

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Chemii



## **Autoreferat**

Paweł Wydro

Kraków, 2013

## 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 naukowego	4
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
5.2. Publikacje tworzące jednotematyczny cykl publikacji	4
5.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników	7
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	26
7. Pozostałe aspekty działalności naukowej	35
7.1. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych	35
7.2. Uczestnictwo w projektach badawczych	37
7.3. Recenzowanie publikacji naukowych	38
7.4. Staże zagraniczne	38
8. Nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową	38
9. Działalność dydaktyczna	39
10. Działalność organizacyjna	39

### 1. Imię i Nazwisko:

Paweł Wydro

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne

- I.2006            Stopień naukowy doktora nauk chemicznych na podstawie pracy doktorskiej pt.:  
"Badanie wzajemnych oddziaływań składników w adsorpcyjnych filmach mieszanych  
wytworzonych na granicy faz woda/powietrze", Wydział Chemii, Uniwersytet  
Jagielloński.
- VI.2002            Tytuł zawodowy magistra chemii na podstawie pracy magisterskiej pt: „Wpływ stężenia  
i rodzaju elektrolitu na właściwości monowarstw adsorbowanych z równomolowych  
mieszanin zawierających surfaktant anionowy i kationowy.” , Wydział Chemii,  
Uniwersytet Jagielloński.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 2008 – do chwili obecnej            adiunkt (Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydział Chemii UJ)
- 2006 - 2008                                asystent (Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydział Chemii UJ)
- 2002 – 2005                                doktorant (Studia Doktoranckie na Wydziale Chemii UJ)

### 4. Dane bibliometryczne dotyczące dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje 40 pełnotekstowych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports o sumarycznym  $IF_{\text{wg roku opublikowania}} = 111,478$ . Dziewięć z nich ( $IF = 13,804$  wg roku opublikowania pracy) opublikowanych zostało przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, zaś kolejne 31 ( $IF = 97,674$  wg roku opublikowania pracy) po doktoracie w latach 2007-2013. Jako podstawę habilitacji wybrałem cykl 11 artykułów o sumarycznym  $IF = 39,202$ . Ponadto jestem współautorem 4 pełnotekstowych publikacji w materiałach z międzynarodowych konferencji naukowych, a wyniki moich badań były wielokrotnie prezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.

dane bibliometryczne (z dnia 02.03.2013)

wg bazy Scopus:    całkowita liczba cytowań = 259 (bez autocytowań = 234)

                          index Hirscha = 10

wg bazy Web of Science: całkowita liczba cytowań = 232 (bez autocytowań = 209)

                          index Hirscha = 9

**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.):**

**5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

Fizykochemiczna charakterystyka monowarstw zawierających lipidy ludzkich i bakteryjnych błon biologicznych.

**5.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

Prace przedstawione zostały w kolejności ich omawiania w tekście autoreferatu. Współczynnik wpływu (Impact Factor) podany został wg roku opublikowania poszczególnych prac.

**[H1] P. Wydro, S. Knapczyk, M. Łapczyńska, *Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration*, Langmuir 27 (2011) 5433-5444. (IF = 4,186)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, samodzielnym wykonaniu eksperymentów z zastosowaniem mikroskopii kąta Brewstera, wykonaniu części eksperymentów z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**[H2] P. Wydro, *The magnitude of condensation induced by cholesterol on the mixtures of sphingomyelin with phosphatidylcholines-Study on ternary and quaternary systems*, Colloids Surf. B, 82 (2011) 594-601. (IF = 3,456)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

**[H3] P. Wydro, *Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers – analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments*, Colloids Surf. B, 93 (2012) 174– 179. (IF = 3,456)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

**[H4]** P. Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, *Does cholesterol preferentially pack in lipid domains with saturated sphingomyelin over phosphatidylcholine? A comprehensive monolayer study combined with Grazing Incidence X-ray Diffraction and Brewster Angle Microscopy experiments*, J. Colloid Interface Sci. – DOI: 10.1016/j.jcis.2013.01.060 (IF = 3,070)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, samodzielnym wykonaniu eksperymentów z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira i mikroskopii kąta Brewstera, wykonaniu części eksperymentów z zastosowaniem dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, samodzielnej interpretacji wyników badań uzyskanych za pomocą techniki monowarstw Langmuira i mikroskopii kąta Brewstera, współudziale w interpretacji wyników uzyskanych metodą dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

**[H5]** P. Wydro, *The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of humane erythrocytes membrane (DPPE and DPPS) in binary and ternary films-The effect of sodium and calcium ions*, Colloids Surf. B, 82 (2011) 209-216. (IF = 3,456)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

**[H6]** P. Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, *The properties of SOPE/Cholesterol monolayers –studies on domains formation in the inner layer of membrane*. Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes – DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.01.023 (IF = 3,990)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, samodzielnym wykonaniu eksperymentów z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira i mikroskopii kąta Brewstera, wykonaniu części eksperymentów z zastosowaniem dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, samodzielnej interpretacji wyników badań uzyskanych za pomocą techniki monowarstw Langmuira i mikroskopii kąta Brewstera, współudziale w interpretacji wyników uzyskanych metodą dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

**[H7]** 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 (IF = 4,086)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu części eksperymentów, wykonaniu wszystkich obliczeń, współudziale w interpretacji wyników badań, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**[H8]** P. Wydro, *The influence of cholesterol on multicomponent Langmuir monolayers imitating outer and inner leaflet of human erythrocyte membrane*, Colloids Surf. B 103 (2013) 67-74. (IF = 3,456)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

**[H9]** P. Wydro, K. Witkowska, *The interactions between phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamines in model bacterial membranes. The effect of the acyl chain length and saturation*, Colloids Surf. B, 72 (2009) 32-39. (IF = 2,600)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu części eksperymentów, wykonaniu wszystkich obliczeń, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**[H10]** P. Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, *Molecular organization of bacterial membranes lipids in mixed systems – A comprehensive monolayer study combined with Grazing Incidence X-ray Diffraction and Brewster Angle Microscopy experiments*, Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes 1818 (2012) 1745-1754. (IF = 3,990)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, samodzielnym wykonaniu eksperymentów z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira, mikroskopii kąta Brewstera i pomiarów zmian potencjału powierzchniowego, wykonaniu części eksperymentów z zastosowaniem dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, samodzielnej interpretacji wyników badań uzyskanych za pomocą techniki monowarstw Langmuira, mikroskopii kąta Brewstera i pomiarów zmian potencjału powierzchniowego, współdziałanie w interpretacji wyników uzyskanych metodą dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 60 %.*

**[H11]** P. Wydro, *Cardiolipin influences the properties of phosphatidylglycerol/ phosphatidylethanolamine monolayers – Studies on ternary films imitating bacterial membranes*, Colloids Surf. B, 106 (2013) 217– 223. (IF = 3,456)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

### 5.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Literą H oznaczono publikacje odnoszące się do spisu prac podanego w pkt. 5.2

#### Wprowadzenie

Błony biologiczne, zarówno te otaczające komórki (błony komórkowe) jak i te otaczające organelle komórkowe (błony wewnętrzne) stanowią selektywnie przepuszczalne bariery chroniące i oddzielające komórkę od środowiska pozakomórkowego oraz poszczególne organelle od siebie nawzajem. Są one także miejscem, w którym zachodzi szereg procesów gwarantujących prawidłowe funkcjonowanie komórki np. procesy transportowe, związane z przemianą energii czy przesyłaniem sygnałów [1,2].

Zmiany w strukturze i składzie błon biologicznych towarzyszą wielu stanom chorobowym (np. układu krążenia, chorobie Alzheimera, otyłości czy chorobom nowotworowym). Membrany stanowią również pierwszą barierę na drodze różnorodnych bakterii, wirusów i innych patogenów wnikających do wnętrza komórki [3,4]. Z drugiej strony mechanizm działania wielu substancji leczniczych (np. antynowotworowych, bakteriobójczych) związany jest ściśle z ich wbudowywaniem się w błony i modyfikowaniem właściwości membran [3,5,6]. Tak więc, zarówno z punktu widzenia funkcjonowania komórek jak i poznania mechanizmów rozwoju wielu chorób, a także projektowania farmaceutyków skutecznych w ich leczeniu, poznanie struktury i organizacji membran jest bardzo ważnym i od lat realizowanym celem badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych. Ze względu na złożoność budowy i funkcjonowania błon biologicznych badania te prowadzi się często w układach modelowych z wykorzystaniem np. liposomów, czarnych membran lipidowych, membran na stałych podłożach oraz monowarstw lipidowych jako sztucznych układów imitujących różnorodne biomembrany. Naturalne membrany mają strukturę dwuwarstwową i charakteryzują się ogromną różnorodnością składu lipidowo-białkowego, który determinowany jest rodzajem organizmu (np. bakteryjny vs. zwierzęcy), typem komórki (np. wątrobowa vs. nerkowa) i typem membrany (np. mitochondrialna vs. komórkowa). Różnice dotyczą także składu obydwu warstw w obrębie tej samej membrany. Tak np. w przypadku membran komórkowych erytrocytów ssaków rodzaj lipidu oraz jego zawartość jest inna w obrębie warstwy zewnętrznej i wewnętrznej błony [1,2]. Prowadzenie badań w układach modelowych pozwala przygotować sztuczne membrany o składzie znacznie prostszym od tego charakteryzującego błony naturalne i badać wybrane zjawiska zachodzące w obrębie błony (np. oddziaływania lipid-białko, formowanie kanałów jonowych i porów w membranach, tworzenie domen lipidowych). Jakkolwiek każda z metod wykorzystywanych do modelowania błon posiada swoje ograniczenia, to jednak wyniki uzyskiwane z ich zastosowaniem

uzupełniają się wzajemnie, a prowadzone eksperymenty od lat dostarczają nowych informacji na temat organizacji molekularnej membran i zmieniają nasze poglądy na temat budowy tych struktur. Jedną z metod stosowanych z powodzeniem do modelowania błon jest technika monowarstw Langmuira. Technika ta nie pozwala wprowadzić na odzwierciedlenie w modelu biwarstwowej struktury błony, ale umożliwia badanie każdej z warstw membrany oddzielnie i dzięki praktycznie nieograniczonej możliwości manipulowania składem monowarstwy, pozwala zachować asymetrię membrany. Technika monowarstw Langmuira umożliwia przeprowadzenie analizy oddziaływań cząsteczek w monowarstwach, badanie ich upakowania i organizacji na granicy międzyfazowej. W powiązaniu z innymi komplementarnymi technikami badawczymi (np. mikroskopią kąta Brewstera - BAM, mikroskopią fluorescencyjną czy dyfrakcją promieni rentgena – GIXD) dostarcza szczegółowych informacji na temat właściwości badanych filmów, ich morfologii, grubości i możliwości tworzenia domen. Technika ta jest wykorzystywana na przykład do badania oddziaływań lipidów w modelowych membranach, właściwości domen lipidowych, badania mechanizmów działania różnorodnych farmaceutyków oraz szeroko pojętej organizacji molekularnej membran różnego typu. Ponadto wykazano, że w zakresie wysokich ciśnień powierzchniowych właściwości monowarstw i biwarstw lipidowych ściśle ze sobą korelują [7] dlatego wyniki uzyskane dla monowarstw lipidowych mogą być źródłem informacji na temat właściwości struktur dwuwarstwowych.

Jakkolwiek badania dotyczące organizacji membran i ich funkcjonowania prowadzone są od wielu lat, to istnieje szerokie spektrum zagadnień, które albo nie były poddawane weryfikacji eksperymentalnej albo uzyskane wyniki są niekompletne lub/i niespójne, a więc wymagają doprecyzowania i wyjaśnienia. Obserwacja ta stała się motywacją podjętych przeze mnie badań, których celem było przeprowadzenie systematycznej charakterystyki monowarstw lipidowych imitujących ludzkie i bakteryjne błony komórkowe. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań zawarte zostały w pracach opublikowanych w specjalistycznych czasopismach naukowych.

Wyniki badań, które zostały omówione w niniejszym autoreferacie zostały przedstawione w cyklu **11** publikacji, stanowiących podstawę mojej rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej: **„Fizykochemiczna charakterystyka monowarstw zawierających lipidy ludzkich i bakteryjnych błon biologicznych”**. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report o sumaryczny **IF = 39,202** (wg roku opublikowania pracy), w **5** z nich jestem jedynym autorem, w pozostałych zaś głównym autorem korespondencyjnym. Wkład pozostałych Autorów został określony w stosownych oświadczeniach (załącznik 4). Niniejsze opracowanie nie zawiera szczegółowego omówienia wszystkich wyników (takowe znajduje się w tekstach załączonych



publikacji), lecz stanowi przegląd przeprowadzonych badań oraz najważniejsze, sformułowane na ich podstawie wnioski.

