



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Badanie wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego
na modelowe membrany lipidowe w kontekście
poszukiwania mechanizmu aktywności
antynowotworowej tego leku**

Karolina Olechowska

Promotor: dr hab. Paweł Wydro, prof. UJ

Wydział Chemii

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

Zespół Fizykochemii Powierzchni

Kraków 2019

Pomimo rozwoju w zakresie diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych dokonanego na przestrzeni ostatnich lat, rosnąca liczba zachorowań i zgonów wskazuje, iż powszechnie stosowane formy leczenia onkologicznego pozostają nieskuteczne w przypadku wielu typów nowotworów, a dodatkowo na ogół wiążą się z występowaniem poważnych skutków ubocznych. Konieczne jest zatem poszukiwanie nowych, bezpieczniejszych i bardziej efektywnych metod terapeutycznych.

Procesy rozwoju nowotworów zawsze powiązane są z nieprawidłowościami w metabolizmie lipidów. W efekcie, w błonach komórek nowotworowych obserwuje się zaburzenia zawartości tych substancji, w stosunku do komórek niepatologicznych. W związku z kluczową rolą lipidów błonowych w regulowaniu wielu procesów fizjologicznych komórek, powstała koncepcja by poprzez bezpośrednią ingerencję w skład i strukturę błon biologicznych doprowadzać do odwrócenia stanu patologicznego, zatrzymania rozwoju lub śmierci komórek nowotworowych. Ta metoda terapeutyczna, określana jako lipidowa terapia membranowa (membrane lipid therapy, MLT), polega na wprowadzeniu do biomembrany odpowiedniej substancji o budowie amfifilowej, co umożliwia modyfikację składu oraz struktury błony i może indukować zmianę lokalizacji i aktywności białek błonowych, odpowiedzialnych za regulację szlaków sygnałowych komórki.

Kwas 2-hydroksyoleinowy (2OHOA, Minerval) jest nowym lekiem typu MLT. Zarówno badania komórkowe, jak i kliniczne dowodzą skuteczności tej substancji w leczeniu wielu typów nowotworów, wskazując dodatkowo na jej selektywnie działanie w stosunku do komórek zmienionych patologicznie, jednak dokładny mechanizm działania 2OHOA na poziomie molekularnym pozostaje częściowo niejasny. W ramach przedstawionej rozprawy, jako metodę dokładniejszego zbadania aktywności antynowotworowej 2OHOA na poziomie błony komórkowej, zastosowano układy modelowe – lipidowe monowarstwy Langmuira oraz liposomy.

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie kompleksowych badań dotyczących charakterystyki oddziaływań kwasu 2-hydroksyoleinowego z głównymi lipidowymi składnikami ludzkich błon komórkowych oraz określenie wpływu badanego leku na właściwości modelowych membran takie jak: stabilność, płynność, przepuszczalność, stopień uporządkowania oraz morfologia. Eksperymenty rozpoczęto od fizykochemicznej charakterystyki jednoskładnikowej monowarstwy 2OHOA, która dotychczas nie została przeprowadzona. Aby dokonać dokładnej weryfikacji wyników otrzymanych dla układów o stosunkowo dużej złożoności, przeprowadzono badania dotyczące analizy właściwości układów dwu- i trójskładnikowych. Wyniki te opracowano także pod kątem wpływu struktury

fosfolipidów na efekty wywołane obecnością 2OHOA w układzie. Istotnym celem przedstawionych badań była próba wskazania obszarów błony szczególnie podatnych na działanie leku, na podstawie efektów inkorporacji 2OHOA do membran stanowiących modele zewnętrznej warstwy ludzkich błon komórkowych oraz raftu lipidowego. Realizacja kolejnego celu pracy polegała na porównaniu wpływu 2OHOA na modelowe błony komórek zdrowych i nowotworowych. Ocena skuteczności działania 2OHOA w stosunku do analizowanych struktur może bowiem dostarczyć informacji na temat powinowactwa tej substancji do poszczególnych układów i pomóc w wyjaśnieniu selektywności kwasu 2-hydroksyoleinowego. Eksperymenty dotyczące wpływu kwasu 2-hydroksyoleinowego na modele błon komórkowych stanowiły główny cel badawczy niniejszej rozprawy, ale w toku prac wykonano także badania dotyczące określenia właściwości potencjalnych liposomowych nośników kwasu 2-hydroksyoleinowego, zawierających lipid kationowy.

Właściwości monowarstw Langmuira zostały przeanalizowane w oparciu o pomiary ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej, parametry obliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm oraz obrazy uzyskane techniką mikroskopii kąta Brewstera. Fizykochemicznej charakterystyki liposomów dokonano na podstawie rezultatów pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, potencjału zeta, anizotropii fluorescencji znacznika fluorescencyjnego oraz miareczkowania spektrofotometrycznego.

W oparciu o otrzymane wyniki stwierdzono, że w stosunku do monowarstw bardziej skondensowanych, o silnych, korzystnych oddziaływaniach międzycząsteczkowych, kwas 2-hydroksyoleinowy wykazuje wyraźniejsze właściwości upłynniające i powoduje osłabienie oddziaływań przyciągających. Wbudowywanie się 2OHOA w strukturę raftów lipidowych jest korzystne termodynamicznie i wywołuje silną zmianę właściwości mikrodomen. Fakt ten może stanowić potwierdzenie szczególnej roli tych struktur w antynowotworowym mechanizmie działania badanego leku. 2OHOA charakteryzuje się większym powinowactwem w stosunku do dwóch przebadanych modeli linii komórek nowotworowych w porównaniu do ich nienowotworowych odpowiedników, co może wskazywać na jego selektywność w kierunku komórek patologicznych. Obdarzone dodatnim ładunkiem powierzchniowym liposomy EPOPC/DOPC/2OHOA, dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym, mogą poprawić efektywność dostarczania 2OHOA do komórek patologicznych.