Dr Małgorzata Jurak Zakład Zjawisk Międzyfazowych Katedra Chemii Fizycznej Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Załącznik 2a do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

w języku polskim

Motto

Mądrość rodzi się z doświadczenia, a doświadczenie zdobywamy popełniając błędy 1. Imię i nazwisko: Małgorzata Jurak, nazwisko rodowe: Szwajcer

| Adres służbowy: | Zakład Zjawisk Międzyfazowych |
|-----------------|--|
| | Katedra Chemii Fizycznej |
| | Wydział Chemii |
| | Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej |
| | plac Marii Curie-Skłodowskiej 3/131, 20-031 Lublin |
| | tel. 081 537 55 47 |
| | e-mail: malgorzata.jurak@poczta.umcs.lublin.pl |

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

| 2004 | Tytuł zawodowy: magister chemii Jednostka: Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Tytuł pracy magisterskiej: Synteza P-chiralnej <i>o</i> -anizylo- <i>m</i> - anizylo- <i>p</i> -anizylofosfiny Promotor: Prof. dr hab. K. Michał Pietrusiewicz |
|------|--|
| 2009 | Stopień naukowy: doktor nauk chemicznych Jednostka: Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Tytuł pracy doktorskiej: Właściwości nanowarstewek fosfolipi- dów osadzonych na podłożu stałym i ich zmiany pod wpływem enzymów Promotor: Prof. dr hab. Emilian Chibowski |

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

| 2004-2009 | doktorant (Stacjonarne Studia Doktoranckie), Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie |
|--------------------|--|
| II. 2009 - obecnie | adiunkt naukowo-dydaktyczny, Zakład Zjawisk Międzyfazo- wych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie |

4. 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Charakterystyka fizykochemiczna modelowych błon komórkowych oraz układów zawierających substancje o aktywności biologicznej na ciekłej fazie nośnej i podłożu stałym

b) wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Podstawę postępowania habilitacyjnego stanowi monotematyczny cykl 20 prac [H1-H20], w tym 17 oryginalnych prac twórczych [H1, H3-H8, H11-H20] oraz 3 prac przeglądowych [H2, H9, H10], opublikowanych w latach 2011-2018, uszeregowanych chronologicznie. Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **IF=48,620**.

H1. E. Chibowski, M. Jurak, Interaction energy of model lipid membranes with water and diiodomethane, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 383 (2011) 56-60.

IF₂₀₁₁=2,236

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, współudziale w opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

H2. E. Chibowski, M. Jurak, L. Holysz, Preparation, investigation techniques and surface free energy of solid supported phospholipid layers, in The Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition, edited by P. Somasundaran, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2011, pp. 1-22, ISBN: 0-8493-9615-8.

IF₂₀₁₁=brak

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej koncepcji, dokonaniu obszernego przeglądu literaturowego, współredagowaniu tekstu manuskryptu, współudziale w przygotowaniu rysunków oraz opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

H3. A. Szcześ, **M. Jurak**, E. Chibowski, *Stability of binary model membranes - Prediction of the liposome stability by the Langmuir monolayer study*, Journal of Colloid and Interface Science 372 (**2012**) 212-216.

IF₂₀₁₂=3,172

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu doświadczeń techniką Langmuira, przeprowadzeniu analizy termodynamicznej stabilności badanych układów oraz ich stanu fazowego, współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu i rysunków, współudziale w opracowaniu odpowiedzi na recenzje.

Mój udział procentowy szacuję na 45%.

H4. M. Jurak, Changes in stability of the DPPC monolayer during its contact with the liquid phase, Chemistry and Physics of Lipids 165 (2012) 302-310.

IF₂₀₁₂=2,147

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H5. M. Jurak, Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayer study, Journal of Physical Chemistry B 117 (2013) 3496-3502.

IF₂₀₁₃=3,377

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H6. M. Jurak, J. Miñones Conde, *Characterization of the binary mixed monolayers of α-tocopherol with phospholipids at the air-water interface*, Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes 1828 (**2013**) 2410-2418.

IF₂₀₁₃=3,431

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, zaplanowaniu i przeprowadzeniu większości doświadczeń (poza wizualizacją morfologii monowarstw przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera), współudziale w interpretacji wyników badań, przygotowaniu rysunków i tabel, współredagowaniu tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem, współudziale w opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

H7. E. Chibowski, **M. Jurak**, *Comparison of contact angle hysteresis of different probe liquids on the same solid surface*, Colloid and Polymer Science 291 (**2013**) 391-399.

IF₂₀₁₃=2,410

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, współudziale w opracowaniu wyników i przygotowaniu rysunków, współredagowaniu tekstu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

 H8. M. Jurak, Surface Gibbs energy interaction of phospholipid/cholesterol monolayers deposited on mica with probe liquids, Chemistry and Physics of Lipids 183 (2014) 60-67.

IF₂₀₁₄=2,422

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**. H9. E. Chibowski, M. Jurak, L. Holysz, Wettability of solid supported lipid layers, in Surfactant Science and Technology: Retrospects and Prospects, Part II, Chapter 3, edited by L.S. Romsted, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2014, pp. 121-148, ISBN: 978-1-4398-8295-5.

IF₂₀₁₄=brak

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej koncepcji, dokonaniu obszernego przeglądu literaturowego, współredagowaniu tekstu manuskryptu, współudziale w przygotowaniu rysunków oraz opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H10. E. Chibowski, **M. Jurak**, L. Holysz, A. Szczes, *Wetting properties of model biological membranes*, Current Opinion in Colloid & Interface Science 19 (**2014**) 368-380.

IF₂₀₁₄=5,840

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej koncepcji, dokonaniu obszernego przeglądu literaturowego, współredagowaniu tekstu manuskryptu, współudziale w przygotowaniu rysunków oraz opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H11. M. Jurak, Wettability of binary solid supported films of zwitterionic/anionic phospholipids, Adsorption Science and Technology 33 (2015) 625-638.

IF₂₀₁₅=0,633

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H12. M. Jurak, *Contact angle hysteresis and phase separation in dry phospholipid films with cholesterol deposited on mica surface*, Applied Surface Science 328 (**2015**) 596-605.

IF₂₀₁₅=3,150

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H13. M. Jurak, E. Chibowski, *Characteristics of a phospholipid DOPC/cholesterol bilayer based on surface free energy and its components*, RSC Advances 5 (2015) 66628-66635.

IF₂₀₁₅=3,289

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków, współredagowaniu tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **80%**.

H14. M. Jurak, J. Miñones Jr., Interactions of lauryl gallate with phospholipid components of biological membranes, Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes 1858 (2016) 1821-1832.

IF₂₀₁₆=3,498

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń, przygotowaniu wszystkich rysunków, współudziale w interpretacji wyników badań, współredagowaniu tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem, współudziale w opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H15. M. Jurak, *Effect of lauryl gallate on wetting properties of organized thin phospholipid films on mica*, The Journal of Physical Chemistry B 120 (2016) 6657-6666.

IF₂₀₁₆=3,177

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H16. M. Jurak, Surface free energy of organized phospholipid/lauryl gallate monolayers on mica, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 510 (2016) 213-220.

IF₂₀₁₆=2,714

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu wszystkich wyników, przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

H17. M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Terpiłowski, Properties of PEEK-supported films of biological substances prepared by the Langmuir-Blodgett technique, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 510 (2016) 263-274.

IF₂₀₁₆=2,714

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, współudziale w zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu doświadczeń z wyjątkiem aktywacji powierzchni polimeru plazmą, przygotowaniu wszystkich rysunków, współudziale w interpretacji wyników badań, zredagowaniu tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem, współudziale w opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **85%**. H18. M. Jurak, A.E. Wiącek, Wettability of hybrid chitosan/phospholipid coatings, Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives 22 (2017) 66-76.

IF₂₀₁₇=brak

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, współudziale w zaplanowaniu badań, wykonaniu doświadczeń techniką Langmuira-Blodgett/Schaefera i rozpływania, współudziale w opracowaniu wszystkich wyników i przygotowaniu rysunków, napisaniu pracy, korespondencji z edytorem, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **85%**.

H19. M. Jurak, A.E. Wiącek, R. Mroczka, R. Łopucki, *Chitosan/phospholipid coated polyethylene terephthalate (PET) polymer surfaces activated by air plasma*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 532 (2017) 155-164.
IF₂₀₁₆=2,714^{*}

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, współudziale w zaplanowaniu eksperymentów, wykonaniu doświadczeń techniką Langmuira-Blodgett/Schaefera i rozpływania, współudziale w interpretacji wszystkich wyników i przygotowaniu rysunków, współredagowaniu pracy, korespondencji z edytorem, współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **85%**.

H20. M. Jurak, R. Mroczka, R. Łopucki, Properties of artificial phospholipid membranes containing lauryl gallate or cholesterol, Journal of Membrane Biology 251 (2018) 277-294.

IF₂₀₁₆=1,696*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń techniką Langmuira i Langmuira-Blodgett, przygotowaniu próbek do analizy FTIR-ATR, współudziale w interpretacji wszystkich wyników i przygotowaniu rysunków, współredagowaniu pracy, korespondencji z edytorem, współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz wniesieniu stosownych poprawek do manuskryptu po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na **85%**.

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Błony biologiczne są złożonymi strukturami ograniczającymi komórki, a także ich organelle wewnętrzne. Podstawową funkcją błon jest ochrona przed otaczającym środowiskiem oraz kontrola przepuszczalności jonów lub cząsteczek do i na zewnątrz komórki [1, 2]. Większość naturalnych błon biologicznych stanowią mieszaniny różnych cząsteczek lipidowych (głównie fosfolipidów) i białek. Rdzeń tworzy biwarstwa lipidowa zbudowana głównie z fosfolipidów PL (takich jak fosfatydylocholina, nazywana potocznie lecytyną, fosfatydyloseryna, fos-

^{*}IF aktualnie dostępny w bazie JCR na stronie: <u>http://jcr.incites.thomsonreuters.com/</u>

fatydyloetanoloamina), glikolipidów i steroli. Lipidy błonowe (fosfo- i glikolipidy) charakteryzują się wyraźnie wykształconą częścią hydrofobową, którą stanowią dwa łańcuchy węglowodorowe i częścią hydrofilową (polarną głową) [1, 2]. Wykazują zdolność do formowania trwałych biwarstw w środowisku wodnym. Pozostałe lipidy występuja jako domieszki lipidów błonowych. W danej temperaturze niektóre lipidy błonowe występują w fazie ciekłokrystalicznej (*fluid*), a niektóre w fazie żelowej [3], co prowadzi do lateralnej separacji faz i tworzenia domen. Domeny są to wydzielone obszary, które odbiegają składem i strukturą od pozostałej części błony i charakteryzują się podwyższoną lub obniżoną zawartością danego typu związku(-ów). Formowanie domen jest kluczowym elementem funkcjonowania błon włączając mechanizmy rozpoznawania, przesyłania sygnałów, aktywnego transportu, endocytozy, egzocytozy, wzrostu mikrobiologicznego i adaptacji do różnych środowisk [3-5]. Heterogeniczność składu chemicznego błony, uwzględniając zróżnicowanie zarówno polarnych części ("głów") jak i acylowych łańcuchów ("ogonów") jej lipidowych składników, przyczynia się do zachowania odpowiedniej płynności [3, 6]. Zależnie od składu jakościowego i ilościowego błony domeny ulegają modyfikacjom. Ich rozmiar, struktura i stabilność są determinowane oddziaływaniami pomiędzy poszczególnymi komponentami.

Typowym składnikiem błon biologicznych ssaków jest fosfatydylocholina (PC) o charakterze obojnaczym: nasycona (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina – **DPPC**), półnienasycona (2-oleoilo-1-palmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina – **POPC**) i nienasycona (1,2-dioleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina – **DOPC**) (rys. 1). Natomiast błony bakteryjne zawierają głównie anionowy fosfatydyloglicerol (PG) [7]. Przedstawicielem tej grupy związków jest nasycony 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-*rac*-(1-glicerol) – **DPPG** (rys. 1). Zarówno PC, jak i PG są najczęściej spotykanymi fosfolipidami surfaktantu płucnego, będącego mieszaniną lipidów i specyficznych białek, w skład którego mogą wchodzić także nienasycone fosfolipidy i cholesterol (**Chol**) w ilościach zależnych od rodzaju organizmu [8]. Cholesterol (rys. 1) jest jednym ze specyficznych składników błon eukariontów, który poprzez oddziaływania z innymi lipidami, moduluje przepuszczalność, mechaniczną stabilność oraz uporządkowanie strukturalne błon [9].