### Cel badań i omówienie najważniejszych wyników

Głównym celem moich badań było określenie fizykochemicznych właściwości monowarstw lipidowych będących prostymi modelami odpowiednio; ludzkich i bakteryjnych błon komórkowych, w szczególności zaś: przeprowadzenie analizy oddziaływań pomiędzy składnikami monowarstw, oraz zbadanie ich morfologii i organizacji molekularnej. W prowadzonych eksperymentach, dwu- i wieloskładnikowe lipidowe modele ludzkich i bakteryjnych błon komórkowych, otrzymywałem techniką monowarstw Langmuira. Metoda ta polega na pomiarze zmian ciśnienia powierzchniowego spowodowanych kompresją monowarstw. Zastosowałem ponadto techniki komplementarne takie jak: mikroskopia kąta Brewstera (BAM), pozwalająca na obrazowanie monowarstw *in situ* oraz dyfrakcja synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD, *ang. grazing incidence X-ray diffraction*), umożliwiającą badanie tworzenia się wysokouporządkowanych struktur na granicy międzyfazowej. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły mi na zrealizowanie szeregu celów badawczych, które można najogólniej sformułować w następujący sposób:

- 1) badanie organizacji molekularnej fosfolipidowo-cholesterolowych monowarstw mieszanych oraz dokonanie termodynamicznej analizy wpływu cholesterolu na fosfolipidy zewnętrznej i wewnętrznej warstwy błony komórek ludzkich w układach dwu- i wieloskładnikowych w kontekście porządkującego i kondensującego efektu cholesterolu w zależności od zawartości sterolu i składu lipidowego monowarstwy.
- 2) próba określenia dystrybucji cholesterolu w błonie komórek ludzkich erytrocytów poprzez zbadanie wpływu cholesterolu na upakowanie i uporządkowanie cząsteczek lipidów, ich wzajemne oddziaływanie, a także na morfologię monowarstw fosfolipidowych stanowiących modele odpowiednio zewnętrznej i wewnętrznej warstwy membrany.
- 3) analiza właściwości monowarstw imitujących membrany bakteryjne i badanie ich organizacji molekularnej w kontekście tworzenia się wysokouporządkowanych domen lipidowych.

W przeważającej części eksperymentów monowarstwy Langmuira swym składem imitowały poszczególne warstwy membrany ludzkich erytrocytów. Błona otaczająca czerwone krwinki ssaków jest jedną z najczęściej badanych i stąd najlepiej poznanych błon biologicznych i jej skład jest dobrze opisany w literaturze. Membrana ta charakteryzuje się asymetrią składu lipidowego to znaczy takie fosfolipidy jak fosfatydylocholino (PC) i sfingomielina (SM) skumulowane są w jej zewnętrznej

warstwie zaś fosfatydyloetanolaminy (PE), fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloinozytol (PI) występują głównie w warstwie wewnętrznej. Wymienione fosfolipidy membranowe, różniące się strukturą grupy polarnej, wykazują także duże zróżnicowanie pod względem długości i stopnia nasycenia łańcuchów hydrofobowych w obrębie poszczególnych cząsteczek [2]. Ważnym składnikiem membran ludzkich komórek jest cholesterol, który reguluje płynność i przepuszczalność błony oraz wpływa na jej organizację molekularną. Wprowadzenie cholesterolu do modelowej błony lipidowej i jego oddziaływanie z fosfolipidami powoduje m.in. porządkowanie łańcuchów hydrofobowych fosfolipidów (efekt porządkujący, *ang. ordering effect*), zmniejszenie średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę lipidu (efekt kondensujący, *ang. condensing effect*) oraz ścisłe upakowanie cholesterolu z lipidami posiadającymi nasycone łańcuchy i formowanie się fazy ciekłej uporządkowanej (*lo* – *ang. liquid ordered phase*) w obrębie fazy ciekłej nieuporządkowanej (*ld* – *ang. liquid disordered phase*) [4,8-11]. Lipidy nie są więc jednorodnie rozmieszczone w membranach, lecz tworzą skupiska zwane domenami, których przykładem są tratwy lipidowe (*ang. lipid rafts*) – domeny wzbogacone w cholesterol, sfingolipidy oraz białka. Znacząca rola cholesterolu w regulowaniu parametrów fizykochemicznych membran ssaków powoduje, że wiele uwagi w badaniach naukowych poświęca się analizie wpływu tego związku na modelowe membrany lipidowe. Wciąż jednak pozostaje szereg zagadnień, które wymagają dalszych badań.

W swojej pracy podjąłem badania zmierzające do określenia oddziaływań cholesterolu z lipidami wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony ludzkich erytrocytów w dwu- i wieloskładnikowych mieszanych filmach Langmuira. W pierwszym etapie realizacji tych badań zajmowałem się właściwościami monowarstw utworzonych z cząsteczek cholesterolu i fosfatydylocholin o różnej strukturze części hydrofobowej cząsteczki [H1]. Wydaje się, że jakkolwiek modelowe układy zawierające cholesterol i fosfatydylocholinę są jednymi z najczęściej badanych mieszanin, to jednak wciąż istnieją kwestie dotyczące właściwości tych układów, które nie zostały w pełni wyjaśnione. Celem moich badań było przeprowadzenie termodynamicznej analizy oddziaływań cząsteczek w filmach powierzchniowych oraz porównanie efektu kondensującego i porządkującego cholesterolu na fosfatydylocholinę różniące się strukturą części hydrofobowej w zależności od stężenia sterolu w membranie. Dotąd prowadzone różnymi metodami badania dotyczące tego tematu, wykazały, że cholesterol korzystniej oddziałuje z fosfatydylocholinami zawierającymi w pełni nasycone łańcuchy, jednak eksperymenty prowadzono zazwyczaj w wąskim zakresie stężenia cholesterolu, zaś nieliczne badania uwzględniające również zakres wysokich stężeń cholesterolu w modelowej błonie realizowano zwykle dla jednego bądź dwóch fosfolipidów, często związki pod względem struktury nie były dobrane systematycznie lub analizę wpływu cholesterolu prowadzono jedynie dla wybranych stężeń cholesterolu [9, 12-19]. Przeprowadzone przeze mnie

badania [H1] miały charakter studiów systematycznych, były wykonane z wykorzystaniem tej samej techniki modelowania membran, w tych samych warunkach eksperymentalnych, a związki do badań dobrałem tak, aby było możliwe analizowanie wpływu jednego tylko elementu strukturalnego fosfatydylocholin na efekt wywołany dodawaniem cholesterolu. Porównywałem zatem właściwości mieszanych monowarstw zawierających fosfatydylocholin (PC), które posiadały 18-węglowe łańcuchy (C18:0) i różniły się jedynie ilością jednonienasyconych łańcuchów (C18:1) w cząsteczce: di - C18:0 (1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholina - DSPC), C18:0 - C18:1 (1-stearoilo-2—oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina - SOPC), di- C18:1 (1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina - DOPC). Porównywałem również właściwości układów zawierających fosfatydylocholin posiadające w obrębie cząsteczki jeden jednonienasycony łańcuch osiemnastowęglowy (C18:0) i drugi łańcuch w pełni nasycony, ale różnej długości tzn. C16:0-C18:1 (1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina - POPC) vs. C18:0-C18:1 (1-stearoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina - SOPC). Badania prowadziłem dla 5 dwuskładnikowych układów cholesterol/PC w szerokim zakresie zawartości cholesterolu w filmach. Analiza wyników pomiarów zmian ciśnienia powierzchniowego występujących w trakcie kompresji filmów oraz zdjęć wykonanych za pomocą mikroskopu kąta Brewstera pozwoliły mi szczegółowo przedyskutować wpływ kondensujący i porządkujący cholesterolu na poszczególne fosfatydylocholin i określić zależność między ilością jednonienasyconych łańcuchów w cząsteczce PC a oddziaływaniem cholesterolu w zakresie wysokich ciśnień powierzchniowych (30 mN/m). Eksperymenty wykazały przede wszystkim, że w zakresie niskich zawartości cholesterolu w monowarstwie (do 30%) spełniona jest, wykazana przez innych badaczy zależność, wskazująca że efekt kondensujący sterolu i jego oddziaływania są silniejsze z fosfatydylocholinami zawierającymi w pełni nasycone łańcuchy i słabną wraz z ilością łańcuchów jednonienasyconych w obrębie cząsteczki (DSPC > SOPC > DOPC), jednak w zakresie wyższych stężeń cholesterolu zależność okazała się być inna. Oznacza to, że efekt kondensujący cholesterolu na PC zawierającą w pełni nasycone łańcuchy (DSPC) był znacznie słabszy niż wpływ obserwowany dla pozostałych fosfolipidów. Ponadto wyniki uzyskane dla fosfatydylocholin posiadających jeden i dwa jednonienasycone łańcuchy (SOPC vs DOPC) były w granicy błędu identyczne. Różną zależność pomiędzy strukturą fosfatydylocholin i wpływem kondensującym cholesterolu w zakresie niskich i wysokich jego zawartości w mieszanym filmie wyjaśniłem rozpatrując właściwości monowarstw jednoskładnikowych badanych fosfolipidów i różnice w orientacji (nachyleniu) grup polarnych poszczególnych związków w stosunku do granicy faz oraz zmiany w ich nachyleniu spowodowane dodatkiem cholesterolu. W przypadku fosfolipidów zawierających jeden jednonienasycony łańcuch oraz jeden nasycony, ale różnej długości (SOPC vs POPC) wyniki dowiodły, że silniejszy efekt

kondensujący występuje w przypadku SOPC (o dłuższym łańcuchu), co jest związane z silniejszymi oddziaływaniami typu van der Waalsa.

Analiza uzyskanych wyników, w kontekście efektu porządkującego cholesterolu na badane fosfatydylocholino, wykazała, że wpływ ten jest znacznie silniejszy w przypadku DSPC niż pozostałych fosfolipidów. Początkowo (10% cholesterolu w monowarstwie), dodatek cholesterolu do DSPC zaburzał silnie skondensowaną monowarstwę fosfolipidu, lecz w całym zakresie wyższych stężeń wpływ porządkujący cholesterolu był znacznie silniejszy niż dla pozostałych lipidów ze względu na silniejsze oddziaływania van der Waalsa między lipidami. Ponadto w przypadku fosfatydylocholin zawierających jeden lub dwa jednonienasycone łańcuchy, w zakresie zawartości sterolu do 30% efekt porządkujący był raczej słaby i dodatkowo różnice dla poszczególnych fosfolipidów ujawniały się dopiero, wtedy, gdy cholesterol stanowił co najmniej 30% składu w monowarstwie i był tym silniejszy im więcej nasyconych i dłuższych łańcuchów w cząsteczce. Dla mieszanin równomolowych zależność ta przedstawia się następująco : SOPC > POPC > DOPC. Wyniki te potwierdzają, że efekt ten jest determinowany korzystnymi oddziaływaniami van der Waalsa. W pracy [H1], która dotyczy omawianych powyżej eksperymentów porównałem także wyniki uzyskane w przeprowadzonych przeze mnie badaniach dla monowarstw z wynikami badań uzyskanymi przez innych autorów dla układów biwarstwowych.

Wyniki badań zaprezentowane w pracy [H1] stały się inspiracją dla dalszych eksperymentów dotyczących siły kondensującego i porządkującego efektu cholesterolu w kierunku fosfolipidów zewnętrznej warstwy membrany w zależności od zawartości sterolu w mieszaninie. Kolejne badania, których wyniki znajdują się w pracy [H2] i [H3] dotyczą bardziej złożonych, a mianowicie trój- i czteroskładnikowych monowarstw. Monowarstwy te lepiej oddają skład naturalnych membran i oprócz cholesterolu i fosfatydylocholino (PC) zawierały także sfingomielinę (SM) – drugi pod względem procentowej zawartości fosfolipid zewnętrznej membrany ludzkich erytrocytów. Należy zwrócić uwagę, że modelowe membrany zawierające trzy lub więcej składniki (liposomy, monowarstwy Langmuira) badane są znacznie rzadziej niż układy dwuskładnikowe, a analiza wyników dotyczy głównie mieszalności składników, stanów fazowych błon, rozmiarów i kształtu formowanych domen i ich morfologii. Układy takie (np. SM/PC/Chol) badane są zwykle w kontekście tworzenia w membranach raftów lipidowych. W przypadku monowarstw eksperymenty te prowadzone są zwykle metodami pozwalającymi na ich obrazowanie, bardzo rzadko zaś dokonuje się termodynamicznego opisu oddziaływań międzycząsteczkowych w takich układach, analizy kontrakcji powierzchni wywoływanej dodatkiem cholesterolu i współczynnika ściśliwości, które dostarczają ważnych informacji na temat efektu kondensującego i porządkującego sterolu, płynności modelowej membrany i powinowactwa sterolu do błon o różnym składzie.

W wykonanych przeze mnie badaniach monowarstwy zawierały fosfatydylocholinę i sfingomielinę zmieszane w stałym stosunku odpowiadającym proporcji tych związków w naturalnej membranie ludzkich erytrocytów (SM/PC = 0,9). Do takich monowarstw dodawany był cholesterol w różnej ilości. W eksperymentach zastosowałem te same fosfatydylocholino, które badałem w pracy [H1] – różniły się więc one ilością jednonienasyconych łańcuchów w obrębie cząsteczki (DSPC, SOPC, DOPC) oraz długością nasyconego łańcucha (SOPC vs POPC). Moją intencją było sprawdzenie czy zależności pomiędzy zawartością sterolu i budową fosfatydylocholino a wpływem cholesterolu na modelową membranę ujawnione w badaniach przeprowadzonych dla filmów dwuskładnikowych [H1] będą takie same wtedy, jeśli w monowarstwie obecny będzie dodatkowy lipid. Prócz trójskładnikowych mieszanych filmów SM/PC/Chol [H2,H3] badałem także czteroskładnikową mieszaninę SM/DSPC/DOPC/Chol, w której stosunek DSPC/DOPC odpowiadał proporcji łańcuchów C18:0 i C18:1 w cząsteczkach fosfatydylocholin obecnych w naturalnej membranie. Również w tym przypadku proporcja SM/PC (tutaj PC = DSPC+DOPC) pozostawała stała, równa 0,9.

