

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Chemii



Autoreferat

(załącznik 1a)

Katarzyna Hąc-Wydro

Kraków 2014

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Dane bibliometryczne dotyczące dorobku naukowego	3
5. Wskazanie osiągnięcia	
wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	4
b) Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe	4
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników	9
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych	35
7. Podsumowanie najważniejszych aspektów aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej	46

1. Imię i Nazwisko:

Katarzyna Hąc-Wydro

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- IX. 2005 Stopień doktora nauk chemicznych – uzyskany na podstawie pracy doktorskiej pt. "Badanie organizacji molekularnej nowych pochodnych amfoterycyny B o obniżonej toksyczności w monowarstwach lipidowych", Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
- VI. 2002 Tytuł zawodowy magistra chemii na podstawie pracy magisterskiej pt. "Badanie właściwości filmów powierzchniowych adsorbowanych z równomolowych mieszanin surfaktantów kationowych i anionowych", Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Miejsce zatrudnienia: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii,
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków

Zajmowane stanowiska:

- XI.2013 - do chwili obecnej- adiunkt (Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii,
Uniwersytet Jagielloński)
- X.2007 – X.2013 – adiunkt (Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii,
Uniwersytet Jagielloński)
- X.2005 – IX.2007 – asystent (Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński)
- X. 2002 – IX. 2005- doktorant (Studia Doktoranckie na Wydziale Chemii
Uniwersytet Jagielloński)

4. Dane bibliometryczne dotyczące dorobku naukowego

Całkowity dorobek publikacyjny (Spis publikacji naukowych - zał. 2a) obejmuje:

- 44 artykuły naukowe opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny Impact Factor tych pracy, obliczony wg roku ich opublikowania wynosi IF = 121,392
- 2 artykuły przeglądowe
- 5 pełnotekstowych artykułów w materiałach konferencyjnych

W tym:

przed doktoratem - 10 prac w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (IF = 15,918 wg roku opublikowania pracy)
- 3 artykuły w materiałach konferencyjnych

po doktoracie - 34 prace w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (IF = 105,475 wg roku opublikowania pracy)
- 2 artykuły w materiałach konferencyjnych
- 2 artykuły przeglądowe

dane bibliometryczne (z dnia 20.08.2014)

wg bazy Scopus: całkowita liczba cytowań = 491 (bez autocytowań = 408)
index Hirscha = 13

wg bazy Web of Science: całkowita liczba cytowań = 461 (bez autocytowań = 366)
index Hirscha = 11

5. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Badanie wpływu steroli i stanolu roślinnego na monowarstwy lipidowe – analiza właściwości membranowych fitozwiązków w układach modelowych.

b) publikacje składające się na osiągnięcie naukowe

Jako podstawę habilitacji wybrałam cykl 12 pełnotekstowych artykułów opublikowanych w latach 2007-2014 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny Impact Factor tych pracy, obliczony wg roku ich opublikowania wynosi IF = 42,424 (średnio na pracę: 3,535). We wszystkich wskazanych pracach jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, cztery artykuły to prace monoautorskie. Wkład współautorów pozostałych publikacji został określony w załączonych oświadczeniach (załącznik 3).

[H1] K. Hąc-Wydro, P. Wydro, A. Jagoda, J. Kapusta, *The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes*, Chem. Phys. Lipids, 150 (2007) 22-34.

(IF2007 = 2,396)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników i współpracy podczas ich interpretacji, uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma, przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[H2] K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *The impact of sterol structure on the interactions with sphingomyelin in mixed Langmuir monolayers*, J. Phys. Chem. B, 112 (2008) 11324-11332.

(IF2008 = 4,189)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów, przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników, współpracy podczas ich interpretacji i przygotowywania manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

[H3] K. Hąc-Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, P. Dynarowicz-Łątka, J. Majewski, *Comparative studies on the influence of β -sitosterol and stigmasterol on model sphingomyelin membranes - A grazing-incidence X-ray diffraction study*, J. Phys. Chem. B, 114 (2010) 6866-6871.

(IF2010 = 3,603)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, uczestnictwie w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowywaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz współpracy podczas korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

[H4] K. Hąc-Wydro, *The replacement of cholesterol by phytosterols and the increase of total sterol content in model erythrocyte membranes*, Chem. Phys. Lipids 163 (2010) 689-697.

(IF 2010 = 2,861)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów, przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy wynosi 100%.

[H5] K. Hąc-Wydro, A. Zając, P. Dynarowicz-Łątka, *The influence of plant stanol on phospholipids monolayers – The effect of phospholipid structure*, J. Colloid Interface Sci. 360 (2011) 681–689.

(IF2011 = 3,070)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów z zastosowaniem techniki mikroskopii kąta Brewstera oraz części eksperymentów polegających na rejestracji izoterm podczas kompresji monowarstw Langmuira, przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników, współpracy podczas interpretacji wyników i przygotowywania manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma, współpracy w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[H6] K. Hąc-Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, P. Dynarowicz-Łątka, J. Majewski, *Properties of β -sitostanol/DPPC monolayers studied with Grazing Incidence X-ray Diffraction (GIXD) and Brewster Angle Microscopy*, J. Colloid Interface Sci. 364 (2011) 133–139.

(IF2011 = 3,070)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów z zastosowaniem techniki mikroskopii kąta Brewstera oraz rejestracji izoterm kompresji dla badanych monowarstw, przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników, współpracy podczas interpretacji wyników oraz przygotowywania manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

[H7] K. Hąc-Wydro, *Langmuir monolayers studies on the relationship between the content of cholesterol in model erythrocyte membranes and the influence of β -sitosterol*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 91 (2012) 226– 233.

(IF 2012 = 3,554)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów, przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy wynosi 100%.

[H8] K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *Externalization of phosphatidylserine from inner to outer layer may alter the effect of plant sterols on human erythrocyte membrane — The Langmuir monolayer studies*, Biochim. Biophys. Acta 1818 (2012) 2184–2191.

(IF2012 = 3,389)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów i przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników, współpracy podczas interpretacji uzyskanych wyników i przygotowywaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

[H9] K. Hąc-Wydro, R. Lenartowicz, P. Dynarowicz-Łątka, *The influence of plant stanol (β -sitostanol) on inner leaflet of human erythrocytes membrane modeled with the Langmuir monolayer technique*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 102 (2013) 178 – 188.

(IF2013 = 4,287)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów z zastosowaniem techniki mikroskopii kąta Brewstera, przeprowadzeniu analizy uzyskanych wyników, współpracy podczas interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

[H10] K. Hąc-Wydro, *The effect of β -sitosterol on the properties of cholesterol/phosphatidylcholine/ganglioside monolayers – The impact of monolayer fluidity*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 110 (2013) 113 – 119.

(IF2013 = 4,287)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów, przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy wynosi 100%.

[H11] K. Hąc-Wydro, *Studies on β -sitosterol and ceramide-induced alterations in the properties of cholesterol/sphingomyelin/ganglioside monolayers*, Biochim. Biophys. Acta, 1828 (2013) 2460–2469.

(IF2013 = 3,431)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów, przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i

przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy wynosi 100%.

[H12] K. Hąc-Wydro, K. Luty, Miscibility and interactions of animal and plant sterols with choline plasmalogen in binary and multicomponent model systems, Colloids Surf. B Biointerfaces, 116 (2014) 138 – 146.

(IF2013 = 4,287)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich eksperymentów z zastosowaniem techniki mikroskopii kąta Brewstera oraz części eksperymentów polegających na rejestracji izoterm podczas sprężania monowarstw Langmuira, przeprowadzeniu analizy i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów oraz korekty manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Sterole roślinne (fitosterole) oraz ich nasycone pochodne - stanole - (fitostanole) - to steroidy występujące naturalnie w organizmach roślinnych. Pośród nich najbardziej rozpowszechnione są β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol (fitosterole), a także β -sitostanol oraz kampestanol (fitostanole). W odróżnieniu od membran zwierzęcych, zdominowanych przez jeden typ sterolu (cholesterol), w komórkach i błonach roślinnych sterole występują w postaci mieszaniny [1-3].

Organizm człowieka nie jest zdolny do samodzielnej syntezy wyżej wspomnianych fitozwiązków, jednak potrafi przyswajać je z pokarmów, w wyniku czego występują one również w komórkach ludzkich. Mimo, że wchłanianie steroli i stanoli roślinnych w jelitach człowieka jest średnio, odpowiednio, 10-krotnie i 100-krotnie niższe niż przyswajalność cholesterolu pokarmowego [4,5], udowodniono bardzo korzystny wpływ tych substancji na zdrowie człowieka [2,6]. Najbardziej znany rodzaj ich aktywności w organizmie ludzkim związany jest ze zdolnością do zmniejszania wchłaniania cholesterolu, zarówno endogennego jak i pokarmowego, i obniżania całkowitego poziomu cholesterolu oraz frakcji LDL (tzw. „złego cholesterolu”) we krwi [7]. Ponadto, związki te wspomagają pracę układu krążenia, wykazują działanie przeciwzapalne, mają korzystny wpływ na układ odpornościowy [8,9]. Fitosterole wykazują także aktywność antynowotworową, która polega zarówno na obniżaniu ryzyka rozwoju chorób nowotworowych [10] jak i hamowaniu wzrostu komórek rakowych i wywoływaniu ich apoptozy [11-13]. Ponieważ dieta człowieka zwykle jest uboga w produkty zawierające fitosterole, w świetle korzystnych właściwości tych związków, od lat 90 ubiegłego wieku wiele produktów żywnościowych (głównie margaryny, mleko, ale także soki, napoje, batony) wzbogacanych jest w sterole roślinne i ich pochodne. Wśród działań ubocznych tych substancji wymienia się obniżanie stężenia beta-karotenu oraz witaminy E we krwi [14]. Zagadnienia związane z metabolizmem fitosteroli oraz ich aktywnością w organizmie człowieka zostały szeroko opisane w wielu artykułach przeglądowych [np. 15-17].

Tematyka badań podjętych w cyklu prac przedstawianych przeze mnie jako podstawa habilitacji związana jest z aktywnością membranową steroli i stanoli roślinnych. Jak dowiodły badania *in vitro* i *in vivo*, związki te mogą wbudowywać się w błony biologiczne ssaków. Wykazano, że suplementacja fitosterolami powoduje wzrost ich stężenia w membranach ludzkich i zwierzęcych erytrocytów (zarówno zdrowych jak i zmienionych chorobowo) [18-24]. Związki te wbudowują się także w błony ludzkich keratynocytów [25] oraz komórek nowotworowych [11,12]. Stwierdzono, że wnikanie fitozwiązków w membrany skutkuje

wzrostem całkowitej zawartości steroli w błonie lub zastąpieniem w niej części cholesterolu przy utrzymaniu całkowitego stężenia steroli na stałym poziomie [11, 12 20-22]. Pojawia się więc pytanie czy i w jaki sposób wbudowywanie się steroli roślinnych w membrany człowieka zmienia ich właściwości?

Biorąc pod uwagę budowę cząsteczki, fitosterole są analogami cholesterolu i, podobnie jak cholesterol w błonach ludzkich, pełnią w membranach roślinnych funkcję regulatorów ich parametrów fizykochemicznych (płynności, sztywności, przepuszczalności). Jak wykazano, obecność cholesterolu w biwarstwie lipidowej powoduje zwiększenie gęstości powierzchniowej membrany i zmniejszenie średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę (efekt kondensujący; ang. „condensing effect”), prostowanie i porządkowanie łańcuchów acylowych (efekt porządkujący; ang. „ordering effect”) oraz tworzenie się, w obrębie fazy nieuporządkowanej (ang. liquid disordered – ld), uporządkowanych domen (fazy uporządkowanej (ang. liquid ordered phase – lo) [26-29]. Pod tym względem (jakościowym) wpływ steroli roślinnych na błonę jest tożsamy z wpływem cholesterolu. Jednak mimo, że β -sitosterol i stigmasterol posiadają właściwości kondensujące i porządkujące i, oddziałując z lipidami, promują tworzenie się domen, są w tym działaniu mniej efektywne niż cholesterol, a powstające domeny mają inną morfologię niż struktury formowane pod wpływem sterolu zwierzęcego [30-33]. Mimo sprzecznych danych na temat różnic w oddziaływaniu głównych fitosteroli (β -sitosterolu i stigmasterolu) z lipidami [np. 31 vs 32], istnieje zgoda co do tego, że wpływ tych związków na membrany ilościowo różni się od wpływu cholesterolu. Stwierdzone doświadczalnie różnice w aktywności membranowej cholesterolu i fitosteroli mogłyby więc wskazywać, że wprowadzenie sterolu roślinnego do błony i/lub zastąpienie w niej części cholesterolu zmieni organizację molekularną membrany i jej właściwości fizykochemiczne. Jednak prezentowane w literaturze naukowej wyniki dotyczące tego zagadnienia nie są jednoznaczne. Część z nich dowodzi, że wzrost zawartości fitosteroli w membranach powoduje zmiany ich sztywności, płynności i przepuszczalności, co w konsekwencji obniża plastyczność komórek i prowadzi do wzrostu ich kruchości [20,21,25]. Inne doniesienia wskazują zaś, że wzrost zawartości fitosteroli we krwi i w komórkach erytrocytów nie wpływa na ich właściwości i funkcjonowanie [23,34,35]. Te rozbieżności naturalnie nasuwają pytanie o czynniki, które mogą determinować wpływ fitosteroli na membrany. Analiza danych literaturowych dotyczących profilu lipidowego błon ludzkich erytrocytów pochodzących od różnych dawców pozwala postawić tezę, że jednym z czynników regulujących wpływ fitosteroli na błony biologiczne może być skład lipidowy membrany, który zmienia się np. pod wpływem diety, leków, chorób a nawet treningu fizycznego [36-39]. Innym czynnikiem, który należałoby wziąć pod uwagę jest stężenie fitosteroli w błonie, które zależy od stosowanej diety oraz

indywidualnych predyspozycji organizmu do przyswajania i metabolizowania tych związków [18,23,24,35,40].

Zagadnienia te, związane ściśle z aktywnością membranową fitosteroli, stały się genezą eksperymentów podjętych przeze mnie w ramach badań habilitacyjnych, a weryfikacja wcześniej sformułowanych pytań i tez – jednym z głównych celów badawczych. Badania te dotyczyły wpływu β -sitosterolu, stigmasterolu oraz β -sitostanolu na lipidowe monowarstwy Langmuira, które imitowały błony biologiczne. Takie biomimetyczne układy membranowe (sztuczne błony) są szeroko stosowane w badaniach oddziaływania substancji bioaktywnych ze składnikami błon. Jest to podyktowane ogromną złożonością składu i struktury naturalnych membran, których wykorzystanie w badaniach daje odpowiedź jedynie na pytania o całościowy efekt analizowanej substancji na właściwości membrany. Zastosowanie układów modelowych, chociaż posiada szereg ograniczeń, umożliwia przygotowanie układu znacznie prostszego, o znanym składzie potrzebnym do zrealizowania postawionych celów badawczych i analizowania poszczególnych zjawisk zachodzących w układzie w danych warunkach doświadczalnych. Przegląd literatury wskazuje, że eksperymenty z wykorzystaniem sztucznych błon dotyczące wpływu steroli na organizację i funkcjonowanie membran są wyraźnie skoncentrowane na układach zawierających sterol dominujący w błonach ludzkich tzn. cholesterol. Z drugiej strony dostarczone do organizmu fitosterole również mogą stać się komponentami błon ludzkich i, w świetle dostępnej literatury, ich wpływ na parametry fizykochemiczne błon, a tym samym na żywotność komórek jest niejasny. W literaturze naukowej wyraźnie brakowało systematycznych badań dotyczących oddziaływania poszczególnych fitosteroli na lipidowe modelowe membrany, a ponadto wiele zagadnień dotyczących właściwości tych substancji pozostawało nierozstrzygniętych. Te fakty, bardziej szczegółowo omówione w dalszej części niniejszego opracowania, zainspirowały moje badania, których wyniki umożliwiły dokonanie porównania wpływu badanych fitosteroli/stanolu na sztuczne membrany, przeprowadzenie analizy zależności między składem monowarstwy oraz budową i stężeniem fitozwiązku a jego wpływem na modelową błonę i na tej podstawie zgłębienie szeregu zagadnień związanych z aktywnością membranową tych związków.

