

**UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE**

**WYDZIAŁ CHEMII**



**STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Badanie oddziaływań związków biologicznie aktywnych  
z modelowymi membranami lipidowymi**

**Marcelina Gorczyca**

**Promotorzy:**

**prof. dr hab. Jacek Korchowicz**

**dr hab. Ewa Luchter-Wasylewska**

**Kraków 2015**

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013.



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Jednym z głównych problemów współczesnej medycyny i zdrowia publicznego jest oporność drobnoustrojów na antybiotyki. Znaczenie tego problemu dostrzegła Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), która antybiotykooporność uznaje za jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla współczesnej medycyny. W raporcie tej organizacji, który ukazał się w 2014 roku, WHO podkreśla, że „znajdujemy się obecnie w erze post-antybiotykowej, w której ponownie łagodne infekcje mogą prowadzić do śmierci”. Poszukiwanie nowych, skuteczniejszych leków antybakteryjnych jest zatem ważnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. Doniesienia literaturowe wskazują, że kluczowym elementem w walce człowieka z bakteriami chorobotwórczymi jest poznanie mechanizmu przenikania antybiotyku przez ścianę komórkową bakterii. Struktura ściany komórkowej, w tym membrany lipidowej bakterii, jest czynnikiem determinującym aktywność antybiotyków i wykształcenie przez bakterie oporności na nie.

Aby poznać mechanizm oddziaływania leków antybakteryjnych z membraną lipidową, badania często prowadzi się w układach modelowych, wśród których szczególne miejsce zajmują monowarstwy Langmuira. Związane jest to z łatwością przygotowania filmów monomolekularnych oraz możliwością ściślego kontrolowania ich składu. Technika ta jest doskonałym narzędziem do badania wpływu związków biologicznie aktywnych na strukturę i właściwości modelowych błon.

Celem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej była charakterystyka oddziaływań potencjalnych środków antybakteryjnych z modelowymi membranami biologicznymi, przy wykorzystaniu metody filmów Langmuira. Jako potencjalne leki zastosowano związki należące do dwóch różnych klas, a mianowicie kaliksareny oraz surfaktanty dimeryczne. Do realizacji założonych celów pracy wykorzystano techniki eksperymentalne oraz modelowanie metodą dynamiki molekularnej w rozdzielczości atomowej.

Kaliksareny to związki makrocykliczne, które ze względu na swoje cechy strukturalne znajdują zastosowanie w otrzymywaniu nowych leków. Materiałem badawczym w pracy doktorskiej były pochodne *p-tert*-butylokaliks[4]arenu podstawione cząsteczkami antybiotyków. Tak zaprojektowane połączenia supramolekularne wykazują aktywność antybakteryjną. W pierwszym etapie pracy scharakteryzowano oddziaływania  $\beta$ -laktamowej pochodnej kaliksarenu (CX) z dwulaurynofosfatydylocholiną (DLPC). Badania te miały na celu uzyskanie odpowiedzi, czy  $\beta$ -laktamowa pochodna kaliksarenu wpływa na właściwości modelowej błony eukariotycznej. Jest to niezwykle istotne, gdyż każdy lek nim dotrze do miejsca swojego działania musi przejść w organizmie człowieka przez liczne membrany

komórkowe. Uzyskane rezultaty pokazały, że CX w znacznym stopniu modyfikuje strukturę monowarstwy DLPC. Szczegółowa analiza termodynamiczna wskazuje, że proces formowania się monowarstw mieszanych CX/DLPC zachodzi na drodze silnej kompensacji entalpowo-entropowej. Filmy dwuskładnikowe wykazują większe uporządkowanie niż monowarstwy czystych składników, co prawdopodobnie wynika z tworzenia się sieci wiązań wodorowych między grupami polarnymi CX i DLPC. Szczególnie cenne wydają się być wnioski otrzymane z badań lipolizy enzymatycznej. Mianowicie zaobserwowano, że w małym stężeniu,  $\beta$ -laktamowa pochodna kaliksarenu powoduje kondensację filmu DLPC oraz obniża aktywność katalityczną enzymu fosfolipazy A2. Można przypuszczać, że w organizmie człowieka, antybakteryjna pochodna kaliksarenu będzie hamować działanie enzymów lipolitycznych.

