

Kraków, 28.06.2013

Monika Orlof
Zespół Fizykochemii Powierzchni
Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński

„Fizykochemiczne badania pochodnych kaliksarenów do zastosowań biomedycznych”

Promotor: Prof. dr hab. Maria Paluch
Promotor pomocniczy: dr Beata Korchowiec

Celem pracy doktorskiej była charakterystyka wpływu nowych pochodnych kaliksarenów, wykazujących właściwości antybakteryjne, na strukturę i właściwości monowarstw lipidowych, stanowiących model błon komórek bakteryjnych i eukariotycznych. Tak zaprojektowane związki makrocycliczne mogą być lekami nowej generacji, konkurencyjnymi dla klasycznych antybiotyków i skutecznymi w leczeniu chorób bakteryjnych. Do przygotowania modelowych błon komórkowych wykorzystano technikę nierozpuszczalnych filmów Langmuira.

Praca składa się z trzech zasadniczych części. Pierwsza część ma charakter opisowy i obejmuje zarys stanu wiedzy dotyczącej tematu pracy. W części tej omówiono budowę i otrzymywanie kaliksarenów oraz ich właściwości i możliwe zastosowania. Zamieszczono również krótką charakterystykę antybiotyków przyłączonych do badanych pochodnych kaliksarenów. Ponadto ze względu na charakter i biologiczne znaczenie badanych substancji przedstawiono budowę i funkcje błony komórkowej oraz scharakteryzowano podstawowe lipidy błonowe występujące w komórkach eukariotycznych i bakteryjnych. Na koniec omówiono zagadnienia związane z monowarstwami Langmuira. Przedstawiono rys historyczny badań, charakterystykę nierozpuszczalnych filmów mieszanych oraz ich właściwości elektryczne. Zamieszczono również przegląd literaturowy związany z badaniami

różnych pochodnych kaliksarenów w środowisku modelowych membran biologicznych z wykorzystaniem techniki filmów Langmuira. Zagadnienia opisane w części literaturowej opracowano w oparciu o bibliografię.

W drugiej części pracy przedstawiono charakterystykę materiału badawczego. Przedmiotem badań były pochodne *p-tert*-butylokaliks[4]arenu podstawione w dolnej i górnej części kielicha różnymi antybiotykami oraz wybrane lipidy błonowe. Opisano również stosowaną aparaturę i technikę pomiarową. W badaniach wykorzystano nowoczesną aparaturę do pomiarów ciśnienia powierzchniowego i potencjału powierzchniowego, mikroskopię pod kątem Brewstera (BAM) oraz spektroskopię refleksyjno-absorpcyjną o modulowanej polaryzacji wiązki promieniowania (PM-IRRAS). Badania eksperymentalne uzupełniono modelowaniem molekularnym i obliczeniami dynamiki molekularnej, co pozwoliło na kompleksową charakterystykę badanych układów na poziomie molekularnym i atomowym.

Kolejna część pracy zawiera prezentację otrzymanych wyników oraz ich interpretację. W pierwszej części badań określono właściwości międzyfazowe dwóch amfifilowych pochodnych *p-tert*-butylokaliks[4]arenu z przyłączonymi odpowiednio jedną i dwoma cząsteczkami kwasu nalidyksowego do dolnej części kielicha. Kwas nalidyksowy jest syntetycznym antybiotykiem z grupy chinolonów, który selektywnie blokuje replikację bakteryjnego DNA. Badane pochodne kaliksarenu mogą być potencjalnymi platformami, do dystrybucji i uwalniania tego antybiotyku w organizmie. Zostały one zsyntetyzowane w celu określenia mechanizmu kompleksowania wybranych jonów metali. Przebieg reakcji kompleksowania badano w nierozpuszczalnych filmach utworzonych przez obie pochodne na czystej wodzie oraz na wodnych roztworach soli zawierających, biologicznie istotne, jedno- i dwudodatnie kationy metali. Otrzymane wyniki pozwoliły określić stabilność powstających kompleksów na granicy faz oraz różnice w sposobie kompleksowania kationów metali w zależności od budowy chemicznej badanych kaliksarenów. Badania pokazały, że kaliksarenowe pochodne kwasu nalidyksowego tworzą kompleksy międzycząsteczkowe lub wewnątrzcząsteczkowe. Uzyskane rezultaty wskazują, że kompleksowanie kationów metali może mieć istotny wpływ na ewentualne, medyczne zastosowanie pochodnych kaliks[4]arenu. Zbadano również mieszalność i oddziaływania obu związków z cholesterolem. Uzyskane wyniki dały odpowiedź na pytanie w jaki sposób badane pochodne kaliksarenu przenikają przez błony komórkowe organizmów zwierzęcych i jak wpływają na ich stabilność. Ma to istotne znaczenie dla efektywności ich działania jako przenośników kwasu nalidyksowego i potencjalnego zastosowania farmakologicznego.

W drugiej części badań skupiono się na charakterystyce kaliksarenu rozpuszczalnego w wodzie, trifluorooctanu *p*-guanidynoetylo-kaliks[4]arenu (CX) oraz jego monomeru trifluorooctanu *p*-guanidynoetylofenolu (mCX). CX posiada cztery grupy guanidyniowe przyłączone do górnej krawędzi kaliks[4]arenu i wykazuje aktywność przeciwko różnym Gram-dodatnim i Gram-ujemnym bakteriom, przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek gospodarza. Skutkiem działania CX jest zakłócenie błony bakteryjnej i zwiększenie jej przepuszczalności. W celu zbadania wpływu CX i mCX na modelowe membrany biologiczne utworzono monowarstwy fosfolipidów o takiej samej długości łańcuchów węglowodorowych, ale różnych grupach polarnych. Otrzymane wyniki wskazują na wyższe powinowactwo CX do lipidów anionowych wskazujące na występowanie oddziaływań elektrostatycznych. Dodatkowo, porównując wpływ CX oraz mCX na monowarstwy fosfolipidów stwierdzono, że za reorganizację modelowych błon odpowiadają oddziaływania jon-jon oraz oddziaływania niepolarne pomiędzy CX i lipidami. Przeprowadzone badania pokazały, że związki CX1 i mCX1, które wykazują pewne wspólne cechy strukturalne, wywierają zupełnie inny wpływ na modelowe monowarstwy lipidowe.

W kolejnym etapie zbadano wpływ struktury łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów na charakter ich oddziaływań z CX. Wpływ ten okazał się mniej znaczący niż rodzaj grupy polarnej lipidów, co wskazuje, że większe znaczenie odgrywają oddziaływania elektrostatyczne niż niepolarne. Ponadto zbadano interakcje zachodzące w mieszanych monowarstwach fosfolipidów bakteryjnych oraz wpływ CX na te oddziaływania. W zależności od składu monowarstwy lipidowej badana pochodna w różnym stopniu penetruje do filmów powierzchniowych oraz modyfikuje ich strukturę i właściwości. Ogólnie stwierdzono, że CX wykazuje duże powinowactwo do błon bakteryjnych, wpływa na oddziaływania fosfolipidów tworzących membranę i z powodzeniem może być przez nią transportowana. Jest ona zatem potencjalnym kandydatem do przeprowadzenia badań nad aktywnością biologiczną *in vitro* na hodowlach komórek drobnoustrojów chorobotwórczych.

Można się spodziewać, że przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania własności fizykochemicznych potencjalnych, nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, pozwolą na opracowanie ogólnego modelu mechanizmu działania tych związków bioaktywnych na membrany biologiczne.

Monika Orłof