Przeгляд przeprowadzonych eksperymentów i najważniejszych wyników uzyskanych podczas realizacji badań oraz główne wnioski formułowane na ich podstawie przedstawiłam w kolejnych częściach autoreferatu. Wszystkie uzyskane wyniki wraz z ich szczegółową analizą zostały opublikowane w cyklu 12 artykułów w czasopiśmie indeksowanym w bazie Journal Citation Report. Całkowity Impact Factor tych prac, obliczony zgodnie z rokiem opublikowania artykułów, wynosi IF = 42,424.

Cele badawcze i omówienie najważniejszych wyników badań

Podstawowym celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie wpływu wybranych steroli roślinnych (β -sitosterolu i stigmasterolu) i stanolu roślinnego (β -sitostanolu) na właściwości monowarstw utworzonych z cząsteczek lipidów tzn. na ich morfologię, kondensację i uporządkowanie oraz oddziaływania międzycząsteczkowe. Badania prowadziłam w układach dwuskładnikowych (fitozwiązek/lipid) oraz wieloskładnikowych (fitozwiązek/mieszanina lipidów). Analiza właściwości monowarstw dokonywana była na podstawie izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę rejestrowanych podczas kompresji monowarstw (izoterm π -A) i parametrów obliczonych na ich podstawie, a także zdjęć zarejestrowanych za pomocą mikroskopu kąta Brewstera (BAM) oraz, w części badań, parametrów uzyskanych z pomiarów z zastosowaniem techniki dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD). Skład mieszanin traktowanych jako modele błon biologicznych (wieloskładnikowe monowarstwy Langmuira) doбираłam w taki sposób, aby na podstawie uzyskanych wyników możliwe było również zgłębienie szeregu zagadnień związanych z aktywnością membranową i biologiczną badanych fitozwiązków, a mianowicie:

- a) Analiza wpływu poszczególnych fitozwiązków tzn: β -sitosterolu, stigmasterolu i β -sitostanolu na właściwości monowarstw lipidowych w układach dwuskładnikowych i wieloskładnikowych i na tej podstawie porównanie ich aktywności membranowej.
- b) Zbadanie wpływu fitozwiązków na monowarstwy imitujące membranę ludzkich erytrocytów - normalną i zaburzoną pod względem składu - i analiza zależności pomiędzy składem i właściwościami modelowej błony a wpływem fitosteroli.
- c) Porównanie, który efekt związany z wbudowywaniem się fitosteroli silniej modyfikuje właściwości modelowej membrany: wzrost całkowitego stężenia steroli czy zastępowanie cholesterolu?
- d) Analiza wpływu fitosteroli na monowarstwy imitujące błony komórek nowotworowych w kontekście antyrakowych właściwości tych substancji.

Realizację badań związanych z tematyką habilitacyjną rozpoczęłam w 2007 roku i początkowo skoncentrowałam się na porównaniu wpływu β -sitosterolu i stigmasterolu na monowarstwy utworzone z cząsteczek fosfolipidów. Podjęcie tej tematyki wynikało z braku systematycznych badań dotyczących oddziaływania fitosteroli z lipidami oraz wyraźnych sprzeczności w literaturze naukowej dotyczących różnic w aktywności membranowej β -sitosterolu i stigmasterolu. Dostępne w literaturze wyniki badań wykazały, że fitosterole oddziałując z lipidami są zdolne do formowania domen lipidowych i powodują kondensację i porządkowanie

łańcuchów lipidowych w membranach [30-33]. Pod względem jakościowym związku te wykazują więc właściwości podobne do cholesterolu. Jednak wpływ steroli roślinnych na błony jest, przy takim samym stężeniu, słabszy niż wpływ sterolu zwierzęcego, a ich oddziaływania z lipidami są mniej korzystne. Wyniki eksperymentów prowadzonych na pęcherzykach lipidowych [30-33] wykazały, że domeny lipidowe w układach zawierających fitosterol są mniejsze i słabiej upakowane niż struktury powstające w obecności cholesterolu, a wpływ porządkujący β -sitosterolu i stigmasterolu jest słabszy niż cholesterolu. Cholesterol bardziej efektywnie zmienia grubość i elastyczność biwarstwy oraz silniej ją stabilizuje niż sterole roślinne [31,41,42]. Nieliczne wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem jako modeli monowarstw Langmuira utworzonych z cząsteczek 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DPPC) [42,43] również potwierdziły silniejsze właściwości kondensujące cholesterolu oraz korzystniejsze jego oddziaływania z fosfolipidem w porównaniu do fitosteroli. Rozbieżności pojawiają się jednak, gdy porównuje się właściwości membranowe dwóch steroli roślinnych – β -sitosterolu i stigmasterolu. Część publikowanych wyników wskazuje, że stigmasterol posiada silniejsze właściwości kondensujące i silniej oddziałuje z cząsteczkami DPPC i sfingomieliny w biwarstwach niż β -sitosterol [32,33]. Jednak wyniki innych badań, prowadzonych zarówno w biwarstwach [31,42,44] jak i monowarstwach [42,43] utworzonych z cząsteczek nasyconych fosfatydylocholin lub sfingomieliny, wskazują, że silniejsze właściwości porządkujące i kondensujące, a także większą efektywność w stabilizowaniu fazy uporządkowanej, modyfikowaniu grubości i elastyczności modelowej membrany posiada β -sitosterol. Pojawiły się także doniesienia, że wpływ obu fitosteroli na biwarstwy utworzone z fosfatydylocholin posiadających w pełni nasycone łańcuchy jest porównywalny [45-47]. Podobne rozbieżności pojawiają się w wynikach nielicznych badań prowadzonych w układach zawierających fosfatydylocholin posiadających w obrębie cząsteczki jeden łańcuch nasycony (C16:0) i drugi nienasycony C18:1 lub C18:2 [31,47]. Wyżej wspomniane wyniki pozostawiają nierozstrzygnięty problem różnic/podobieństw w aktywności membranowej β -sitosterolu i stigmasterolu i dodatkowo sugerują, że wpływ ten może być determinowany składem i właściwościami modelowego układu. To zachęciło mnie do podjęcia systematycznych badań z zastosowaniem jako modeli monowarstw lipidowych. Cykl eksperymentów rozpoczęłam od zbadania wpływu β -sitosterolu i stigmasterolu na monowarstwy utworzone z cząsteczek fosfatydylocholin (PC) różniących się strukturą części hydrofobowej cząsteczek tzn. zawierających odpowiednio: dwa nasycone łańcuchy C18:0 (1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina - DSPC) lub C16:0 (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina - DPPC), dwa osiemnastowęglowe łańcuchy zawierające podwójne wiązanie o konfiguracji *cis* C18:1 (1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina - DOPC) oraz fosfatydyloetanoloaminy (PE) posiadającej w pełni nasycone łańcuchy acylowe C16:0 (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanoloamina - DPPE). Taki dobór fosfolipidów umożliwił nie

tylko porównanie oddziaływań β -sitosterolu i stigmasterolu z poszczególnymi fosfolipidami, lecz także przeanalizowanie wpływu struktury fosfolipidu tzn. długości łańcuchów (DSPC vs DPPC), stopnia nasycenia łańcuchów (DSPC vs DOPC) oraz budowy grupy polarnej (DPPC vs DPPE) na oddziaływania z fitosterolami. Wyniki tych badań, opublikowane w pracy [H1], wykazały, że badane sterole roślinne powodują kondensację monowarstw i w mieszaninach fitosteroli z fosfatydylocholinami występują korzystniejsze, w porównaniu do odpowiednich monowarstw jednoskładnikowych, oddziaływania międzycząsteczkowe. Jest to związane z separowaniem cząsteczek fosfatydylocholin przez cząsteczki steroli wprowadzane do układu i osłabianiem sił elektrostatycznego odpychania występujących pomiędzy ich grupami polarnymi. Oddziaływania fitosterol/PC były tym silniejsze im dłuższe były nasycone łańcuchy w cząsteczkach fosfolipidu (DSPC i DPPC), co związane jest z silniejszymi oddziaływaniami van der Waalsa występującymi pomiędzy cząsteczkami w badanych monowarstwach. Na oddziaływania fitosteroli z fosfatydylocholinami ma wpływ również obecność podwójnych wiązań w łańcuchach fosfolipidów. Porównanie wyników dla mieszanin zawierających cząsteczki PC posiadające łańcuchy tej samej długości, lecz różniących się stopniem ich nasycenia wykazało, że sterole mniej korzystnie oddziałują z DOPC niż DSPC i inna jest stechiometria najbardziej stabilnej termodynamicznie monowarstwy. Wyniki te zostały wyjaśnione różnicami w kondensacji jednoskładnikowych monowarstw DOPC i DSPC, do których wprowadzane były fitozwiązki. Ponadto okazało się, że mieszalność oraz oddziaływania fitosteroli z fosfolipidami zależą również od struktury grupy polarnej fosfolipidu. Badane fitosterole wywierały znacznie korzystniejszy termodynamicznie wpływ na monowarstwy utworzone z cząsteczek fosfatydylocholin (DPPC) niż fosfatydyloetanolaminy (DPPE). Efekt ten można wyjaśnić biorąc pod uwagę wpływ budowy głów polarnych badanych fosfolipidów na oddziaływania ich cząsteczek w monowarstwach jednoskładnikowych. Wprowadzenie sterolu do monowarstwy DPPE, podobnie jak w przypadku monowarstwy DPPC, zaburza oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy grupami polarnymi lipidów, ale równocześnie osłabia oddziaływania poprzez wiązania wodorowe, co z termodynamicznego punktu widzenia jest mniej korzystne. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników, odnosząc się również do wyników literaturowych dla podobnych mieszanin zawierających cholesterol, w pracy [H1] analizowany był wpływ struktury sterolu na oddziaływania z poszczególnymi fosfolipidami. Wyniki wykazały, że struktura cząsteczki sterolu (tzn. cholesterolu, β -sitosterolu i stigmasterolu) nie wpływa na stechiometrię najstabilniejszej termodynamicznie mieszaniny sterol/PC, ale różnice w strukturze bocznego łańcucha steroli wpływają na oddziaływania międzycząsteczkowe. Badane fitosterole posiadają, w porównaniu do cholesterolu, dodatkową grupę etylową w bocznym łańcuchu, a stigmasterol dodatkowo podwójne wiązanie. To sprawia, że boczny łańcuch w cząsteczce fitosterolu jest bardziej rozbudowany niż w cząsteczce cholesterolu i stanowi zawadę

steryczną osłabiającą oddziaływania z fosfolipidami, co wyjaśnia znacznie korzystniejsze oddziaływania cholesterolu w porównaniu do fitosteroli z fosfatydylocholinami. Najważniejsza, z punktu widzenia dalszych eksperymentów, okazała się konkluzja, że β -sitosterol nieco silniej oddziałuje z fosfatydylocholinami niż stigmasterol, lecz stigmasterol nieco efektywniej separuje cząsteczki DPPE w monowarstwach niż β -sitosterol.

Badania dotyczące wpływu fitosteroli na monowarstwy lipidowe w układach dwuskładnikowych kontynuowałam dla mieszanin sterol/naturalna sfingomielina (Sph) [H2]. Do badań tych prócz β -sitosterolu i stigmasterolu włączyłam także cholesterol, co umożliwiło szerokie przedyskutowanie wpływu budowy bocznego łańcucha steroli na ich oddziaływania z lipidami w monowarstwach Langmuira. Uzyskane w trakcie eksperymentów wyniki potwierdziły, że wszystkie badane sterole kondensują i porządkują monowarstwy utworzone z cząsteczek sfingomieliny, a w monowarstwach występują silne oddziaływania międzycząsteczkowe, najkorzystniejsze przy tym samym, dla wszystkich badanych układów, składzie monowarstwy (30% sterolu). Jednak wpływ ten jest znacznie silniejszy dla cholesterolu niż fitosteroli, oraz jedynie nieco silniejszy w przypadku mieszanin zawierających β -sitosterol w porównaniu do stigmasterolu. Uzyskane wyniki zostały wyjaśnione różnicami w budowie bocznego łańcucha badanych steroli w odniesieniu do wyników obliczeń komputerowych [48], które wykazały, że pole przekroju poprzecznego cząsteczki cholesterolu posiada mniejszą średnicę i cząsteczka jest dłuższa niż cząsteczki fitosteroli. Taka struktura zapewnia korzystniejsze oddziaływania van der Waalsa pomiędzy cząsteczkami cholesterolu i Sph aniżeli fitosteroli. Różnice w budowie bocznego łańcucha poszczególnych fitosteroli sprawiają, że stigmasterol posiada nieco większe pole przekroju poprzecznego a jego cząsteczka jest nieco krótsza od cząsteczki β -sitosterolu [48]. Jednak różnice te nie są znaczne, co tłumaczy uzyskane wyniki, a mianowicie jedynie nieznacznie słabszy wpływ stigmasterolu w porównaniu do β -sitosterolu na badane monowarstwy. Podobnie szczegółowa analiza wyników w kierunku wpływu porządkującego steroli wykazała, że efekt ten jest wyraźnie silniejszy dla cholesterolu, ale porównywalny dla obu fitosteroli. Ponadto w oparciu o wyniki dla monowarstw sterol/Sph oraz otrzymane wcześniej dane dla monowarstw sterol/DPPC [H1], możliwe było porównanie wpływu porządkującego steroli na monowarstwy utworzone z cząsteczek sfingomieliny vs fosfatydylocholicy (DPPC). Uzyskane wyniki pozwoliły sformułować wniosek, że w szerokim zakresie stężeń sterolu w mieszaninie ($\leq 50\%$ sterolu) wpływ porządkujący poszczególnych fitosteroli w kierunku DPPC i Sph jest podobny.

Wyniki badań zaprezentowane w pracach [H1, H2] wskazują wprawdzie nieco większą aktywność membranową β -sitosterolu niż stigmasterolu w badanych monowarstwach lipidowych, lecz wartości parametrów, na podstawie których analizowane były właściwości monowarstw są dosyć podobne, tak więc przeprowadzone badania nie przyniosły jednoznacznej

odpowiedzi na pytanie dotyczące różnic we właściwościach kondensujących i porządkujących tych fitozwiązków. To zachęciło mnie do podjęcia dalszych eksperymentów w tym zakresie, w których do badania właściwości mieszanin fitosterol/sfingomielina zastosowana została technika dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD ang. Grazing Incidence X-ray Diffraction), dedykowana układom charakteryzującym się periodycznym uporządkowaniem cząsteczek [H3]. Uzyskane z pomiarów dyfraktogramy oraz parametry obliczone na ich podstawie pozwoliły porównać organizację cząsteczek sfingomieliny oraz poszczególnych fitosteroli w monowarstwach jednoskładnikowych oraz w mieszaninach. Badania wykazały heksagonalne upakowanie uporządkowanych cząsteczek w monowarstwie Sph i steroli i potwierdziły dowiedzione wcześniej, silne oddziaływania fitosteroli ze sfingolipidem oraz ich wpływ kondensujący i porządkujący na monowarstwę Sph. Użykane wyniki wykazały nieco silniejszy wpływ porządkujący stigmasterolu, jednak niewielkie różnice w wartościach analizowanych parametrów (i błędy jakimi są one obarczone) doprowadziły do konkluzji, że oba fitosterole w podobnym stopniu kondensują i porządkują monowarstwę Sph [H3].