Na podstawie wyników, które analizowałem zarówno w zakresie wysokich jak i niskich ciśnień powierzchniowych stwierdziłem, że wprowadzenie cholesterolu do mieszanin SM/PC jest korzystne termodynamicznie, a filmy zawierające w pełni nasycone PC są silniej skondensowane niż filmy zawierające w cząsteczkach PC łańcuchy nienasycone. Jednak jedynie w zakresie niskich ciśnień powierzchniowych i stężeń cholesterolu nie przekraczających 30% efekt kondensujący sterolu był silniejszy dla filmów zawierających w pełni nasyconą fosfatydylocholinę (SM/DSPC/Chol), zaś dalszy wzrost zawartości sterolu powodował, że efekt kondensujący przy tym ciśnieniu powierzchniowym stawał się silniejszy dla mieszanin SM/DOPC/Chol. Tylko w takich warunkach ciśnienia powierzchniowego oraz składu monowarstwy wyniki były zgodne z trendem obserwowanym dla układów dwuskładnikowych [H1]. W zakresie wyższych ciśnień powierzchniowych (15 i 32.5 mN/m), niezależnie od zawartości cholesterolu w mieszanej monowarstwie efekt kondensujący był silniejszy dla mieszanin zawierających nienasyconą fosfatydylocholinę (SM/DOPC/Chol). Podczas analizy powyższych wyników odniosłem się do publikowanych przez innych autorów wyników modelowania molekularnego, dotyczących orientacji polarnej głowy PC w stosunku do normalnej membrany w zależności od struktury PC i zmian jej nachylenia pod wpływem cholesterolu [20-22]. Wyniki te wskazują, że PC o krótszych lub/i nienasyconych łańcuchach cechują się większym nachyleniem grup polarnych w stosunku do normalnej membrany niż fosfatydylocholino zawierające dłuższe lub/i nasycone łańcuchy, a wprowadzenie do układu cholesterolu zmienia to nachylenie [20-22]. Równocześnie fosfolipidy, w których kąt nachylenia części polarnej jest większy tworzą monowarstwy o niższej kondensacji i uporządkowaniu łańcuchów. Rozpatrując zakres wyższych ciśnień powierzchniowych mieszana monowarstwa SM/DSPC jest bardziej skondensowana niż SM/DOPC,

co potwierdzają wyniki badań. Oczywiście obecność cząsteczek sfingomieliny powoduje, że kąt nachylenia głowy PC jest inny niż w przypadku jednoskładnikowej monowarstwy jednak można założyć, że jest on większy dla SM/DOPC niż dla SM/DSPC. Dodatek cholesterolu w obu przypadkach powoduje zmianę orientacji grupy polarnej, ale zaznacza się ona wyraźniej dla układu SM/DOPC. Tak więc efekt kondensujący cholesterolu jest silniejszy w przypadku mieszaniny o tym składzie.

Wyniki uzyskane dla monowarstw trójskładnikowych porównałem z tymi dla badanych wcześniej mieszanin dwuskładnikowych. Odnosząc się jedynie do zakresu wyższych ciśnień powierzchniowych, wyniki dla obu typów monowarstw nieco się różnią tzn. w zakresie wyższych zawartości cholesterolu w membranach zarówno dla układów Chol/PC jak i SM/PC/Chol efekt kondensujący cholesterolu jest silniejszy dla mieszanin zawierających nienasyconą PC. W przypadku monowarstw, o ułamku molowym cholesterolu mniejszym lub równym 0,3 efekt kondensujący sterolu jest silniejszy w układzie SM/DOPC niż w monowarstwie SM/DSPC, czyli przeciwnie do wyników uzyskanych dla filmów dwuskładnikowych [H1]. Różnice te można wyjaśnić biorąc pod uwagę, że kontrakcja powierzchni pod wpływem cholesterolu związana jest z takimi efektami jak wzrost upakowania cząsteczek, uporządkowania łańcuchów *acylowych* fosfolipidów i reorientacja ich grup polarnych, które w różnym stopniu determinują końcowy efekt działania cholesterolu. Dokładna interpretacja wyników zamieszczona jest w pracy [H2]. Wyniki te pozwalają sformułować bardzo ważny wniosek, że wpływ cholesterolu na modelową błonę zależy nie tylko od struktury fosfatydylocholiny, lecz determinowany jest również obecnością innych składników (w tym przypadku SM), które wpływają na właściwości modelowej membrany i na organizację molekularną jej składników.

W swoich badaniach porównywałem także właściwości monowarstw SM/SOPC/Chol i SM/POPC/Chol [H3]. Uzyskane wyniki pozwoliły mi stwierdzić, że nieco korzystniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe i wyższą kondensację wykazują mieszaniny zawierające fosfatydylocholinę posiadającą dłuższy łańcuch w pozycji *sn-1*. Równocześnie analiza zdjęć BAM oraz porównanie parametrów obliczonych na podstawie izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie, wykazały, że zarówno morfologia warstw jak i najkorzystniejszy termodynamicznie skład (30% cholesterolu) są takie same dla obu mieszanin (SM/SOPC/Chol i SM/POPC/Chol). Okazało się również, że bardzo podobną kondensację wykazują monowarstwy zawierające 50% cholesterolu. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowałem, że obie mieszaniny to znaczy SM/POPC/Chol oraz SM/SOPC/Chol zawierające 30% sterolu (1:1:1) mogą stanowić model do badania zjawiska powstawania raftów lipidowych (*ang. raft-like mixtures*). Ponadto stwierdziłem, że modelem takim nie mogą być układy utworzone z wyżej wymienionych składników, ale zawierające 50% cholesterolu. Wnioski te sformułowałem odnosząc uzyskane wyniki do wcześniej przeprowadzonych badań w układach dwuskładnikowych.

Ciekawych wyników dostarczyły też eksperymenty, które wykonałem dla monowarstw czteroskładnikowych SM/DSPC/DOPC/Chol [H2]. Okazało się, że efekt kondensujący cholesterolu na monowarstwy SM/DSPC/DOPC jest silniejszy niż dla SM/DSPC, ale słabszy niż dla SM/DOPC. Ponadto w całym zakresie badanych ciśnień powierzchniowych efekt porządkujący cholesterolu w kierunku SM/DSPC/DOPC był podobny jak dla badanych wcześniej SM/DOPC. Oznacza to, że w tym przypadku efekt porządkujący jest silnie determinowany obecnością w mieszaninie fosfatydylocholin posiadającej jednonienasycone łańcuchy (DOPC), która obniża efektywność cholesterolu w porządkowaniu łańcuchów fosfolipidowych (*chain-ordered state*).

Zachęcony uzyskanymi wynikami, kontynuowałem jeszcze w latach następnych badania dotyczące oddziaływań cholesterolu z lipidami zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Genezą kolejnych eksperymentów [H4] były liczne kontrowersje pojawiające się w literaturze naukowej dotyczące powinowactwa cholesterolu do sfingomielin i fosfatydylocholin. Zagadnienie to było dosyć intensywnie analizowane w układach modelowych w kontekście formowania się domen lipidowych. Obecność domen wzbogaconych sfingolipidami i cholesterol (tratwy lipidowe) potwierdzono w naturalnych membranach, zaś w modelowych błonach wykazano możliwość tworzenia się takich domen również w mieszaninach zawierających cholesterol i nasycone fosfatydylocholin [np. 9, 11, 23-25]. Wyżej wspomniane kontrowersje dotyczą przyczyny preferencyjnego formowania się w naturalnych membranach domen sfingolipid/cholesterol nad domenami fosfatydylocholina/cholesterol. Część badaczy postuluje istnienie specyficznych oddziaływań pomiędzy cholesterolu i sfingolipidami, zaś inni autorzy uważają, że oddziaływania te nie są specyficzne, a kluczowe znaczenie dla segregacji lipidów i powstawania domen mają warunki dopasowania hydrofobowego (*ang. hydrophobic matching conditions*) lipidów [25-30].

Celem przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów [H4] było dokonanie szczegółowego porównania wpływu cholesterolu na monowarstwy utworzone z cząsteczek syntetycznej fosfatydylocholin (PC) i sfingomieliny (SM), których cząsteczki zawierały w pełni nasycone łańcuchy hydrofobowe. Analiza właściwości badanych filmów została przeprowadzona w oparciu o parametry wynikające z izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie, zdjęć uzyskanych za pomocą mikroskopu kąta Brewstera oraz parametrów obliczonych na podstawie eksperymentów dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD). Dokładna analiza wyników dla monowarstw jednoskładnikowych DSPC i SSM (N-stearoilo-sfingomielina), ich równomolowej mieszaniny oraz układów, w których stosunek molowy fosfolipidów do cholesterolu wynosił 2:1 i odpowiadał ich proporcji w wysoko-uporządkowanych domenach lipidowych (SSM/Chol 2:1, DSPC/Chol 2:1 oraz DSPC/SSM/Chol 1:1:1) dowiodła, że organizacja molekularna jednoskładnikowych monowarstw badanych lipidów ma



znaczący wpływ na obserwowaną w wynikach badań kontrakcję powierzchni pod wpływem dodatku cholesterolu do badanych monowarstw. Uzyskane z pomiarów GIXD dyfraktogramy pozwoliły wyciągnąć wniosek, że w przeciwieństwie do prostopadle zorientowanych cząsteczek cholesterolu, w jednoskładnikowych monowarstwach DSPC i SSM molekuly te posiadają niezerowy kąt względem normalnej do granicy międzyfazowej (*ang. tilt angle*). Wprowadzenie cholesterolu zarówno do monowarstwy utworzonej z cząsteczek SSM jak i DSPC powoduje, że cząsteczki przyjmują orientację prostopadłą do powierzchni. Ponadto porównanie parametrów obliczonych z danych dyfrakcyjnych dowodzi, że domeny powstające w obu układach mieszanych mają podobne właściwości, a zdjęcia uzyskane przy użyciu mikroskopu BAM wskazują na podobną morfologię badanych filmów, chociaż obserwowany efekt kondensujący cholesterolu okazał się być silniejszy w przypadku filmów zawierających fosfatydylocholinę. Wpływ ten wyjaśniono różnicą w organizacji cząsteczek w jednoskładnikowych monowarstwach utworzonych odpowiednio z DSPC i SSM, porównując kąty odchylenia cząsteczek od normalnej do granicy międzyfazowej w obu fosfolipidowych filmach. Należy jednak podkreślić, że efekt końcowy obecności cholesterolu w przypadku obu monowarstw (SSM i DSPC) jest taki sam – tzn. mają one podobną kondensację, morfologię i w obrębie monowarstw powstają domeny o podobnych właściwościach. Najważniejszy wniosek sformułowany na podstawie przeprowadzonych badań dotyczył tego, że cholesterol jest zdolny w podobnym stopniu do formowania domen z badaną fosfatydylocholiną jak i sfingomieliną i że zdolność ta jest determinowana oddziaływaniami hydrofobowymi cząsteczek. Wyniki te pozostają w zgodności z danymi prezentowanymi przez innych badaczy, którzy nie stwierdzili występowania specyficznych oddziaływań pomiędzy sfingolipidami i cholesterolem.

Wyniki eksperymentów przedstawionych w dwóch kolejnych pracach [H5,H6] dotyczą oddziaływania cholesterolu z fosfolipidami, które w naturalnej membranie ludzkich erytrocytów występują w największej ilości w warstwie wewnętrznej to znaczy fosfatydyloetanolaminą (PE) oraz fosfatydyloseryną (PS) [1,2]. Należy podkreślić, że w porównaniu do liczby eksperymentów prowadzonych w różnych laboratoriach badawczych dla układów zawierających cholesterol i fosfolipidy zewnętrznej warstwy błony (fosfatydylocholinę, sfingomielinę), intensywność badań dotyczących fosfolipidów warstwy wewnętrznej jest znacznie mniejsza. Tymczasem wpływ cholesterolu na cząsteczki PE i PS jest inny aniżeli na cząsteczki PC i SM. Różnice te, determinowane niewątpliwie strukturą polarnych głów omawianych lipidów, dotyczą np. mieszalności, organizacji molekularnej membrany, występowania separacji fazowej. Ponadto część wyników prezentowanych w literaturze jest niespójna, co dodatkowo motywuje do podjęcia badań w tym obszarze tematycznym.