Nowym aspektem w dziedzinie badań oddziaływań między cząsteczkami lipidów okazał się fakt, że błony komórek zwierząt zawierają lateralnie wydzielone domeny zwane lipidowymi tratwami/raftami (*lipid rafts*) [5, 10, 11]. Rafty składają się ze stosunkowo małych (submikroskopowych) domen o małej zawartości nienasyconych fosfolipidów i białek transmembranowych, ale wzbogaconych w cholesterol, sfingolipidy i specyficzne białka, w stosunku do ich zawartości w otaczającej błonie [5]. Rafty mają ogromne znaczenie w procesie przekazywania sygnałów, transportu pęcherzykowego, w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy, bowiem wpływają na aktywację receptorów błonowych [5, 10]. Biorą udział w przebiegu chorób, takich jak: cukrzyca, choroba Alzheimera, choroby prionowe czy nowo-twory [11, 12]. Badania wskazują, że oddziaływania Chol z innymi lipidami odgrywają ważną rolę w tworzeniu raftów w błonach komórek zwierząt. Zwiększanie lub zmniejszanie zawartości cholesterolu w membranie może indukować poważne zmiany w rozkładzie i/lub funkcjach składników raftów.



Rys. 1. Związki budujące naturalne błony biologiczne i/lub zastosowane do badania oddziaływań w obrębie modelowych błon.

Najczęściej naukowcy skupiają się na badaniach z wykorzystaniem wąskiego zakresu stężenia Chol (do 50%) [13, 14] ze względu na ograniczoną jego rozpuszczalność w błonie. Powyżej progu rozpuszczalności, który zależy od składu, tworzą się kryształy monohydratu [15] lub dwuwarstwowe domeny [16, 17]. Uważa się je zwykle za symptom patologii, jed-nakże okazuje się, że mogą one odgrywać także pozytywną rolę fizjologiczną. Stwierdzono na przykład, że błony w soczewce oka ludzkiego mają wyższą zawartość cholesterolu w porównaniu z innymi błonami, który prawdopodobnie utrzymuje przezroczystość soczewki chroniąc przed zaćmą [16, 18]. Skład błony soczewki oka zmienia się znacznie wraz z wiekiem i można zaobserwować zmniejszenie stosunku molowego PL/Chol [19]. Inne funkcje cholesterolu obejmują regulację przepuszczalności błony dla małych polarnych i niepolarnych

cząsteczek [17]. Ta specyficzna rola cholesterolu przejawia się poprzez oddziaływanie błony PL-Chol z otaczającym środowiskiem.

W obrębie błony rafty współistnieją z obszarami o wyższej zawartości nienasyconych fosfolipidów. Obecność wiązań podwójnych w łańcuchach kwasów tłuszczowych sprawia, że są one podatne na utlenianie będące skutkiem powstawania wolnych rodników w komórkach i tkankach. Utlenianie natomiast obniża płynność błony, niszczy jej strukturę i zaburza jej prawidłowe funkcjonowanie [20, 21]. Uszkodzenia komórek spowodowane peroksydacją lipidów prowadzą do zmian nowotworowych. Biorąc pod uwagę ten aspekt funkcjonowania błon wyłoniła się potrzeba badania wpływu związków wykazujących aktywność przeciwutleniającą, stosowanych w celu ochrony błony przed uszkodzeniem oksydacyjnym, a w konsekwencji przed powstawaniem i rozwijaniem się niektórych typów nowotworów.

Do badań wybrano dwa antyutleniacze: α -tokoferol (**TF**) – naturalnie występującą i najbardziej biologicznie aktywną formę witaminy E [22, 23], oraz galusan laurylu (dodecylu, **LG**) – pochodną kwasu galusowego (GA) będącego naturalnym roślinnym trifenolem [24]. Wzbogacenie diety α -tokoferolem pomaga w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, Alzheimera, Parkinsona lub miażdżycy, a także wpływa korzystnie na profilaktykę przeciwnowotworową [22]. LG wykazuje również potencjalną aktywność przeciwnowotworową [25, 26], a z drugiej strony działanie antybakteryjne i przeciwwirusowe [27, 28]. Znikoma rozpuszczalność TF i LG w wodzie sprzyja organizowaniu się cząsteczek w obrębie błony. Stwierdzono ich zwiększone powinowactwo do obszarów występowania lipidów nienasyconych, w których gromadząc się, mogą optymalizować ochronę błon przed utlenieniem i zniszczeniem, a jednocześnie wywierać efekt farmakologiczny [29-31].

Struktura układów (wielkość, morfologia i stabilność domen) zależy od energii oddziaływań występujących pomiędzy składnikami w warstwie. W zależności od składu błony, energia oddziaływań może ulegać modyfikacji. Jednakże trudno jest określać właści-wości fizyczne i funkcje poszczególnych związków oraz ich wzajemne oddziaływania w natu-ralnych błonach, tym bardziej skorelować rodzaj i wielkość oddziaływań w obrębie błony, jej strukturę oraz płynność, z energią oddziaływań błon z otaczającym środowiskiem. Dlatego tego typu badania wykonuje się w układach modelowych stosując pojedyncze związki lub mieszaniny. Monowarstwy Langmuira na granicy faz woda/powietrze oraz mono- i biwarstwy osadzone na podłożu stałym stanowią uznane modele błon biologicznych [32, 33].

Słaba rozpuszczalność w wodzie oraz amfifilowy charakter cząsteczek PL, Chol, TF i LG (rys. 1) sprawiają, że orientują się one specyficznie na granicy faz woda/powietrze, two-rząc monowarstwy Langmuira. Fazą nośną dla filmu jest ciecz, najczęściej woda, zwana sub-

fazą, która imituje naturalne środowisko błon. Technika monowarstw Langmuira (L) jest użyteczna w badaniach oddziaływań występujących pomiędzy poszczególnymi składnikami modelowych błon biologicznych [34, 35], jak również ich struktury w połączeniu z mikroskopią kąta Brewstera (BAM) [36, 37]. Natomiast do otrzymywania warstw molekularnych o kontrolowanej grubości na stałym nośniku służą metody Langmuira-Blodgett (LB) oraz Langmuira-Schaefera (LS) [32, 38, 39]. Obie techniki polegają na przenoszeniu monowarstw Langmuira, skompresowanych do ustalonej wartości ciśnienia powierzchniowego, z fazy ciekłej na podłoże stałe. Różnica dotyczy orientacji nośnika: pionowa – LB, pozioma – LS.

Podłoża dla układów biomimetycznych mogą być różne. Do przeprowadzonych przeze mnie badań wybrano płatki miki (muskowitu – naturalnie występującego glinokrzemianu) oraz płytki polimerowe z polieteroeteroketonu – PEEK, politereftalanu etylenu – PET, które dodatkowo pokryto biopolimerem (chitozanem) (rys. 2). Mika, ze względu na molekularną gładkość powierzchni oraz wysoką gęstość ładunku powierzchniowego (3,2×10⁷ e/cm²) [40], umożliwia silną adhezję cząsteczek przenoszonych związków prowadząc do utworzenia zwartego filmu na ciele stałym przy jednoczesnym zachowaniu właściwości monowarstw Langmuira. Z kolei zastosowanie wymienionych polimerów i/lub biopolimeru jako nośników rozszerza zakres badań układów biomimetycznych w wymiarze aplikacyjnym.



Rys. 2. Nośniki układów biomimetycznych.

Wydało się interesujące poszukiwanie zależności pomiędzy właściwościami monowarstw Langmuira o ściśle zdefiniowanym składzie, utworzonych na granicy faz woda/powietrze, a zwilżalnością analogicznych monowarstw Langmuira-Blodgett/Schaefera osadzonych na mice i/lub podłożu polimerowym/biopolimerowym. Badania podjęto w celu uzyskania najbardziej stabilnych układów oraz oszacowania ich energii oddziaływań z cieczami o różnym charakterze (polarnym i niepolarnym) na granicy faz membrana/ciecz/gaz. Błony biologiczne nie są izolowanymi układami, ale pozostają w kontakcie z substancjami o dużej różnorodności, dlatego też wyniki przeprowadzonych badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu ich funkcjonowania w procesach zachodzących na powierzchni membran i z nimi związanych, takich jak transport cząsteczek wody, jonów i różnych substancji przez błony.

Ilościowe określenie oddziaływań pomiędzy hydrofobowymi powierzchniami i wodą stanowi wciąż wyzwanie dla naukowców. Jedną z termodynamicznych funkcji służących do charakteryzowania energetycznych i zwilżających właściwości filmów jest ich swobodna energia powierzchniowa, określana przez rodzaj i wielkość oddziaływań występujących w obszarze międzyfazowym film/ciecz/gaz. Nadal istnieją trudności związane z jej bezpośrednim, eksperymentalnym wyznaczeniem i opisem termodynamicznym [41-44]. Obecnie szeroko rozpowszechnione jest wyznaczanie pozornej swobodnej energii powierzchniowej ciał stałych poprzez pomiary kątów zwilżania cieczy o znanym napięciu powierzchniowym w powiązaniu z odpowiednimi koncepcjami oddziaływań międzyfazowych, co pozwala na stosunkowo szybką ocenę oddziaływań ciało stałe-ciecz [45-51].

Ponadto badania dotyczące zmian swobodnej energii powierzchniowej stanowią ważny parametr w ocenie biokompatybilności materiałów wszczepianych do organizmu [52]. Drugi aspekt podjętych przeze mnie badań dotyczył kwestii polepszenia biokompatybilności polimerów stosowanych w implantologii (PEEK-u oraz PET-u) poprzez pokrycie aktywowanych powierzchni materiałów polimerowych modelową błoną biologiczną. Obecność związków budujących naturalne błony biologiczne stanowi swoisty łącznik pomiędzy układami sztucznymi i biologicznymi zwiększając prawdopodobieństwo pozytywnej odpowiedzi organizmu, a jednocześnie może ułatwić wprowadzenie substancji czynnej, np. o właściwościach bakteriobójczych (LG), co dodatkowo zabezpiecza przed infekcjami.

W dziedzinie chirurgii ortopedycznej PEEK uznawany jest za wysokiej jakości termoplastyczny zamiennik kości [53]. Testy przeprowadzone *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzają brak cytotoksyczności. Jednakże, biologiczna bierność powierzchni PEEK-u, wynikająca ze stosunkowo niskiej energii powierzchniowej, osłabia integrację z tkankami, co może sprzyjać rozwojowi bakterii wywołując infekcje otaczającej tkanki. Adhezja bakterii do powierzchni biomateriałów stanowi ważny wskaźnik ryzyka infekcji i jest uwarunkowana między innymi topografią i swobodną energią powierzchniową [54].

Natomiast PET jest często stosowany w rekonstrukcjach naczyń krwionośnych jako materiał ochronny stentu [55, 56]. Jednak jego wadą jest hydrofobowość, obojętność chemiczna i słaba biokompatybilność. Ponadto włókna PET są wrażliwe na powolną degradacje hydrolityczną prowadzącą do niekorzystnych reakcji biologicznych [55]. W związku z tym powierzchnia PET wymaga modyfikacji przed kontaktem z krwią [56], w celu uzyskania odporności na degradację, właściwości przeciwzakrzepowych i lepszej biokompatybilności. Okazuje się, że właściwości powierzchni polimerów można zmodyfikować powlekając je filmem biopolimerowym. W badaniach wykorzystano biopolimer – chitozan (rys. 2). Jest on naturalnym polisacharydem o unikalnych właściwościach, korzystnych z punktu widzenia zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych, takich jak: biodegradowalność, biokompatybilność, nietoksyczność oraz właściwości antybakteryjne [57, 58]. Jednakże w kontakcie z krwią chitozan zyskuje ładunek dodatni, co indukuje adhezję erytrocytów i płytek krwi, adsorpcję fibrynogenu i krzepnięcie krwi [59, 60]. W celu przezwyciężenia tej trudności pojawił się pomysł dalszej modyfikacji filmu chitozanowego poprzez pokrycie monowarstwa fosfolipidu PL. Przylegająca warstwa PL miała stanowić osłonę dla chitozanu przed bezpośrednim kontaktem z krwią i/lub zmniejszać gęstość ładunku dodatniego, polepszając w ten sposób właściwości hemostatyczne materiału. Wiadomo, że morfologia powierzchni implantów odgrywa ważną rolę w "zakotwiczeniu się" w organizmie, dlatego zastosowanie odpowiedniej strategii modyfikacji może zapewnić materiałom zoptymalizowaną zwilżalność i chropowatość.