Zastosowanie metody GIXD potwierdziło więc wcześniej sformułowane wnioski, że β -sitosterol oraz stigmasterol, mimo różnic w budowie cząsteczek, posiadają bardzo podobne właściwości porządkujące w kierunku badanych dotąd lipidów. Eksperymenty w układach dwuskładnikowych dotyczące tego zagadnienia kontynuowałam [H4] badając właściwości mieszanin fitosteroli z fosfolipidem posiadającym w cząsteczce szesnastowęglowy łańcuch nasycony C16:0 i osiemnastowęglowy łańcuch zawierający podwójne wiązanie *cis* C18:1 (1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina - POPC). Uzyskane wyniki po raz kolejny potwierdziły, że badane sterole bardzo podobnie zachowują się w dwuskładnikowych monowarstwach lipidowych. W pracy [H4] przeprowadziłam również obszerną dyskusję wyników uzyskanych dla badanych dotąd monowarstw fitosterol/fosfatydylocholina. Na podstawie analizy wyników systematycznych badań opublikowanych w pracach [H1,H2,H4] stwierdziłam, że badane fitosterole wykazują silniejszy wpływ porządkujący na fosfolipidy posiadające nasycone łańcuchy i słabszy, gdy w cząsteczce fosfolipidu obecne są łańcuchy zawierające podwójne wiązanie o konfiguracji *cis* (DPPC>POPC>DOPC). Wniosek ten wyjaśniłam biorąc pod uwagę wyniki innych Autorów [49], które dowiodły, że obecność steroli w mieszaninie powoduje zmniejszenie ilości konformacji *gauche* w łańcuchu acylowym. Ponieważ obecność wiązania podwójnego o konfiguracji *cis* w łańcuchu obniża swobodę jego rotacji, silniejsze porządkowanie występuje dla nasyconych łańcuchów. Ponadto odniosłam się do wyników symulacji dynamiki molekularnej [50] przeprowadzonych dla cząsteczek cholesterolu, desmosterolu i ketosterolu w biwarstwach zawierających DPPC lub DOPC, które wykazały, że różnice w efekcie porządkującym steroli różniących się strukturą zaznaczają się wyraźniej w

przypadku, gdy sterol znajduje się w mieszaninie z fosfolipidem posiadającym nasycone łańcuchy. Wyniki analizy zgromadzonych przeze mnie danych eksperymentalnych okazała się być zgodna z wynikami analiz komputerowych i potwierdziła, że właściwości monowarstw utworzonych z cząsteczek fosfolipidów zawierających nienasycone łańcuchy acylowe są mniej wrażliwe na zmianę struktury sterolu niż monowarstw zawierających fosfolipidy posiadające łańcuchy nasycone.

Badania właściwości dwuskładnikowych monowarstw fitosterol/PC stanowiły jedynie niewielką część pracy [H4], której tematyka dotyczyła w głównej mierze mieszanin wieloskładnikowych - praca ta zapoczątkowała bowiem cykl publikacji, w których badałam wpływ fitosteroli na modelowe membrany ludzkich erytrocytów. Celem badań przedstawionych w pracy [H4] było porównanie, który z efektów związany z wprowadzeniem fitosterolu do monowarstwy tzn. zastępowanie części cholesterolu w modelowej membranie czy wzrost całkowitej zawartości steroli w monowarstwie spowodowany dodawaniem fitosterolu, silniej modyfikuje właściwości badanego układu. Jak wcześniej wspomniałam zarówno zdolność fitosteroli do wbudowywania się w membrany, np. erytrocytów krwi, jak i wyżej wymienione zmiany w składzie sterolowym błony indukowane wnikaniem fitosterolu, zostały dobrze udokumentowane w literaturze naukowej [16,18-24], jednak nie jest jasne czy i w jakim stopniu zmiany te modyfikują parametry membrany [20,21,23,25,34,35]. Badania podjęte przez mnie w układach modelowych zarówno w pracy [H4] jak i kolejnych pozwoliły odnieść się do tego zagadnienia.

W pracy [H4] model membrany stanowiła monowarstwa utworzona z cząsteczek cholesterolu i fosfatydylocholino (POPC). Lipidy te zmieszane były w stosunku odzwierciedlającym proporcję sterolu do fosfolipidów w membranie ludzkich erytrocytów tzn. cholesterol/POPC = 0.9 [51]. Podczas eksperymentów stopniowo zwiększałam zawartość fitosterolu (β -sitosterolu lub stigmasterolu) w mieszaninie, zachowując równocześnie stałą proporcję cholesterol/POPC. Natomiast w badaniach dotyczących zastępowania cholesterolu przez fitosterol w modelowej błonie stosunek całkowitej zawartości steroli (cholesterol+fitosterol) do POPC pozostawał stały (0,9) zaś stopniowo wzrastało w mieszaninie stężenie fitosterolu kosztem cholesterolu. W obu typach eksperymentów analiza wyników prowadzona była w szerokim zakresie ciśnień powierzchniowych oraz zawartości fitosterolu w monowarstwie. Uzyskane wyniki wykazały, że po wprowadzeniu fitosterolu do modelowej membrany (w obu eksperymentach) składniki monowarstwy mieszają się nieidealnie i korzystnie ze sobą oddziałują. Jednak zarówno kontrakcja powierzchni jak i oddziaływania międzycząsteczkowe zmieniają się w porównaniu do tych w wyjściowym układzie cholesterol/POPC. W przypadku, gdy w układzie proporcja cholesterol/POPC pozostawała stała, powyższy wpływ, przy niskich stężeniach fitosteroli był bardzo słaby i porównywalny dla obu badanych fitozwiązków. Dopiero, gdy zawartość

fitosterolu w mieszaninie osiągnęła 30% (lub więcej) zaobserwowałam silniejszą kondensację i uporządkowanie monowarstw zawierających β -sitosterol w porównaniu do stigmasterolu. Wyniki uzyskane podczas eksperymentów polegających na eliminowaniu cholesterolu przez fitosterole wykazały natomiast, że zastępowanie sterolu zwierzęcego w mieszaninie cholesterol/POPC sterolem roślinnym znacznie silniej zmienia właściwości monowarstwy, nawet przy niskich zawartościach fitozwiązku, aniżeli wzrost całkowitego stężenia steroli. Już wprowadzenie 2% fitosterolu do mieszaniny kosztem cholesterolu powodowało silniejsze obniżenie kondensacji monowarstwy i osłabienie oddziaływań międzycząsteczkowych niż zwiększenie całkowitego stężenia steroli w mieszaninie poprzez wprowadzenie 5% fitozwiązku. W eksperymentach polegających na zastępowaniu cholesterolu fitosterolem różnice w aktywności β -sitosterolu i stigmasterolu ujawniły się już przy niższych ich zawartościach w monowarstwie (10%) i okazało się, że stigmasterol silniej modyfikuje właściwości badanej modelowej membrany niż β -sitosterol. Analiza uzyskanych wyników w kontekście ich aktywności membranowej w organizmie człowieka pozwoliła mi zaproponować, że wpływ fitosteroli na membranę zależy od ich stężenia oraz efektu z jakim wiąże się ich wprowadzenie. Niski wzrost całkowitej zawartości steroli w błonie nie musi wywierać niekorzystnego wpływu na ich funkcjonowanie. Natomiast silny wzrost stężenia tych substancji lub eliminowanie cholesterolu w błonie może skutkować zaburzeniami w jej organizacji. Uzyskane wyniki pozwoliły również sformułować wniosek, że przy niskich zawartościach fitosteroli wpływ obu związków na monowarstwy cholesterol/POPC jest ilościowo podobny, zaś przy wyższych stężeniach stigmasterol silniej modyfikuje właściwości membrany niż β -sitosterol.

W kolejnych latach do badań dotyczących wpływu fitosteroli na membrany włączyłam stanol roślinny tzn. β -sitostanol. Pod względem struktury związek ten różni się od β -sitosterolu tym, że nie posiada w pierścieniu B podwójnego wiązania. Celem moich badań było sprawdzenie w jaki sposób taka modyfikacja strukturalna wpływa na właściwości membranowe związku. Uwzględnienie stanolu roślinnego w prowadzonych przeze mnie eksperymentach wynikało z tego, że w literaturze naukowej brak jest wyników dotyczących oddziaływania tego związku na błony, zarówno naturalne jak i sztuczne. Również dane dotyczące właściwości innych stanoli (np. cholestanolu) publikowane są bardzo rzadko. Z drugiej strony stanole roślinne znajdują się w produktach żywnościowych spożywanych przez człowieka i wykazują jakościowo podobną do fitosteroli aktywność w ludzkim organizmie [17]. Tematyka kolejnych dwóch prac włączonych do cyklu habilitacyjnego [H5, H6] dotyczyła wpływu stanolu roślinnego na lipidowe monowarstwy Langmuira. Celem eksperymentów omówionych w pracy [H5] było sprawdzenie oddziaływania β -sitostanolu na monowarstwy utworzone z następujących fosfolipidów: DSPC, SOPC (1-stearoilo-2—oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina), DOPC, DPPC, DPPE i DPPS (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryna). Taki wybór związków z jednej strony umożliwił mi

przeanalizowanie zależności między strukturą fosfolipidu i jego oddziaływaniami ze stanolem roślinnym, z drugiej zaś, poprzez odniesienie do wyników uzyskanych wcześniej dla mieszanin zawierających β -sitosterol [H1], porównanie właściwości obu fitozwiązków.

Okazało się, że podobnie jak sterole roślinne, również stanol po wprowadzeniu do monowarstwy utworzonej z cząsteczek fosfatydylocholin, powoduje kontrakcję średniej powierzchni na cząsteczkę w monowarstwie (wpływ kondensujący) oraz porządkowanie i „prostowanie” łańcuchów fosfolipidowych (wpływ porządkujący). Wpływ ten w sposób ilościowy zależy od struktury cząsteczki PC i dodatkowo od zawartości stanolu. To znaczy w całym zakresie badanych stężeń najłagodniejszy efekt kondensujący oraz najmniej korzystne oddziaływanie występują w mieszaninach stanol/DOPC. Jest to związane z obecnością wiązania podwójnego o konfiguracji *cis* w łańcuchach fosfolipidu, odpowiedzialnego za zgięcie łańcuchów i utrudniającego oddziaływanie międzycząsteczkowe i kondensację monowarstwy. Jeśli chodzi o pozostałe fosfatydylocholin zawierające 18-węglowe łańcuchy (DSPC vs SOPC), to gdy zawartość stanolu nie przekraczała 30% silniejszy wpływ fitozwiązku obserwowano w przypadku monowarstw zawierających cząsteczki DSPC. Jednak wraz z dalszym wzrostem zawartości stanolu trend ten się zmieniał i jego wpływ na monowarstwy SOPC stawał się silniejszy. Powyższe różnice również determinowane są obecnością podwójnego wiązania *cis* w łańcuchu. W pełni nasycone łańcuchy (DSPC, DPPC) są łatwiej porządkowane przez cząsteczki stanolu, umożliwiają ściśle upakowanie się cząsteczek zwiększając siłę oddziaływań van der Waalsa. Ten korzystny wpływ stanolu na monowarstwy utworzone z fosfatydylocholin zawierających nasycone łańcuchy acylowe osiąga maksimum przy 30% zawartości stanolu w mieszaninie i dalsze dodawanie fitozwiązku, z powodu wysokiej kondensacji i uporządkowania monowarstwy, nie zmienia już tak efektywnie właściwości modelowej membrany.

Wyniki dla mieszanych monowarstw stanolu roślinnego z fosfolipidami posiadającymi łańcuchy C16:0 i różniących się strukturą grupy polarnej tzn DPPC, DPPE, DPPS wykazały, że fitostanol, z termodynamicznego punktu widzenia, najkorzystniej miesza się i oddziałuje z fosfatydylocholinami. Wprowadzenie tego lipidu do monowarstwy zawierającej cząsteczki PC i wynikające z tego separowanie cząsteczek fosfolipidu prowadzi do osłabienia elektrostatycznych sił odpychania pomiędzy cząsteczkami fosfatydylocholin. Ten korzystny efekt przejawia się w ujemnych odchyleniach od idealności, zmniejszeniu powierzchni przypadającej na cząsteczkę (w porównaniu do powierzchni wynikającej z reguły addytywności) oraz silniejszym oddziaływaniu cząsteczek w mieszaninie niż w poszczególnych monowarstwach jednoskładnikowych. Z drugiej strony wprowadzenie stanolu do monowarstwy DPPE lub DPPS jest termodynamicznie niekorzystne, o czym świadczą dodatnie odchylenia od idealnego mieszania obserwowane dla tych układów. Jest to związane ze strukturą polarnych części ich cząsteczek i wynikającej z tego możliwości oddziaływania również poprzez wiązania

wodorowe. Dlatego separacja cząsteczek DPPS lub DPPE wynikająca z wprowadzenia stanolu roślinnego jest mniej korzystna niż w przypadku cząsteczek fosfatydylocholiny. Analiza izoterm oraz zdjęć BAM wykazała jednak różnice w mieszalności stanolu z DPPE oraz DPPS w monowarstwach. Okazało się, że składniki monowarstwy stanol roślinny/DPPE mieszają się nieidealnie, lecz oddziaływania międzycząsteczkowe są mniej korzystne niż w jednoskładnikowych monowarstwach utworzonych z cząsteczek poszczególnych lipidów. W przypadku monowarstw stanol/DPPS stwierdzone dodatnie odchylenia od idealności wynikają z separacji fazowej niemieszających się cząsteczek w monowarstwie.

W ostatniej części pracy [H5] porównano również wpływu β -sitostanolu i β -sitosterolu na monowarstwy lipidowe, odnosząc się do wyników opublikowanych w pracach [H1,H4]. Okazało się, że oba fitozwiązki korzystniej mieszają się z fosfatydylocholinami niż z DPPE, wykazują efekt kondensujący i porządkujący oraz korzystniej oddziałują z fosfatydylocholinami posiadającymi nasycone łańcuchy acylowe w cząsteczce (DSPC, DPPC) niż tymi, które posiadają łańcuchy nienasycone (DOPC). Ponadto zarówno dla β -sitostanolu jak i β -sitosterolu najsilniejsza kontrakcja powierzchni oraz najkorzystniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe występują przy takiej samej ich zawartości w mieszaninie z poszczególnymi fosfolipidami, a wartości analizowanych parametrów osiągają przy tym składzie monowarstwy podobne wartości. Wszystko to pozwoliło sformułować wniosek, że fitostanol i odpowiadający mu fitosterol podobnie zachowują się w monowarstwach badanych fosfolipidów i modyfikują ich właściwości.

W celu zbadania wpływu stanolu na monowarstwy lipidowe i porównania jego właściwości membranowych z właściwościami sterolu wykonane zostały również eksperymenty z zastosowaniem techniki GIXD. W pracy [H6] technika ta w połączeniu z mikroskopią kąta Brewstera została wykorzystana do zbadania organizacji molekularnej jednoskładnikowych monowarstw utworzonych z cząsteczek stanolu i DPPC oraz mieszanin wybranych na podstawie wyników badań opublikowanych pracy [H5] tzn. mieszaniny, w których dominował fosfolipid (10% stanolu) lub stanol (90% stanolu) oraz mieszaniny, dla której stwierdzono najsilniejszą kontrakcję powierzchni (30% stanolu). Analiza zdjęć uzyskanych z mikroskopu kąta Brewstera pozwoliła prześledzić zmiany morfologii monowarstwy DPPC pod wpływem wprowadzania do niej stanolu w różnych stężeniach. Mimo, że zdjęcia zarejestrowane w zakresie wyższych ciśnień powierzchniowych (30 mN/m) nie wykazały różnic w morfologii monowarstw badanych mieszanin (wszystkie monowarstwy były wysoko skondensowane a zdjęcia wskazywały na homogeniczną strukturę), dyfraktogramy otrzymane z pomiarów GIXD oraz obliczone parametry wykazały, że istnieją różnice w organizacji badanych mieszanin w zależności od ich składu. Wraz ze wzrostem zawartości stanolu zmieniało się nachylenie hydrofobowej części cząsteczek (aż do prostopadłego w stosunku do granicy faz) oraz ich upakowanie (od sieci jednoskośnej do

heksagonalnej), a także rozmiar skondensowanych domen. Analiza danych dla mieszanin wykazała m.in. że powstające w układzie uporządkowane domeny zawierają zarówno cząsteczki stanolu jak i fosfolipidu, ale ich skład zmienia się wraz ze składem monowarstwy. Uzyskane wyniki wykazały również, że cząsteczki stanolu, podobnie jak β -sitosterolu [H3] przy badanym ciśnieniu powierzchniowym upakowane są w sieci heksagonalnej i zorientowane prostopadle do granicy faz. Ostateczny wniosek z powyższych badań był taki, że mimo różnic w strukturze pierścienia stanol i sterol roślinny mają podobną organizację w monowarstwie.

