybrano mikroskopię sił atomowych (metodę AFM) oraz kalorymetrię różnicową (metodę DSC). Zarówno układ modelowych błon biologicznych, jak i metody badawcze zostały dobrane trafnie, gdyż wraz ze wzrostem temperatury DPPC pokazuje do czterech przejść fazowych (w zależności od stopnia oczyszczenia oraz od wartości ciśnienia zewnętrznego), z których zwykle dwa mierzy się w preparatach liposomów, natomiast obie użyte metody pozwoliły na analizę komplementarnych aspektów badanego efektu, a mianowicie zmiany temperatur przejść fazowych układu lipidowego, oraz zmian adhezji wielowarstwowego liposomu pod wpływem dodanych karotenoidów.

Rozprawa doktorska napisana została w języku angielskim, a podzielona, zgodnie z dobrym schematem redakcji prac naukowych, na "Introduction", poświęcony literaturowemu opisowi badanych układów ciekłokrystalicznych, w którym Autorka omówiła budowę błony biologicznej, jej skład lipidowy, następnie szczególnie zogniskowała uwagę na karotenoidach błonalnych, omawiając ich skład, oraz funkcje w reakcji jasnej fotosyntezy, ich własności fotoprotekcyjne oraz antyoksydacyjne, wreszcie przeciwrakowe, następnie omówiła lokalizację wybranych karotenoidów w dwuwarstwie lipidowej; "Materials and methods" opisujące preparatykę wielolamelarnych liposomów, zaawansowaną preparatykę wiolaksantyny, oraz opis zastosowanych metod badawczych, "Results" przedstawiający wyniki zarówno badań kalorymetrycznych, jak i wyniki badań mikroskopii sił atomowych; "Discussion"; wreszcie zwięzłe wnioski, oraz streszczenia zarówno w języku angielskim jak i po polsku, a dodatkowo spis wykorzystywanych skrótów, spis rysunków i a także spis tabel.

Rozprawa obejmuje łącznie 104 strony tekstu, 130 pozycji literatury, 33 rysunki i jedną tabelę.

Szczegółowy opis rezultatów pracy:

W pracy przedstawiono wyniki tras kalorymetrycznych, DSC, dla wielolamelarnych liposomów DPPC oraz takich liposomów dotowanych zeaksantyną. Konformacja zeaksantyny zasadniczo zmienia sposób lokalizacji tego związku w błonie liposomu [Ref. 52 - Literatura], co mogłoby mieć wpływ na ruchliwość łańcuchów węglowodorowych modelowej błony biologicznej i tym samym wpływ na zmianę temperatury głównego przejścia fazowego układu DPPC-zeaksantyna. Jednakże w pracy wykorzystano zakupioną zeaksantynę, w której, jak wydaje się, dominuje konformacja trans i do zeaksantyny w tej właśnie konformacji należy odnosić uzyskane wyniki.

W pracy zauważono, że obecność zeaksantyny nie wpływa na główne przejście fazowe w DPPC, a jednocześnie obniża o 2°C temperaturę przedprzejścia. Nie można zapomnieć, że główne przejście fazowe wiąże się ze zmianą uporządkowania krótkozasięgowego w błonie (od fazy $P_{\beta'}$ do L_{α}), natomiast przedprzejście ze zmianą uporządkowania dalekozasięgowego (od fazy $L_{\beta'}$ do $P_{\beta'}$).

Fakt, że obecność zeaksantyny nie wpływa na główne przejście fazowe DPPC, może oznaczać, że takiego efektu w ogóle nie ma. Jednakże warto się zastanowić, czy brak efektu nie mógłby być wynikiem przyjętego protokołu preparacyjnego, gdy skutek procedury nastąpiłaby separacja obu frakcji lipidowych (Może na przykład preparatyka prowadzona w temperaturach poniżej temperatury głównego przejścia fazowego spowalnia mieszanie się obu frakcji, a może wręcz przeciwnie: prowadzi do separacji wymieszanych na początku frakcji, a tym samym agregacji karotenoidów w błonie, wiodąc do powstawania stabilnych domen).

Równie intrygujące jest spostrzeżenie wpływu obecności karotenoidów na temperaturę przedprzejścia fazowego. Udało się zauważyć obniżenie temperatury przedprzejścia T_p DPPC w przypadku dotowania dwuwarstwy DPPC zeaksantyną, co raczej należy powiązać z różnicą w dystrybucji/agregacji zeaksantyny wbudowanej w dwuwarstwę, niż z efektem związanym z udziałem zeaksantyny o różnych konformacjach.