Cele ogólne badań opisanych w pracach objętych postępowaniem habilitacyjnym to:

- określenie uporządkowania i upakowania cząsteczek w monowarstwach Langmuira oraz wyznaczenie ich struktury, rodzaju i wielkości oddziaływań oraz stabilności układów dwu- i trójskładnikowych PL-PL [H11], PL-Chol [H3, H5], PL-TF [H6], PL-LG [H14], DPPC-DOPC-Chol i DPPC-DOPC-LG [H20], dla następujących ułamków molowych drugiego lub trzeciego składnika x = 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1, na subfazie wodnej,
- preparatyka filmów DPPC [H4], PL-PL [H11], PL-Chol [H1, H12, H13], PL-LG na mice [H15, H16], DPPC-LG na aktywowanym PEEK-u [H17], DPPC na PET/chitozan (PET – PET aktywowany plazmą powietrzną) [H18, H19], o kontrolowanej grubości i orientacji molekuł za pomocą technik LB lub LS oraz samoorganizujących się filmów chitozanu techniką rozpływania roztworu S,
- scharakteryzowanie struktury oraz wyznaczenie parametrów topograficznych powierzchni mika/PL-Chol [H12, H13], mika/PL-LG [H15, H16], PEEK/DPPC-LG [H17],

PET/chitozan/DPPC [H19] przy wykorzystaniu technik mikroskopowych (mikroskopii sił atomowych AFM, mikroskopii optycznej, profilometrii optycznej),

- określenie zwilżalności powierzchni mika/DPPC [H4, H7], mika/PL-PL [H11], mika/PL-Chol [H1, H9, H10, H12, H13], mika/PL-LG [H15, H16], PEEK/DPPC-LG [H17], PET/chitozan/DPPC [H18, H19] na podstawie pomiarów kąta zwilżania i jego histerezy,
- wyznaczenie zmian swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych dla badanych powierzchni w oparciu o modele oddziaływań międzyfazowych [H1, H2, H4, H5, H7, H8, H10-H13, H16-H19],
- opracowanie termodynamicznej charakterystyki modelowych membran dzięki kompleksowej analizie właściwości zwilżających i energetycznych oraz struktury uzyskanych układów na stałym nośniku (mika, PEEK, PET) w odniesieniu do upakowania, mieszalności i stabilności monowarstw na subfazie wodnej.

Analiza monowarstw Langmuira

Stan termodynamiczny oraz jakość monowarstw Langmuira określono na podstawie izoterm sprężania, prezentujących zależność ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni fazy nośnej przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie (A).

W celu zweryfikowania i porównania stanów fizycznych badanych filmów, jak również, aby uzyskać informacje na temat uporządkowania i upakowania cząsteczek w monowarstwach bezpośrednio z przebiegu izoterm π -A obliczono moduł ściśliwości dla filmów o znanym składzie korzystając z równania 1 [61]:

$$C_s^{-1} = -A(\frac{d\pi}{dA}) \tag{1}$$

Mieszalność i oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w dwu- i trójskładnikowych monowarstwach poddano jakościowej analizie zgodnie z regułą addytywności [34, 35]. W związku z tym, bezpośrednio z izoterm wyznaczono średnią rzeczywistą powierzchnię na cząsteczkę w mieszanym filmie dwuskładnikowym (A_{12}) lub trójskładnikowym (A_{123}) przy różnych wartościach ciśnienia powierzchniowego, a następnie porównano ją z wartością odpowiadającą mieszalności idealnej lub całkowitemu brakowi mieszalności cząsteczek (rów. 2):

$$A_{12}^{id} = A_1 x_1 + A_2 x_2 \text{ lub } A_{123}^{id} = A_1 x_1 + A_2 x_2 + A_3 x_3$$
(2)

gdzie: A_1 , A_2 , A_3 oznaczają powierzchnię przypadającą na cząsteczkę w poszczególnych filmach jednoskładnikowych przy danym ciśnieniu powierzchniowym, oraz x_1 , x_2 , x_3 są ułamkami molowymi składników 1, 2, 3 w filmie mieszanym.

Na tej podstawie obliczono powierzchnię nadmiarową przypadającą na cząsteczkę w mieszanych monowarstwach dwu- i trójskładnikowych (rów. 3):

$$A_{exc} = A_{12} - A_{12}^{id} \ \text{lub} \ A_{exc} = A_{123} - A_{123}^{id} \tag{3}$$

Natomiast w celu oszacowania wielkości oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w filmach mieszanych obliczono nadmiarową energię Gibbsa mieszania (rów. 4):

$$\Delta G_{exc} = N \int_0^{\pi} A_{exc} \, d\pi \tag{4}$$

gdzie: N oznacza liczbę Avogadro.

Ponadto ocenę termodynamicznej stabilności układów określono w oparciu o całkowitą energię Gibbsa mieszania z równania:

$$\Delta G_m = \Delta G_{exc} + \Delta G_{id} \tag{5}$$

gdzie idealną energię Gibbsa mieszania wyrażono jako:

$$\Delta G_{id} = RT(x_1 ln x_1 + x_2 ln x_2) \quad \text{lub} \quad \Delta G_{id} = RT(x_1 ln x_1 + x_2 ln x_2 + x_3 ln x_3) \tag{6}$$

gdzie: R to stała gazowa oraz T to temperatura.

Analizę przeprowadzono dla monowarstw przy ciśnieniu powierzchniowym 30-35 mN/m, które odpowiada wewnętrznemu ciśnieniu bocznemu biwarstw fosfolipidowych i błon biologicznych o określonej gęstości upakowania cząsteczek, pod ciśnieniem atmosferycznym i przy braku sił zewnętrznych (*external stress*) [62].

Monowarstwy PL-PL

Badania rozpoczęto od analizy mieszanin dwuskładnikowych fosfolipidów wchodzących w skład surfaktantu płucnego (PC i PG) [H11]. Głównym zadaniem surfaktantu płucnego jest usprawnienie mechaniki oddechowej, zmniejszenie napięcia powierzchniowego na granicy faz powietrze/ciecz, zapobieganie zapadnięciu pęcherzyków płucnych i zmniejszenie wysiłku związanego z oddychaniem [8, 63, 64]. Powszechnie przyjmuje się, że ściśle upakowane filmy mieszane wzbogacone w DPPC (40-50%) są odpowiednie do zminimalizowania napięcia powierzchniowego na granicy faz powietrze/ciecz w celu uniknięcia zapadnięcia pęcherzy-

ków przy końcu wydechu. Jednakże odkryto, że stabilnie niskie napięcie powierzchniowe można osiągnąć również stosując filmy nienasyconych fosfolipidów, sprężane w wystarczająco szybkim tempie [65]. Ważnym aspektem stabilności warstewki lipidowej w wysoce skompresowanych stanach jest upakowanie cząsteczek lipidowych oraz występowanie uporządkowanych i nieuporządkowanych obszarów. Okazuje się, że obecność anionowego fosfolipidu DPPG zwiększa zdolność mieszaniny do separacji faz [66]. Zatem skład filmu surfaktantu płucnego odgrywa kluczową rolę w lateralnej organizacji błony, jej stabilności i prawidłowym funkcjonowaniu [63].

W tym kontekście podjęto systematyczne badania oddziaływań anionowego fosfolipidu DPPG na fosfolipidy obojnacze DPPC, DOPC i POPC w monowarstwach Langmuira na granicy faz woda/powietrze w celu określenia stopnia skondensowania i mieszalności układów dwuskładnikowych [H11]. Na podstawie wartości ΔG_{exc} udowodniono występowanie silniejszych oddziaływań przyciągających pomiędzy nasyconymi fosfolipidami DPPC-DPPG, i osłabienie tych oddziaływań w układach zawierających nasycony i nienasycony fosfolipid (POPC-DPPG i DOPC-DPPG) w porównaniu do układów jednoskładnikowych. Równocześnie filmy DPPC-DPPG okazały się ściślej upakowane i bardziej uporządkowane niż POPC-DPPG i DOPC-DPPG, w których stwierdzono częściową mieszalność związaną z tworzeniem obszarów dwufazowych (domen). Luźniejsze upakowanie cząsteczek monowarstwy zwiększa jej przepuszczalność w stosunku do wody i innych cieczy [H11].

Monowarstwy PL-Chol

Badanie mechanizmu tworzenia domen w modelowych błonach zintensyfikowano od momentu postawienia hipotezy o istnieniu tzw. raftów lipidowych [5]. Rafty są definiowane jako nano-obszary (10-200 nm) błon wzbogacone w cholesterol, nasycone długołańcuchowe lipidy i niektóre białka. Tym obszarom przypisuje się udział w różnorodnych procesach komórkowych, szlakach sygnałowych, w procesie ontogenezy oraz w chorobach takich jak HIV, Alzheimer czy choroby prionowe [11]. Jednakże wciąż istnieją kontrowersje dotyczące mechanizmów tworzenia raftów, ich składu i funkcji.

Cholesterol (Chol) jest ważnym komponentem komórek eukariotycznych, w tym ssaków. Wprowadzenie cholesterolu do membrany modyfikuje jej płynność, przepuszczalność i właściwości dielektryczne [9]. Jedną z wyjątkowych cech cholesterolu jest wywieranie tzw. efektu kondensacyjnego/kondensacji (*condensing effect*) na cząsteczki fosfolipidów (PL). Przejawia się to w zmniejszeniu powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę w mieszaninie PL-Chol [67, 68]. W celu wyjaśnienia nieidealnego zachowania mieszanin PL-Chol zaproponowano kilka modeli, które różnią się podstawowym mechanizmem prowadzącym do kondensacji filmu. Na uwagę zasługują: model nadstruktury (*superlattice model*) [69, 70], parasola (*umbrella model*) [71, 72], kompleksów skondensowanych (*condensed-complexes model*) [73, 74], mezoskopowy (*mesoscopic water–lipid–cholesterol model*) [75] i inne [76, 77]. Weryfikację modeli prowadzi się zarówno dla układów monowarstw Langmuira, jak i biwarstwowych pęcherzyków – liposomów [78]. Jednostkę strukturalną liposomów stanowi biwarstwa – układ dwóch monowarstw, których cząsteczki są skierowane polarnymi częściami na zewnątrz. Z tego względu molekularne upakowanie i oddziaływania między cząsteczkami określone w mieszanych monowarstwach Langmuira na granicy faz woda/powietrze można odnieść do układów pęcherzyków liposomowych o analogicznym składzie.

W pracy [H3] wykazano użyteczność techniki monowarstw Langmuira do przewidywania stabilności liposomów złożonych z DPPC i Chol w aspekcie tworzenia dwuskładnikowych kompleksów skondensowanych. Dodatek Chol do monowarstwy DPPC powoduje wzrost jej skondensowania przejawiający się wyższymi wartościami modułu ściśliwości C_S^{-1} i zmniejszeniem średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę A_{12} . Nadmiarowa energia mieszania Gibbsa ΔG_{exc} przyjmuje ujemne wartości osiągając minimum przy ułamku molowym $x_{Chol} = 0,25$, co wskazuje równocześnie na najbardziej uprzywilejowany skład mieszaniny DPPC-Chol. Powyższy wniosek potwierdziła wysoka stabilność liposomów o analogicznym składzie [H3].

Następnie rozszerzono badania stabilności układów PL-Chol o inne fosfolipidy: DPPG, DOPC i POPC, w celu kompleksowego określenia wpływu Chol w zależności od rodzaju polarnej głowy fosfolipidu (PC kontra PG) i nasycenia/nienasycenia łańcuchów węglowodorowych [H5]. Z wartości modułów ściśliwości C_S^{-1} wynika, że wzrost stężenia Chol powoduje wzrost upakowania (skondensowania) monowarstw PL (rys. 3a). W przypadku DPPG stosunkowo niewielka głowa polarna w porównaniu do DPPC umożliwia ścisłą organizację cząsteczek w monowarstwie ze względu na zmniejszone zatłoczenie steryczne. Z drugiej strony, wiązania podwójne o konfiguracji *cis* w cząsteczkach POPC i DOPC indukują "załamania" łańcuchów węglowodorowych. Ich obecność utrudnia tworzenie się zwartej monowarstwy, a tym samym uzyskuje się niższe wartości modułu ściśliwości w odniesieniu do wartości określonych dla nasyconych PL. Ponadto przeprowadzone badania wykazały, że wprowadzenie Chol do monowarstwy PL powoduje redukcję średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę A_{12} (efekt kondensacyjny). Zgodnie z modelem Radhakrishnana i McConnella [73, 74] kontrakcja powierzchni jest efektem tworzenia się skondensowanych kompleksów PL-Chol, co widoczne jest w postaci przegięć lub załamań na krzywych zależności powierzchni od składu błony. Na tej podstawie wstępnie oszacowano skład dwuskładnikowych kompleksów, tj. dla DPPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$, zaś dla POPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,5$. Brak przegięć na krzywych $A_{12} = f(x_{Chol})$ w przypadku układów DOPC-Chol oraz DPPG-Chol sugeruje tworzenie się słabych kompleksów lub ich brak. Po przekroczeniu stężenia granicznego w monowarstwie, Chol miesza się z kompleksem lub wytrąca się z układu [H5].



