



**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE**

Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Badanie oddziaływań wybranych kationowych
pochodnych fosfatydylocholiny z lipidowymi składnikami
bakteryjnymi i zwierzęcych błon komórkowych**

Marzena Mach

Promotor: dr hab. Paweł Wydro, prof. UJ

Wydział Chemii

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

Zespół Fizykochemii Powierzchni

Kraków 2019

Lipoidy kationowe są grupą syntetycznych związków chemicznych o strukturze lipidopodobnej, co sprawia, że tak samo jak naturalne lipidy posiadają charakter amfifilowy. Odgrywają one ogromne znaczenie w szeregu zastosowań medycznych, farmaceutycznych i biotechnologicznych. Są szeroko wykorzystywane jako nośniki leków, a w szczególności jako nośniki materiału genetycznego w terapii genowej. Co więcej, w ostatnich latach ze względu na rosnącą liczbę lekoopornych szczepów bakterii, związki te zaczęto również badać pod kątem ich aktywności przeciwbakteryjnej. Specyficzne właściwości tej grupy amfifili wynikają przede wszystkim z obecności ładunku dodatniego, który umożliwia lipidom tworzenie trwałych kompleksów z materiałem genetycznym, ułatwia wychwytywanie liposomów kationowych z zamkniętym lekiem, a także przyczynia się do zmiany właściwości membran komórkowych. Ograniczeniem zastosowania lipoidów *in vivo* jest ich wysoka toksyczność w kierunku komórek ssaków. Powoduje to, że syntezuje się wciąż nowe kationowe lipoidy, które przy zachowaniu swoich szczególnych właściwości będą miały ograniczoną cytotoxyczność.

Triestry diacylo-fosfatydylocholin (Et-PC) są stosunkowo nową grupą kationowych lipoidów, które jako pochodne naturalnych fosfatydylocholin charakteryzują się niższą toksycznością. Badania naukowe wskazują, że związki te są dobrymi kandydatami do zastosowania w terapii genowej oraz jako nośniki leków. Pomimo, iż nigdy nie badano ich właściwości antybakteryjnych można oczekiwać, że przez analogię do innych kationowych amfifili, również mogą wykazywać aktywność antybakteryjną.

Mechanizmy dostarczania leków, lipofekcji czy antybakteryjnego działania kationowych lipoidów są najprawdopodobniej procesami wieloetapowymi i do tej pory nie zostały do końca wyjaśnione. Pomimo tego, błona komórkowa jest pierwszym miejscem działania tych substancji, stanowiąc cel ich aktywności albo barierę chroniącą wnętrze komórki, którą muszą one pokonać. Zatem, badanie wpływu kationowych lipoidów na membrany lipidowe jest bardzo istotne gdyż może pomóc w zrozumieniu wyżej wymienionych zjawisk.

Celem pracy było określenie wpływu selektywnie wybranych syntetycznych triestrów diacylo-fosfatydylocholin o różnej strukturze hydrofobowej na monowarstwy i dwuwarstwy lipidowe imitujące błony komórek zarówno bakteryjnych jak i zwierzęcych. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano termodynamicznej charakterystyki interakcji pomiędzy Et-PC i głównymi lipidami biomembran w układach modelowych. Zmiany oddziaływań w warstwach lipidowych w skutek działania lipoidów kationowych mogą dostarczyć kluczowych informacji na temat ich powinowactwa do konkretnych lipidowych składników

biomembran. Ponadto, sprawdzono czy właściwości wybranych lipidów kationowych są skorelowane z ich strukturą, która może modyfikować ich interakcje z poszczególnymi lipidami błonowymi, a tym samym wywierać wpływ na całą membranę komórkową. W pracy dokonano także analizy wpływu lipidów kationowych na płynność, przepuszczalność oraz organizację molekularną modelowych membran lipidowych.

Układy modelowe imitujące membrany komórkowe stanowiły monowarstwy Langmuira oraz liposomy, które utworzone były zarówno z poszczególnych lipidów błon komórkowych jak i mieszanin wieloskładnikowych o kompozycjach odzwierciedlających wzajemne proporcje lipidów w biomembranach. Charakterystyki filmów powierzchniowych dokonano w oparciu o pomiary izoterm ciśnienie powierzchniowe – powierzchnia cząsteczkowa, obrazy z mikroskopii kąta Brewstera oraz parametry obliczone na podstawie uzyskanych krzywych (średnią i nadmiarową powierzchnię cząsteczkową, nadmiarową entalpię swobodną mieszania, stopień kondensacji). Natomiast, dla utworzonych pęcherzyków liposomalnych analizy ich właściwości fizykochemicznych dokonano w oparciu o wyniki uzyskane z pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, potencjału dzeta, anizotropii fluorescencji DPH oraz pomiarów uwalniania kalceiny.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że wbudowywanie się cząstek lipidów kationowych w strukturę modelowych membran lipidowych przyczynia się do zmian: ładunku powierzchniowego, płynności, przepuszczalności oraz międzycząsteczkowych interakcji. Pokazano także, iż struktura i zawartości poszczególnych lipidów wpływają na różnice w organizacji molekularnej membran. Wprowadzenie Et-PC do membran bakteryjnych skutkuje pojawieniem się bardziej przyciągających oddziaływań międzycząsteczkowych w stosunku do tych między komponentami modelowej błony. Dodatkowo, bardzo silne przyciąganie elektrostatyczne między lipidami a fosfatydyloglicerolem i/lub kardiolipiną może wskazywać, iż obecność ujemnie naładowanych lipidów może ułatwiać wbudowywanie się kationowych amfifili w biomembrany. To z kolei może prowadzić do zaburzenia struktury i ładunku błony, a w konsekwencji do śmierci komórki bakteryjnej. Natomiast, wbudowywanie się Et-PC w strukturę membran komórek ssaków osłabia interakcje między lipidami, co przyczynia się do wzrostu płynności, nieuporządkowania łańcuchów *acylowych* i przepuszczalności membrany. Następująca w ten sposób destabilizacja biomembrany może ułatwiać wnikanie leków lub materiału genetycznego przenoszonego wewnątrz liposomów kationowych do wnętrza komórki patologicznej.