Jemioła-Rzemińska i in. 2005 analizowali z użyciem symulacji molekularnych analizowano wpływ pojedynczej molekuly β -karotenu na jej otoczenie lipidowe w dwuwarstwie POPC, symulowanej dla temperatury 320 K (POPC w fazie ciekłokrystalicznej, L_{α}), co wprawdzie różni się od sytuacji w liposomach badanych przez Doktorantkę, jednakże, zdaniem Recenzenta, właśnie dla fazy ciekłokrystalicznej efekt od β -karotenu powinien być najsilniejszy, więc wnioski można przenieść do sytuacji badanej w recenzowanej pracy. Autorzy, w układzie zawierającym β -karoten w stężeniu ~0.5 mol% (więc w zakresie badanym w recenzowanej pracy) oraz 72 molekuly POPC, przekonująco ocenili zasięg oddziaływania jako znacząco mniejszy niż 12Å, co wyklucza wpływ pojedynczych molekuł β -karotenu na dalekozasięgowe uporządkowanie błony [Ref. Jemioła-Rzemińska, Pasenkiewicz-Gierula i Strzałka, 2005, Chem. Phys. Lipids 135, 27]. Jednakże temu Recenzentowi nie jest znana praca, w której analizowano by wpływ agregatów molekuł karotenoidu na zmiany dalekozasięgowego uporządkowania błony, chętnie więc usłyszałby opinię Doktorantki o takiej możliwości.

Obrazowanie metodą AFM wielolamelarnych liposomów DPPC, zarówno kontrolnych, jak i dotowanych karotenoidami wykonano zarówno w trybie bezkontaktowym oraz w trybie kontaktowym, zarówno dla próbek umieszczonych w powietrzu jak i zanurzonych we wodzie.

Wprawdzie w pomiarach wykorzystano zakupioną zeaksantynę, jednak wcześniej w rozdziale „Isolation of violaxanthin” przedstawiono zaawansowaną izolację wiolaksantyny i β -karotenu wykorzystanych w pomiarach AFM. Z liści pokrzywy wyekstrahowano frakcję

barwnikową obejmującą zarówno chlorofil, jak i karotenoidy. Chlorofil usunięto reakcją saponifikacji. Dzięki kolejnej ekstrakcji z frakcji barwnikowej od chlorofilu oddzielono frakcję karotenoidową. Z niej oddzielono wiolaksantynę, która łatwo rozpuszcza się w metanolu – w odróżnieniu od β -karotenu, dlatego oba te barwniki oddzielono użyciem mieszaniny heksanu (faza o mniejszej gęstości zawierająca β -karoten) i metanolu (faza o większej gęstości zawierająca wiolaksantynę).

Oddziaływanie sondy AFM z powierzchnią wielolamelarnego liposomu DPPC, zarówno kontrolnego, jak i dotowanego karotenoidem, a deponowanego na powierzchni krzemu miało ograniczony charakter. Otóż, siły adhezji liposomu do podłoża przekraczały poziom oddziaływania z sondą AFM, a ponadto nakłucie układu błonalnego sondą AFM nie powodowało trwałego uszkodzenia powierzchni, lecz struktura natychmiast się odtwarzała; na dodatek nie stwierdzono różnic w kształcie liposomów obrazowanych w modzie kontaktowym i w modzie bezkontaktowym.

Analiza sił adhezji pokazała, że mają one znacznie mniejszą wartość dla liposomów mierzonych (zanurzonych) we wodzie, niż dla pomiarów liposomów prowadzonych w powietrzu (jednakże stale pokrytych filmem wodnym stabilizującym strukturę eksponowanych do atmosfery liposomów). Właśnie obecny dla takiej próbki film wodny indukuje powstanie mostków wodnych znacząco zwiększających siły adhezji wskutek pojawiającego się członu pochodzącego od sił kapilarnych. Dla próbki badanej w atmosferze, spadek sił adhezji wraz z rosnącą temperaturą spowodowany jest postępującą dehydratacją próbki, a tym samym pękaniem mostków wodnych, gdyż podobnego efektu nie zarejestrowano w trakcie pomiarów liposomów zanurzonych we wodzie. Obecność w błonie β -karotenu dodatkowo zwiększa siły adhezji, a efekt od ksantofili jest jeszcze silniejszy, co prawdopodobnie wynika z indukowanego obecnością karotenoidu dodatkowego usztywnienia dwuwarstwy lipidowej, co, zdaniem Recenzenta trafnie, zostało przez Autorkę zinterpretowane, jako dodatkowe oddziaływanie między głowicami hydrofilowymi DPPC, a grupami polarnymi ksantofilu. Autorka zasygnalizowała możliwy wpływ różnych rozmiarów/różnej stabilności domen lipidowych w badanych układach, jednak zastosowane metody (zarówno DSC jak i AFM) w tym szczególnym przypadku nie dostarczyły dokładniejszych rozróżnień.

Bardzo wysoko oceniam przedstawione w pracy nowatorskie analizy struktury i dynamiki molekularnej wielolamelarnych liposomów DPPC dotowanych karotenoidami, a przeprowadzone komplementarnymi metodami.

Należy jednak wytknąć drobne usterki nie mające wpływu na zasadniczą ocenę pracy.