Rys. 3. (a) Moduł ściśliwości C_s^{-1} oraz (b) nadmiarowa energia Gibbsa ΔG_{exc} wyznaczone dla monowarstw PL-Chol w zależności od składu [H5].

Wyznaczone wartości nadmiarowej energii Gibbsa ΔG_{exc} (rys. 3b) potwierdziły tworzenie się stabilnych i zwartych filmów DPPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$. Dla monowarstw DPPG-Chol niewielkie minimum przy $x_{Chol} = 0,25$ dowiodło znacznie mniejszej mieszalności Chol z DPPG niż z DPPC. Dla układów nienasyconych fosfolipidów POPC i DOPC z Chol minimum ΔG_{exc} pojawiło się dla równomolowych mieszanin, ale mniejsze wartości energii Gibbsa sugerują występowanie słabszych oddziaływań przyciągających w porównaniu z układem DPPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$. Potwierdzono, że cholesterol wykazuje większe powinowactwo do nasyconej PC, a powinowactwo to maleje ze wzrostem nienasycenia łańcuchów acylowych [H5]. Obecność Chol w środowisku nieuporządkowanych nienasyconych łańcuchów węglowodorowych narzuca ograniczenia w ich konformacjach prowadząc do obniżenia entropii (*entropic penalty*), co jest niwelowane, gdy Chol znajduje się obok uporządkowanych nasyconych łańcuchów palmitynowych PC [79]. Uprzywilejowane oddziaływania PC-Chol oraz ścisłe upakowanie cząsteczek mogą indukować tworzenie się domen wzbogaconych w Chol, co dobrze wpisuje się w hipotezę raftów lipidowych.

Błona i antyoksydanty

W przeciwieństwie do raftów błony zawierają domeny wzbogacone w nienasycone fosfolipidy, które są podatne na utlenianie wskutek powstania wolnych rodników w komórkach i tkankach. Ze względu na wysoką reaktywność, wolne rodniki są zdolne do wywoływania zaburzeń metabolicznych i uszkodzenia struktury błony na różne sposoby, ostatecznie wywołując niepożądane zmiany chorobowe [20, 21]. Uszkodzenia komórek spowodowane peroksydacją lipidów prowadzą do zmian nowotworowych. Podstawową rolą biologiczną antyutleniaczy jest ochrona przed takim uszkodzeniem oksydacyjnym, a tym samym przed powstawaniem i rozwijaniem się niektórych nowotworów [80]. Aby zmniejszyć ryzyko zmian patologicznych, wiele wysiłku wkłada się w opracowywanie bezpiecznych i skutecznych przeciwutleniaczy.

Jak juž wspomniano we wstępie do badań, wybrano dwa antyutleniacze: *a*-tokoferol (**TF**) i **galusan laurylu (LG)**. TF jest bez wątpienia najbardziej istotną dla ludzi formą witaminy E znaną ze swoich właściwości antyoksydacyjnych [81]. Chociaż naturalne błony biologiczne zawierają niewielką ilość TF, tj. w zakresie of 0,1 do 1,0 mol% [23], która wydaje się zbyt niska, aby chronić ogromną ilość nienasyconych fosfolipidów przed utlenianiem, ostatnie badania nad wpływem suplementacji TF-em mitochondriów i mikrosomów wykazały wzrost stężenia TF w tych frakcjach subkomórkowych [82]. W związku z tym wysunięto hipotezę, że TF asocjuje z nienasyconymi fosfolipidami, do których ma powinowactwo, co prowadzi do zwiększonego stężenia witaminy w tych regionach. Optymalizuje to proces ochrony membran przed utlenianiem i zniszczeniem [29]. Jednakże zależności między TF i lipidami nie wynikają wyłącznie z mechanizmu antyoksydacyjnego. Amfifilowy charakter cząsteczek witaminy E sprawia, że lokalizują się i odpowiednio orientują na granicy faz lipid/woda, gdzie oprócz funkcji antyoksydacyjnej mogą istotnie wpływać na strukturę i dynamikę błony [83]. Dlatego TF w znacznym stopniu przyczynia się do zachowania integralności i fizycznej stabilności błon, a tym samym ich bioaktywności [83].

Monowarstwy PL-TF

Celem badań przedstawionych w [H6] było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób wyższa niż fizjologiczna ilość TF wpływa na właściwości modelowej błony złożonej z fosfolipidu nasyconego DPPC, pół-nienasyconego POPC lub nienasyconego DOPC.

Dodanie "niefizjologicznej" ilości TF do PL (DPPC, POPC i DOPC) znacząco zmienia właściwości filmów Langmuira tych PL, powodując zarówno zmniejszenie gęstego upakowania cząsteczek, jak i uporządkowania monowarstw. Ujemne wartości energii Gibbsa mieszania ΔG_{mix} dowodzą, że składniki monowarstwy mieszają się w obszarze ciśnień powierzchniowych poniżej pierwszego załamania (tab. 1), a następnie podczas jej dalszej kompresji cząsteczki TF są częściowo wypychane z monowarstwy mieszanej.

W celu wyjaśnienia mechanizmu zachowania mieszanych filmów DPPC-TF wykonano diagram fazowy widoczny na rysunku 4 poprzez naniesienie wartości ciśnienia załamania π_c dla różnych ułamków molowych TF.

Tabela 1. Wartości ciśnienia załamania mieszanych monowarstw fosfolipidów (DPPC, POPC i DOPC) oraz α -tokoferolu (TF) przy różnym ułamku molowym x_{TF} [H6].

| | X _{TF} | π_{c_1} mN/m | π_{c_1} , mN/m | π_{c_2} mN/m |
|---------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| DPPC/TF | 0,25 0,50 | 38,5 33 1 | | 50,0 50,0 |
| DITCIT | 0,75 | 15,0 | 31,5 | 50,0 |
| POPC/TF | 0,25 0,50 0,75 | 22,3 16,1 | 31,5 | 42,8 42,8 42,8 |
| DOPC/TF | 0,25 0,50 0,75 | 37,5 19,2 | 32,7 | 45,0 45,0 45,0 |
| | | · · · | · · | · · · · |



Rys. 4. Diagram fazowy dla dwuskładnikowych filmów DPPC-TF [H6].

Faza P_1 składająca się z cząsteczek DPPC i TF tworzy układ o dobrej mieszalności składników przy ciśnieniach powierzchniowych poniżej linii *abcd*. Pomiędzy cząsteczkami występują oddziaływania, które powodują, że dodanie DPPC do monowarstwy utrudnia usuwanie TF poza warstwę, wywołując wzrost ciśnienia załamania, które jest tym większe im większa jest zawartość DPPC w monowarstwie. W tym obszarze wzajemne oddziaływania pomiędzy składnikami sugerują tworzenie się kompleksu odpowiedzialnego za maksymalną stabilność układu. Największe ciśnienie załamania uzyskano przy $x_{TF} = 0,25$ (tab. 1), co wskazuje, że stosunek molowy TF/DPPC w kompleksie wynosi 1:3.

Powyżej linii *abcd* składniki monowarstwy także tworzą układ jednofazowy P_2 , ale o innej konformacji. Wzdłuż linii odpowiadającej pierwszemu załamaniu c₁ następuje rozerwanie kompleksu, chociaż cząsteczki TF nie są całkowicie wypychane z mieszanej monowarstwy, lecz tylko częściowo, tworzą "obszar podpowierzchniowy" [84,85]. Zatem P_2 składa się z cząsteczek TF "pseudo-załamanych" i cząsteczek DPPC. Podczas drugiego załamania filmów mieszanych (c₂) przy ciśnieniu ok. 50 mN/m, zachodzi wypychanie obu składników z pojedynczej warstwy niezależnie od ich składu (linia *ef*) z jednoczesnym utworzeniem trzech faz: (a) wyżej wymieniona faza P_2 , (b) faza TF po załamaniu (TF_(c)) i (c) faza DPPC po załamaniu (DPPC_(c)). Powyższa interpretacja została potwierdzona techniką mikroskopową kąta Brewstera.

Analiza wartości średniej powierzchni na cząsteczkę w upakowanej monowarstwie Langmuira A_{12} wyraźnie wskazuje na znaczne rozprężenie monowarstwy DPPC spowodowane przez cząsteczki TF. Natomiast w układzie DOPC-TF obserwuje się kontrakcję powierzchni, co potwierdza wysokie powinowactwo TF do nienasyconych PL i zwiększoną stabilność monowarstw. W konsekwencji można założyć, że siła oddziaływań przyciągających między PL i TF zmniejsza się w następującej kolejności: DOPC> POPC> DPPC [H6].

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają hipotezę, że α -tokoferol może odgrywać ważną rolę w utrzymywaniu stabilności błon biologicznych, a oddziaływania pomiędzy cząsteczkami są determinowane głównie rodzajem fosfolipidów [H6]. Stabilizacja błon biologicznych następuje w wyniku oddziaływań pomiędzy fitylowym łańcuchem bocznym α -tokoferolu i łańcuchami kwasów tłuszczowych cząsteczek fosfolipidów oraz tworzenia wiązań wodorowych między grupą fenoksylową TF a grupą karbonylową lub fosforanową fosfolipidu [83]. TF tworzy stabilne kompleksy (klastry) z fosfatydylocholiną o ściśle określonym składzie, przy którym cząsteczki TF są zorientowane wertykalnie w stosunku do płaszczyzny membrany z grupami –OH skierowanymi do granicy faz lipid/woda. Cząsteczki TF preferują lokalizację w pobliżu wiązań nienasyconych, tj. cząsteczka TF jest głębiej zanurzona w membranie DOPC [H6]. Położenie TF względem nienasyconych lipidów w tych samych domenach błony stanowi funkcjonalne połączenie roli strukturalnej z działaniem antyoksydacyjnym witaminy E. Analogicznie do roli cholesterolu w tratwach, α -tokoferol może stabilizować domeny nie-raftowe (*non-raft domains*), wzbogacone w nienasycone fosfolipidy [29]. Podobną hipotezę postawiono w przypadku galusanu laurylu (LG).

Monowarstwy PL-LG

LG jest pochodną kwasu galusowego będącego naturalnym roślinnym trifenolem. LG i inne pochodne kwasu galusowego, takie jak: galusan metylu, propylu, oktylu są szeroko stosowane jako antyoksydanty w produkcji żywności, gdyż wychwytują reaktywne formy tlenu [86, 87]. LG prawdopodobnie ulega hydrolizie, przynajmniej częściowo, po spożyciu. Wciąż nie jest jasne, czy niezhydrolizowany LG trafia do miejsc docelowych w błonach, gdzie jest potrzeb-

ny do ochrony przed utlenianiem. Niektóre spekulacje na ten temat zostały przedstawione w pracy [86]. Ponadto LG jest szeroko stosowany nie tylko w przemyśle spożywczym, ale również w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Stwierdzono, że poprzez wychwy-tywanie rodników hydroksylowych LG jest skutecznym środkiem zapobiegającym uszkodzeniu komórek fibroblastów skóry [88] oraz chroni m. in. mitochondria i ludzkie czerwone krwinki przed utlenieniem [86]. LG wiąże się z błoną [30] i jako hydrofobowy przeciwutleniacz wnika do wnętrza błon komórek i organelli oraz podobnie jak α -tokoferol [29], może koncentrować się w regionach podatnych na utlenienie. Dlatego przeprowadzono badania mieszalności LG z fosfolipidami, gdyż mogą być pomocne w opracowaniu nowej generacji przeciwutleniaczy wprowadzanych do nośników lipidowych w żywności, farmaceutykach i kosmetykach.