W kolejnych badaniach kontynuowałam eksperymenty, których genezę stanowiły wspomniane wcześniej kontrowersje literaturowe dotyczące wpływu fitosteroli na właściwości membran erytrocytów krwi. W badaniach zaprezentowanych w pracach [H7 i H8] skoncentrowałam się na zależności między składem modelowej membrany a wpływem fitosterolu. Podjęcie badań w tym kierunku wydawało mi się bardzo ważne w świetle udowodnionych naukowo modyfikacji, którym ulega skład lipidowy naturalnej membrany erytrocytów krwi człowieka pod wpływem takich czynników jak choroby (np. anemia sierpowata [38], alkoholizm [52], hypercholesterolemia [53], otyłość [54]), przyjmowanie leków [37], styl życia (np. dieta [36], trening fizyczny [39]), procesy starzenia [55]. Zmiany w składzie lipidowym błony pociągają za sobą zmiany ich parametrów fizykochemicznych, a to z kolei może różnicować wpływ fitosteroli na błony. Można więc postawić tezę, że wpływ fitosteroli na membranę może być determinowany jej składem lipidowym, co tłumaczyłoby wspomniane wcześniej różnice w wynikach badań prowadzonych na erytrocytach pochodzących od różnych dawców. Ja w swoich eksperymentach skoncentrowałam się na zaburzeniach składu membran związanych ze zmianami stężenia cholesterolu w błonie [H7] oraz redystrubucją fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony [H8].

Celem badań przedstawionych w pracy [H7] było sprawdzenie zależności pomiędzy stężeniem cholesterolu w monowarstwie imitującej błonę ludzkich erytrocytów a wpływem β -sitosterolu na jej właściwości w zależności od stężenia fitosterolu w mieszaninie oraz efektu związanego z jego wbudowywaniem się (tzn. zastępowanie cholesterolu vs wzrost stężenia steroli). Zmiany zawartości cholesterolu w membranach erytrocytów występują naturalnie w procesie starzenia [55], ale są również konsekwencją takich zaburzeń jak np. hipercholesterolemia [53], choroby wątroby [56], nowotwory [57], alkoholizm [52], otyłość [54], reumatoidalne zapalenie stawów [58]. Badane przeze mnie monowarstwy utworzone były z cząsteczek reprezentujących główne klasy lipidów występujących w naturalnej błonie erytrocytów ludzkich tzn: cholesterolu, sfingomieliny (SM) oraz fosfatydylocholin (POPC). Proporcja SM/POPC utrzymywana była na stałym poziomie (0,9) i odzwierciedlała proporcje sfingomieliny do fosfatydylocholin w naturalnej membranie [51]. W celu zbadania wpływu fitosterolu na membrany różniące się zawartością cholesterolu, przygotowałam trzy modelowe układy Chol/POPC/SM o różnej

zawartości cholesterolu, do których wprowadzałam β -sitosterol. Uzyskane wyniki wykazały, że składniki wszystkich monowarstw mieszają się nieidealnie, a cząsteczki oddziałują ze sobą bardziej korzystnie aniżeli w jednoskładnikowych monowarstwach. Dane z eksperymentów dotyczących zwiększania całkowitego stężenia steroli w monowarstwach poprzez dodanie fitosterolu, dokładna analiza uzyskanych wyników i porównanie wartości analizowanych parametrów oraz uwzględnienie błędów, którymi są obarczone doprowadziło do konkluzji, że w zakresie badanych zawartości w mieszaninie ($\leq 30\%$), β -sitosterol nie powoduje znaczących zmian w upakowaniu i oddziaływaniach cząsteczek w modelowych układach Chol/POPC/SM.

Silna korelacja pomiędzy stężeniem cholesterolu a wpływem fitozwiązku ujawniła się natomiast w badaniach polegających na eliminowaniu cholesterolu z modelowych membran. W tym przypadku, nawet przy najniższych zawartościach fitozwiązku w układzie, zastępowanie cholesterolu β -sitosterolem powodowało bardzo silne obniżenie kondensacji monowarstw oraz znaczne osłabienie oddziaływań w stosunku do tych występujących w układach Chol/POPC/SM, a wpływ ten był tym silniejszy im większe było stężenie cholesterolu w modelowej membranie. Ponadto zastąpienie cholesterolu prowadziło do obniżenia uporządkowania cząsteczek w monowarstwie (co potwierdziły również zdjęcia BAM). Wyniki te pozwoliły mi zaproponować, że stężenie cholesterolu w modelowej błonie może być jednym z czynników, który różnicuje wpływ fitosterolu na jej właściwości. Analizując te wyniki w szerszym kontekście można powiedzieć, że skład membrany może determinować wpływ fitosterolu na erythrocyty, co zaś może tłumaczyć różnice we wpływie tych związków na komórki pochodzące od różnych dawców.

W kolejnej pracy [H8] badana była zależność między zawartością fosfatydyloseryny w monowarstwie imitującej zewnętrzną membranę ludzkich erythrocytów i wpływem β -sitosterolu na jej właściwości. Jak wiadomo, fosfatydyloseryna kumuluje się naturalnie w wewnętrznej warstwie błony ludzkich erythrocytów i stanowi ok. 15% wszystkich fosfolipidów [51,59]. Zmiany w asymetrii błony ludzkich erythrocytów polegające na gromadzeniu się fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie membrany są charakterystyczne dla procesu starzenia się komórek [60], ale występują również u pacjentów cierpiących np. na niedokrwistość hemolityczną, przewlekłą niewydolność nerek i kamicę nerkową, cukrzycę, hipercholesterolemię i otyłość [61]. Można więc traktować tego rodzaju zaburzenia asymetrii błony (zmiany w dystrybucji PS) jako kolejny z potencjalnych czynników, który może determinować wpływ fitosteroli na membranę. Weryfikacja tej tezy poprzez przeprowadzenie badań w układach modelowych, była celem pracy [H8]. W przeprowadzonych eksperymentach model membrany stanowiła monowarstwa utworzona z cząsteczek głównych lipidów występujących naturalnie w zewnętrznej warstwie ludzkich erythrocytów tzn. sfingomieliny (SM), fosfatdylocholiny (POPC), fosfatdyloetanolaminy (POPE) oraz cholesterolu. Wzajemną

proporcję lipidów w monowarstwie ustaliłam na podstawie danych literaturowych, tak, aby najlepiej odzwierciedlała ona ich stosunek w warstwie zewnętrznej naturalnej membrany [51,59]. Wpływ fitosterolu badany był na 3 modelowe układy, różniące się zawartością fosfatydyloseryny. Monowarstwa Chol/SM/POPC/POPE, pozbawiona fosfatydyloseryny imitowała zewnętrzną warstwę normalnych (zdrowych) erytrocytów, zaś monowarstwy Chol/SM/POPC/POPE/PS (o 5 lub 10% zawartości PS) stanowiły modele zaburzonej zewnętrznej warstwy błony. Do wszystkich modelowych układów dodawany był β -sitosterol w różnych stężeniach. Jak wykazały wyniki uzyskane dla modelowych membran (tzn. mieszanin pozbawionych fitozwiązku), oddziaływania międzycząsteczkowe w tych monowarstwach są tym mniej korzystne i słabsze, a monowarstwa tym słabiej skondensowana i mniej stabilna termodynamicznie, im większe jest stężenie fosfatydyloseryny w układzie. Wpływ ten został wyjaśniony biorąc pod uwagę silne oddziaływania cząsteczek fosfatydyloseryny w monowarstwach jednoskładnikowych. Wyniki te prowadzą do konkluzji, że redystrybucja cząsteczek PS z warstwy wewnętrznej do zewnętrznej membrany może, w naturalnej błonie, powodować wzrost jej płynności. Wniosek ten jest zgodny z wynikami badań prowadzonych na komórkach erytrocytów krwi charakteryzującymi się zaburzeniami asymetrii lipidów [np. 62]. Wprowadzenie fitosterolu do poszczególnych badanych układów modelowych miało wpływ na właściwości monowarstw, ale kierunek obserwowanych zmian zależał silnie od zawartości fosfatydyloseryny w układzie. W przypadku, gdy mieszanina pozbawiona była tego fosfolipidu lub gdy jego zawartość procentowa była równa 5%, wprowadzenie β -sitosterolu powodowało jedynie niewielki wzrost kondensacji monowarstwy w porównaniu do mieszaniny pozbawionej fitosterolu i wpływ fitozwiązku na organizację molekularną monowarstw był raczej niewielki. Przy 10% zawartości fosfatydyloseryny w mieszaninie wprowadzenie fitosterolu znacznie obniżało kondensację monowarstwy i prowadziło do osłabienia oddziaływań międzycząsteczkowych w porównaniu do układu pozbawionego fitosterolu. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że trend zmian powodowanych dodatkiem fitosterolu zależy od zawartości fosfatydyloseryny w monowarstwie i przy stężeniu 10% PS fitosterol powoduje znaczną destabilizację modelowej błony. Silną zależność między wpływem fitosterolu na monowarstwy a stężeniem fosfatydyloseryny ujawniły również zdjęcia zarejestrowane za pomocą mikroskopu kąta Brewstera. W przypadku monowarstw zawierających 10% PS wprowadzenie β -sitosterolu skutkowało tworzeniem się trójwymiarowych struktur; wyraźnie widocznych na zdjęciach. Takich struktur nie zaobserwowano ani na zdjęciach dla mieszanin pozbawionych fitosterolu ani dla monowarstw zawierających 5% PS w obecności fitosterolu. Tworzenie się trójwymiarowych struktur obserwowanych na zdjęciach BAM dla monowarstwy zawierającej 10% PS i 10% fitosterolu został wyjaśniony możliwością tworzenia się krystalitów w mieszaninie z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność steroli w środowisku lipidowym (*ang. solubility limit*). Uzyskane

wyniki pozwoliły zasugerować, że w przypadku badanych monowarstw obecność fosfatydyloseryny może obniżać granicę rozpuszczalności steroli (chol+ β -sito) w mieszaninie badanych lipidów.

Eksperymenty przeprowadzone w ramach pracy [H8] dostarczyły również nowych niezwykle ciekawych wyników na temat wpływu zwiększania całkowitego stężenia steroli związanego z dodawaniem fitosterolu na właściwości monowarstwy lipidowej. Wcześniej prowadzone przeze mnie badania [H4 i H7] wykazały, że zwiększenie zawartości steroli w monowarstwie poprzez dodanie $\leq 10\%$ β -sitosterolu wywołuje jedynie niewielkie zmiany w organizacji modelowej membrany. Wyniki uzyskane w pracy [H8] potwierdzają ten wniosek, ale jedynie w przypadku, gdy monowarstwa nie zawierała fosfatydyloseryny lub gdy stężenie tego fosfolipidu nie przekraczało 5%. Przy większym stężeniu fosfatydyloseryny wpływ zwiększenia stężenia steroli w monowarstwie pod wpływem dodatku fitosterolu zaznaczał się wyraźnie już przy niskich zawartościach fitozwiązku.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że skład modelowej błony może silnie determinować wpływ fitosterolu na jej właściwości. Dlatego w kolejnych eksperymentach [H9] skoncentrowałam się na zbadaniu wpływu fitozwiązku na monowarstwę imitującą składem wewnętrzną warstwę błony ludzkich erytrocytów, która różni się znacznie składem od warstwy zewnętrznej, co w świetle wcześniej uzyskanych wyników pozwala przypuszczać, że wpływ fitozwiązku na obie warstwy błony może być różny. Do badań wybrałam β -sitostanol, który zgodnie z wynikami wcześniejszych eksperymentów, wykazuje podobne właściwości membranowe jak β -sitosterol, zaś jako model wewnętrznej warstwy błony ludzkich erytrocytów traktowałam monowarstwę utworzoną z cząsteczek 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy (POPE), 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryny (POPS) oraz cholesterolu. Wyżej wymienione lipidy reprezentują główne, pod względem zawartości procentowej klasy lipidów w wewnętrznej warstwie błony czerwonych krwinek i w badanej monowarstwie występowały w proporcji odpowiadającej proporcji tych lipidów w tej części membrany czerwonych krwinek. Celem podjętych eksperymentów było zbadanie wpływu β -sitostanolu na monowarstwę POPE/POPS/Cholesterol, porównanie wpływu zastępowania cholesterolu w tej mieszaninie fitostanolem z wpływem wynikającym ze wzrostu całkowitego stężenia steroidów w monowarstwie i wreszcie porównanie wpływu fitozwiązków (sterolu vs stanolu roślinnego) na monowarstwy imitujące odpowiednio zewnętrzną i wewnętrzną warstwę błony. W pierwszej fazie badań analizowałam wpływ stanolu roślinnego na monowarstwy utworzone z cząsteczek POPE oraz POPS w układach dwuskładnikowych – mieszaniny te nie były wcześniej badane, a ponadto analiza ich właściwości była niezbędna do przeprowadzenia prawidłowej interpretacji wyników dla mieszanin wieloskładnikowych. Badania wykazały, że wprowadzenie β -sitostanolu do monowarstwy zawierającej cząsteczki

POPE lub POPS jest niekorzystne termodynamicznie i oddziaływania cząsteczek w takiej mieszaninie są słabiej przyciągające aniżeli oddziaływania cząsteczek w poszczególnych monowarstwach jednoskładnikowych, co wynika z niekorzystnego separowania cząsteczek poszczególnych fosfolipidów po wprowadzeniu do monowarstwy cząsteczek stanolu. Dodatkowo na zdjęciach z mikroskopu kąta Brewstera dla mieszanin stanol/fosfolipid zawierających 50% i więcej stanolu wyraźnie widać tworzenie się trójwymiarowych krystalitów, co jest skutkiem ograniczonej rozpuszczalności stanolu w środowisku fosfolipidowym. Z porównania wpływu cholesterolu i stanolu roślinnego na właściwości monowarstwy POPE/POPS wynika, że wprowadzenie sterolu zwierzęcego (cholesterolu) do mieszaniny fosfolipidów POPE/POPS jest bardzo korzystne termodynamicznie i powoduje kondensację monowarstwy. Wpływ stanolu roślinnego na monowarstwę POPE/POPS był znacznie mniej korzystny i dodatkowo przejawiał się w tworzeniu w układzie krystalitów, które nie pojawiały się na zdjęciach dla mieszaniny POPE/POPS/Chol przy takiej samej zawartości cholesterolu. Analiza wyników eksperymentów polegających na zwiększaniu całkowitego stężenia steroidów w mieszaninie POPE/POPS/Chol poprzez dodawanie stanolu roślinnego wykazała silny wpływ fitozwiązku na kondensację (obniżenie) i oddziaływania międzycząsteczkowe (osłabienie) w monowarstwie. Ponadto, już przy 10% lub większej zawartości stanolu w mieszaninie zaobserwowano tworzenie się fazy trójwymiarowej w monowarstwie. Wpływ stanolu roślinnego polegający na obniżeniu kondensacji monowarstwy i osłabieniu oddziaływań cząsteczek oraz tworzeniu krystalitów okazał się być jeszcze silniejszy, gdy wprowadzenie fitozwiązku wiązało się z eliminowaniem cholesterolu z mieszaniny. Na podstawie powyższych wyników sformułowano wniosek, że wprowadzenie stanolu do monowarstwy POPE/POPS/Chol powoduje obniżenie granicy rozpuszczalności steroidów w tej mieszaninie oraz, że β -sitostanol silnie modyfikuje właściwości monowarstwy imitującej wewnętrzną wartość membrany ludzkich erytrocytów a jego wpływ zależy od stężenia w układzie. Uzyskane wyniki porównałam z wynikami badań dotyczących wpływu β -sitosterolu (który posiada podobne właściwości membranowe jak stanol) na monowarstwy wieloskładnikowe utworzone z lipidów występujących głównie w zewnętrznej warstwie błony erytrocytów (POPC/SM/Chol) [H7]. Okazało się, że wpływ fitozwiązku związany ze zwiększaniem stężenia całkowitego steroidów jest silniejszy w kierunku monowarstw POPE/POPS/Chol imitujących wewnętrzną warstwę błony niż monowarstw POPC/SM/Chol – modeli zewnętrznej warstwy błony. Natomiast w obu przypadkach (POPE/POPS/Chol i POPC/SM/Chol) zastępowanie cholesterolu silniej modyfikowało właściwości monowarstwy niż zwiększanie całkowitego stężenia steroidów, ale jedynie w monowarstwie POPE/POPS/Chol prowadziło do tworzenia się krystalitów. Jest to związane z niższą rozpuszczalnością steroidów w środowisku fosfatydyloetanolamin i fosfatydyloseryn niż w obecności sfingomieliny i fosfatydylocholiny.