Za cel moich badań postawiłem sobie przeprowadzenie analizy oddziaływań cholesterolu z 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryną (DPPS) i 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanoloaminą (DPPE) o takich samych strukturach części hydrofobowej cząsteczek (to znaczy zawierających w pełni nasycone szesnastowęglowe łańcuchy) w monowarstwach dwuskładnikowych oraz zbadanie wpływu cholesterolu na mieszane filmy DPPE/DPPS, w których stosunek fosfolipidów obliczony na podstawie danych literaturowych, odzwierciedlał ich proporcje w wewnętrznej warstwie błony ludzkich erytrocytów. Badania te wykonałem w fizjologicznej temperaturze (37°C) dla szerokiego zakresu ułamków molowych sterolu w monowarstwach. Oprócz eksperymentów wykonanych na subfazie wodnej przeprowadziłem także badania na roztworach zawierających jony sodu i wapnia – dzięki temu sprawdziłem wpływ wyżej wymienionych jonów na oddziaływania cholesterolu z badanymi fosfolipidami w układach dwu – i trójskładnikowych. Na podstawie uzyskanych wyników zaprezentowanych w artykule [H5] przeprowadziłem analizę wpływu jonów na właściwości monowarstw jednoskładnikowych DPPE i DPPS oraz filmów dwuskładnikowych i trójskładnikowych w kontekście różnic struktury polarnych głów badanych fosfolipidów i ich stanu jonowego w warunkach eksperymentu. W przypadku jednoskładnikowych filmów utworzonych z cząsteczek DPPE oraz mieszanin DPPE/Chol obecność jonów, zarówno sodu jak i wapnia, nie wpływała na właściwości monowarstw w stopniu, który uwidaczniałby się w otrzymanych wynikach. Z drugiej strony wpływ ten był znaczny w przypadku monowarstw zawierających DPPS. Wyniki wykazały, że fosfatydyloseryna, ze względu na zdolność oddziaływania polarnych głów lipidu poprzez wiązania wodorowe, tworzy filmy silnie skondensowane i uporządkowane. Jednak zarówno upakowanie jak i uporządkowanie cząsteczek w monowarstwach jednoskładnikowych ulega osłabieniu w obecności jonów sodu, których obecność prowadzi do ekranowania ładunku na polarnej głowie fosfolipidu i w konsekwencji do osłabienia wiązań wodorowych i może powodować reorientację głów polarnych. Jony wapnia natomiast nie wpływały na uporządkowanie cząsteczek. Obecność jonów sodu i wapnia wpływała także na oddziaływania cząsteczek w mieszaninach DPPS z cholesterolem. Jony sodu w subfazie sprawiały, że oddziaływania cholesterol-DPPS były termodynamicznie bardziej korzystne niż w przypadku monowarstw tworzonych na wodzie, zaś wprowadzenie jonów wapnia powodowało, że oddziaływania lipidów były mniej korzystne od tych występujących zarówno na wodzie jak i w obecności jonów sodu. Wyniki uzyskane dla monowarstw DPPE/DPPS/Chol pozwoliły mi natomiast sformułować wniosek, że fosfatydyloseryna silnie determinuje właściwości badanej membrany, chociaż jej stężenie w monowarstwach było zawsze niższe niż drugiego fosfolipidu (DPPE). Okazało się, że dla wszystkich badanych mieszanin o różnych zawartościach cholesterolu wpływ jonów silnie uwidaczniał się w uzyskanych wynikach. Najkorzystniejsze oddziaływania

występowały dla badanych monowarstw w obecności jonów sodu zaś najmniej korzystne, gdy subfaza zawierała jony wapnia.

Wyniki przedstawione w pracy [H6] stanowią kontynuację powyższych badań i dotyczą właściwości filmów zawierających cholesterol i 1-stearoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolaminę (SOPE). Celem tych badań, przeprowadzonych z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira, mikroskopii kąta Brewstera oraz techniki GIXD było sprawdzenie możliwości tworzenia się domen w mieszaninach Chol/SOPE i określenie ich właściwości w zależności od składu mieszanego filmu. Uzyskane wyniki analizowane były w kontekście tworzenia się wysokouporządkowanych domen w obrębie wewnętrznej warstwy błony. W toku analizy parametrów uzyskanych z izoterm oraz zdjęć BAM dla tych mieszanin okazało się, że w monowarstwach Chol/SOPE może dochodzić do segregacji lipidów. Możliwość tworzenia się domen w tych filmach potwierdziły eksperymenty z zastosowaniem techniki GIXD. Wykazały one, że w mieszanych monowarstwach tworzą się dwa rodzaje domen – tzn. domeny bogatsze w cholesterol i drugie, wzbogacone w fosfolipid. Ilość domen poszczególnego typu zależy od składu filmu, ale, co ciekawe ich stechiometria jest stała niezależnie od proporcji poszczególnych składników w monowarstwie. Właściwości domen w układach Chol/SOPE są więc inne aniżeli tych w mieszaninach zawierających fosfatydylocholino, w przypadku których skład powstających domen zmienia się wraz z zawartością cholesterolu. Analiza tych wyników dostarczyła ważnych informacji na temat organizacji molekularnej wewnętrznej warstwy błony komórkowej ssaków. Pozwoliły one zasugerować, że w wewnętrznej warstwie membrany lipidy mogą ulegać segregacji i tworzyć domeny podobnie jak w warstwie zewnętrznej [H6].

Kolejny temat badawczy, który realizowałem w ramach prac z cyklu habilitacyjnego dotyczył problemu dystrybucji cholesterolu w membranach ludzkich erytrocytów. Jak wcześniej wspomniałem skład membran czerwonych krwinek ssaków jest dobrze opisany w literaturze: dane obejmują takie informacje jak asymetria lipidów w membranie, zawartość różnych klas lipidów w poszczególnych warstwach błony oraz procentowy udział łańcuchów o określonej długości i stopniu nasycenia w obrębie całej błony jak i poszczególnych klasach lipidów [1,2,31]. W literaturze naukowej podawana jest także procentowa zawartość cholesterolu w błonie. Dostępne są także szczegółowe informacje na temat tego jak zmienia się procentowy lipidowy skład membran w konsekwencji różnego typu zaburzeń chorobowych [np. 32,33]. Zagadnieniem, które wydaje się być niewyjaśnionym i wymagającym rozstrzygnięcia jest problem zawartości cholesterolu w poszczególnych warstwach membrany. Wyniki badań, prowadzonych na komórkach lub w układach modelowych w celu zgłębienia tego problemu, są sprzeczne. Część z nich wskazuje, że cholesterol kumuluje się głównie w wewnętrznej warstwie membrany, inni autorzy wskazują na warstwę zewnętrzną, jeszcze inni natomiast postulują symetryczny rozkład tego lipidu pomiędzy

poszczególne warstwy [34-41]. Problem ten, ze względu na bardzo ważną rolę cholesterolu zarówno w funkcjonowaniu komórki jak i regulowaniu parametrów błony, zaintrygował mnie kilka lat temu – pierwsza praca, w której przedstawione zostały wyniki dotyczące tego zagadnienia ukazała się w roku 2007 i zapoczątkowała mój cykl prac habilitacyjnych [H7]. Badania przeprowadzone były w prostych, w kontekście skomplikowanej pod względem składu natury membrany, mieszanych monowarstwach zawierających nasyconą 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholinę (DPPC) i nasyconą 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminę (DPPE), do których w różnej ilości wprowadzany był cholesterol. Stosunek DPPC do DPPE odzwierciedlał proporcję fosfatydylocholin do fosfatydyloetanolamin odpowiednio w zewnętrznej i wewnętrznej warstwie membrany. Badanie zaplanowane były w ten sposób, że w pierwszej ich fazie analizowane były właściwości filmów dwuskładnikowych DPPC/Chol, DPPE/Chol oraz DPPC/DPPE w całym zakresie ułamków molowych, a następnie wpływ cholesterolu na modelowe warstwy membrany. Okazało się, że wpływ cholesterolu na mieszaniny DPPC/DPPE imitujące warstwy błony był porównywalny dla obu badanych układów stanowiących modele wewnętrznej i zewnętrznej warstwy membrany. Wyjaśnienie tego zagadnienia było możliwe na podstawie wyników uzyskanych dla dwuskładnikowych filmów badanych w ramach tej samej pracy. Analiza otrzymanych wyników prowadziła do wniosku, że cholesterol jest prawdopodobnie symetrycznie rozmieszczony pomiędzy obydwie warstwy membrany. Praca [H7] ma dla mnie szczególne znaczenie nie tylko ze względu na tematykę podjętych w niej badań. Jest to także pierwsza publikacja, w której badaliśmy mieszane monowarstwy zawierające więcej niż dwa składniki. Badania dla wieloskładnikowych monowarstw prowadzone są raczej rzadko i zwykle z zastosowaniem takich metod jak mikroskopia kąta Brewstera czy mikroskopia fluorescencyjna, bez termodynamicznej analizy mieszalności i oddziaływań międzycząsteczkowych. Praca ta niewątpliwie zainspirowała moje dalsze badania, w których jako modele membran przygotowywałem monowarstwy trój- a z czasem wieloskładnikowe.

Do tematu dotyczącego dystrybucji cholesterolu w membranie powróciłem w roku 2012, kiedy to przeprowadziłem badania, w których jako modele wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony wykorzystałem monowarstwy zawierające praktycznie wszystkie główne klasy lipidów występujące w poszczególnych warstwach membrany zmieszane w stosunkach odpowiadających ich proporcji w naturalnej błonie [H8]. Do takich modelowych układów wprowadzałem, w różnym stężeniu, cholesterol. Główną motywacją do podjęcia tych badań stanowiło dla mnie to, że wskazany problem, niezwykle ważny, nadal pozostawał nierozstrzygnięty. Ponadto nabyłem doświadczenia w badaniu układów wieloskładnikowych, a wyniki badań przeprowadzonych wcześniej upewniły mnie, że skład monowarstwy (nawet niewielka zawartość danego lipidu) może w znacznym stopniu wpływać na obserwowany efekt sterolu. Termodynamiczna analiza oddziaływań składników w badanych filmach,

analiza ich kondensacji i morfologii (mikroskopia kąta Brewstera), a także dyskusja wyników przeprowadzona w oparciu o dane literaturowe w kontekście oddziaływań poszczególnych lipidów w membranie oraz limitu rozpuszczalności cholesterolu w środowisku lipidowym doprowadziła mnie do wniosku, że cholesterol może być symetrycznie rozmieszczony pomiędzy obie warstwy błony lub kumulować się w jej zewnętrznej warstwie, ale raczej nie preferuje warstwy wewnętrznej. Wyniki te zostały opublikowane w pracy [H8].

W ramach badań przedstawionych w cyklu prac habilitacyjnych zajmowałem się także badaniem organizacji molekularnej modelowych błon bakteryjnych. Tej tematyki dotyczą prace [H9, H10, H11].

Zarówno bakterie *Gram*-ujemne jak i *Gram*-dodatnie posiadają w swej strukturze błonę cytoplazmatyczną (otaczającą komórkę), a bakterie *Gram*-ujemne - dodatkowo błonę zewnętrzną. Błony cytoplazmatyczne różnią się znacznie składem od błon komórek ludzkich ponieważ, zarówno w przypadku błon bakterii *Gram*-ujemnych jak *Gram*-dodatnich występują w nich tylko 3 główne klasy lipidów to znaczy fosfatydyloetanolaminy (PE), fosfatydyloglicerole (PG) oraz kardiolipiny (CL). Wzajemna proporcja lipidów wśród poszczególnych bakterii jest zróżnicowana, jednak ogólnie zawartość PE jest większa u bakterii *Gram*-ujemnych niż *Gram*-dodatnich, które często mają znikomą ilość tego lipidu w membranach [42-45]. Ponadto bakterie mają zdolność do zmieniania składu membrany, np. modyfikują zawartość nasyconych i nienasyconych łańcuchów lipidowych oraz ich długość w obrębie poszczególnych cząsteczek lipidów, dostosowując ją do warunków zewnętrznych, co powoduje dodatkowe zróżnicowanie składu membran [46]. Opisanie właściwości błon bakteryjnych ma, podobnie jak w przypadku membran zwierzęcych, znaczenie poznawcze, ale równocześnie jest szczególnie ważne biorąc pod uwagę, że błona bakteryjna jest miejscem aktywności wielu leków antybakteryjnych. Badanie mechanizmów ich działania oraz ukierunkowane projektowanie nowych leków wymaga dokładnego poznania organizacji membrany. Często jako matryce do badania nowych substancji antybakteryjnych stosuje się układy imitujące membrany np. monowarstwy Langmuira, co dodatkowo stymuluje badania właściwości membran w układach modelowych [47,48].