W literaturze można znaleźć doniesienia, że LG wykazuje potencjalna aktywność przeciwnowotworową względem nowotworów skóry [89] czy piersi [90] obejmując procesy apoptotyczne (zaprogramowanej genetycznie śmierci) w rosnacych komórkach. Ponadto, działa także przeciwwirusowo wobec wirusów zwierzęcych, np. grypy, afrykańskiego pomoru świń oraz przeciwbakteryjnie czy przeciwgrzybicznie [27, 28]. Tę biologiczną aktywność galusanu można przypisać charakterystycznej amfifilowej budowie cząsteczki, która zawiera grupę hydrofilową oraz hydrofobowy łańcuch alkilowy. Hydrofobowy łańcuch dodecylu wydaje się wnosić znaczny wkład do aktywności, prawdopodobnie poprzez rosnące powinowactwo do błon biologicznych, tym samym wpływając na zmianę ich przepuszczalności [26], analogicznie jak łańcuch fitylowy α-tokoferolu [29]. Słaba rozpuszczalność LG w wodzie ułatwia jego penetrację do wnętrza membrany, gdzie oddziałując z poszczególnymi składnikami zmienia przepuszczalność i stabilność membrany. Dlatego też bezpośrednie oddziaływania pomiędzy LG i fosfolipidami wydają się być ściśle powiązane z aktywnością farmakologiczną. Z szerokiego spektrum galusanów tylko galusan laurylu łączy wysoką aktywność przeciwutleniającą z dostateczną hydrofobowością cząsteczek [91] niezbędną do utworzenia monowarstw Langmuira. Jako cząsteczka amfifilowa może silnie oddziaływać z błonami lipidowymi, które są odpowiedzialne za większość ich funkcji biologicznych. Jednak informacje na temat wpływu LG na przejścia fazowe lipidów i przestrzenną organizację błon są znikome. Do tej pory niewiele wiadomo na temat ich oddziaływania z heterogenicznymi filmami lipidowymi. Dlatego badania skoncentrowano na określeniu wpływu LG na właściwości jednoi wieloskładnikowych modelowych błon fosfolipidowych w aspekcie upakowania i uporządkowania monowarstw, rodzaju i wielkości oddziaływań, jak również stabilności i struktury filmów.

Badania zaprezentowane w pracy [H14] jasno wskazują, że LG wpływa na upakowanie i organizację monowarstw PL (rys. 5a). Efekt ten jest bardziej wyrazisty dla nasyconych fosfolipidów. W obecności LG następuje silne upłynnienie warstwy DPPG, natomiast w mieszaninie DPPC-LG przy $x_{LG} = 0,25$, obserwuje się wzrost skondensowania i obniżenie ciśnienia przejścia fazowego monowarstwy DPPC. Przy większej zawartości LG ($x_{LG} \ge 0,5$) warstewka staje się bardziej płynna.

Właściwość upłynniania błon przez LG jest ważnym aspektem w dziedzinie zmian nowotworowych, gdyż proliferacja (namnażanie) komórek nowotworowych jest związana ze zmienioną płynnością błon komórkowych. Na przykład guzy piersi są sztywniejsze w porównaniu do normalnych tkanek piersi [92, 93]. Prawdopodobnie efekt upłynnienia zmienionej nowotworowo błony może przeciwdziałać dalszemu rozwojowi komórek nowotworowych.



Rys. 5. (a) Moduł ściśliwości C_s^{-1} oraz (b) nadmiarowa energia Gibbsa ΔG_{exc} wyznaczone dla monowarstw PL-LG w zależności od składu [H14].

Z drugiej strony, LG nie zmienia płynności błon utworzonych z nienasyconych fosfolipidów POPC i DOPC (rys. 5a). Chociaż precyzyjna lokalizacja LG w membranach jest kontrowersyjna, wiadomo że amfifilowy charakter cząsteczek umożliwia ich organizację nie tylko na granicy faz membrana/woda, gdzie oddziałuje poprzez wiązanie wodorowe z polarnymi grupami PL, ale także w głębszych regionach poprzez oddziaływania hydrofobowe z łańcuchami węglowodorowymi PL. Bardziej ujemne wartości ΔG_{exc} uzyskane dla monowarstw POPC-LG i DOPC-LG niż dla DPPC-LG wskazują na silniejsze oddziaływania LG z nienasyconymi PL (rys. 5b). Na tej podstawie można wnioskować, że LG lokuje się preferencyjnie w głębszych regionach hydrofobowych nienasyconych PL, oddziałuje silnie "siłami hydrofobowymi", utrzymując płynność błony [H14].

Udział grup funkcyjnych DPPC lub DOPC w oddziaływaniach z LG w uwodnionych biwarstwach PC-LG utworzonych na krysztale ZnSe, potwierdzono techniką spektroskopową wykorzystującą zjawisko osłabionego całkowitego odbicia promieniowania IR (FTIR-ATR) [H20]. Porównanie oparto na założeniu, że właściwości monowarstw Langmuira przy ciśnieniu powierzchniowym 30-35 mN/m można z powodzeniem skorelować z właściwościami układów biwarstwowych [94, 95]. Taką analogię monowarstwa-biwarstwa udowodniono poprzednio w odniesieniu do układów PC-Chol w pracy [H3].

Ponadto oszacowano wzajemne położenie ugrupowań cząsteczek w monowarstwach dwuskładnikowych DPPC-LG i DOPC-LG przy $x_{LG} = 0,25$, po przeniesieniu na mikę, prowadząc badania powierzchni techniką spektrometrii mas jonów wtórnych z czasem przelotu (TOF-SIMS) [H20]. Technika ta pozwala na chemiczne oznaczenie rozmieszczenia związków w filmach LB w oparciu o intensywność sygnału charakterystycznych jonów wtórnych [96]. Analiza TOF-SIMS potwierdziła, że LG jest głębiej zanurzony w warstewce DOPC niż w DPPC, bliżej wiązań podwójnych, co koreluje z jego aktywnością przeciwutleniającą [H20]. Stwierdzono, że LG nie penetruje matrycy węglowodorowej, ale znajduje się w obszarze międzyfazowym lipid/woda zapewniając skuteczną ochronę lipidów przed utlenianiem. W tym aspekcie zachowanie LG wydaje się analogiczne do TF [31].

Monowarstwy DPPC-DOPC-Chol oraz DPPC-DOPC-LG

Następnie porównano wpływ Chol i LG na właściwości monowarstwy DPPC-DOPC (1:1), która wykazuje częściową mieszalność składników przejawiającą się w występowaniu skondensowanych obszarów uporządkowanych wzbogaconych w DPPC i nieuporządkowanych wzbogaconych w DOPC [H20].

Dostosowaniu/organizowaniu się Chol lub LG w obrębie monowarstwy fosfolipidowej DPPC/DOPC towarzyszy zmniejszanie się powierzchni na cząsteczkę, która z wyjątkiem x = 0,25, jest niższa w układzie DPPC-DOPC-LG, ponieważ powierzchnia zajmowana przez cząsteczkę LG jest mniejsza niż Chol przy tym samym ciśnieniu powierzchniowym. Stwierdzono, że grupy hydroksylowe reszty polarnej LG mogą tworzyć wiązania wodorowe z atomami tlenu grupy fosforanowej i estrowej PC, podczas gdy łańcuch laurylowy znajduje się pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi PC. W konsekwencji oddziaływań LG-PC, polarne głowy PC zorientowane początkowo prawie równolegle do granicy faz powietrze/woda [97] zmieniają orientację (nachylenie). Zbliżenie głów w wyniku tworzenia wiązania wodorowego prowadzi do pozornej kondensacji monowarstwy, o czym świadczą mniejsze wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę A₁₂₃. Mimo to LG utrzymuje płynność monowarstwy DPPC-DOPC (rys. 6a), co przypisuje się zginaniu lub nachyleniu łańcuchów PC. Jednak w tym układzie grubość i upakowanie monowarstw zmieniają się tylko nieznacznie ze wzrostem ilości LG ze względu na podobny stan fizyczny i stopień skondensowania monowarstwy LG i DPPC-DOPC. Dodanie LG do mieszaniny DPPC-DOPC, podobnie jak Chol, redukuje oddziaływania odpychające, zwiększając tym samym stabilność układu trójskładnikowego. Z tym, że wielkość oddziaływań jest większa w układach z Chol. W przeciwieństwie do Chol, LG preferencyjnie umiejscawia się w obszarach wzbogaconych w nienasycone PC chroniąc przed utlenianiem. Bardziej ujemne wartości ΔG_{exc} i ΔG_{mix} wskazują na silniejsze oddziaływania przyciągające (rys. 6b). Na podstawie tych parametrów oszacowano najbardziej korzystny skład układów trójskładnikowych przy x_{Chol} lub $x_{LG} = 0,5$. Wynika stąd, że zarówno Chol, jak i LG, stabilizują membrany fosfolipidowe, jednak mechanizm stabilizacji jest zupełnie inny. Cholesterol wywiera efekt kondensacyjny na PC (rys. 6a), indukuje konformacyjne uporządkowanie łańcuchów weglowodorowych i zwiększa grubość membrany [98]. LG wzmacnia stabilność monowarstw mieszanych oddziałując przez wiązanie wodorowe z polarnymi częściami PC [H20].



Rys. 6. (a) Moduł ściśliwości C_s^{-1} oraz (b) nadmiarowa energia Gibbsa ΔG_{exc} wyznaczone dla monowarstw DPPC-DOPC-Chol (LG) w zależności od składu [H20].

Tego typu oddziaływania lipofilowych przeciwutleniaczy z PC stanowią istotny mechanizm ochronny przed utlenianiem [99], ponieważ redukują dostęp zewnętrznych i wewnętrznych czynników agresywnych (to znaczy utleniaczy) do błony, zachowując w ten sposób jej struk-

turę i funkcje. Wydaje się, że za aktywność przeciwutleniającą LG głównie odpowiada ugrupowanie galusanowe, ale hydrofobowy łańcuch dodecylowy może również odgrywać rolę w modulacji właściwości fizycznych błony [86].

Struktura cienkich warstw na subfazie ciekłej i podłożu stałym

W celu uzupełnienia charakterystyki monowarstw Langmuira dokonanej w oparciu o rejestrowane izotermy π -A równolegle prowadzono bezpośrednią wizualizację morfologii filmów na granicy faz woda/powietrze w czasie rzeczywistym przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera (BAM). Technikę zastosowano do badań homogeniczności i/lub częściowej mieszalności, stanu fizycznego i przejść fazowych monowarstw jedno-, dwu- lub trójskładnikowych PL-TF i PL-LG, uporządkowania w poszczególnych fazach kompresji, transformacji monowarstw w struktury wielowarstwowe [H6, H14, H20] oraz określenia grubości filmów [H20].

Na podstawie analizy mikroskopowej BAM dowiedziono, że TF nie ulega degradacji podczas kompresji monowarstwy [H6]. Ponadto wykazano, że cząsteczki TF powyżej ciśnienia pierwszego załamania filmów DPPC-TF nie opuszczają obszaru międzyfazowego DPPC/subfaza, a tworzą dodatkową warstwę (*sublayer*) utrzymując jednocześnie stan jednofazowy układu [H6]. W przypadku mieszanin PL-LG potwierdzono całkowitą mieszalność DPPC-LG, DOPC-LG i POPC-LG oraz częściową mieszalność DPPG-LG z występowaniem dwóch współistniejących faz: o podwyższonej zawartości DPPG i o podwyższonej zawartości LG [H14].

Następnie monowarstwy Langmuira przenoszono na podłoże stałe techniką Langmuira-Blodgett (LB) poprzez wynurzanie nośnika o właściwościach hydrofilowych. Filmy LB wysuszone w suszarce próżniowej są bezpośrednio fizycznie zaadsorbowane do powierzchni nośnej, co pociąga ryzyko zmian w oryginalnej strukturze monowarstwy poprzez oddziaływania filmu z ciałem stałym. W związku z tym kolejną z podjętych kwestii była weryfikacja zachowania struktury molekularnej filmów Langmuira po przeniesieniu ich na stały nośnik na podstawie pomiarów topograficznych profilometrem optycznym (OP) oraz mikroskopem sił atomowych (AFM). Porównania dokonano na przykładzie układów PL-LG na mice [H15, H16]. Przekładanie sprężonych monowarstw odbywało się przy ciśnieniu powierzchniowym 30-35 mN/m, zależnie od rodzaju filmu. Wykazano, że transfer skompresowanego filmu z granicy faz woda/powietrze na mikę zasadniczo nie zmienia podstawowych cech strukturalnych związanych ze stopniem kondensacji, jednorodnością lub tworzeniem domen o określonym kształcie i wielkości [H14-H16]. Natomiast wyznaczone wartości parametrów chropowatości (R_a – średnia chropowatość, R_q – średnie odchylenie kwadratowe) powierzchni [100, 101] powiązano ze wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami, a także upakowaniem i uporządkowaniem filmów.