W kolejnym etapie badań dotyczących wpływu fitosteroli na modelowe membrany lipidowe zwróciłam uwagę na zagadnienia związane z antynowotworowymi właściwościami tych fitozwiązków. Jak wykazano, β -sitosterol posiada zdolność do hamowania wzrostu i promowania apoptozy różnych linii komórek nowotworowych (np. piersi, prostaty, okrężnicy i żołądka) [11-13,63]. W toku badań ujawniono, że sterol ten wywołuje szereg zmian we właściwościach i funkcjonowaniu komórki nowotworowej [11,13,63], a ważnym etapem w mechanizmie antynowotworowego działania tego fitozwiązku jest jego wnikanie do membrany komórkowej i wynikające z tego modyfikacje w jej składzie i strukturze [11,12,64]. Komórki nowotworowe wykazują jednak zróżnicowaną wrażliwość na działanie β -sitosterolu, np. β -sitosterol jest znacznie skuteczniejszy w niszczeniu komórek nowotworowych piersi i okrężnicy niż prostaty i żołądka [11-13, 63,64]. Biorąc pod uwagę wcześniej omówione przeze mnie wyniki, wskazujące że wpływ β -sitosterolu na błony komórkowe może zależeć od ich składu można zasugerować, że różnice w składzie lipidowym membran komórek nowotworowych mogą leżeć u podstaw selektywności tego fitozwiązku. Analizując dane dotyczące profilu lipidowego błon komórek gruczolakoraków (*adenocarcinoma*) żołądka, okrężnicy i piersi, które charakteryzują się różnym stopniem wrażliwości na działanie β -sitosterolu, można stwierdzić, że cholesterol i fosfolipidy oraz sfingomielina i fosfatydylocholina występują w nich w podobnej proporcji [np. 65], zaś membrany te różnią się w charakterystyczny sposób zawartością nasyconych i nienasyconych łańcuchów *acylowych* w cząsteczkach fosfolipidów tzn. komórki nowotworów piersi posiadają procentowo najniższą, komórki nowotworów okrężnicy nieco wyższą i wreszcie komórki nowotworów żołądka najwyższą zawartość nasyconych łańcuchów *acylowych* w cząsteczkach fosfolipidów [np. 65]. Powyższe stało się genezą badań, które prowadziłam w ramach pracy [H10]. Celem badań było porównanie wpływu β -sitosterolu na monowarstwy cholesterol/fosfatydylocholina/gangliozyd GM3 (chol/PC/GM3), różniące się strukturą łańcuchów hydrofobowych w cząsteczce fosfatydylocholiny (DSPC vs SOPC vs DOPC) a przez to stopniem upakowania cząsteczek w monowarstwie. Uzyskane wyniki w połączeniu z wynikami poprzednich eksperymentów umożliwiły mi przeprowadzenie szczegółowej analizy zależności między płynnością monowarstwy a wpływem β -sitosterolu.

Analiza wyników wykazała, że istnieje zależność pomiędzy strukturą części hydrofobowej cząsteczki fosfatydylocholiny a wpływem β -sitosterolu na monowarstwy cholesterol/PC/GM3. Chociaż w sensie jakościowym wpływ zastępowania cholesterolu fitosterolem oraz zwiększania stężenia steroli w monowarstwie zgodny był z wcześniej otrzymanymi wynikami to jednak ilościowo efekt ten zależny był od struktury fosfatydylocholiny w modelowej błonie. Okazało się, że eliminowanie cholesterolu i zastępowanie go fitosterolem, prowadzące do osłabienia oddziaływań międzycząsteczkowe oraz destabilizacji układu, zaznacza się silniej w przypadku monowarstwy, która zawierała fosfolipid posiadający dwa nienasycone łańcuchy (DOPC). Z

drugiej strony wpływ fitosterolu związany ze wzrostem całkowitego stężenia steroli w monowarstwie był silniejszy, gdy mieszanina zawierała fosfatydylocholinę posiadającą w pełni nasycone łańcuchy (DSPC). Wyniki te interpretowałam odnosząc się do danych literaturowych opublikowanych wcześniej dla dwuskładnikowych monowarstw sterol/fosfatydylocholina.

Ponieważ wpływ β -sitosterolu, polegający na zastępowaniu cholesterolu w membranie zaobserwowano w badaniach na komórkach nowotworów okrężnicy i piersi [66,67] uzasadnione jest analizowanie uzyskanych wyników również w kontekście antynowotworowej aktywności fitozwiązku. Stwierdzona w eksperymentach przedstawionych w pracy [H10] zależność, polegająca na tym, że przy danej zawartości cholesterolu w monowarstwie Chol/PC/GM3 zastąpienie go fitosterolem silniej modyfikuje właściwości monowarstwy bardziej płynnej (zawierającej DOPC) wydaje się być zgodna z tendencją ujawnioną w badaniach biologicznych tzn. większą efektywnością β -sitosterolu w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych, które w błonach posiadają więcej fosfolipidów zawierających nienasycone łańcuchy.

Niezwykle ważnych i ciekawych wniosków dostarczyła analiza powyższych wyników w kontekście zależności między płynnością monowarstwy a wpływem zastępowania cholesterolu β -sitosterolem. Wyniki opublikowane wcześniej [H7] wykazały, że β -sitosterol tym silniej modyfikuje właściwości monowarstw cholesterol/POPC/SM im większe jest stężenie cholesterolu w mieszaninie. Na tej podstawie można więc wnioskować, że im bardziej skondensowana jest monowarstwa tym silniejszy wpływ zastępowania w niej cholesterolu fitosterolem. Jednak w świetle wyników uzyskanych w pracy [H10] wniosek ten jest błędny – wpływ β -sitosterolu na silniej skondensowane monowarstwy Chol/DSPC/GM3 były słabszy niż na bardziej płynne monowarstwy Chol/DOPC/GM3. Dowodzi to, że wpływ zastępowania cholesterolu fitosterolem na właściwości monowarstwy nie zależy od płynności monowarstwy *per se*, lecz od jej składu. Szczegółowa analiza tych wyników, w odniesieniu do badań przeprowadzonych w pracy [H4] pozwoliła mi zasugerować, że szczególne znaczenie w kontekście wpływu β -sitosterolu na modelową membranę ma stężenie cholesterolu.

Badania w kierunku szeroko pojętej aktywności fitosteroli w membranach komórek nowotworowych kontynuowałam w ramach kolejnej publikacji [H11], w której modelowe membrany składały się z głównych komponentów domen lipidowych zidentyfikowanych w błonach komórek nowotworowych piersi tzn. cholesterolu, sfingomieliny, gangliozydu GM3 (chol/SM/GM3) [68]. Ze względu na kluczową rolę domen z punktu widzenia wzrostu, rozwoju i rozprzestrzeniania się komórek zmienionych nowotworowo [69], struktury te traktuje się jako miejsce ataku (*ang. target*) w terapii antynowotworowej [69-71]. W badaniach poświęconych zagadnieniu zmian w organizacji domen i membran wywoływanych usuwaniem z nich cholesterolu, wykazano, że obniżenie stężenia cholesterolu prowadzi do modyfikacji morfologii

komórek nowotworowych oraz wywołuje apoptozę komórkową skutkującą zniszczeniem komórki [np.70-71]. Zmiany w organizacji i składzie lipidowym błony komórki nowotworowej, wynikające z eliminowania cholesterolu, występują również pod wpływem β -sitosterolu. Zmiany te, zidentyfikowane podczas badań na komórkach nowotworowych okrężnicy, piersi oraz prostaty obejmowały nie tylko obniżenie poziomu cholesterolu i zastępowanie go fitosterolem, lecz także spadek zawartości sfingomieliny i równoczesny wzrost stężenia ceramidów w błonie [12,64,66,67]. Powyższe modyfikacje mogą skutkować poważnymi zmianami w organizacji zarówno błony jako całej struktury jak i domen lipidowych. W pracy [H11] podjęłam badania, których celem było sprawdzenie jaki wpływ na właściwości monowarstwy Chol/SM/GM3 wywierają wyżej wymienione modyfikacje jej składu, wywoływane obecnością β -sitosterolu. W pierwszym etapie badań porównywałam właściwości monowarstwy podstawowej Chol/SM/GM3 i monowarstw, w których częściowo (50%) lub całkowicie cholesterol został zastąpiony fitosterolem. Następnie w monowarstwie podstawowej Chol/SM/GM3 oraz dla porównania w monowarstwie β -sito/SM/GM3 zastępowałam częściowo (50%) lub całkowicie cząsteczki SM cząsteczkami ceramidu (Cer). W ostatnim etapie badań porównywałam właściwości monowarstwy podstawowej Chol/SM/GM3 oraz monowarstwy, w której równocześnie 50% cholesterolu oraz 50% SM zastąpiłam odpowiednio β -sitosterolem i ceramidem (Chol/ β -sito/SM/Cer/GM3). W trakcie realizacji tych badań prowadziłam również eksperymenty dla wybranych mieszanin dwuskładnikowych (sterol/GM3, sterol/Cer, SM/GM3, Cer/GM3), co było niezbędne dla prawidłowego przeprowadzenia analizy właściwości monowarstw wieloskładnikowych.

Wyniki powyższych eksperymentów wykazały, że wprowadzenie fitosterolu w miejsce sterolu zwierzęcego w monowarstwie Chol/SM/GM3 prócz tego, że osłabia oddziaływania międzycząsteczkowe, obniża kondensację i stabilność monowarstwy, przejawia się również hamowaniem powstawania skondensowanych domen w mieszaninie, co wyraźnie widać na zdjęciach z mikroskopu kąta Brewstera. Ten sam efekt zaobserwowałam w przypadku badanych przeze mnie mieszanin sterol/GM3, tzn. na zdjęciach BAM dla monowarstwy zawierającej sterol roślinny (β -sito/GM3) nie obserwowałam domen, które pojawiały dla monowarstwy Chol/GM3. Różnice te wynikają ze słabszych właściwości kondensujących sterolu roślinnego w porównaniu do sterolu zwierzęcego. Ciekawych wniosków dostarczyły również wyniki, które otrzymałam podczas badania właściwości dwuskładnikowych monowarstw sterol/Cer = 1:2. Badania takie były wcześniej prowadzone dla monowarstw zawierających cholesterol i wykazały one, że morfologia monowarstwy ściśle zależy od proporcji składników w układzie [72]. Wyniki uzyskane dla monowarstwy Chol/Cer = 1:2, przede wszystkim zdjęcia z mikroskopu kąta Brewstera wykazały, że w monowarstwie powstaje faza bogatsza w cząsteczki ceramidu, która współlistnieje z fazą mieszaną zawierającą obydwa składniki mieszaniny. Zdjęcia otrzymane dla

monowarstwy β -sito/Cer = 1:2 znacznie różniły się od tych zarejestrowanych dla układu chol/Cer. Biorąc pod uwagę różnice w strukturze i właściwościach obu steroli i odnosząc się do wyników badań prowadzonych metodą AFM dla mieszanin Chol/Cer [73] zaproponowałam, że morfologia badanej mieszaniny β -sito/Cer może być podobna do mieszaniny Chol/Cer, ale o niższym stężeniu cholesterolu, a obserwowane na zdjęciach struktury zinterpretowałam jako efekt formowania się fazy krystalicznej składającej się z cząsteczek ceramidu w mieszaninie.

Częściowe lub całkowite zastąpienie sfingomieliny cząsteczkami ceramidu w monowarstwach sterol/SM/GM3 prowadziło do separacji fazowej w układzie. Choć pod wpływem ceramidu drastycznie zmieniała się morfologia obu badanych monowarstw (Chol/SM/GM3 oraz β -sito/SM/GM3), to jednak zależała ona ściśle od rodzaju sterolu w mieszaninie. Najsilniejsze zmiany właściwości monowarstwy Chol/SM/GM3 zaobserwowałam przy równoczesnym zastąpieniu 50% cholesterolu β -sitosterolem i 50% SM - ceramidem (Chol/ β -sito/SM/Cer/GM3). Dla tej mieszaniny w szerokim zakresie ciśnień powierzchniowych na zdjęciach BAM pojawiały się współistniejące ze sobą różnorodne struktury formujące się w obrębie monowarstwy tzn. homogeniczną fazę skondensowaną, skondensowane domeny oraz krystaliczne domeny 3D, których ilość wzrastała podczas kompresji monowarstwy.

Ponieważ badane w niniejszej pracy modyfikacje w składzie lipidowym monowarstwy (tzn. częściowe zastąpienie cholesterolu - fitosterolem przy równoczesnym obniżeniu zawartości sfingomieliny i wzroście stężenia ceramidów) odzwierciedlały zmiany zidentyfikowane pod wpływem wprowadzenia fitosterolu do membrany komórki nowotworowej, uprawniony jest wniosek, że obecność β -sitosterolu w naturalnej błonie może znacznie zmieniać jej właściwości fizykochemiczne i morfologię. To zaś pozwala zasugerować, że występująca pod wpływem β -sitosterolu segregacja lipidów w membranach i domenach lipidowych może być niezwykle istotna z punktu widzenia antynowotworowych właściwości fitozwiązku.

W ostatniej z prac prezentowanych w ramach cyklu habilitacyjnego [H12], zajmowałam się badaniem zależności między zawartością plazmalogenu cholinowego (PC-plasm) w monowarstwach chol/POPC/PC-plasm, a wpływem β -sitosterolu i stigmasterolu na te monowarstwy. Plazmalogen cholinowy to lipid posiadający wiązanie eterowo - winylowe w pozycji *sn*-1) traktowany, podobnie jak gangliozydy, jako marker komórek nowotworowych. Stężenie tego związku wyraźnie wzrasta w komórkach nowotworowych (np. tych wrażliwych na działanie fitosteroli), w których stanowi on znaczną część fosfoglicerydów membranowych. Podjęte w ramach pracy [H12] badania były kontynuacją eksperymentów dotyczących zależności między składem membrany a wpływem fitozwiązków na jej właściwości. Ich celem było porównanie oddziaływań fitosteroli i cholesterolu z plazmalogenem w monowarstwach dwuskładnikowych oraz zweryfikowanie wpływu poszczególnych fitosteroli na monowarstwy chol/POPC/PC-plasm o różnej zawartości plazmalogenu. Uzyskane wyniki wykazały, że

wprowadzenie cząsteczek sterolu do monowarstwy utworzonej z cząsteczek plazmalogenu cholinowego (30% sterolu w monowarstwie) jest niekorzystne z termodynamicznego punktu widzenia i prowadzi do tworzenia się trójwymiarowych struktur w obrębie monowarstwy. Wraz ze wzrostem stężenia steroli poprawia się mieszalność składników monowarstwy, ale w przypadku fitosteroli efekt ten zaobserwowano dopiero przy ich 70% zawartości w mieszaninie. Na podstawie uzyskanych wyników, w pracy [H12] zostały porównane oddziaływania steroli z plazmalogenem oraz fosfatydylocholiną i przeanalizowany wpływ wiązania winylowego na mieszalność plazmalogenu ze sterolami. Wyniki wykazały również, że zwiększenie stężenia plazmalogenu cholinowego kosztem fosfatydylocholiny w mieszaninie chol/POPC/PC-plazm silnie destabilizuje monowarstwę i modyfikuje jej morfologię. Częściowe zastąpienie cholesterolu sterolem roślinnym powodowało dalsze zmiany właściwości modelowego układu, ale silniejsze zmiany w organizacji membrany wywoływał β -sitosterol niż stigmasterol, co koreluje z udowodnionymi różnicami we właściwościach antynowotworowych obu fitosteroli. Ponadto, uzyskane wyniki pozwoliły zaproponować, że plazmalogen może różnicować wpływ fitosteroli na membrany (np. komórek zdrowych w porównaniu z nowotworowymi).