Celem pierwszego etapu badań, które przeprowadzone zostały dla modelowych membran bakteryjnych było dokonanie analizy mieszalności oraz oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerolem) (DPPG) i fosfatydyloetanolaminami (PE) różniącymi się strukturą łańcuchów węglowodorowych (1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminą - DSPE, 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminą - DPPE, 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminą - DOPE). Badania te wykonane zostały w szerokim zakresie składu monowarstw, a ich analizę przeprowadziłem w całym zakresie ciśnień powierzchniowych – uzyskane wyniki

zaprezentowałem i omówiłem szczegółowo w pracy [H9], a najważniejsze z nich przedstawiają się następująco. W mieszanych filmach zawierających badany fosfatydyloglicerol oraz fosfatydyloetanolaminę posiadające w pełni nasycone łańcuchy hydrofobowe C16:0 (DPPE) lub C18:0 (DSPE) cząsteczki mieszają się w całym zakresie stężeń a ich oddziaływania są korzystne pod względem termodynamicznym. Oddziaływania te są nieco silniejsze w przypadku układu zawierającego PE o dłuższym łańcuchy, co wynika z korzystniejszych oddziaływań van der Waalsa pomiędzy łańcuchami. Korzystny efekt wprowadzenia PE do PG wyjaśniłem biorąc pod uwagę strukturę polarnych głów obu fosfolipidów, ich stan jonowy oraz zdolność do tworzenia między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Silne oddziaływania PG z nasyconymi PE powodują także, że w mieszanych monowarstwach cząsteczki są silniej upakowane i uporządkowane, a łańcuchy *acylowe* ustawione bardziej prostopadle do granicy faz niż w odpowiednich monowarstwach jednoskładnikowych i dodatkowo mieszaniny są bardziej stabilne termodynamicznie. Wyniki uzyskane dla mieszanin zawierających DPPG i DOPE były nieco inne. To znaczy obecność w cząsteczce DOPE dwóch jednonienasyconych łańcuchów *acylowych* osłabia oddziaływania wodorowe pomiędzy tymi fosfolipidami i utrudnia ścisłe pakowanie się molekuł. W konsekwencji monowarstwy DPPG/DOPE okazały się być mniej stabilne, słabiej skondensowane a oddziaływania międzycząsteczkowe mniej korzystne w porównaniu do układów zawierających nasycone fosfatydyloetanolaminy. Uzyskane wyniki wskazują również na możliwość separacji fazowej w mieszaninach DPPG/DOPE. Obserwacja ta pozwoliła mi sformułować wniosek, że w naturalnych membranach bakteryjnych, zróżnicowanych pod względem zawartości lipidów PE i PG i struktury ich łańcuchów węglowodorowych mogą się tworzyć domeny lipidowe zawierające PE i PG w różnej proporcji. Ponadto analiza wyników doprowadziła do wniosku, że PG w membranach bakteryjnych wydaje się pełnić podobną funkcję jak cholesterol w membranach zwierzęcych – zwiększa ich stabilność, reguluje upakowanie i uporządkowanie molekuł i reguluje płynność błony. Wyniki te zachęciły mnie do dalszych badań, których celem było dokonanie bardziej szczegółowej charakterystyki organizacji molekularnej modelowych membran bakteryjnych. Skoncentrowałem się na mieszaninach DPPE/DPPG o różnej proporcji lipidów, a analizę wyników przeprowadziłem w zakresie wysokich ciśnień powierzchniowych w oparciu o pomiary izoterm ciśnienia powierzchniowego oraz zmian potencjału powierzchniowego podczas kompresji monowarstw, zdjęcia uzyskane za pomocą mikroskopu kąta Brewstera na różnych etapach kompresji filmów i pomiary GIXD. Wyżej wymienionymi metodami przeprowadziłem charakterystykę, najpierw jednoskładnikowych monowarstw tworzonych przez cząsteczki badanych lipidów, a następnie dla szeregu mieszanin zawierających te lipidy w różnej proporcji, analizując uporządkowanie oraz upakowanie molekuł, porównując nachylenie cząsteczek w stosunku do normalnej do powierzchni

oraz ich upakowanie. Wyniki zostały opublikowane w artykule [H10]. Przeprowadzone badania potwierdziły, że DPPE i DPPG w mieszanych filmach oddziałują ze sobą korzystnie. Oddziaływania te są najsilniejsze dla mieszaniny równomolowej – filmy te charakteryzowały się najwyższym uporządkowaniem łańcuchów oraz najwyższą kondensacją. Organizacja cząsteczek w membranie odpowiadała upakowaniu heksagonalnemu z prostopadłą w stosunku do granicy faz orientacją łańcuchów. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że w modelowej membranie tworzą się korzystne połączenia DPPE-DPPG 1:1, co pozwala stwierdzić, że w naturalnym układzie badane fosfolipidy mogą tworzyć wysokouporządkowane domeny o takiej stechiometrii. Istnienie domen o takim składzie powinno być brane pod uwagę np. podczas projektowania nowych leków antybakteryjnych.

Badania dotyczące właściwości modelowych membran bakteryjnych kontynuowałem dla monowarstw bardziej złożonych zawierających, prócz cząsteczek głównych fosfolipidów (PE i PG) także kardiolipinę występującą w membranach w niewielkich ilościach [H11]. W celu porównania wpływu stężenia kardiolipiny, struktury cząsteczki PG oraz elektrolitu nieorganicznego na właściwości mieszanych filmów, analizowałem kondensację, oddziaływania międzycząsteczkowe oraz morfologię monowarstw PE/PG (POPG lub DPPG) o stałej proporcji tych lipidów (3:1), odzwierciedlającej ich stosunek w błonach bakterii *Gram*-ujemnych, do których wprowadzana była kardiolipina, a monowarstwy formowane były na subfazie wodnej lub wodnych roztworach NaCl. Badania te mają znaczenie jeśli weźmie się pod uwagę, że bakterie mają szczególne zdolności adaptacyjne polegające na do dostosowywania składu membran do warunków środowiskowych. Okazało się, że wprowadzenie do mieszanin PE/PG kardiolipiny silnie obniża kondensację filmów i destabilizuje je oraz zmniejsza ilość obserwowanych na zdjęciach domen, które dodatkowo mają inną charakterystykę. Wyniki te są o tyle ciekawe, że kardiolipina występuje w błonach bakteryjnych w bardzo małych, w porównaniu do pozostałych lipidów, ilościach – a jednak silnie modyfikuje ich właściwości. Podobnie obecność elektrolitu osłabia oddziaływania cząsteczek w badanych mieszaninach, ale jego wpływ jest znacznie silniejszy w przypadku monowarstw zawierających w pełni nasycony fosfatydyloglicerol (DPPG).

### **Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych w cyklu prac habilitacyjnych**

W ramach badań przedstawionych w cyklu prac habilitacyjnych przeprowadziłem systematyczne eksperymenty dla szeregu jedno-, dwu- i wieloskładnikowych monowarstw, które traktowałem jako modele membran biologicznych – ludzkich i bakteryjnych. Za jedno z najważniejszych osiągnięć w mojej pracy eksperymentalnej uważam podjęcie badań dla monowarstw zawierających więcej niż dwa składniki i przeprowadzenie dla nich termodynamicznej

analizy oddziaływań międzycząsteczkowych. Umożliwiło to rozszerzenie zakresu badań naukowych i zrealizowanie tematów badawczych, które nie mogłyby być podjęte jedynie w eksperymentach dla tradycyjnie badanych filmów dwuskładnikowych (np. problem dystrybucji cholesterolu w błonach). Wyniki tych badań, szczegółowo omówione w każdej z publikacji, dostarczyły szeregu ważnych informacji dotyczących oddziaływań międzycząsteczkowych w tych modelowych układach oraz ich organizacji molekularnej. Realizacja nakreślonych, ogólnych celów badawczych pozwoliła na sformułowanie następujących, ważnych wniosków:

- 1) Badania dotyczące oddziaływań cholesterolu z fosfolipidami zewnętrznej i wewnętrznej warstwy błony komórek ludzkich w układach dwu- i wieloskładnikowych pozwoliły na:
  - a) wykazanie, że efekt kondensujący cholesterolu zależy nie tylko od struktury fosfatydylocholiny, ale także od zawartości cholesterolu w filmie dwuskładnikowym. Jednak, gdy do monowarstwy wprowadzony zostanie kolejny lipid błonowy – sfingomielina – zależność wykryta dla monowarstw dwuskładnikowych PC/Chol w zakresie niskich stężeń sterolu ulega zmianie, co zaś dowodzi, że efekt kondensujący cholesterolu zależy od składu membrany. Efekt porządkujący cholesterolu jest zaś silnie determinowany obecnością w mieszaninie fosfatydylocholiny zawierającej nienasycone łańcuchy.
  - b) wykazanie, że przy 30% zawartości cholesterolu zarówno mieszanina SM/POPC/Chol jak i SM/SOPE/Chol może być traktowana jako model do badania zjawiska powstawania raftów lipidowych (ang. *raft-like mixture*). Jednocześnie żadna z nich nie stanowi modelu raftu, gdy zawartość cholesterolu wynosi 50%.
  - c) wykazanie, że cholesterol posiada podobną zdolność do formowania domen z fosfatydylocholiną i sfingomieliną, a siłą napędową tego procesu są oddziaływania hydrofobowe, a nie specyficzne oddziaływania cholesterol-sfingomielina.
  - d) wykazanie możliwości tworzenia się domen w układach cholesterol/SOPE i dokonanie charakterystyki ich właściwości (składu) – zasugerowanie możliwości występowania takich domen w wewnętrznej warstwie membrany ssaków.
- 2) Badania dotyczących dystrybucji cholesterolu pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną warstwę błony komórek ludzkich erytrocytów pozwoliły na:
  - e) zbadanie wpływu cholesterolu na wieloskładnikowe modele wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony ludzkich erytrocytów - zasugerowanie, że w naturalnej membranie ludzkiej krwinki czerwonej cholesterol kumuluje się w zewnętrznej warstwie lub jest równomiernie rozmieszczony w obu warstwach błony – jego kumulowanie się w warstwie wewnętrznej jest raczej niekorzystne.



3) Badania dotyczące modelowania membran bakteryjnych i badania ich organizacji pozwoliły na:

- f) wykazanie możliwości występowania segregacji lipidów w membranach bakteryjnych i tworzenia się domen zawierających PE i PG – połączenia te charakteryzują się najwyższą stabilnością i uporządkowaniem, gdy lipidy zmieszane są w proporcji 1:1
- g) wykazanie, że nawet niewielka zawartość kardiolipiny w monowarstwie PE/PG (3:1) imitujących błony bakteryjne silnie wpływa na ich kondensację i oddziaływania międzycząsteczkowe oraz zmienia morfologię filmu.

Powyższe wnioski mają znaczenie poznawcze, lecz mogą one mieć także implikacje praktyczne, ponieważ pozwalają na lepsze zrozumienie budowy biomembran i oddziaływań pomiędzy ich składnikami, co może ułatwić m. in. lepsze projektowanie leków działających na poziomie membranowym i wyjaśnienie mechanizmu ich działania.

#### **Spis literatury cytowanej w powyższym rozdziale (z wyłączeniem prac z cyklu habilitacyjnego)**

1. R. Lipowsky, E. Sackmann, Handbook of Biological Physics, Elsevier, Amsterdam, 1995.
2. Y. Yawata, Cell Membrane: the Red Blood Cell as a Model, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
3. P. V. Escriba, Trends Mol. Med. 12 (2006) 34.
4. K. Simons, R. Ehehalt, J. Clin. Invest. 110 (2002) 597.
5. M. L. Nelson, M. C. Grier, S. E. Barbaro, M. Y. Ismail, 8 (2009) 13.
6. C. Gajate, E. del Canto-Jañez, A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, E. Geijo, A. M. Santos-Beneit, R. J. Veldman, F. Mollinedo, J. Exp. Med. 200 (2004) 353.
7. D. Marsh, Biochim. Biophys. Acta 1286 (1996) 183.
8. T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 8 (2004) 459.
9. H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte, Prog. Lipid Res. 41 (2002) 66.
10. K. Simons, W. L. C. Vaz, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33 (2004) 269.
11. K. Simons, E. Ikonen, Science 290 (2000) 1721.
12. T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 97.
13. H. Martinez-Seara, T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, R. Reigada, Biophys. J. 95 (2008) 3295.
14. F. F. P. Almeida, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 72.
15. M. Bonn, S. Roke, O. Berg, L. B. F. Juurlink, A. Stamouli, M. Muller, J. Phys. Chem. B 108 (2004) 19083.
16. W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen, H. W. Huang Biophys. J. 92 (2007) 3960.
17. J. Pan, T. T. Mills, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, Phys. Rev. Lett. PRL 100 (2008) 198103.
18. J. Czub, M. Bagiński, Biophys. J. 90 (2006) 2368.
19. H. Martinez-Seara, T. Róg, M. Karttunen, I. Vattulainen, R. Reigada, J. Phys. Chem. B 113 (2009) 8347.
20. H. Dominguez, A. M. Smondyrev, M. L. Berkowitz, J. Phys. Chem. B 103 (1999) 9582.