Dodatek LG podwyższa chropowatość filmów nasyconych PL-LG i obniża nienasyconych PL-LG w stosunku do czystych PL, ze względu na różnice w lokalizacji LG w monowarstwach PL, niedopasowanie strukturalne cząsteczek i/lub występowanie separacji faz (DPPG-LG, $x_{LG} = 0,25$ i 0,5) [H15].

Dla układów mononowarstw PL-Chol (otrzymanych techniką LB) i biwarstwy DOPC-Chol (uzyskanej techniką LS) stwierdzono znaczący wzrost chropowatości w obszarze wytrącania się Chol [H12, H13], natomiast jej minimum wystąpiło przy takiej proporcji obu składników, przy której określono najsilniejsze oddziaływania przyciągające na podstawie zmian ΔG_{exc} [H5]. Silna asocjacja cząsteczek Chol i obojnaczych PC powoduje kondensację i wygładzenie filmu. Mono- i biwarstwy Chol nie są ciągłe, a cząsteczki Chol agregują tworząc charakterystyczne igły [H12] lub wysepki [H13]. Badania topograficzne potwierdziły zgodność właściwości odpowiednich monowarstw L i LB/LS.

Sytuacja jest całkiem inna i dość skomplikowana, jeśli nośnik filmu lipidowego wykazuje chropowatość na poziomie mikrometrów, np. PEEK [H17]. Prace [H17, H19] przedstawiają charakterystykę topografii powierzchni spreparowanych w oparciu o nową koncepcję projektowania biokompatybilnych materiałów polimerowych poprzez modyfikację plazmą, a następnie pokrycie zmodyfikowanej powierzchni modelową błoną zawierającą substancję o aktywności biologicznej [H17] lub warstwą mieszaną (hybrydową) chitozan/DPPC [H19]. Działanie plazmą niskotemperaturową (zjonizowany gaz zawierający jony, elektrony i/lub atomy/cząsteczki niezjonizowane) na powierzchnie polimerów powoduje ich aktywację poprzez utworzenie nowych grup funkcyjnych, zwiększając tym samym właściwości adhezyjne [102]. W konsekwencji może prowadzić to do lepszej integracji implantów polimerowych z tkankami Jednocześnie aktywacja może zwiększać lub zmniejszać chropowatość powierzchni w zależności od rodzaju zastosowanego gazu [H17, H19].

Podczas procesu osadzania metodą rozpływania (S), LB lub LS cząsteczki związków mogą wnikać w zagłębienia w powierzchni chropowatego nośnika wygładzając ją lub przeciwnie – wywoływać wzrost chropowatości. Znaczne różnice w chropowatości monowarstwy DPPC-LG na mice (rzędu nanometrów) [H15] i PEEK-u (rzędu mikrometrów) [H17] są związane oczywiście z chropowatością samego podłoża, ale także wynikają z prawdopodobnych zmian w homogeniczności, upakowaniu i uporządkowaniu cząsteczek wywoływanych oddziaływaniem filmu z ciałem stałym. Jego właściwości dodatkowo zmieniają się w zależności od rodzaju gazu użytego do aktywacji plazmą. Wydaje się mało prawdopodobne, żeby monowarstwa ściśle przylegała do chropowatego podłoża. Obecność monowarstw indukuje nierówności w skali nanometrów, które dodatkowo zwiększają mikro-chropowatość PEEK-u w wyniku tworzenia się powierzchni o strukturze hierarchicznej.

W badaniach opisanych w kolejnej pracy [H19] jako nośnik stały zastosowano polimer PET o szerokim spektrum zastosowań, m. in. jako materiał do produkcji sztucznych więzadeł czy stentów do naczyń krwionośnych [56, 103]. W celu zmniejszenia lub nawet wyeliminowania efektów ubocznych towarzyszących umieszczeniu implantów w organizmie, tj. stany zapalne w wyniku zbyt słabej integracji polimeru z otaczającą tkanką lub tworzenie skrzepów, istnieje potrzeba dalszej modyfikacji powierzchni PET. Wykorzystano aktywację plazmą powietrzną oraz dwuetapowe pokrycie polimeru, najpierw warstwą chitozanu przez rozpływanie (S), a następnie monowarstwą DPPC czterema różnymi metodami: S, LB przez wynurzanie (LB \uparrow) i zanurzanie (LB \downarrow) nośnika przez monowarstwę L, oraz LS. Topografie i chropowatość powierzchni określono za pomocą trzech komplementarnych technik: AFM, profilometria optyczna (OP) i mechaniczna (MP). Wykazano, że film chitozanu związany z aktywowanym polimerem PET powoduje 26-30 krotny wzrost parametru S_q (równoważnego z parametrem R_a) w stosunku do powierzchni polimeru, ze względu na formowanie krystalicznych wzniesień o średnicy w zakresie 1,3-3,5 µm i wysokości 100 nm-2,1 µm. Obecność warstewki DPPC zmniejsza chropowatość PET-u po aktywacji w skali nanometrów, natomiast dla filmu chitozan/DPPC, wyraźne wygładzenie powierzchni występuje tylko po zastosowaniu techniki S do naniesienia roztworu DPPC. W pozostałych przypadkach, prawdopodobnie na skutek różnic w upakowaniu i organizacji cząsteczek DPPC obserwuje się wzrost chropowatości [H19].

Kąt zwilżania i jego histereza

Analiza topografii i chropowatości powierzchni warstw i nośnika okazała się pomocna w określaniu czynników odpowiedzialnych za zwilżalność modelowych błon. Badania zwilżalności stanowiły kolejny ważny element w realizacji celów badawczych.

Kąt zwilżania jest bezpośrednio mierzoną wielkością, która odzwierciedla uśrednione oddziaływania (siły) w obszarze trójfazowego kontaktu (ciało stałe/ciecz/gaz) jako efekt wzajemnej "rywalizacji" energii kohezji cząsteczek cieczy i energii adhezji pomiędzy cieczą i ciałem stałym [104, 105]. Kąt zwilżania wody stanowi parametr określający hydrofilowość/hydrofobowość powierzchni ciała stałego. Stwierdzono, że dopiero chropowatość powierzchni większa niż 10-30 nm [106] wpływa na wartość mierzonego kąta zwilżania. Chropowatość powierzchni wszystkich badanych filmów LB/S (PL/Chol, PL/LG) na mice była znacznie mniejsza niż podany zakres [H12, H13, H15]. Dotyczy to także powierzchni pięciu statystycznych monowarstw DPPC otrzymanych przez rozpływanie roztworu na mice, szkle i polimetakrylanie metylu (PMMA) [H7]. Stąd wniosek, że topografia tak cienkich filmów nie powinna być głównym czynnikiem decydującym o mierzonych wartościach kąta zwilżania.

Z drugiej strony powierzchnia PEEK-u, warstwy DPPC-LG na PEEK-u, warstwy chitozanowe i mieszane chitozan/DPPC wykazują chropowatość znacznie większą niż 10-30 nm, tj. $R_q = 181-224$ nm (dla powierzchni 50x50 μ m²). Dlatego w tych przypadkach zarówno chropowatość, jak i chemiczna heterogeniczność determinują wartość mierzonego makroskopowego kąta zwilżania [H17, H19].

Do badań zwilżalności stosowano trzy ciecze o zdefiniowanej polarności: wodę (W), formamid (F) i dijodometan (DM), różniące się wartościami napięć powierzchniowych i ich składowych. Podstawowe parametry charakteryzujące ciecze testowe zebrano w tabeli 2.

| Ciecz | γl | ${\gamma_L}^{LW}$ | γ_L^+ | γ_L^- | ${\gamma_L}^{AB}$ | Temperatura wrzenia °C | Prężność pary w 20°C mm Hg | Objętość cząsteczki nm ³ | Powierzchnia cząsteczki nm ² |
|--|------|-------------------|--------------|--------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Woda, H ₂ O | 72,8 | 21,8 | 25,5 | 25,5 | 51,0 | 100 | 17,5 | 0,030 | 0,059 |
| Formamid, HCONH ₂ | 58,0 | 39,0 | 2,28 | 39,6 | 19,0 | 210 | 0,08 | 0,066 | 0,197* |
| Dijodometan, CH ₂ I ₂ | 50,8 | 50,8 | 0 | 0 | 0 | 182 | 0,82 | 0,134 | 0,215 |

Tabela 2. Napięcie powierzchniowe i jego składowe cieczy testowych użytych do pomiarów kąta zwilżania w mN/m [46] oraz inne parametry fizykochemiczne cieczy [H7].

* obliczona przy założeniu kulistego kształtu cząsteczki, γ_L – napięcie powierzchniowe cieczy, γ_L^{LW} – składowa Lifshitza-van der Waalsa, γ_L^{AB} – składowa kwasowo-zasadowa Lewisa, γ_L^+ – parametr elektrono-akceptorowy, γ_L^- – parametr elektrono-donorowy.

Powszechnie przyjmuje się, że napięcie powierzchniowe niepolarnego dijodometanu wynika wyłącznie z międzycząsteczkowych oddziaływań Lifshitza-van der Waalsa $\gamma_L^{LW} = \gamma_L$, w których skład wchodzą głównie oddziaływania dyspersyjne Londona. Chociaż dijodometan i formamid nie są spotykane w naturalnym środowisku błon biologicznych, zastosowanie powyższego tripletu stwarza możliwość wiarygodnej oceny uśrednionych oddziaływań z cieczami o różnym charakterze, zarówno polarnym, jak i niepolarnym. Jest to tym bardziej uzasadnione, że błony nie są izolowanymi układami, ale kontaktują się z substancjami o zróżnicowanych właściwościach.

Zmierzono wstępujące θ_a i cofające θ_r kąty zwilżania metodą "siedzącej kropli" o objętości odpowiednio 3 µL i 2 µL [H1, H4, H5, H7-H13, H15, H16] oraz 6 µL i 4 µL [H17-H19], zależnie od chropowatości powierzchni.

Zmiany kąta zwilżania w zależności od czasu kontaktowania z cieczą

Ze względu na fakt, że fosfolipidy w środowisku wodnym ulegają spontanicznej agregacji do biwarstw, pierwszym etapem badań było określenie zmian kąta zwilżania od momentu postawienia kropli cieczy na powierzchni filmu w czasie 120 min kontaktowania [H4]. Pomiary kątów zwilżania przeprowadzono na monowarstwie DPPC, ponieważ jest to najczęściej stosowany fosfolipid w badaniach modelowych błon biologicznych. Ponadto, ze względu na obecność nasyconych łańcuchów palmitynowych, tworzy ściśle upakowane monowarstwy, w których części węglowodorowe skierowane są na zewnątrz, a polarne grupy fosfocholinowe w kierunku podłoża.

Wartości kątów zwilżania zależą od rodzaju cieczy i czasu jej kontaktowania z filmem (rys. 7, tab. 3). W ciągu 120 minut wstępujący kąt zwilżania dijodometanu maleje o ok. 8°, formamidu o ok. 25°, zaś kąt zwilżania wody gwałtownie zmniejsza się w ciągu pierwszej minuty o ok. 20° i po 60 minutach kropla wody rozpływa się całkowicie po warstwie DPPC.



Rys. 7. Wstępujące kąty zwilżania (θ_a) wody (W), formamidu (F) i dijodometanu (DM) na monowarstwie DPPC w zależności od czasu kontaktowania monowarstwy z kroplą cieczy [H4].