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych wynikających z badań przeprowadzonych w cyklu prac habilitacyjnych

Najważniejsze osiągnięcia naukowe oraz wnioski wynikające z badań opublikowanych w cyklu prac habilitacyjnych dotyczące wpływu dwóch fitosteroli tzn. β -sitosterolu i stigmasterolu oraz stanolu roślinnego (β -sitostanolu) na monowarstwy lipidowe można podsumować następująco.

Analiza właściwości dwuskładnikowych monowarstw zawierających poszczególne badane fitozwiązki oraz cząsteczki lipidów błon biologicznych dowiodła, że:

- a) Fitosterole (β -sitosterol i stigmasterol) oraz fitostanol (β -sitostanol) posiadają słabszą, w porównaniu do cholesterolu aktywność membranową.
- b) Badane fitosterole (β -sitosterol i stigmasterol) w porównywalnym stopniu kondensują i porządkują cząsteczki badanych fosfolipidów w monowarstwach, posiadają więc bardzo podobne właściwości membranowe z niewielką jedynie przewagą na korzyść β -sitosterolu.
- c) Różnice we właściwościach porządkujących badanych steroli ujawniają się wyraźniej w przypadku, gdy sterol znajduje się w mieszaninie z fosfolipidem posiadającym nasycone łańcuchy acylowe.

- d) Fitosterol (β -sitosterol) i jego nasycony odpowiednik fitostanol (β -sitostanol) mimo różnic strukturalnych w części pierścieniowej cząsteczki, podobnie zachowują się w monowarstwach badanych fosfolipidów i w podobnym stopniu modyfikują ich właściwości.

Wyniki badań prowadzonych dla monowarstw wieloskładnikowych imitujących naturalne membrany biologiczne wykazały, że:

- e) Wpływ fitozwiązku wynikający z zastępowania cholesterolu w mieszanej monowarstwie lipidowej jest silniejszy niż efekt wynikający ze zwiększania całkowitego stężenia steroli w układzie poprzez dodawanie fitosterolu.
- f) Zarówno wpływ fitozwiązku wynikający z eliminowania cholesterolu jak i zwiększania całkowitego stężenia steroli w monowarstwie silnie zależy od składu modelowej membrany i stężenia fitosterolu.
- g) Stężenie cholesterolu w modelowej błonie, ale nie jej płynność *per se* silnie determinuje wpływ fitosterolu na jej właściwości.
- h) Silniejszy jest wpływ fitozwiązku na monowarstwę imitującą wewnętrzną warstwę błony niż model zewnętrznej warstwy błony, co wiąże się z ograniczoną rozpuszczalnością steroli/stanoli w środowisku lipidowym.
- i) β -sitosterol powoduje wyraźniejsze zmiany w morfologii monowarstw różniących się zawartością plazmalgenu cholinowego niż stigmasterol, co pozwala potraktować plazmalogen cholinowy jako lipid różnicujący wpływ poszczególnych fitosteroli na membrany.
- j) Zmiany wywoływane w składzie lipidowym membran pod wpływem wprowadzenia fitosterolu zidentyfikowane w komórkach nowotworowych znajdują silne odzwierciedlenie w morfologii i właściwościach układów biomimetycznych - występująca pod wpływem β -sitosterolu segregacja lipidów w membranach i domenach lipidowych może być niezwykle istotna z punktu widzenia antynowotworowych właściwości fitozwiązku.

Spis literatury cytowanej w powyższym rozdziale (z wyłączeniem prac stanowiących cykl prac habilitacyjnych)

1. W. Piironen, D. G. Lindsay, T. A. Miettinen, J. Toivo, A.-M. Lampi, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 939.
2. R.A. Moreau, B.D. Whitaker, K.B. Hicks, Prog. Lipid Res. 41 (2002) 457.
3. M.-A. Hartmann, Trends Plant Sci. 3 (1998) 170.

4. R. E. Ostlund, Jr., J. B. McGill, C. M. Zeng, D. F. Covey, J. Stearns, W. F. Stenson, C.A. Spilburg, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2002) E911.
5. M. S. Bosner, L. G. Lange, W. F. Stenson, R. E. Ostlund, Jr., *J. Lipid Res.* 40 (1999) 302.
6. R. E. Ostlund, Jr., *Lipids* 42 (2007) 41.
7. C. A Vanstone, M. Raeini-Sarjaz, W.E Parsons, P.J.H Jones, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 1272.
8. P. J. Bouic, *Drug Discov. Today* 7 (2002) 775.
9. Ch. Shi, F. Wu, J. Xu *J. Bioenerg. Biomembr.* 45 (2013) 301.
10. E. De Stefani, P. Boffetta, A.L. Ronco, P. Brennan, H. Deneo-Pellegrini, J.C. Carzoglio, M. Mendilaharsu, *Nutr. Cancer* 37 (2000) 140.
11. A.B. Awad, M. Chinnam, C.S. Fink, P.G. Bradford, *Phytomedicine* 14 (2007) 747.
12. A.B. Awad, Y.C. Chen, C.S. Fink, T. Hennessey, *Anticancer. Res.* 16 (1996) 2797.
13. A.B. Awad, Y. Gan, C.S. Fink, *Nutr. Cancer* 36 (2000) 74.
14. M. Law, *BMJ* 320 (2000) 861.
15. P. J.H. Jones, S.S. AbuMweis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 12 (2009) 147.
16. A. de Jong, J. Plat, R. P. Mensink, *J. Nutr. Biochem.* 14 (2003) 362.
17. A.K. Gupta, C.G. Savapoulos, J. Ahuja, A.I. Hatzitolios, *Q. J. Med.* 104 (2011) 301.
18. A.M. Ketomaki, H. Gylling, M. Antikainen, M.A. Siimes, T.A. Miettinen, *J. Pediatr.* 142 (2003) 524.
19. P. Child, A. Kuksis, *Lipids* 17 (1982) 748.
20. K.R. Bruckerdorfer, R.A Demel, J. De Gier, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* 183 (1969) 334.
21. W.M.N. Ratnayake, M.R. L'Abbe, R. Mueller, S. Hayward, L. Plouffe, R. Hollywood, K. Trick, *J. Nutr.* 130 (2000) 1166.
22. N. Watanabe, F. Kimura, F. Kojima, Y. Endo, K. Fujimoto, Y. Kikuchi, *J. Oleo Sci.* 54 (2005) 1.
23. H. F. J. Hendriks, E. J. Brink, G. W. Meijer, H. M. G. Princen, F. Y. Ntanos, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 681.
24. P. Pianese, G. Salvia, A. Campanozzi, O. D'Apolito, A. Dello Russo, M. Pettoello- Mantovani, G. Corso, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 47 (2008) 645.
25. M. P. Mora, C. Tourne-Peteilh, M. Charveron, B. Fabre, A. Milon, I. Muller, *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999) 255.
26. T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2004) 459.
27. H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimaki, J. P. Slotte, *J. P. Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 66.
28. Y. Barenholz, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 1.
29. L. S. Vermeer, B. L. de Groot, V. Reat, A. Milon, J. Czaplicki, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 919.

30. X. Xu, R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33540.
31. A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, G. Pabst, *Biophys. J.* 94 (2008) 3935.
32. K. Halling, J. P. Slotte, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 161.
33. C. Bernsdorff, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 10658.
34. P. J. Jones, M. Raeini-Sarjaz, D. J. A. Jenkins, C. W. C. Kendall, E. Vidgen, E. A. Trautwein, K. G. Lapsley, A. Marchie, S. C. Cunnane, P.W. Connelly, *Lipids* 50 (2005) 169.
35. A. de Jong, J. Plat, R. P. Mensink, *Eur. J. Clin. Nutr.* 60 (2006) 985.
36. C. Murray Skeaff, L. Hodson, J.E. McKenzie, *J. Nutr.* 136 (2006) 565.
37. S.A. König, J. Knolle, S. Friedewald, W. Koelfen, E. Longin, T. Lenz, D. Hannak, *Epilepsia* 44 (2003) 708.
38. W.E. Connor, D.S. Lin, G. Thomas, F. Ey, T. DeLoughery, N. Zhu, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 2516.
39. K. Sumikawa, Z. Mu, T. Inoue, T. Okochi, T. Yoshida, K. Adachi, *Eur. J. Appl. Physiol.* 67 (1993) 132.
40. H.P. Fransen, N. de Jong, M. Wolfs, H. Verhagen, W.M. M. Verschuren, D. Lutjohann, K. von Bergmann, J. Plat, R. P. Mensink, *J. Nutr.* 137 (2007) 1301.
41. B. D. McKersie, J. E. Thompson, *Plant Physiol.* 63 (1979) 802. 38
42. H. Yamauchi, Y. Takao, M. Abe, K. Ogino, *Langmuir* 9 (1993) 300 39
43. Y. Su, Q. Li, L. Chen, Z. Yu, *Colloids Surf., A* 293 (2007) 123. 40
44. W-Y. Gao, P. J. Quinn, Z.-W- Yu, *Mol. Membr. Biol.* 25 (2008) 485.
45. W.-Y. Gao, L. Chen, F.-G. Wu, Z.-W. Yu, *Acta Phys. Chim. Sin.* 24 (2008) 1149.
46. G. Orädd, V. Shahedi, G. Lindblom, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1762.
47. L. I. Hellgren, A. S. Sandelius, *Physiologia Plantarum* 113 (2001) 23.
48. M. Y. Berezin, J. M. Dzenitis, B. M. Hughes, S. V. Ho, *Phys.Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 2184.
49. H. Martinez-Seara, T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, R. Reigada, *Biophys. J.* 95 (2008) 3295.
50. J. Aittoniemi, T. Róg, P. Niemel, M. Pasenkiewicz-Gierula, M. Karttunen, I. Vattulainen, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 25562.
51. Y. Yawata, 2003. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
52. M. Parmahamsa, K. Rameswara Reddy, N. Varadacharyulu, *Alcohol Alcohol.* 39 (2004) 110.
53. M. Koter, I. Franiak, K. Strychalska, M. Broncel, J. Chojnowska-Jeziarska, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 205.
54. R. Cazzola, M. Rondanelli, S. Russo-Volpe, E. Ferrari, B. Cestaro, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1846.
55. D. Prisco, P.G. Rogasi, R. Paniccia, R. Abbate, G.F. Gensini, *Angiology* 42 (1991) 316.

56. J.S. Owen, K.R. Bruckdorfer, R.C. Day, N. McIntyre, J. Lipid Res. 23 (1982) 124.
57. A.B. Hendrich, K. Michalak, Curr. Drug Targets 4 (2003) 23.
58. D. Vijayakumar, K. Suresh, S. Manoharan, Ind. J. Clin. Biochem. 20 (2005) 52.
59. S.L. Keller, W.H. Pitcher III, W.H. Huestis, H.M. McConnell, , Phys. Rev. Lett. 81 (1998) 5019.
60. J. Connor, Ch.C. Pak, A.J. Schroit, Biol. Chem. 269 (1994) 2399.]
61. R.F.A. Zwaal, P. Comfurius, E.M. Bevers, , CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 971.
62. S. Kumar, S. S. Daniel, C.M. Agarwal, J. Gupta, J. Biosci. 11 (1987) 543.
63. Y. Zhao, S.K.C. Chang, G. Qu, T. Li, H. Cui, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 5211.
64. A.B. Awad, C.S. Fink, J. Nutr. 130 (2000) 2127.
65. K. Itoh, M. Nakamaru, Lipids 16 (1981) 876.
66. A.B. Awad, R.L. von Holtz, J.P. Cone, C.S. Fink, Y.C. Chen, Anticancer Res. 18 (1998) 471.
67. A.B. Awad, H. Williams, C.S. Fink, J. Nutr. Biochem. 14 (2003) 111.
68. P.A. Corsetto, A. Cremona, G. Montorfano, I.E. Jovenitti, F. Orsini, P. Arosio, A.M. Rizzo, Cell Biochem. Biophys. 64 (2012) 45.
69. I.S. Babina, S. Donatello, I. R. Nabi, A.M. Hopkins (2011). Lipid Rafts as Master Regulators of Breast Cancer Cell Function, Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.), ISBN: 978-953-307-714-7, InTech, 2011.
70. L. Zhuang, J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, J. Clin. Invest. 115 (2005) 959.
71. Y. Chun Li, M. Jung Park, S.K. Ye, Ch.W. Kim, Yong-Nyun Kim, Am. J. Pathol. 168 (2006) 1107.
72. L. Scheffer, I. Solomonov, M.J. Weygand, K. Kjaer, L. Leiserowitz, L. Addadi, Biophys. J. 88 (2005) 3381.
73. E. Sparr, L. Eriksson, J.A. Bouwstra, K. Ekelund, Langmuir 17 (2001) 164.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Okres mojej działalności naukowej obejmuje 13 lat, podczas których przygotowałam pracę magisterską (2002), pracę doktorską (2005) oraz byłam zatrudniona na stanowisku asystenta (2005-2007) i następnie adiunkta (2007 - do chwili obecnej) na Wydziale Chemii UJ. Jestem autorką lub współautorką 44 pełnotekstowych artykułów opublikowanych w czasopiśmie indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (w tym 12 prac będących podstawą procedury habilitacyjnej), 2 artykułów przeglądowych oraz 5 pełnotekstowych prac opublikowanych w materiałach konferencyjnych (pełna lista publikacji znajduje się w załączniku 2a).

Osiągnięcia naukowo-badawcze nie związane z tematyką prac stanowiących podstawę habilitacji omówię dzieląc czas mojej aktywności naukowej na dwa etapy: przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Spis publikacji omawianych w tej części autoreferatu zamieściłam na końcu rozdziału.

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

Moją działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam w roku akademickim 2001/2002 jako studentka V-go studiów magisterskich na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UJ podczas realizacji pracy magisterskiej. Pracę magisterską pt. "Badanie właściwości filmów powierzchniowych adsorbowanych z równomolowych mieszanin surfaktantów kationowych i anionowych" przygotowywałam w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii UJ pod bezpośrednią opieką p. dr D. Góralczyk. Tematyka pracy dotyczyła zagadnień z obszaru fizykochemii powierzchni tzn. rozpuszczalnych monowarstw tworzonych na granicy faz roztwór wodny/powietrze, a wyniki badań uzyskane w trakcie jej realizacji zostały opublikowane w 2003 roku w formie pełnotekstowego artykułu naukowego, którego jestem współautorką [1].