21. Z. Li, R. M. Venable, L. A. Rogers, D. Murray, R. W. Pastor, *Biophys. J.* 97 (2009) 155.
22. K. Tu, M. L. Klein, D. J. Tobias, *Biophys. J.* 75 (1998) 2147.
23. D. A. Brown, E. London, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240 (1997) 1.
24. G. T. Noble, F. L. Craven, J. Voglmeir, R. Sardzik, S. L. Flitsch, S. J. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 13010.
25. R. J. Schroeder, E. London, D. A. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 12130.
26. J. M. Smaby, H. L. Brockman, R.E. Brown, R. E. *Biochemistry* 33 (1994) 9135.
27. B. Ramstedt, J. P. Slotte, *Biophys. J.* 76 (1999) 908.
28. R. Bittman, C. R. Kasireddy, P. Mattjus, J. P. Slotte, *Biochemistry* 33 (1994) 11776.
29. L. Zheng, C. M. McQuaw, A. G. Ewing, N. Winograd, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 15730.
30. J. M. Holopainen, A. J. Metso, J. P. Mattila, A. Jutila, P. K. Kinnunen, *Biophys. J.* 86 (2004) 1510.
31. S. L. Keller, W. H. Pitcher III, W. H. Huestis, H. M. McConnell, *Phys. Rev. Lett.* 81 (1998) 5019.
32. K. Kolanjiappana, S. Manoharana, M. Kayalvizhi, *Clin. Chim. Acta* 326 (2002) 143.
33. R. Cazzola, M. Rondanelli, S. Russo-Volpe, E. Ferrari, B. Cestaro, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1846.
34. F. Schroeder, G. Nemezc, W. G. Wood, C. Joiner, G. Morrot, M. Ayrault-Jarrier, P. F. Devaux, *Biochim. Biophys. Acta* 22 (1991) 183.
35. M. Mondal, B. Mesmin, S. Mukherjee, F. R. Maxfield, *Mol. Biol. Cell* 20 (2009) 581.
36. F. Schroeder, A. A. Frolov, E. J. Murphy, B. P. Atshaves, J. R. Jefferson, L. Pu, W. G. Wood, W. B. Foxworth, A. B. Kier, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213 (1996) 150.
37. K. A. Fisher, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 173.
38. J. A. F. Op den Kamp, *Ann. Rev. Biochem.* 48 (1979) 47.
39. J. A. Virtanen, K. H. Cheng, P. Somerharju, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 4964.
40. L. Blau, R. Bittmann, *J. Biol Chem.* 253 (1978) 8366
41. N. Kucerka, M.-P. Nieh, J. Katsaras, *Langmuir* 25 (2009) 13522.
42. L. Rilfors, G. Lindblom, *Colloid Surf. B* 26 (2002) 112.
43. R. P. H. Huijbregts, A. I. P. M. de Kroon, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 43.
44. R. M. Epand, R. F. Epand, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 289.
45. R. M. Epand, R. F. Epand, *J. Pept. Sci.* 17 (2011) 298.
46. A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget, S. Łabużek, *Pol. J. Environ. Stud.* 13 (2004) 487.
47. F. Neville, A. Ivankin, O. Konovalov, D. Gidalevitz, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 851.
48. A. A. Polyansky, R. Ramaswamy, P. E. Volynsky, I. F. Sbalzarini, S. J. Marrink, R. G. Efremov, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 3108.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

W moim dotychczasowym dorobku naukowym znajduje się 40 prac (w tym 11 włączonych do cyklu habilitacyjnego, IF = 39,202) o łącznym IF=111,478 (wg roku opublikowania) oraz 4 pełnotekstowe artykuły opublikowane w materiałach konferencyjnych. Dorobek zgromadzony przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora obejmuje 9 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej (IF = 13,804 wg roku opublikowania pracy) i 4 artykuły opublikowane w materiałach konferencyjnych, zaś po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 31 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej (IF = 97,674 wg roku opublikowania pracy).

W niniejszej części Autoreferatu krótko przedstawię tematykę badań, w których uczestniczyłem w całym okresie mojej działalności naukowej z wyłączeniem zagadnień przedstawionych w pracach będących podstawą rozprawy habilitacyjnej. Spis publikacji omawianych w tej części Autoreferatu zamieściłem na końcu rozdziału.

Początek mojej działalności naukowej przypada na rok akademicki 2001/2002 kiedy jako student V-roku na kierunku Chemia Wydziału Chemii UJ przygotowywałem swoją pracę magisterską. Pracę tą realizowałem w Zespole Fizykochemii Powierzchni w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, w którym jestem obecnie zatrudniony i z którym byłem związany przez cały okres mojej pracy naukowej. Bezpośrednią opiekę naukową podczas realizacji pracy magisterskiej sprawowała p. dr D. Góralczyk, a tematyka pracy dotyczyła właściwości filmów powierzchniowych Gibbisa (monowarstw adsorpcyjnych). Właśnie w tym czasie po raz pierwszy miałem okazję szerzej zapoznać się z zagadnieniami związanymi ściśle z fizykochemią powierzchni. Pracę magisterską pt „*Wpływ stężenia i rodzaju elektrolitu na właściwości monowarstw adsorbowanych z równomolowych mieszanin zawierających surfaktant anionowy i kationowy.*” obroniłem w czerwcu 2002 roku a jej wyniki zostały opublikowane w formie pełnotekstowego artykułu, którego jestem współautorem [1].

Od października 2002 roku kontynuowałem naukę na studiach doktoranckich na Wydziale Chemii UJ. Pracę doktorską, podobnie jak pracę magisterską przygotowywałem w Zespole Fizykochemii Powierzchni, a moim promotorem była p. prof. dr hab. Maria Paluch. W tym czasie kontynuowałem także współpracę naukową z p. dr D. Góralczyk, która zaowocowała jeszcze jedną pełnotekstową publikacją [2]. W ramach pracy doktorskiej pt „*Badanie wzajemnych oddziaływań składników w adsorpcyjnych filmach mieszanych wytworzonych na granicy faz woda/powietrze*” przeprowadziłem systematyczne badania właściwości powierzchniowych mieszanin surfaktantów różnego typu tj.: niejonowo-niejonowych, niejonowo-anionowych, niejonowo-kationowych, niejonowo-bijonowych, anionowo-anionowych, anionowo-kationowych, anionowo-bijonowych,

kationowo-kationowych i kationowo-bijonowych. Na podstawie uzyskanych wyników analizowałem wpływ rodzaju grupy hydrofilowej (jej rozmiaru i charakteru chemicznego) na skład i organizację molekularną mieszanych monowarstw i micel oraz na wzajemne oddziaływania i mieszanie się składników w monowarstwach i micelach. Badałem także właściwości elektryczne monowarstw i wyznaczyłem względne momenty dipolowe cząsteczek tworzących monowarstwy jednoskładnikowe i mieszane, oszacowałem wpływ struktury elektrycznej warstwy podwójnej na mierzone wartości zmian potencjału powierzchniowego, a także określiłem orientację molekuł w filmach utworzonych przez poszczególne surfaktanty. Tematykę związaną z właściwościami adsorpcyjnych filmów powierzchniowych oraz micel kontynuowałem jeszcze po doktoracie – wszystkie wyniki badań uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej; rozszerzone o dalsze badania przeprowadzone w późniejszym czasie zostały opublikowane w formie 6 artykułów w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports [3-8] (w tym prace [6-8] po doktoracie).

W okresie studiów doktoranckich w ramach współpracy z Zespołem Fizykochemii Zjawisk Międzyfazowych kierowanym przez p. prof. dr hab. P. Dynarowicz-Łątkę zajmowałem się także badaniem właściwości filmów Langmuira (monowarstw nierozpuszczalnych). Wtedy po raz pierwszy zetknąłem się z tą techniką badawczą i możliwościami jej zastosowania. Tematyka badań, w których w tym czasie brałem udział dotyczyła m.in. właściwości jednoskładnikowych filmów utworzonych z cząsteczek tlenku tri-n-oktylofosfinowego (TOPO) i oddziaływań tego związku z bromkami dialkilodimetyloamoniowymi o różnej strukturze w monowarstwach mieszanych [9,10]. Uzyskane wyniki wykazały, że TOPO tworzy monowarstwy charakteryzujące się wysoką stabilnością, miesza się z badanymi bromkami dialkilodimetyloamoniowymi w całym zakresie składu badanych filmów, ale siła oddziaływań międzycząsteczkowych w mieszanych monowarstwach determinowana jest długością łańcuchów badanych bromków dialkilodimetyloamoniowych. W tym czasie uczestniczyłem także w badaniach, których celem było porównanie oddziaływań bromków dialkilodimetyloamoniowych – substancji o właściwościach grzybobójczych ze steroidem zwierzęcym (cholesterolem) oraz steroidem grzybowym (ergosterolem) w mieszanych monowarstwach [11]. Badania wykazały, że bromki dialkilodimetyloamoniowe zawierające 16 i 18 – węglowe łańcuchy podobnie oddziałują z badanymi steroidami. Największe różnice występują dla bromku zawierającego krótszy łańcuch (C14) – związek ten wykazał silną selektywność w kierunku steroli tzn. silniejsze powinowactwo do sterolu grzybowego. Ponadto zajmowałem się badaniem jednoskładnikowych monowarstw utworzonych z cząsteczek alkoholi [12]. Uzyskane wyniki pozwoliły nam porównać kondensację badanych filmów, ich morfologię oraz nachylenie łańcuchów przy najwyższym ciśnieniu powierzchniowym a także przeprowadzić analizę właściwości elektrycznych monowarstw i mechanizmu ich relaksacji.

Obrona mojej pracy doktorskiej odbyła się 12 stycznia 2006 roku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskałem dnia 26 stycznia 2006 roku na posiedzeniu Rady Wydziału Chemii UJ, która na wniosek recenzentów wyróżniła moją pracę doktorską.

Po obronie pracy doktorskiej, w lutym 2006 roku, zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydział Chemii UJ, a dwa lata później (luty 2008) zostałem awansowany na stanowisko adiunkta w tym samym Zakładzie.

Jak wcześniej wspomniałem „po doktoracie” przez krótki czas kontynuowałem tematykę realizowaną podczas pracy doktorskiej i dotyczącą właściwości filmów powierzchniowych Gibbsa. Jednak bardziej zainteresowany byłem badaniem filmów tworzonych przez nierozpuszczalne związki amfipatyczne (filmy Langmuira). Eksperymenty, w których początkowo uczestniczyłem pozwoliły mi zapoznać się z technikami badawczymi, które można stosować do badania monowarstw nierozpuszczalnych (pomiaru zmian potencjału powierzchniowego podczas kompresji warstwy, mikroskopii kąta Brewstera, badania stabilności monowarstw), sposobami analizy wyników i możliwościami tej metody w kontekście jej stosowania do modelowania membran. W późniejszym okresie (od 2007 roku) zająłem się badaniem filmów wieloskładnikowych tzn. zawierających minimum trzy składniki. W dalszym etapie prowadzonych przeze mnie badań monowarstwy imitujące modelowe membrany zawierały nawet 5 lipidów. Chciałbym podkreślić, że tak złożone monowarstwy Langmuira badane są bardzo rzadko – filmy trójskładnikowe charakteryzowane są zwykle za pomocą takich metod jak mikroskopia fluorescencyjna czy BAM, a badania nie uwzględniają termodynamicznej analizy oddziaływań międzycząsteczkowych. Dlatego eksperymenty dotyczące filmów wieloskładnikowych uważam za szczególnie istotne w mojej działalności naukowej. Pierwsza praca zawierająca termodynamiczną analizę wyników dla tego typu filmów została opublikowana w roku 2007 i zapoczątkowała mój cykl prac habilitacyjnych. W 2011 roku rozszerzyłem zakres stosowanych do badania monowarstw technik eksperymentalnych o pomiary z zastosowaniem dyfrakcji synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD).

Od roku 2007 do chwili obecnej zajmowałem się zagadnieniami wchodzącymi w zakres pracy habilitacyjnej i równocześnie uczestniczyłem w innych projektach ściśle związanych z charakterystyką monowarstw Langmuira. Tematykę badań, w które byłem zaangażowany po obronie pracy doktorskiej (z wyłączeniem prac habilitacyjnych) krótko omówiłem poniżej, zaś mój wkład do poszczególnych publikacji, które powstały na podstawie przeprowadzonych badań określiłem w zał. 2.