Tabela 3. Zmiany wstępujących i cofających kątów zwilżania cieczy (W, F, DM) zmierzone w ciągu 60 sekund od postawienia kropli na monowarstwie DPPC osadzonej na mice [H4].

| Czes | Wstępujące i cofające kąty zwilżania (°) | | | | | | | | |
|------|--|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|--|
| CZas | V | V | I | 7 | D | DM | | | |
| (8) | θ_a | θ_r | θ_a | θ_r | θ_a | θ_r | | | |
| 1 | 97,1 | 79,6 | 88,9 | 84,7 | 68,9 | 67,3 | | | |
| 2 | 96,8 | 79,8 | 88,9 | 84,7 | 67,1 | 66,5 | | | |
| 3 | 97,2 | 78,6 | 89,5 | 84,7 | 67,1 | 66,5 | | | |
| 4 | 97,3 | 79,2 | 89,5 | 84,7 | 66,8 | 65,6 | | | |
| 5 | 96,2 | 78,3 | 88,3 | 84,2 | 66,8 | 65,6 | | | |
| 6 | 95,8 | 77,7 | 88,3 | 84,2 | 66,8 | 65,6 | | | |
| 7 | 94,7 | 77,7 | 88,3 | 83,9 | 66,8 | 65,6 | | | |
| 8 | 93,9 | 77,9 | 88,6 | 83,6 | 67,5 | 65,6 | | | |
| 9 | 92,8 | 76,7 | 88,6 | 83,6 | 66,8 | 65,6 | | | |
| 10 | 90,3 | 76,4 | 88,1 | 83,9 | 67,5 | 65,6 | | | |
| 20 | 87,4 | 75,1 | 86,9 | 82,8 | 66,8 | 65,3 | | | |
| 30 | 83,0 | 73,0 | 86,6 | 81,7 | 66,3 | 65,3 | | | |
| 60 | 76,5 | 70,3 | 85,0 | 81,2 | 66,3 | 65,3 | | | |

Wzrost hydrofilowości powierzchni jest wynikiem reorganizacji monowarstwy do fragmentarycznej biwarstwy, w której cząsteczki zewnętrznej warstewki orientują ugrupowania polarne w kierunku wody. Zastosowanie techniki AFM *in situ* w środowisku wodnym potwierdziło, że monowarstwa DPPC przy dłuższym kontakcie z wodą stopniowo przekształca się do fragmentarycznej biwarstwy o grubości 5-6 nm. Jednakże nawet w przypadku kropli wody kąt zwilżania nie zmienia się znacząco w ciągu pierwszych kilku sekund po postawieniu kropli $(\theta_a/\theta_r = 97^\circ \pm 1,77/79^\circ \pm 1,47)$ (tab. 3). Stwarza to możliwość wiarygodnego określenia zwilżalności oryginalnych monowarstw. Mając na uwadze silnie polarny charakter wody jej względnie wysokie kąty zwilżania ($\theta_a/\theta_r = 97^\circ/79^\circ$) wyraźnie wskazują na apolarny charakter filmu DPPC [H4].

Zmiany kąta zwilżania w zależności od składu chemicznego filmów

Kolejnym etapem były badania wpływu składu chemicznego ściśle określonych monowarstw PL-PL [H1, H11], PL-Chol [H1, H12] i PL-LG [H15, H16] na wartość mierzonego kąta zwilżania i jego histerezy. Na ich podstawie wykazano, że wartości kąta zwilżania są w głównej mierze determinowane stanem fizycznym monowarstw, składem jakościowym i ilościowym oraz rodzajem cieczy użytej do pomiarów.

W temperaturze prowadzenia eksperymentu fosfolipidy DPPC i DPPG występują w stanie żelu, zwanym fazą stałą uporządkowaną (*solid-ordered phase*), w której łańcuchy węglowodorowe wykazują konformację *trans* sprzyjającą tworzeniu zwartych filmów. Łańcuchy mogą być nachylone o ok. 30° względem normalnej do membrany [33, 97], a nachylenie zależy także od charakteru polarnej części cząsteczek. Szczególnie grupy hydroksylowe DPPG są zdolne do silnych oddziaływań poprzez wiązania wodorowe [107]. W związku z tym, chociaż ścisłe upakowanie łańcuchów zapobiega penetracji wody w głąb monowarstwy, co przejawia się stosunkowo wysokim kątem zwilżania wody, to jednak silna tendencja DPPG do tworzenia wiązań wodorowych z wodą [108] powoduje obniżenie kąta zwilżania wody ($\theta_a/\theta_r = 76,1^{\circ}/62,9^{\circ}$) w stosunku do DPPC ($\theta_a/\theta_r = 97^{\circ}/79^{\circ}$).

Natomiast filmy zbudowane z nienasyconych fosfolipidów POPC lub DOPC znajdują się w fazie ciekłokrystalicznej, zwanej fazą nieuporządkowaną ciekłą (*liquid-disordered phase*, *fluid*). Taki stan wynika z obecności wiązań podwójnych, które zakłócają uporządkowaną strukturę łańcuchów węglowodorowych [3]. W związku z tym warstewka ciekłokrystaliczna jest luźniej upakowana i bardziej przepuszczalna, a kąty zwilżania wody zdecydowanie niższe (DOPC $\theta_a^W/\theta_r^W = 67,9^{\circ}/44,5^{\circ}$; POPC $\theta_a^W/\theta_r^W = 59,5^{\circ}/41,7^{\circ}$) [H11].

Temperatura przejścia fazowego żel-ciekły kryształ wynosi ok. 41°C dla DPPC i DPPG, podczas gdy dla POPC wynosi -3°C, a dla DOPC -18°C do -20°C [66,109]. Dlatego występowanie fosfolipidów w różnych stanach fizycznych, w temperaturze pomiaru, narzuca częściowy rozdział faz w mieszaninie udowodniony dodatnimi wartościami nadmiarowej energii Gibbsa mieszania ΔG_{exc} [H11]. Współistnienie przestrzennie oddzielonych obszarów skondensowanych (uporządkowanych) wzbogaconych w nasycony PL (DPPC lub DPPG), które są zanurzone w ciekłokrystalicznej (nieuporządkowanej) matrycy wzbogaconej w nienasycone PL (POPC lub DOPC), może zwiększać lub zmniejszać zwilżalność daną cieczą zależnie od wzajemnego stosunku obu składników w monowarstwie w odniesieniu do układów jednoskładnikowych. Biorąc pod uwagę wartości modułu ściśliwości, układy mieszane fosfolipidów POPC(DOPC)-DPPG są mniej skondensowane, a przez to lepiej penetrowane przez cząsteczki cieczy niż film DPPC/DPPG [H11].

Mieszanie cząsteczek różnego typu zwykle utrudnia tworzenie ściśle uporządkowanych monowarstw. Wprowadzenie nienasyconego fosfolipidu DOPC zawierającego wiązania podwójne o konfiguracji *cis* do nasyconego DPPC zaburza jego ścisłe upakowanie zwiększając powierzchnię przypadającą na cząsteczkę i wywołuje częściową mieszalność. Tworzeniu domen w układzie DPPC-DOPC towarzyszy obniżenie skondensowania i uporządkowania (niższe wartości C_s^{-1}) oraz osłabienie oddziaływań przyciągających w stosunku do czystych monowarstw ze względu na dodatnie wartości A_{exc} i ΔG_{exc} [H1, H20]. W efekcie luźniej upakowana warstwa staje się bardziej przepuszczalna dla cząsteczek cieczy, a mierzony kąt zwilżania mniejszy [H1].

Wyniki badań układów fosfolipidów z cholesterolem (PL-Chol) przedstawione w pracy [H12] wyraźnie wskazują, że obecność Chol w monowarstwach (DPPC, POPC, DOPC, DPPG) wywołuje stopniowe obniżenie wartości kątów zwilżania wody i dijodometanu ze wzrostem zawartości Chol. Wyjątek stanowi układ POPC-Chol $x_{Chol} = 0,25$, gdzie kąt zwilżania wody jest większy niż na POPC. Jednocześnie mieszaniny Chol z nasyconymi PL (DPPC, DPPG) tworzą bardziej skondensowane i uporządkowane filmy niż układy Chol z nienasyconymi PL (POPC, DOPC), a stopień skondensowania rośnie ze wzrostem ilości Chol w monowarstwie [H5]. W tych układach zmiany kątów zwilżania nie korelują ściśle ze zmianą skondensowania filmu, ale zależą od składu i wzajemnej mieszalności składników. Szczególnie drastyczne obniżenie kątów zwilżnia wody obserwuje się na monowarstwach PL-Chol, gdy zawartość Chol przekracza próg jego rozpuszczalności i nadmiar Chol wytrąca się. Ponadto kąty zwilżania zmierzone na monowarstwie czystego Chol przeniesionej na mikę są stosunkowo niskie, odpowiednio $\theta_a^W / \theta_r^W = 10,7^o/5,5^o$; $\theta_a^F / \theta_r^F = 9,1^o/6,8^o$; $\theta_a^{DM} / \theta_r^{DM} =$ 50,1^o/31,8^o [H12] pomimo, że moduł ściśliwości monowarstwy Chol świadczy o wysokim upakowaniu i uporządkowaniu filmu [H5]. Można to uzasadnić faktem, że Chol nie tworzy jednorodnych struktur lamelarnych, co oznacza, że po przeniesieniu monowarstwy na stały nośnik cząsteczki agregują formując struktury o kształcie igieł. Dlatego ciecze stosowane do pomiarów mogą mieć dostęp do odsłoniętej powierzchni miki, co wnosi istotny wkład do wartości kąta zwilżania układu mika/Chol [H12]. Podobny trend zmian kątów zwilżania wy-stępuje dla mono- i biwarstw DPPC-Chol, z tym że biwarstwy wykazują mniejszą zwilżal-ność, ze względu na zmianę orientacji cząsteczek zewnętrznej warstwy [H9].

Kolejny etap badań obejmował określenie wpływu temperatury fizjologicznej 37°C na zwilżalność biwarstw DOPC-Chol osadzonych na mice w zależności od zmieniających się proporcji obu składników i w odniesieniu do temperatury 20°C [H13]. Stwierdzono, że obecność Chol w biwarstwie DOPC powoduje zmiany kątów zwilżania z minimum przy $x_{Chol} = 0,5$. Wyższe kąty zwilżania wody i formamidu otrzymano w temperaturze 37°C na czystym DOPC i DOPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$ [H13].

Następnie określono zwilżalność układów zawierających LG. Monowarstwa LG występując na subfazie wodnej w stanie cieczy rozprężonej charakteryzuje się luźnym upakowaniem cząsteczek, podobnie do nienasyconych PL [H14]. W mieszaninach z POPC i DOPC utrzymuje się stan cieczy rozprężonej, natomiast skondensowanie układów DPPC i DPPG ulega zmniejszeniu w obecności LG ze względu na zakłócenie ich uporządkowania (mniejsze wartości C_s^{-1}) [H14]. Jedynie w układzie DPPC-LG przy $x_{LG} = 0,25$ występuje wzrost upakowania. Na podłożu stałym monowarstwa LG wykazuje niższe kąty zwilżania w porównaniu do monowarstw PL ($\theta_a^W/\theta_r^W = 37,2/25,3^\circ$; $\theta_a^F/\theta_r^F = 26,9/17,4^\circ$; $\theta_a^{DM}/\theta_r^{DM} = 61,0/59,1$) [H15, H16]. Jak można było oczekiwać, znacznie mniejsze kąty zwilżania wody w stosunku do PL obserwuje się w przypadku monowarstw dwuskładnikowych DPPC-LG i DPPG-LG, przy czym większą redukcję kątów uzyskuje się na DPPG-LG uwidaczniając jednocześnie wpływ polarnej grupy i częściowej mieszalności (separacji faz) na zwilżalność filmów dwuskładnikowych.

Ponadto warto podkreślić, że przebieg zmian kątów zwilżania na monowarstwach DPPC-LG, osadzonych na mice i PEEK-u, zależnie od składu jest analogiczny, mimo różnic w wartościach (rys. 8). Stałe podłoże odgrywa decydującą rolę w procesie osadzania cienkich filmów lipidowych [110, 111]. Gładka powierzchnia miki ułatwia tworzenie zwartych filmów zachowując strukturę i orientację cząsteczek monowarstwy Langmuira na granicy faz powie-trze/woda. Prowadzi to zazwyczaj do uzyskania wysokich kątów zwilżania. Chropowate podłoże polimerowe może indukować znaczną redystrybucję cząsteczek w filmach mieszanych DPPC-LG w porównaniu z pierwotnym rozkładem w monowarstwach Langmuira. Z jednej strony, bardziej rozwinięta powierzchnia nośnika zmniejsza oddziaływania między membraną a podłożem [112], tj. ścisłe przyleganie, które wymagałoby wysokich nakładów energetycz-

nych związanych ze zginaniem filmu. Dodatkowo aktywacja polimeru plazmą modyfikuje jego właściwości powierzchniowe, w tym ilość i rodzaj grup funkcyjnych oraz heterogeniczność topografii. Wpływają one na boczne oddziaływania sąsiadujących cząsteczek filmu, co powoduje zmiany w gęstym całkowitym upakowaniu cząsteczek, ich grupowaniu i uporządkowaniu. Z drugiej strony, wzrost nieuporządkowania łańcuchów alkilowych może sprzyjać lokalnym silniejszym oddziaływaniom hydrofobowym między cząsteczkami w monowarstwie [113]. W związku z tym zauważalne są wyraźne zmiany zwilżalności monowarstw DPPC-LG w zależności od rodzaju nośnika i plazmy użytej do aktywacji polimeru [H17].