W czerwcu 2002 roku uzyskałam tytuł zawodowy magistra chemii i w październiku 2002 rozpoczęłam Studia Doktoranckie na Wydziale Chemii UJ. Pracę doktorską pt. "Badanie organizacji molekularnej nowych pochodnych amfoterycyny B o obniżonej toksyczności w monowarstwach lipidowych przygotowywałam w Zakładzie Chemii Ogólnej pod kierunkiem p. prof. dr hab. Patrycji Dynarowicz-Łątki. W ramach pracy doktorskiej podjęłam próbę wyjaśnienia mechanizmu obniżonej toksyczności pięciu pochodnych antygrzybiczego antybiotyku polienowego – amfoterycyny B (AmB) poprzez zbadanie właściwości monowarstw tworzonych przez te związki oraz analizę ich oddziaływań z wybranymi lipidami błonowymi tzn. z fosfolipidem i sterolami: cholesterolem – sterolem błon ludzkich i ergosterolem – sterolem błon grzybowych w mieszanych monowarstwach Langmuira. Amfortery cyna B to lek aktywny membranowo, którego mechanizm działania jest związany z powinowactwem do sterolu w błonach komórek grzybowych. Niestety niska selektywność tego leku sprawia, że jest on silnie

toksyczny. Z tego powodu poszukuje się rozwiązań, które mogłyby zwiększyć selektywność leku nie obniżając jego silnych terapeutycznych właściwości. Jedną z dróg jest zmodyfikowanie cząsteczki AmB i synteza nowych pochodnych tej substancji. Takie podejście do rozwiązania problemu toksyczności amfoterycyny B stosowane było przez pracowników zespołu Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej kierowanego przez Pana prof. dr inż. Edwarda Borowskiego, którzy zajmowali się syntezą nowych pochodnych leku i którzy udostępnili je do badań fizykochemicznych w ramach mojej pracy doktorskiej. Tematyka pracy doktorskiej obejmowała zagadnienia z szeroko pojętej chemii fizycznej powierzchni jednak, w odróżnieniu do problematyki pracy magisterskiej, dotyczyła nierozpuszczalnych filmów powierzchniowych (monowarstw Langmuira). Właśnie podczas realizacji pracy doktorskiej miałam okazję zapoznać się z tą metodą badawczą i wykorzystać ją do modelowania błon biologicznych. Wykonane podczas realizacji pracy doktorskiej badania pozwoliły nie tylko dokonać analizy właściwości mieszanych filmów zawierających badane antybiotyki i lipidy lecz również określić zależność pomiędzy sposobem modyfikacji cząsteczki amfoterycyny B (tzn. rodzajem i rozmiarem podstawnika oraz miejscem jego wprowadzenia do cząsteczki AmB) i oddziaływaniami związku ze składnikami błon komórkowych. Na tej podstawie został zaproponowany mechanizm, który może prowadzić do obniżenia toksyczności wybranych pochodnych amfoterycyny B, i w którym znaczącą rolę ogrywają silne oddziaływania leków z fosfolipidami błonowymi. Zebrane podczas realizacji pracy doktorskiej wyniki zostały porównane z wynikami badań biologicznych przeprowadzonych dla wybranych związków. Wszystkie uzyskane w ramach pracy wyniki zostały opublikowane w formie czterech pełnotekstowych artykułów naukowych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu [2-5] oraz jednym pełnotekstowym artykule w materiałach konferencyjnych, a także były prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych. Rozprawę doktorską przygotowałam w ciągu trzech lat studiów doktoranckich i jej publiczna obrona odbyła się w 2005 roku, a praca została wyróżniona przez Radę Wydziału Chemii.

Podczas studiów doktoranckich i realizacji pracy doktorskiej uczestniczyłam również w badaniach nie związanych bezpośrednio z tematyką doktoratu. Umożliwiło mi to zarówno zgłębienie wiedzy dotyczącej aktualnej tematyki badań realizowanych w obszarze fizykochemii powierzchni jak również pozwoliło mi nabrać doświadczenia w planowaniu eksperymentów naukowych, badaniu właściwości cienkich filmów, samodzielnej analizie wyników, przygotowywania prac naukowych. Eksperymenty w których brałam udział dotyczyły właściwości zarówno rozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych filmów powierzchniowych i część z nich wykonałam w ramach kontynuowanej współpracy z Zespołem Fizykochemii Powierzchni Wydziału Chemii UJ, w którym wykonałam wcześniej pracę magisterską.

Tematyka badań, w których w tym czasie uczestniczyłam dotyczyła:

a) Właściwości powierzchniowych szeregu surfaktantów anionowych (alkilosulfoniany sodowe) i kationowych (halogenki alkilopirydyniowe) – celem pracy było dokonanie analizy wpływu długości łańcucha surfaktantu oraz rodzaju i stężenia elektrolitu nieorganicznego na proces adsorpcji tych substancji. W oparciu o uzyskane wyniki przygotowaliśmy pełnotekstowy artykuł, który został opublikowany w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports [6].

b) Analizy właściwości monowarstw jednoskładnikowych utworzonych z cząsteczek tlenku tri-n-oktylo fosfinowego (TOPO) – związku stosowanego do ekstrakcji, rozdzielania i oczyszczania metali. Badaliśmy przebieg izoterm zarejestrowanych w różnych warunkach eksperymentalnych, analizowaliśmy stan i morfologię tworzonych monowarstw oraz wpływ temperatury i siły jonowej na właściwości filmów utworzonych z cząsteczek tego związku. Eksperymenty wykazały, że TOPO posiada bardzo dobre właściwości filmotwórcze i tworzy monowarstwy o wysokiej stabilności. Wyniki te opublikowaliśmy w roku 2005 [7] i stały się one punktem wyjścia do dalszych badań, w których uczestniczyłam już po obronie pracy doktorskiej a dotyczących stabilności i mechanizmu relaksacji monowarstw tego związku i jego selektywnego powinowactwa do jonów metali (uzyskane wyniki omówię w dalszej części rozdziału).

c) Termodynamicznej analizy oddziaływań międzycząsteczkowych składników w mieszanych monowarstwach Langmuira – w ramach tej tematyki badane były właściwości mieszanych filmów oraz analizowane oddziaływania międzycząsteczkowe m.in. szeregu homologicznego bromków dialkilodimetyloamoniowych (DXDAB) ze sterolami oraz z TOPO [8,9]. Uzyskane wyniki umożliwiły dokonanie analizy mieszalności, upakowania oraz oddziaływań cząsteczek w mieszanych filmach o różnej proporcji badanych związków i określenie zależności między długością łańcuchów w cząsteczkach badanych DXDAB i ich oddziaływaniami ze sterolami i z TOPO. Stwierdziliśmy także, że również struktura sterolu, determinująca upakowanie cząsteczek w filmie, ma wpływ na oddziaływania międzycząsteczkowe w badanych mieszanych monowarstwach. Największą selektywność w oddziaływaniu ze sterolami i silne powinowactwo do sterolu błon komórkowych grzybów wykazywał bromek dialkilodimetyloamoniowy zawierający 14-węglowe łańcuchy. Wyniki te są bardzo ważne biorąc pod uwagę przeciwgrzybicze właściwości bromków dialkilodimetyloamoniowych.

Uczestniczyłam również w eksperymentach, których celem było dokonanie analizy oddziaływań fosfatydylocholin różniących się strukturą (stopniem nasycenia) łańcucha hydrofobowego oraz fosfatydyloetanolaminy z cholesterolem. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono

m.in., że zastąpienie grupy cholinowej grupą etanoloaminową w cząsteczce fosfolipidu drastycznie obniża stabilność termodynamiczną mieszanych filmów i wpływa na oddziaływania międzycząsteczkowe. Wyniki zostały opublikowane w formie pełnotekstowej pracy w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports [10].

d) W tym czasie uczestniczyłam również w eksperymentach dla monowarstw utworzonych z semifluorowanego alkanu (F8H14) z uwodornionymi alkoholami o różnej długości łańcucha węglowodorowego (C12, C14, C16). Uzyskane wyniki dowiodły, że cząsteczki w mieszaninie F8H14/C16OH nie mieszają się w filmach powierzchniowych niezależnie od wartości ciśnienia powierzchniowego. Natomiast w przypadku mieszanin zawierających alkohol o krótszym łańcuchu (C12, C14) składniki filmu mieszają się jedynie w zakresie niskich ciśnień powierzchniowych zaś w obszarze wysokich zachodzi separacja fazowa. Na podstawie uzyskanych wyników przygotowana została praca, której jestem współautorką [11].

Sumarycznie mój dorobek naukowy zgromadzony podczas studiów doktoranckich w latach 2002-2005 obejmował 10 pełnotekstowych prac w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (IF = 15,918 wg roku opublikowania pracy) oraz 3 pełnotekstowe prace w materiałach konferencyjnych.

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W październiku 2005 roku, po obronie pracy doktorskiej, zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta na Wydziale Chemii UJ. Moja działalność naukowa w czasie dwuletniej pracy na stanowisku asystenta skoncentrowana była na poznawaniu i rozwijaniu możliwości badawczych jakie daje technika monowarstw Langmuira, poznawaniu technik badania monowarstw oraz sposobów analizy uzyskanych wyników. Przeprowadzone w tym czasie badania oraz ich wyniki w ogromnym stopniu ukierunkowały moją dalszą działalność naukową, w tym wybór tematyki habilitacyjnej.

W tym czasie realizowałam następujące tematy badawcze:

a) analiza właściwości monowarstw alkoholi oraz tlenku tri-n-oktylofosfinowego (TOPO) z zastosowaniem metod pomiaru zmian ciśnienia powierzchniowego oraz potencjału powierzchniowego podczas ich kompresji, mikroskopii kąta Brewstera, pomiarów stabilności. Umożliwiło to nam zbadanie elektrycznych i optycznych właściwości tych filmów, ich grubości, morfologii oraz dokonanie analizy mechanizmu ich relaksacji. Pomiar potencjału powierzchniowego oraz badania z zastosowaniem profesjonalnego mikroskopu kąta Brewstera przeprowadziłam podczas pobytu w University of Santiago de Compostela, Faculty of Pharmacy,

Department of Physical Chemistry w grupie kierowanej przez profesora Jose Minones Trillo. Wyniki tych badań opisane zostały w dwóch pełnotekstowych pracach, których jestem współautorką [12,13]. Eksperymenty dotyczące tlenku tri-n-oktylofosfinowego kontynuowaliśmy w celu zbadania selektywności tego związku w kierunku jonów metali. Wyniki tych badań zostały opublikowane w specjalnym (konferencyjnym) wydaniu czasopisma Thin Solid Films (zał. 2a).

b) Podjęłam badania, którym celem było sprawdzenie czy hipoteza dotycząca mechanizmu obniżonej toksyczności pochodnych AmB zaproponowana przeze mnie na podstawie wyników pracy doktorskiej jest słuszna dla innego antygrzybiczego antybiotyku z tej samej grupy leków. Postanowiłam więc porównać wyniki otrzymane podczas realizacji pracy doktorskiej dla amfoterycyny B i jej pochodnych z właściwościami monowarstw tworzonych przez nystatynę - polien różniący się aktywnością biologiczną od amfoterycyny B. Przeprowadziłam eksperymenty dla filmów jednoskładnikowych tworzonych przez nystatynę oraz jej mieszanin z cholesterolem, ergosterolem oraz fosfolipidami różniącymi się strukturą grupy polarnej oraz łańcucha hydrofobowego. W pierwszym etapie badań szczegółowo analizowałam stabilność monowarstw tworzonych przez nystatynę oraz mechanizm jej desorpcji w przy różnych ciśnieniach powierzchniowych. Okazało się, że właściwości filmotwórcze tego związku są słabsze aniżeli amfoterycyny B, jednak obecność nawet niewielkich ilości lipidu w monowarstwie tego antybiotyku znacznie poprawia jej stabilność, co potwierdziło możliwość prowadzenia dalszych badań dla mieszanych filmów nystatyny z lipidami. Najważniejsza konkluzja wynikająca z badań przeprowadzonych dla monowarstw mieszanych nystatyna-lipid dotyczyła znaczącej roli oddziaływań antybiotyk-fosfolipid dla aktywności biologicznej i selektywności leku, prowadzącej do obniżenia stężenia „wolnego” antybiotyku w membranie. Wyniki te potwierdziły hipotezę zaproponowaną przeze mnie w pracy doktorskiej i zostały opublikowane w cyklu 3 artykułów [14-16].

c) W tym czasie rozpoczęłam badania dotyczące właściwości mieszanych filmów zawierających sterole roślinne i fosfolipidy. Badania te zapoczątkowały cykl eksperymentów, które prowadziłam przez następne lata i których wyniki stanowią podstawę mojego dorobku habilitacyjnego [H1].

d) Uczestniczyłam także w eksperymentach, których celem było zbadanie wpływu chitozanu – biodegradowalnego polimeru wiążącego tłuszcze na monowarstwy lipidowe utworzone z kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nasycenia łańcucha oraz cholesterolu. Analiza

uzyskanych wyników, opublikowanych w pracy [17], umożliwiła zaproponowanie mechanizmu oddziaływań chitozanu z lipidami w monowarstwach Langmuira.

e) Za jedne z najważniejszych, z punktu widzenia mojej dalszej pracy naukowej, uważam eksperymenty dotyczące dystrybucji cholesterolu w membranach oraz wpływu kwasów tłuszczowych na modelowe błony zawierające cholesterol i fosfolipidy, przeprowadzone dla monowarstw trójskładnikowych [18,19]. Wyniki tych badań pozwoliły sformułować ciekawe konkluzje dotyczące postawionych w celu prac problemów (zasugerowano symetryczną dystrybucję cholesterolu pomiędzy obie warstwy membrany komórkowej oraz porównano wpływ kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nasycenia łańcucha, determinującym geometrię cząsteczki na właściwości modelowej błony i na tej podstawie wyjaśniono niską zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w naturalnych membranach). Jednak prace te mają szczególne znaczenie ponieważ w badaniach zastosowaliśmy inne od dotąd wykorzystywanego podejście w zakresie procedury eksperymentalnej i analizy wyników. Polegało ono na przygotowaniu i badaniu monowarstw zawierających trzy składniki i przeprowadzeniu analizy mieszalności oraz termodynamicznej analizy oddziaływań międzycząsteczkowych w tych trójskładnikowych układach. Ilościową analizę właściwości trójskładnikowych filmów przeprowadziliśmy odnosząc właściwości filmów trójskładnikowych do mieszanin dwuskładnikowych stanowiących modelową membranę oraz w odniesieniu do poszczególnych jednoskładnikowych monowarstw tworzonych przez badane substancje. Eksperymenty te uważam za jedne z najważniejszych w dotychczasowej mojej działalności naukowej, ponieważ właściwie do dziś badania dotyczące monowarstw trójskładnikowych obejmują głównie eksperymenty z zastosowaniem technik mikroskopowych (BAM, AFM), zaś termodynamiczną analizę właściwości monowarstw mieszanych prowadzi się głównie dla filmów dwuskładnikowych. Ponadto badania te zapoczątkowały dalsze eksperymenty (w tym badania wchodzące w zakres prac przedstawionych przeze mnie jako podstawa habilitacji), w których do modelowania błon wykorzystywane są jeszcze bardziej złożone pod względem składu (≥ 3 składniki) monowarstwy. Z punktu widzenia wykorzystywania techniki monowarstw Langmuira do modelowania membran badanie właściwości wieloskładnikowych układów ma ogromne znaczenie biorąc pod uwagę niezwykle złożoną strukturę błon, różnorodność lipidów budujących te struktury i różnice w składzie poszczególnych warstw błony. Badanie filmów wieloskładnikowych pozwala dokładniej przybliżyć skład i właściwości membrany, co ma znaczenie w badaniu jej organizacji molekularnej oraz wpływu substancji aktywnych biologicznie na błony. Wyżej wspomniane eksperymenty ukierunkowały moje dalsze badania, które w kolejnych etapach pracy naukowej skoncentrowane były właśnie na wykorzystaniu techniki monowarstw Langmuira do modelowania membran i badaniu wpływu związków

aktywnych membranowo na ich właściwości. Właśnie zastosowanie wieloskładnikowych filmów lipidowych umożliwiło mi przedyskutowanie wielu zagadnień dotyczących aktywności membranowej badanych w ramach rozprawy habilitacyjnej fitozwiązków.