Badania, w których uczestniczyłem po uzyskaniu stopnia naukowego doktora obejmowały następujące zagadnienia:

- a) Charakterystykę monowarstw tworzonych przez tlenek tri-n-oktylofosfinowy (TOPO) – badania te stanowiły kontynuację eksperymentów, w których uczestniczyłem wcześniej podczas studiów doktoranckich, a które wykazały, że badany tlenek posiada doskonałe właściwości filmotwórcze. Celem badań było dokonanie charakterystyki właściwości elektrycznych badanych monowarstw, analizy ich morfologii oraz mechanizmu relaksacji. Doskonałe właściwości monowarstw TOPO tzn. ich wysoka stabilność zachęciły do dalszych badań, których celem było porównanie selektywnego powinowactwa TOPO do jonów metali. Podjęcie tego tematu wynikało z faktu, że TOPO jest związkiem zdolnym do kompleksowania jonów metali i jest wykorzystywany do rozdzielania i oczyszczania metali. Wyniki badań wykazały, że TOPO wykazuje silne powinowactwo do jonów  $\text{La}^{3+}$  oraz  $\text{VO}^{2+}$  i mógłby być wykorzystany do rozdzielania tych jonów z mieszanin zawierających badane litowce i berylowce. Wyniki tych badań zostały opublikowane w formie pełno tekstowych artykułów w Polish Journal of Chemistry [13] oraz Thin Solid Films [14].
- b) Analizę oddziaływań cząsteczek w filmach dwuskładnikowych – celem badań było określenie wpływu struktury fosfolipidów na ich oddziaływania ze sterolami roślinnymi oraz polienowym antybiotykiem antygrzybiczym – nystatyną. Badania przeprowadzono dla fosfatydylocholin oraz fosfatydyloetanoloamin różniących się strukturą części hydrofobowej cząsteczek i analizowano właściwości monowarstw mieszanych fosfolipid/sterol oraz fosfolipid/nystatyna tzn. ich płynność, stabilność termodynamiczną oraz oddziaływania międzycząsteczkowe. Uzyskane wyniki pozwoliły nam sformułować wniosek, że silne oddziaływania nystatyny z fosfolipidami mogą mieć wpływ na właściwości biologiczne tego leku oraz określić zależność między strukturą fitosterolu a jego wpływem na modelową błonę fosfolipidową. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w formie 2 artykułów w specjalistycznych czasopismach naukowych [15,16]. W późniejszym okresie uczestniczyłem jeszcze w eksperymentach dotyczących wpływu steroli na monowarstwy dwuskładnikowe imitujące błony – uzyskane wyniki pozwoliły porównać właściwości kondensujące oraz porządkujące steroli roślinnych i cholesterolu i zostały opublikowane w pracy, której jestem współautorem [17].
- c) Analizę oddziaływań międzycząsteczkowych w monowarstwach wieloskładnikowych – w 2007 roku uczestniczyłem w badaniach, których innowacyjność polegała na wykorzystaniu do modelowania błony monowarstwy wieloskładnikowej i przeprowadzeniu termodynamicznej

analizy oddziaływań dla układu trójskładnikowego. Jedną z prac, która w tym czasie powstała ukierunkowała moje dalsze badania i została włączona w cykl prac habilitacyjnych [H1] (tematyka pracy i jej wyniki zostały szczegółowo omówione w części Autoreferatu dotyczącej dorobku habilitacyjnego). W ramach drugiej pracy [18] badany był wpływ kwasów tłuszczowych na monowarstwy fosfolipidowo-sterolowe. Uzyskane wyniki pozwoliły przeanalizować zależność pomiędzy strukturą kwasu tłuszczowego (stopniem nasycenia łańcucha) a stopniem w jakim modyfikuje on właściwości modelowej membrany. Były to pierwsze prace, w których badaliśmy monowarstwy trójskładnikowe i przeprowadziliśmy termodynamiczną analizę oddziaływań cząsteczek w monowarstwach zawierających więcej niż 2 składniki.

- d) Badanie wpływu chitozanu na monowarstwy lipidowe – udział w realizacji tego tematu zaproponowała mi p. dr hab. B. Krajewska, która od lat zajmuje się badaniem właściwości chitozanu – biopolimeru o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Celem przeprowadzonych eksperymentów było zbadanie wpływu chitozanu na monowarstwy utworzone z cholesterolu i kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nasycenia łańcucha. Uzyskane wyniki pozwoliły nam przeanalizować oddziaływanie chitozanu z poszczególnymi lipidami i mechanizm tworzenia kompleksów chitozan-lipid. Wyniki te mają znaczenie z punktu widzenia wykorzystania tego związku jako suplementu obniżającego poziom tłuszczów w organizmie. Ponadto badany był wpływ chitozanu na monowarstwy fosfolipidowe utworzone z cząsteczek cholesterolu, fosfatydylocholine (występującej głównie w błonach zwierzęcych) oraz fosfatydyloglicerolu (fosfolipidów charakterystycznych dla organizmów bakteryjnych) w kontekście antybakteryjnych właściwości chitozanu. Eksperymenty prowadzone były w szerokim zakresie pH oraz stężenia chitozanu i jego średniej masy molowej. Stwierdzono m.in., że chitozan w niewielkim stopniu wpływa na właściwości warstw zawierających fosfatydylocholinę zaś silniej modyfikuje monowarstwę zawierającą fosfolipid występujący w błonach bakteryjnych, co może być istotne dla wyjaśnienia mechanizmu aktywności antygrzybiczej tego polimeru. Wyniki zostały opublikowane w postaci 2 artykułów [19,20].
- e) Modelowanie membran zawierających cząsteczki bromku dialkilodimetyloamoniowego – badania obejmowały analizę warunków i mechanizmu powstawania wielowarstwowych pęcherzyków utworzonych z cząsteczek dioktadecylodimetyloamoniowego (DODAB) oraz badania właściwości modelowych mono i biwarstwowych membran utworzonych z cząsteczek tego związku. W dalszym etapie eksperymentów badany był wpływ kwasu oleinowego na właściwości monowarstw i biwarstw utworzonych z cząsteczek DODAB [21,22].

- f) Badanie właściwości filmotwórczych pentacyklicznych triterpenów – eksperymenty obejmowały charakterystykę właściwości monowarstw utworzonych z cząsteczek lupeolu, betuliny i kwasu betulinowego, które strukturalnie są podobne do steroidów (np. cholesterolu) i wykazują szeroką aktywność biologiczną np. antynowotworową. Celem badań było przeprowadzenie charakterystyki monowarstw tworzonych przez te związki na podstawie pomiarów zmian ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w trakcie kompresji filmów, zdjęć z mikroskopu kąta Brewstera, pomiarów GIXD oraz dokonanie analizy oddziaływań lupeolu oraz kwasu betulinowego z fosfatydylocholiną oraz sfingomieliną w monowarstwach mieszanych. Uzyskane wyniki pozwoliły nam przeprowadzić szczegółową analizę organizacji molekularnej filmów jednoskładnikowych tworzonych z cząsteczek badanych triterpenów oraz dowiodły, że lupeol i kwas betulinowy mieszają się z DPPC oraz sfingomieliną w całym zakresie składu badanych filmów i znacznie zmieniają ich organizację molekularną, ale w odróżnieniu do cholesterolu, który kondensuje monowarstwy fosfolipidowe, zarówno lupeol jak i kwas betulinowy wykazują efekt upłynniający filmy lipidowe. Uzyskane wyniki zostały przedstawione i szczegółowo omówione w dwóch artykułach naukowych [23, 24].
- g) Badanie wpływu naturalnych i syntetycznych lipidów eterowych na monowarstwy lipidowe imitujące błony biologiczne – tematyka ta wchodzi w zakres projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (projekt badawczy pt. *„Jednołańcuchowe lipidy eterowe w dwuwymiarowych błonach lipidowych - próba wyjaśnienia różnic w aktywności membranowej tych związków”*, DEC-2011/01/B/ST4/00910), w którym jestem wykonawcą. W eksperymenty dotyczące wpływu jednego z lipidów eterowych tzn. edelfozyny na membrany lipidowe zaangażowany byłem już w roku 2011 kiedy to uczestniczyłem w badaniach dotyczących wpływu tego związku na modelowe rafty lipidowe oraz mieszaniny cholesterol/sfingomielinina o zróżnicowanej zawartości cholesterolu [25].
- Badania realizowane w projekcie dotyczą trzech lipidów eterowych: syntetycznego związku edelfozyny oraz dwóch lipidów naturalnie występujących w komórkach tzn. czynnika aktywującego płytki krwi (PAF) oraz jego pochodnej (lyso-PAF). Substancje te nieznacznie różnią się strukturą, zaś wykazują odmienne właściwości biologiczne. Edelfozyna jest aktywnym membranowo lekiem, który posiada właściwości antynowotworowe i charakteryzuje się wysoką selektywnością. Jej mechanizm działania jest związany z wnikaniem w błony komórek nowotworowych, lecz zagadnieniem niewyjaśnionym pozostaje mechanizm jej selektywności. PAF jest także związkiem aktywnym membranowo, lecz nie posiada antynowotworowych



właściwości – przeciwnie, stężenie tego związku wzrasta podczas procesu nowotworzenia. Lyso-PAF określany jest zaś jako nieaktywna biologicznie pochodna PAF. Celem projektu jest zbadanie oddziaływań wyżej wymienionych lipidów eterowych z poszczególnymi lipidami błon biologicznych oraz porównanie ich wpływu na właściwości wieloskładnikowych monowarstw imitujących błony komórkowe. Badania te pozwolą nam określić zależność pomiędzy strukturą związku oraz składem monowarstwy a wpływem poszczególnych lipidów eterowych na jej właściwości. Dotąd przeprowadziliśmy eksperymenty, które pozwoliły nam porównać właściwości monowarstw jednoskładnikowych tworzonych przez badane lipidy eterowe, porównać ich oddziaływania z fosfatydyloetanolaminami o różnej strukturze oraz zbadać wpływ na monowarstwy utworzone z cząsteczek fosfatydylocholiny, cholesterolu oraz syntetycznej sfingomieliny. Dotąd ukazały się 3 pełnotekstowe prace [26-28] zawierające uzyskane przez nas wyniki badań, a kolejne znajdują się w przygotowaniu.

Jestem także współautorem pracy dotyczącej zdolności długołańcuchowych tioeterów do tworzenia monowarstw [29].

#### **Spis publikacji omówionych w niniejszym rozdziale Autoreferatu:**

1. D. Góralczyk, K. Hąc, **P. Wydro** *Surface properties of alkylpyridinium halides and sodium alkylsulfonates*, Colloids Surf., A 220 (2003) 55-60.
2. 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.
3. **P. Wydro**, M. Paluch, *Surface properties of cationic-nonionic surfactant systems*, Colloids Surf. A 245 (2004) 75-79.
4. **P. Wydro**, M. Paluch, *Miscibility and Interaction of dodecyl sulfobetaine with anionic, cationic and nonionic surfactants*, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005) 387-391.
5. E. Jarek, **P. Wydro**, P. Warszyński, M. Paluch, *Surface properties of mixtures of surface active sugar derivatives with ionic surfactants. Theoretical and experimental investigations*, J. Colloid Interface Sci., 293 (2006) 194-202.
6. **P. Wydro**, *The influence of the size of the hydrophilic group on the miscibility of zwitterionic and nonionic surfactants in mixed monolayers and micelles*, J. Colloid Interface Sci., 316 (2007) 107-113.
7. **P. Wydro**, *The miscibility of Sodium Dodecyl Sulfonate with Anionic, Nonionic and Cationic Surfactants in Mixed Monolayers and Micelles*, Pol. J. Chem. 81 (2007) 2157-2169.



8. **P. Wydro**, M. Paluch, *The miscibility of dodecyltrihydroxyethylammonium bromide with cationic, nonionic and anionic surfactants in mixed monolayers and micelles*, Colloids Surf. A, 348 (2009) 70-75.
9. K. Hąc-Wydro, **P. Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *A study of 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. K. Hąc-Wydro, **P. Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *A study of the properties of tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) monolayers formed at the air/water interface*, Pol. J. Chem. 79 (2005) 773-781.
11. 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.
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. Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Metal ions binding to tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) monolayer spread at the air/water interface*, Thin Solid Films 516 (2008) 8839-8843.
15. K. Hąc-Wydro, **P. Wydro**, A. Jagoda, J. Kapusta, *The study of the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes*, Chem. Phys. Lipids, 150 (2007) 22-34.
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. The Langmuir monolayers study*, Chem. Phys. Lipids 150 (2007) 125-135.
17. 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.
18. K. Hąc-Wydro, **P. Wydro**, *The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes*, Chem. Phys. Lipids, 150 (2007) 66-81.
19. **P. Wydro**, K. Hąc-Wydro, B. Krajewska, *Chitosan as a lipid binder. A Langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions*, Biomacromol. 8 (2007) 2611-2617.
20. B. Krajewska, **P. Wydro**, A. Jańczyk, *Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films*, Biomacromol. 12 (2011) 4144-4152.