W kolejnym kroku podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu aktywności biologicznej guanidynowej pochodnej kaliksarenu (CX1) i jej monomeru (mCX1). Związki te, mimo że wykazują pewne wspólne cechy strukturalne, charakteryzują się różnymi właściwościami antybakteryjnymi. CX1 wykazuje szerokie spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Co najważniejsze, nie jest on toksyczny względem komórek eukariotycznych. Natomiast mCX1 odznacza się słabszymi właściwościami antybakteryjnymi. Dlatego też w tej części badań porównano oddziaływanie guanidynowej pochodnej kaliksarenu oraz jej monomeru z fosfolipidami błonowymi: dwumirystynofosfatydylocholiną (DMPC) i dwumirystynofosfatydyloseryną (DMPS), stanowiące odpowiednio model eukariotycznej i prokariotycznej membrany komórkowej. Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że CX1 i mCX1 wykazują powinowactwo tylko do anionowej monowarstwy DMPS, co wynika z oddziaływań elektrostatycznych. Ponadto w przypadku guanidynowej pochodnej kaliksarenu, ważną rolę odgrywają również oddziaływania niepolarne. Jeden z najważniejszych wniosków z tej części badań wypływa z modelowania molekularnego. Symulacje MD pokazały, że przejście cząsteczek CX1 z obszaru hydrofilowego do regionu hydrofobowego modelowej membrany bakteryjnej związane jest z mechanizmem flip-flop. Ogólnie wyniki badań sugerują, że aktywność biologiczna CX1 związana może być z oddziaływaniami elektrostatycznymi oraz niepolarnymi, które występują między guanidynową pochodną a ujemnie naładowanymi osłonami komórek bakterii.

Drugą klasą związków zastosowaną w ramach pracy doktorskiej były surfaktanty dimeryczne, tj. bliźniacze amfifilowe pseudopeptydy (GAPs), zawierające w swojej strukturze dwie cząsteczki aminokwasu, połączone giętkim, alkilowym łącznikiem oraz dwa

łańcuchy hydrofobowe. Można sądzić, że ze względu na swoją specyficzną budowę, pseudopeptydy będą wykazywać aktywność przeciw różnym bakteriom. Celem badań było określenie potencjalnych właściwości antybakteryjnych bliźniaczych pseudopeptydów. W ramach tego zagadnienia scharakteryzowano oddziaływanie pseudopeptydów z fosfolipidami bakteryjnymi: dwumirystynofosfatydyloglicerolem (DMPG) oraz kardiolipiną (TMCL). Do badań wybrano pięć surfaktantów, które różniły się długością alkilowego łącznika. Tak zaplanowane doświadczenia pozwoliły ocenić wpływ długości łącznika pseudopeptydu na strukturę i właściwości modelowych membran. Otrzymane rezultaty, zarówno eksperymentalne, jak i teoretyczne pokazały, że długość łącznika w cząsteczce GAP determinuje właściwości jednoskładnikowych filmów pseudopeptydów, jak również monowarstw mieszanych GAP/DMPG i GAP/TMCL. Filmy dwuskładnikowe zawierające pseudopeptydy z dłuższym łącznikiem, wykazują większe nieuporządkowanie i charakteryzują się mniejszą stabilnością termodynamiczną. Efekt ten związany może być z większą swobodą konformacyjną dłuższego łącznika pseudopeptydu. Uzyskane wyniki wskazują, że pseudopeptydy zawierające większą liczbę atomów węgla w łączniku będą wykazywać lepsze właściwości antybakteryjne.

Połączenie nowoczesnych technik eksperymentalnych z obliczeniami metodą klasycznej dynamiki molekularnej pozwoliło szczegółowo opisać sposób oddziaływania potencjalnych środków antybakteryjnych z modelowymi membranami biologicznymi. Uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze, jednak zakłada się, że w przyszłości wniosą one pewien wkład w projektowanie i otrzymywanie nowych, skuteczniejszych leków antybakteryjnych.