W październiku 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii UJ, gdzie pracuję do dziś. Od tego momentu zaczęłam prowadzić systematyczne badania w zakresie tematyki przedstawionej jako przedmiot rozprawy habilitacyjnej. Cel tych badań oraz ich wyniki zostały przedstawione w poprzednim paragrafie autoreferatu dlatego pominię ich omówienie w niniejszym rozdziale. Oprócz tematów dotyczących wpływu fitosteroli na modelowe membrany uczestniczyłam również w realizacji innych projektów, tzn. badałam wpływ kwasów tłuszczowych na modelowe membrany utworzone z fosfatydylocholin w układach dwu i trójskładnikowych (wyniki opublikowane w *Colloids and Surfaces B* [20]), porównywałam wpływ steroli o różnej strukturze na modelowe membrany (wyniki opublikowane – praca [21]), uczestniczyłam w przygotowaniu przeglądowej pracy dotyczącej możliwości stosowania techniki monowarstw Langmuira do modelowania membran i wykorzystania tej metody w naukach biomedycznych (praca opublikowana w czasopiśmie spoza bazy Journal Citation Reports).

Najszerzy projekt, w którego realizacji uczestniczyłam w tym czasie (prócz tematyki wchodzącej w zakres habilitacji) dotyczył jednak badania mechanizmu antynowotworowej aktywności oraz selektywności edelfozyny (ED) (ET-18-OCH₃; 1-*O*-oktadecylo-2-*O*-metylo-*rac*-glycero-3-phosphocholina). Substancja ta to nowej generacji syntetyczny lek antynowotworowy o strukturze podobnej do fosfolipidu, którego mechanizm działania jest ściśle związany z wnikaniem w błony niektórych komórek nowotworowych. Jak dotąd nie wyjaśniono jednak do końca mechanizmu aktywności edelfozyny i podłoża wysokiej selektywności tego leku. Amfipatyczna struktura tego związku oraz jego działanie na poziomie membranowym pozwalają postawić tezę, że jego aktywność biologiczna (właściwości antynowotworowe oraz selektywność) może być związana ze zróżnicowanym składem membran (np. komórek zdrowych vs nowotworowych) determinującym stopień wnikania w nie leku. Eksperymenty, w których uczestniczyłam dotyczyły badania oddziaływań edelfozyny z syntetyczną sfingomieliną oraz gangliozydem w układach dwuskładnikowych oraz wpływu edelfozyny na monowarstwy zawierające sfingomielinę, cholesterol i gangliozyd w różnym stężeniu. Celem kolejnych badań było sprawdzenie w jaki sposób różnice w organizacji molekularnej (płynności) modelowej błony modyfikują wpływ edelfozyny na monowarstwy imitujące błony komórek zdrowych i nowotworowych oraz zbadanie wpływu leku na organizację molekularną monowarstw sfingomielina/cholesterol imitujących składem rafty lipidowe oraz układu o obniżonej/podwyższonej w stosunku do raftów zawartości cholesterolu. Uczestniczyłam także w eksperymentach, które dotyczyły możliwości zastosowania edelfozyny w połączeniu z

amfoterycyną B w leczeniu zakażeń pasożytniczych. Wyniki wszystkich wyżej omówionych eksperymentów zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports w formie 5 pełnotekstowych prac, których jestem pierwszym autorem [22-26]. Z czasem do badań dotyczących aktywności membranowej edelfozyny włączyliśmy dwa inne lipidy eterowe o strukturze bardzo podobnej do struktury edelfozyny, ale odmiennych właściwościach biologicznych. Celem tych badań realizowanych w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN, którym kierowałam, było m.in. określenie zależności pomiędzy strukturą tych związków a ich działaniem na modelowe membrany. Uzyskane wyniki, analizowane również w kontekście różnic we właściwościach biologicznych tych związków, zostały opublikowane w kolejnych 5 pełnotekstowych artykułach naukowych [27-31]. Ponadto jestem współautorką przeglądowej pracy dotyczącej wpływu edelfozyny na monowarstwy lipidowe opublikowanej w specjalnym wydaniu czasopisma *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*.

Aktualnie uczestniczę w badaniach prowadzonych w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (*Iuventus Plus*), dotyczących steroli, które w membranach występują w niewielkich stężeniach i różnią się aktywnością membranową. Celem projektu jest sprawdzenie jaki wpływ na aktywność membranową tych steroli ma ich struktura oraz skład błony. Wybrane do badań związki nie były badane w tym kontekście lub badano je w sposób niesystematyczny, a publikowane dla poszczególnych steroli wyniki nie są spójne i często nie pozwalają jednoznacznie określić korelacji między strukturą związku a jego aktywnością membranową. Pierwsza praca przygotowana na podstawie przeprowadzonych eksperymentów znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Colloids and Surfaces B*. Ponadto uczestniczę w badaniach dotyczących wpływu auksyn na modelowe membrany. Celem przeprowadzonych dotąd badań było porównanie wpływu naturalnej i syntetycznej auksyny na monowarstwy lipidowe (jednoskładnikowe oraz mieszane imitujące membranę roślinną *Arabidopsis thaliana* oraz zwierzęcą tzn. wątroby szczura) i zweryfikowanie czy istnieje korelacja pomiędzy wpływem tych związków na błonę a ich toksycznością. Uzyskane dotąd wyniki zostały przedstawione w formie dwóch artykułów, z których jeden został opublikowany w czasopiśmie *Environmental Research* [32], zaś drugi znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Environmental Toxicology*. Badane auksyny to hormony roślinne, które intensywnie stosowane w rolnictwie, kumulują się w środowisku i są szkodliwe dla żywych organizmów (zarówno zwierzęcych jak i roślinnych). Uzyskane dotąd wyniki wskazują, że związki te w zależności od stężenia w subfazie silnie modyfikują właściwości monowarstw lipidowych, co pozwala zaproponować, że mechanizm ich toksyczności może być związany z zaburzeniem parametrów membran komórkowych roślin i zwierząt. Wyniki te zachęciły nas do podjęcia dalszych badań, które objęłyby szeroką grupę naturalnych i

syntetycznych regulatorów wzrostu roślin. Staramy się o finansowanie tych badań w ramach projektu badawczego, w którym byłabym głównym wykonawcą.

Mój dorobek publikacyjny po doktoracie tzn. w latach 2006-2014 obejmuje 34 prace w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (IF = 105,475 wg roku opublikowania pracy), 2 artykuły w materiałach konferencyjnych, 2 artykuły przeglądowe

Spis publikacji omówionych w niniejszym rozdziale Autoreferatu:

1. D. Góralczyk, **K. Hąc**, P. Wydro, *Surface properties of the binary mixed systems of alkylpyridinium halides and sodium alkylsulfonates*, Colloids Surf. A, 220 (2003) 55 -60.
2. **K. Hąc-Wydro** P. Dynarowicz-Łątka, J. Grzybowska, E. Borowski, *How does the N-acylation and esterification of amphotericin B molecule affect its interactions with cellular membrane components—the Langmuir monolayer study*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 46 (2005) 7–19.
3. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, J. Grzybowska, E. Borowski, *Interactions of Amphotericin B derivative of low toxicity with biological membrane components—the Langmuir monolayer approach*, Biophys. Chem. 116 (2005) 77– 88.
4. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, J. Grzybowska, E. Borowski, *N-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity*, J. Colloid Interface Sci. 287 (2005) 476–484.
5. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, J. Grzybowska, E. Borowski, *Interactions between amphotericin B 3-(N',N'-dimethylamino) propyl amide and cellular membrane components in Langmuir monolayers*, Thin Solid Films 516 (2008) 1197-1203.
6. D. Góralczyk, **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, *Thermodynamic study of adsorption of homologous anionic and cationic surfactants*, J. Colloid Interface Sci. 277 (2004) 202–205.
7. **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *A study of the properties of tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) monolayers at the air/water interface*, Pol. J. Chem. 79 (2005) 773-781.
8. **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *Interactions between dialkyldimethylammonium bromides (DXDAB) and sterols—a monolayer study*, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005) 504–510.
9. **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *A study of the interaction between dialkyldimethylammonium bromides and tri-n-octylphosphine oxide (topo) in mixed monolayers at the air/water interface*, J. Colloid Interface Sci. 278 (2004) 206–214.

10. P. Dynarowicz-Łątka, **K. Hąc-Wydro**, *Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 37 (2004) 21–25.
11. M. Broniatowski, M. Nieto-Suarez, N. Vila-Romeu, **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Two-dimensional miscibility between a semifluorinated hydrocarbon and hydrogenated alcohols*, Colloids Surf. A, 249 (2004) 3–9.
12. P. Wydro, **K. Hąc-Wydro**, M. Paluch, *Insoluble Amphiphiles at the Air/Water Interface. The Characteristics of Alcohols Monolayers*, Pol. J. Chem., 80 (2006) 2041–2054.
13. P. Wydro, **K. Hąc-Wydro**, *Electrical Properties and Relaxation Behavior of TOPO Monolayers Formed at the Air/Water Interface*, Pol. J. Chem., 81 (2007) 115–127.
14. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action*, Biophys. Chem. 123 (2006) 154–161.
15. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Nystatin in Langmuir monolayers at the air/water interface*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 53 (2006) 64–71.
16. **K. Hąc-Wydro**, J. Kapusta, A. Jagoda, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *The influence of a phospholipid structure on the interaction with polyene antifungal antibiotic – nystatin. A Langmuir monolayers study*, Chem. Phys. Lipids 150 (2007) 125–135.
17. P. Wydro, B. Krajewska, **K. Hąc-Wydro**, *Chitosan as a Lipid Binder: A Langmuir Monolayer Study of Chitosan-Lipid Interactions*, Biomacromol. 8 (2007) 2611–2617.
18. P. Wydro, **K. Hąc-Wydro**, *Thermodynamic Description of the Interactions between Lipids in Ternary Langmuir Monolayers: the Study of Cholesterol Distribution in Membranes*, J. Phys. Chem. B, 111 (2007) 2495–2502.
19. **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, *The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes*, Chem. Phys. Lipids, 150 (2007) 66–81.
20. **K. Hąc-Wydro**, K. Jędrzejek, P. Dynarowicz-Łątka, *Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 72 (2009) 101–111.
21. **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, M. Paluch, *Cholesterol and phytosterols effect on sphingomyelin/phosphatidylcholine model membranes—Thermodynamic analysis of the interactions in ternary monolayers*, J. Colloid Interface Sci. 329 (2009) 265–272.
22. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Effect of edelfosine on tumor and normal cells model membranes—A comparative study*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 76 (2010) 366–369.
23. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *The relationship between the concentration of ganglioside GM1 and antitumor activity of edelfosine—The Langmuir monolayer study*, Colloids Surf. B Biointerfaces, 81 (2010) 385–388.

24. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Searching for the role of membrane sphingolipids in selectivity of antitumor ether lipid–edelfosine*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 81 (2010) 492–497.
25. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, P. Wydro, K. Bąk, *Edelfosine disturbs the sphingomyelin–cholesterol model membrane system in a cholesterol-dependent way – The Langmuir monolayer study*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 88 (2011) 635– 640.
26. **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, R. Żuk, *Langmuir monolayer study toward combined antileishmanian therapy involving Amphotericin B and Edelfosine*, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 14239-14246.
27. **K. Hąc-Wydro**, M. Flasiński, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *Towards the understanding of the behavior of single-chained ether phospholipids in model biomembranes: Interactions with phosphatidylethanolamines in Langmuir monolayers*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 97 (2012) 162 – 170.
28. M. Flasiński, M. Broniatowski, P. Wydro, **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Behavior of platelet activating factor in membrane-mimicking environment. Langmuir monolayer study complemented with grazing incidence X-ray diffraction and Brewster angle microscopy*, *J. Phys. Chem B*, 116 (2012) 10842-10855. Erratum in: *J. Phys. Chem. B*, 117 (2013) 3062–3062.
29. M. Flasiński, **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, M. Broniatowski, P. Dynarowicz-Łątka, *Interactions between single-chained ether phospholipids and sphingomyelin in mixed monolayers at the air/water interface – Grazing incidence X-ray diffraction and Brewster angle microscopy studies*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 111 (2013) 43 – 51.
30. M. Flasiński, P. Wydro, **K. Hąc-Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Cholesterol as a factor regulating the influence of natural (PAF and lysoPAF) vs. synthetic (ED) ether lipids on model lipid membranes*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828 (2013) 2700–2708.
31. M. Flasiński, **K. Hąc-Wydro**, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, *Influence of platelet-activating factor, lyso-platelet-activating factor and edelfosine on Langmuir monolayers imitating plasma membranes of cell lines differing in susceptibility to anti-cancer treatment: the effect of plasmalogen level*, *J. R. Soc. Interface*, 11 (2014) 20131103.
32. M. Flasiński, **K. Hąc-Wydro**, *Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids*, *Environ. Res.* 133 (2014) 123–134.

7. Podsumowanie najważniejszych aspektów aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

Wszystkie aspekty mojej aktywności naukowej, dydaktycznej oraz organizacyjnej zostały szczegółowo przedstawione w załączniku 2a. Poniżej znajduje się jedynie ich krótkie podsumowanie.

Działalność naukowa

- aktywność publikacyjna (spis w zał. 2a)
- uczestnictwo w konferencjach naukowych (spis w zał. 2a)
- kierowanie (2 projekty) i uczestnictwo (2 projekty) w projektach badawczych
- recenzowanie projektów badawczych
- recenzowanie publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym
- uczestnictwo w sieci badawczej

Za działalność naukową otrzymałam m.in. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (2012), Stypendium START (dwukrotnie) przyznane przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej oraz Zespołowe nagrody Rektora UJ (dwukrotnie).

Działalność dydaktyczna

- prowadzenie zajęć laboratoryjnych, konwersatoryjnych oraz seminariów z Chemii Ogólnej i Nieorganicznej dla studentów Ochrony Środowiska, Biologii i Biotechnologii
- opiekun zajęć laboratoryjnych w ramach obowiązkowego kursu Chemia Ogólna i Nieorganiczna dla studentów I roku Ochrony Środowiska (od roku akademickiego 2013-2014)
- koordynator zajęć laboratoryjnych w ramach obowiązkowego kursu Podstawy Chemii dla studentów I roku Ochrony Środowiska (od roku akademickiego 2014-2015)
- promotorstwo prac licencjackich (6 prac) i magisterskich (8 prac) oraz opieka naukowa (2 prace) nad realizacją prac magisterskich studentów kierunków Ochrona Środowiska i Chemia
- Uczestnictwo w przygotowaniu programu zajęć konwersatoryjnych z Chemii Ogólnej i Nieorganicznej dla studentów I-go roku biologii
- przygotowanie i prowadzenie nowego wykładu "do wyboru" dla Studentów kierunku Ochrona Środowiska (studia II-go stopnia)

Za działalność dydaktyczną, w 2012 roku otrzymałam Nagrodę JM. Rektora UJ.

Działalność organizacyjna

- Praca w zespole zajmującym się opracowywaniem danych bibliometrycznych dotyczących dorobku naukowego pracowników wg bazy danych naukowych (Scopus) na potrzeby Wydziału Chemii UJ (lata 2009-2010)

- Współpraca w przygotowaniu planów części pomieszczeń Zakładu Chemii Ogólnej w nowym budynku Wydziału Chemii oraz ich wyposażenia, w tym uczestnictwo w spotkaniach z przedstawicielami firmy realizującej budowę (do lipca 2012)
- Organizacja i prowadzenie seminariów Zakładowych (Zakład Chemii Środowiska)
- Uczestnictwo w przygotowaniu projektu dotyczącego zakupu nowoczesnego mikroskopu kąta Brewstera (a następnie udział w realizacji zakupu urządzenia) w ramach międzywydziałowego projektu pt. *Badanie układów w skali atomowej: nauki ścisłe dla innowacyjnej gospodarki (ATOMIN)* POIG.02.01.00-12-023/08 (Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, działanie 2.1. „Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym”).

Katarzyna Hąc-Wydro