- 21.M. Kępczyński, J. Lewandowska, K. Witkowska, S. Kędracka-Krok, V. Mistrikova, J. Bednar, **P. Wydro**, M. Nowakowska, *Bilayer structures in dioctadecyldimethylammonium bromide/oleic acid dispersions*, Chem. Phys. Lipids, 164, (2011) 359-367.
- 22.M. Kępczyński, J. Bednar, D. Kuźmich, **P. Wydro**, M. Nowakowska, *Spontaneous formation of densely stacked multilamellar vesicles in dioctadecyldimethylammonium bromide/oleosiloxane mixtures*, Langmuir 26 (2010) 1551-1556.
- 23.M. Broniatowski, M. Flasiński, **P. Wydro**, *Lupane-type pentacyclic triterpenes in Langmuir monolayers – a synchrotron radiation scattering study*, Langmuir 28 (2012) 5201-5210.
- 24.M. Broniatowski, M. Flasiński, **P. Wydro**, *Investigation of the interactions of lupane type pentacyclic triterpenes with outer leaflet membrane phospholipids - Langmuir monolayer and synchrotron X-ray scattering study*, J. Colloid Interface Sci. 381 (2012) 116-124.
- 25.K. Hąc-Wydro, **P. Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Edelfosine disturbs the sphingomyelin-cholesterol model membrane system in a cholesterol-dependent way - The Langmuir monolayer study*, Colloids Surf. B, 88 (2011) 635-640.
- 26.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, 97 (2012) 162-170.
- 27.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.
- 28.M. Flasiński, M. Broniatowski, **P. Wydro**, P. Dynarowicz-Łątka, *Comparative Characteristics of Membrane-Active Single-Chained Ether Phospholipids: PAF and Lyso-PAF in Langmuir Monolayers*, J. Phys. Chem. B, 116 (2012) 3155–3163.
- 29.M. Broniatowski, M. Flasiński, P. Wydro, E. Broniatowska, *Self-organization of non-amphiphilic molecules. Studies of thin films of long-chain homologous dialkylthioethers at the water/air interface*, J. Colloid Interface Sci., DOI: 10.1016/j.jcis.2012.12.055

## 7. Pozostałe aspekty działalności naukowej

### 7.1. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

1. P. Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, K. Hąc-Wydro, 2012, *The Effect of Cholesterol on Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Films – Brewster Angle Microscopy and Grazing Incidence X-ray Diffraction Studies*, 14<sup>th</sup> International Conference on Organized Molecular Films – ICOMF14, Paris, France - poster
2. M. Flasiński, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, 2012, *Characteristics of Single-chained Ether Phospholipids: PAF and lyso-PAF in Langmuir Monolayers*, 14<sup>th</sup> International Conference on Organized Molecular Films – ICOMF14, Paris, France – poster
3. P. Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, P. Dynarowicz-Łątka, J. Majewski, 2011 *Characterization of PE/PG monolayers serving as artificial bacterial membranes*, P46, The 12th European Conference on Organized Films, Sheffield Hallam University, Sheffield UK - poster
4. B. Krajewska, P. Wydro, A. Jańczyk, G. Stochel, 2011, *Investigation into the mechanism of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with lipids in Langmuir films*, IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011, Kraków, - poster
5. D. Kuźmicz, M. Kępczyński, J. Bednar, K. Witkowska, P. Wydro, M. Nowakowska, 2011, *Preparation and characterization of DODAB/oleosiloxane membranes*, XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society (BES) Cracow, Poland - poster
6. K. Witkowska, M. Kępczyński, P. Wydro, M. Nowakowska, 2011, *Properties of DODAB/oleyl alcohol and DODAB/cholesterol monolayers and bilayers*, The Fifth International Workshop on Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing, SMCBS'2011, Łochów, Polska - poster
7. K. Witkowska, M. Kępczyński, P. Wydro, M. Nowakowska, 2011, *Properties of DODAB/methyl oleate and DODAB/monoolein monolayers and bilayers*, XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society (BES) Cracow, Poland - poster
8. P. Wydro, M. Flasiński, poster, 2010, *Relation Between the Structure of Phospholipid Acyl Chains and the Condensing and Ordering Effect Induced by Cholesterol*, 24th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2010), Praga, Republika Czeska - poster
9. M. Kępczyński, K. Witkowska, J. Lewandowska, P. Wydro, J. Bednar, M. Nowakowska, 2010, *The Effect of the Oleic Acid Addition on the Properties of DODAB Bilayer and Monolayer*, US-Poland Workshop and Summer School Nanoscale Phenomena in Materials and at Interfaces, Kraków - poster
10. P. Wydro, K. Witkowska, M. Paluch, 2008, *The effect of phosphatidylamine acyl chains structure on the interactions with phosphatidylglycerol in model membranes*, 22<sup>nd</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society, Kraków, Polska – poster
11. K. Hąc-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, 2008, *Effect of side chain structure on ordering properties of sterols. Study on binary and ternary model membranes*, The European Conference on Organized Films, ECOF-11, Potsdam, Niemcy – poster

12. A. Jagoda, J. Kapusta, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, 2007, *The study of the interaction between plant sterols and phospholipids in mixed Langmuir monolayers*, COST D43 Workshop & SURUZ Workshop, Functional Interfaces – theory and experiment SURUZ Workshop Surfactants and Dispersed Systems Kraków, Polska, – poster
13. D. Grabowska, P. Wydro, 2007, *The influence of the kind and concentration of inorganic electrolyte on the surface properties of zwitterionic/anionic surfactant mixture*, COST D43 Workshop & SURUZ Workshop, Functional Interfaces – theory and experiment SURUZ Workshop Surfactants and Dispersed Systems, Kraków, Polska – poster
14. M. Flasiński, P. Wydro, K. Hąc-Wydro, 2007, *The study of the electrical properties and relaxation behavior of tri-n-octylphosphine oxide Langmuir monolayers*, COST D43 Workshop & SURUZ Workshop, Functional Interfaces – theory and experiment SURUZ Workshop Surfactants and Dispersed Systems, Kraków, Polska – poster
15. M. Flasiński, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, 2007, *The study on the mixed monolayers formed at the air/water interface by amphiphilic cyclodextrins and DPPE*, Surfactant and dispersed systems in theory and practice (SURUZ), Książ, Polska – poster
16. M. Flasiński, P. Wydro, K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, 2007, *The inclusion of phosphatidylethanolamines into amphiphilic cyclodextrines. The Langmuir monolayers study*. 12<sup>th</sup> International Conference on *Organized Molecular Films (LB-12)* Kraków, Polska – poster
17. P. Wydro, K. Hąc-Wydro, B. Krajewska, 2006, *Interactions of Chitosan with cholesterol and fatty acids as determined in Langmuir monolayers: potential for anticholesterolemic therapy*, 3<sup>rd</sup> Central European Conference, Chemistry towards Biology, Kraków, Polska – poster
18. P. Dynarowicz-Łątka, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, 2006, *Metal Ions binding to Tri-N-Octylphosphine Oxide Monolayer Spread at the Air/Water Interface*, The European Conference on Organised Films, ECOF-10, Ryga, Łotwa – poster
19. J. Miñones Jr, K. Hąc-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, O. Conde, S. Pais, 2006, *The Characteristics of Langmuir Monolayers Formed by Mammalian, Fungi and Plant Sterols*, The European Conference on Organised Films, ECOF-10, Ryga, Łotwa – poster
20. P. Wydro, K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, 2006, *The influence of the kind and the concentration of inorganic, electrolite on the surface properties of, dialkyldimethylammonium bromides*, 20<sup>th</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society, Budapeszt, Węgry – poster
21. D. Góralczyk, P. Wydro, K. Hąc-Wydro, 2005, *Thermodynamic description of anionic-cationic adsorption films based on Butler's type equation*, Surfactant and dispersed systems in theory and practice (SURUZ), Polanica Zdrój, Polska – poster
22. P. Wydro, M. Paluch, 2005, *Surface properties of zwitterionic-ionic mixed surfactant systems* Surfactant and dispersed systems in theory and practice (SURUZ), Polanica Zdrój, Polska – poster
23. K. Hąc-Wydro, P. Wydro, M. Broniatowski, 2005, *Tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) in monolayers at the air/water interface in presence of metal ions*, 19th Conference of the European Colloid and Interface Society, Geilo, Norwegia – poster

24. P. Wydro, M. Paluch, 2004, *Miscibility and Interaction of dodecyl sulfobetaine with anionic, cationic and nonionic surfactants*, XVIII Conference of the European Colloid and Interface Society, Almeria, Hiszpania –poster
25. E. Jarek, P. Wydro, P. Warszyński, M. Paluch, 2004, *Surface properties of mixtures of surface active sugar derivatives with ionic surfactants. Theoretical and experimental investigations*, XVIII Conference of the European Colloid and Interface Society, Almeria Hiszpania -poster
26. P. Wydro, M. Paluch, 2003, *Surface properties of mixed aqueous solutions containing anionic and nonionic surfactants: sodium dodecyl sulfate and n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside*, Surfactant and dispersed systems in theory and practice (SURUZ), Polanica Zdrój, Polska –poster
27. P. Wydro, M. Paluch, 2003, *Surface properties of binary mixed surfactants systems of n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside with anionic cationic and nonionic surfactants*, XVII Conference of the European Colloid and Interface Society, Florencja, Włochy – poster
28. D. Góralczyk, K. Hąc, P. Wydro, M. Paluch, 2002, *Właściwości anionowo-kationowych filmów adsorpcyjnych w obecności elektrolitów nieorganicznych*, XLV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, Polska - poster

## 7.2. Uczestnictwo w projektach badawczych

- Projekt badawczy pt. „Jednołańcuchowe lipidy eterowe w dwuwymiarowych błonach lipidowych - próba wyjaśnienia różnic w aktywności membranowej tych związków” finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/ST4/00910 – charakter udziału w realizacji: główny wykonawca, okres realizacji: 01.XII.2011 – 30.XI. 2013.
- Projekt badawczy pt. „Wpływ cholesterolu na modelowe błony komórkowe” finansowany w ramach Wydziałowego Funduszu Projektów Habilitacyjnych, decyzja nr WCh/SO/401/309/12, charakter udziału: kierownik projektu, okres realizacji: rok 2012.
- Projekt badawczy pt. „Wpływ składu i fizycznego stanu modelowych błon komórkowych na kondensujące i porządkujące właściwości sterolu” finansowany w ramach Wydziałowego Funduszu Projektów Habilitacyjnych, decyzja nr WCh/SO/401/1000/11, charakter udziału: kierownik projektu, okres realizacji: rok 2011.
- Sieć naukowa SURUZ (surfaktanty i układy zdyspergowane w teorii i praktyce) koordynowanej przez Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN. Projekt przyznany decyzją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 75/E-68/BWSN-0119/2008 z dnia 20.05.2008, nr umowy SURUZ/2008/2. Zadanie badawcze I.2. Właściwości powierzchniowe mieszanych zwitterjonowo-jonowych monowarstw adsorpcyjnych na granicy faz

woda/powietrze – charakter udziału w realizacji: główny wykonawca, okres realizacji: 15.07.2008 - 30.06.2009.

- Grant European Commission: Scientific Network – “Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice” (SURUZ), Contract No INCO-CT-2003-003355 - charakter udziału w realizacji: wykonawca, okres realizacji - 1.08.2004 r – 30.07.2007

### **7.3. Recenzowanie publikacji naukowych**

Przygotowywanie recenzji publikacji do takich czasopism naukowych jak: Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes, Biomacromolecules, Langmuir, Journal of Colloid and Interface Science, Polyhedron, Spectrochimica Acta Part A, Colloids and Surfaces B, Colloids and Surfaces A (w sumie 32 recenzje).

### **7.4. Staże zagraniczne**

- 2011 - Laboratorium HASYLAB w ośrodku synchrotronowym DESY w Hamburgu, Niemcy – badania z zastosowaniem technik dyfrakcji i odbicia synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego (GIXD i XR), listopad 2011.
- 2005 - Uniwersytet w Santiago de Compostela, Wydział Farmacji, Zakład Chemii Fizycznej, Hiszpania – dwumiesięczny staż naukowy.

### **8. Nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową:**

- 2012 – Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (przyznane na okres 3 lat)
- 2012-Zespołowa nagroda Rektora UJ za działalność naukową
- 2009 - Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu START (roczne stypendia krajowe dla młodych uczonych) - przedłużenie Stypendium
- 2008 - Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu START (roczne stypendia krajowe dla młodych uczonych)
- 2008 - Zespołowa nagroda Rektora UJ za działalność naukową
- 2006- Wyróżnienie za pracę doktorską – Uniwersytet Jagielloński
- 2005 – Stypendium Fundacji Bolesława Ludwika Dunicza



## 9. Działalność dydaktyczna

- Opieka naukowa i promotorska nad studentami kierunków chemia i ochrona środowiska, przygotowującymi prace magisterskie, prace licencjackie, mini-projekty badawcze – 14 osób w latach 2005 – 2013
- Przygotowanie i prowadzenie nowego wykładu pt. „*Fizykochemia Powierzchni i Elektrochemia*” dla studentów III roku studiów chemicznych I stopnia na Wydziale Chemii UJ.
- Przygotowanie i prowadzenie nowego wykładu pt. „*Fizykochemia układów zdyspergowanych oraz związki powierzchniowo czynne w nanotechnologii*” dla studentów I roku studiów chemicznych II stopnia na Wydziale Chemii UJ.
- Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów II-go roku chemii, biotechnologii i biologii, pracowni specjalizacyjnej dla studentów IV-go roku chemii w ramach panelu Fizykochemiczne podstawy nanotechnologii (*kierownik pracowni*), seminaria i konwersatoria dla studentów I-go roku biologii i ochrony środowiska.
- opracowanie i prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów inżynierii materiałowej – specjalność: biomateriały oraz dla studentów IV-go roku chemii.

## 10. Działalność organizacyjna

- Utworzenie i koordynacja nowego kursu (*Eksperymentalne metody fizykochemiczne w nanotechnologii* IV rok, II stopień studiów) na studiach chemicznych Wydziału Chemii UJ w ramach nowego Panelu: „*Fizykochemiczne podstawy nanotechnologii*”.
- Koordynacja i organizacja laboratorium specjalistycznego „*Fotochemia i Spektroskopia*” na Wydziale Chemii UJ w ramach projektu „*Rozbudowa i modernizacja infrastruktury dydaktycznej na kierunkach przyrodniczych i ścisłych UJ*” – Program Operacyjny Infrastruktura i Środowisko, POIiŚ 13.01.00-00-062/08).
- Członek Wydziałowej Komisji ds. Badań Naukowych w latach 2008-2012.
- Przedstawiciel adiunktów i asystentów w Radzie Wydziału Chemii UJ w kadencji 2008-2012 oraz 2012-2016.