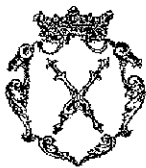
str. 11. Autorka używa własnego neologizmu "soft crystals", w miejsce właściwego określenia "lyotropic liquid crystals". Trzeba zaznaczyć, że jednocześnie Doktorantka posługuje się klasyfikacją liotropowych faz ciekłokrystalicznych wprowadzoną przez V. Luzzatiego [Ref. Luzzati & Tardieu 1974. Ann. Rev. Phys. Chem. 25, 79].

str. 11. Autorka pisze "inverse hexagonal phase H_{II} " w miejsce "inverted hexagonal phase H_{II} ".

str. 12, 13, i 42. W klasyfikacji Luzzatiego łacińską wielką literą oznacza się uporządkowanie dalekozasięgowe, natomiast grecką małą literą umieszczoną w indeksie dolnym oznacza się krótkozasięgowe uporządkowanie/ułożenie łańcuchów węglowodorowych, znaczek prim oznacza zaś, że długa oś symetrii molekuly nie jest prostopadła do powierzchni (do stycznej do powierzchni) dwuwarstwy. Faza ciekłokrystaliczna opisywana jest przez Luzzatiego jako L_{α} , nie $L_{\alpha'}$, gdyż wówczas molekuly ułożone są prostopadle do powierzchni lamelli, co zresztą zamieszczono na poprawnym rysunku na str. 13. Warto też dodać, że fazy ciekłokrystaliczne o dalekozasięgowym uporządkowaniu periodycznym w trzech wymiarach nie muszą być wyłącznie kubiczne, mogą być fazy romboedryczne R, grupa przestrzenna $R\bar{3}m$, a także fazy prostokątne, T, grupa przestrzenna $I422$.

Reasumując, stwierdzam, że cel badawczy recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Augustyńskiej został w pełni zrealizowany, a praca ta zawiera wiele ważnych i nowych rezultatów na temat wpływu wybranych karotenoidów na strukturę i dynamikę molekularną modelowych błon biologicznych z DPPC, dlatego z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że całkowicie spełnia ona wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych. W oparciu o powyższe, uprzejmie proszę wysoką Radę Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto znaczenie uzyskanych wyników oraz jakość przedstawionej rozprawy, w tym poziom analiz wyników i ich dyskusji, pozwalają mi ocenić tę rozprawę jako wyróżniającą. Szczegółowe uzasadnienie proponowanego wyróżnienia pracy Pani mgr Dominiki Augustyńskiej dołączam w oddzielnym piśmie.





plura ratio quam vis

dr hab. Hubert Harańczyk
UNIwersytet Jagielloński
Instytut Fizyki
im. Mariana Smoluchowskiego
30-348 KRAKÓW,
ul. Prof. Stanisława Łojasiewicza 11, Polska
tel: 48-12- 664-46-14,
fax: 48-12-6644905
e-mail: hubert.haranczyk@uj.edu.pl

Kraków, dnia 25 listopada 2016

Rada Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej,
Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica
w Krakowie

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Dominiki Augustyńskiej pt.
"The influence of selected carotenoids on mesomorphic phase behaviour of model
membranes"**

Jako recenzent pracy doktorskiej pani mgr Dominiki Augustyńskiej wykonanej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr. hab. Kazimierza Strzałki, wybitnego eksperta w dziedzinie biochemii roślin i autora pionierskich prac poświęconych badaniu roli karotenoidów w błonach biologicznych, oraz promotora pomocniczego, dr Małgorzaty Jemioły-Rzemińskiej, a poświęconej badaniu wpływu wybranych karotenoidów (β -karotenu, oraz dwóch ksantofili - zeaksantyny oraz wiolaksantyny) na dynamikę fazową oraz na własności adhezyjne wielolamelarnych liposomów z DPPC chciałbym złożyć wniosek o wyróżnienie powyższej pracy doktorskiej.

Pracę doktorską mgr Dominiki Augustyńskiej uważam za wyróżniającą zarówno z uwagi na wybór nowatorskiej tematyki, a mianowicie analizy wpływu i znaczenia karotenoidów dla błon biologicznych roślin, jak i metodologię, w której zastosowano mikroskopię sił atomowych (metodę AFM) oraz kalorymetrię różnicową (metodę DSC). O ile metoda DSC umożliwiła wnikliwe śledzenie dynamiki fazowej badanego układu ciekłokrystalicznego, o tyle pionierskie zastosowanie metody AFM w analizie powierzchni liposomów wielowarstwowych dotowanych karotenoidami pozwoliło na dokładną analizę ich własności powierzchniowych, zarówno dla pomiaru liposomów zanurzonych we wodzie, jak i dla pomiarów liposomów eksponowanych do atmosfery.

Biorąc pod uwagę oryginalność i bogactwo uzyskanych wyników, oraz bardzo wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Augustyńskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.