Rys. 8. Wstępujące i cofające kąty zwilżania (a) wody (W), (b) formamidu (F), (c) dijodometanu (DM) zmierzone na powierzchniach mika/DPPC-LG [H15] oraz PEEK/DPPC-LG [H17].

Warto wspomnieć, że zwilżalność monowarstwy DPPC ściśle zależy od orientacji jej cząsteczek. Na podstawie pomiarów kątów zwilżania i analizy techniką TOF-SIMS powierzchni PET/chitozan/DPPC, zaproponowano indukowany obecnością chitozanu charakterystyczny mechanizm reorientacji cząsteczek DPPC podczas osadzania techniką LB przez wynurzanie (LB↑) lub techniką S. Na skutek oddziaływań chitozan-DPPC polarne części DPPC układają się w kierunku powietrza modyfikując gęstość ładunku powierzchniowego chitozanu i zwiększając charakter hydrofilowy układu [H18, H19].

Histereza kąta zwilżania

Bardziej szczegółowa charakterystyka powierzchni ciał stałych i/lub filmów obejmuje określanie histerezy kąta zwilżania definiowanej jako różnica między wartością wstępującego i cofającego kąta zwilżania [49, 114, 115]. Chociaż cofający kąt zwilżania zależy w pewnym stopniu od techniki prowadzenia eksperymentu [116], to jeśli zastosuje się taką samą technikę i warunki do pomiaru wstępującego i cofającego kąta zwilżania, mierzone pozorne wartości kąta zwilżania są powtarzalne i dlatego wiarygodne. Ponadto na podstawie wartości cofającego kąta zwilżania i histerezy można uzyskać dodatkowe informacje o właściwościach filmu powierzchniowego, jak również o mechanizmie zachowania się cieczy. Jest to możliwe, ponieważ na mierzoną wartość cofającego kąta zwilżania na filmach wpływają takie procesy jak: wnikanie cieczy w głąb filmu, retencja i reorganizacja cząsteczek [117].

Analizę zjawiska histerezy kąta zwilżania w odniesieniu do modelowych błon przedstawiono w pracy [H7] dla mono- i multiwarstw fosfolipidu DPPC otrzymanych techniką rozpływania roztworu (S) na różnych nośnikach (mika, szkło, PMMA). Filmy utworzone poprzez wylanie roztworu na powierzchnię ciała stałego i odparowanie rozpuszczalnika nie są uporządkowane ani gęsto upakowane, a cząsteczki mogą agregować tworząc wysepki z łańcuchami węglowodorowymi "wystającymi" na zewnątrz. Towarzyszą im obszary czystego nośnika niepokrytego filmem [H2, H9, H10]. We wszystkich badanych układach występuje histereza kąta zwilżania, która w przypadku kropel wody wynosi nawet kilkanaście stopni. Znacznie mniejsza histereza pojawia się w przypadku kąta zwilżania dijodometanu. Stwierdzono, że nawet na pięciu statystycznych monowarstwach DPPC wielkość histerezy kąta zależy od rodzaju stałego nośnika. Histereza jest większa na warstwach DPPC osadzonych na powierzchniach wykazujących silne oddziaływanie polarne, tj. szkło i mika, niż na słabo polarnym PMMA (rys. 9). Wynika stąd, że zależność między rodzajem nośnika stałego a właściwościami cieczy determinuje wartość kąta zwilżania i jego histerezy na tym samym rodzaju warstwy. Również na tym samym stałym nośniku histereza kąta zwilżania zależy od rodzaju użytej cieczy. Jest większa dla cieczy polarnych (wody i formamidu) niż niepolarnego dijodometanu [H7, H10]. Jest to konsekwencja penetracji cząsteczek wody do wnętrza warstwy DPPC podczas cofania linii kontaktu trójfazowego przy pomiarze cofającego kąta zwilżania [H7, H10]. Dostęp cząsteczek cieczy do polarnych i niepolarnych ugrupowań w cząsteczkach DPPC znajduje odzwierciedlenie w zmierzonych kątach zwilżania [H7].



Rys. 9. Histereza kąta zwilżania wody, formamidu i dijodometanu na monowarstwach DPPC osadzonych na szkle, mice i PMMA [H7, H10].

W kolejnym etapie badań określono histerezę kąta zwilżania różnych cieczy na ściśle zdefiniowanych monowarstwach PL-Chol i PL-LG o zmiennym składzie, otrzymanych na mice techniką LB [H12, H15]. Dla wszystkich badanych układów histereza jest dodatnia, czyli $\theta_a > \theta_r$, co oznacza całkowitą lub częściową zwilżalność powierzchni filmu przez ciecz pozostałą za cofającą się kroplą. Wykazano, że zwilżalność powierzchni o nanochropowatości może być związana z rozkładem gęstości łańcuchów węglowodorowych. Przy niskiej gęstości cząsteczki cieczy zwilżającej wnikają w zagłębienia prowadząc do lepszej zwilżalności. Wraz ze wzrostem gęstości łańcuchów acylowych, uporządkowana struktura monowarstwy zapobiega penetracji cieczy. Zatem ścisłe upakowanie monowarstwy utrudnia wnikanie cieczy podczas pomiaru wstępującego kąta zwilżania dając względnie wysoką wartość kąta zwilżania. Jednak cofając linię trójfazowego kontaktu ciało stałe/ciecz/gaz, cząsteczki cieczy łatwiej penetrują w zagłębienia powierzchni usuwając powietrze uwięzione poniżej kropli podczas pomiarów wstępującego kąta zwilżania [118]. Wówczas cofający kąt zwilżania jest mniejszy niż wstępujący [H12, H15].

Histereza kąta zwilżania określona dla filmów Chol z nasyconymi PL (DPPC, DPPG) jest większa niż dla filmów Chol z nienasyconymi PL (POPC, DOPC) [H12]. Luźniej upakowane i mniej uporządkowane monowarstwy umożliwiają łatwiejsze przenikanie cieczy prowadząc do niższych wstępujących i cofających kątów zwilżania, dzięki czemu uzyskuje się mniejszą histerezę. Charakterystyczne zmiany histerezy występują dla filmów PL-Chol wykazujących separację faz, związaną z wytrącaniem się nadmiaru Chol przy określonym składzie monowarstwy. Dla tego typu układów histereza kąta zwilżania wody znacząco maleje, podczas gdy histereza kąta zwilżania dijodometanu znacznie wzrasta. Różnice w zachowaniu się wody i dijodometanu przypisano innym mechanizmom (penetracja/retencja) [H12]. Ponadto histereza kąta zwilżania wody określona dla monowarstw PL-LG maleje w zależności od ułamka molowego LG, podczas gdy histereza kąta zwilżania formamidu rośnie (poza POPC-LG). Różnice w zachowaniu wynikają z różnic w polarności cieczy oraz rozmiarów ich cząsteczek. Natomiast histereza kąta zwilżania dijodometanu jest niewielka i zawiera się w przedziale 2º niezależnie od składu, zaś histereza kątów zwilżania polarnych cieczy wynosi od 6º do 26° [H15].

Nawet na ściśle upakowanych filmach histereza kąta zwilżania wody jest dużo większa niż dijodometanu. Sugeruje to występowanie zjawiska sorpcji/penetracji wody modyfikującego strukturę filmu. Histereza może być spowodowana zmianą orientacji zaadsorbowanych fizycznie cząsteczek, które przy dłuższym kontakcie z wodą eksponują polarne ugrupowania w stronę cieczy [115, 119, 120]. W wyniku spontanicznej reorganizacji monowarstwy promowanej oddziaływaniami hydrofobowymi [120, 121] powstają fragmentaryczne biwarstwy. Nawet, jeśli cofający kąt zwilżania jest mierzony bezpośrednio po wstępującym, monowarstwa pozostaje w kontakcie z cieczą przez dłuższy czas, który wystarcza na przekształcenie struktury monowarstwy w biwarstwowe domeny i częściowe odkrycie powierzchni nośnika. Ułatwia to przenikanie wody w głąb warstwy podczas pomiaru cofającego kąta zwilżania i prowadzi do wzrostu histerezy [H12].

Natomiast histereza kąta zwilżania dijodometanu wynika raczej z faktycznego charakteru chemicznego cząsteczki i jej rozmiarów [H15]. Zatem dijodometan będąc praktycznie niepolarną cieczą nie powinien indukować reorganizacji monowarstwy lipidowej. Dijodometan charakteryzuje się średnią powierzchnią na cząsteczkę wynoszącą w przybliżeniu 0,215 nm², która jest ponad 3,6 razy większa niż powierzchnia cząsteczki wody, tj. 0,059 nm² [H1]. Ciecze o większych cząsteczkach posiadają mniejszą zdolność do penetracji warstewki i dlatego wykazują mniejszą histerezę kąta zwilżania. W tym przypadku histereza może być spowodowana filmem cieczy (klastry i/lub nanokropelki) pozostałym za kroplą podczas cofania się czoła kropli (linii trójfazowego kontaktu ciało stałe/ciecz/gaz). Innymi słowy, siły międzycząsteczkowe działające między cząsteczkami filmu i kropli cieczy "wiążą" linię trójfazowego kontaktu do filmu powodując histerezę kąta zwilżania [H12, H15].

Nie ma bezpośredniej korelacji między wartościami kątów zwilżania (i histerezy) oraz chropowatością mniejszą niż 1 µm. W przedstawionych badaniach znacznym zmianom histerezy towarzyszą tylko małe zmiany parametrów chropowatości określone za pomocą profilometru optycznego i mikroskopu sił atomowych (AFM). Chropowatość nie jest główną przyczyną obserwowanej histerezy, dlatego też musi ona wynikać z pewnych różnic w strukturze warstw [H7, H12, H15]. Warunkują ją zmiany składu jakościowego i ilościowego powierzchni, upakowania, uporządkowania i organizacji cząsteczek, którym towarzyszą zmiany topograficzne głównie na poziomie angstremów [H12, H15] i zgodnie z podejściem Chibowskiego, obecność filmu cieczy poza linią trójfazowego kontaktu [H7, H12, H15]. Histereza kąta zwilżania wynika zarówno z właściwości powierzchni nośnika stałego, osadzonego filmu jak i natury cieczy, tj. oddziaływań międzycząsteczkowych między nimi [H7, H10].

Z drugiej strony, ponieważ powierzchnia PEEK bez i z osadzonymi warstwami wykazuje chropowatość w skali mikrometrów, aspekty topograficzne są kluczowe dla występowania histerezy kąta zwilżania [H17]. Obecność monowarstwy DPPC podwyższa histerezę kąta zwilżania cieczy w stosunku do histerezy określonej dla aktywowanego podłoża PEEK. Natomiast obniżenie kątów zwilżania cieczy polarnych na warstewkach DPPC-LG i LG prowadzi również do zmniejszenia ich histerez (o ok. 8° w przypadku kropel wody lub 16° dla formamidu). Decyduje o tym zmiana oryginalnego upakowania i organizacji cząsteczek, których niepolarne grupy dążą do zminimalizowania kontaktu z wodą/formamidem [120, 121]. Na uwagę zasługuje wysoka wartość histerezy kąta zwilżania dijodometanu (w zakresie 15-17°), która w niewielkim stopniu zależy od składu monowarstw DPPC-LG. Warto podkreślić, że chropowate powierzchnie mogą być "jednorodnie" zwilżane cieczą, która wnika do wgłębień, lub "niejednorodnie", gdy pod kroplą cieczy we wgłębieniach pozostaje powietrze. Podczas pomiaru cofającego kąta zwilżania ciecz wypiera uwięzione pod kroplą powietrze, co powoduje wzrost histerezy kąta.

Swobodna energia powierzchniowa

Wiadomo, że kąt zwilżania jest raczej jakościowym parametrem do oceny stanu hydrofobowości/hydrofilowości warstw. Bardziej szczegółową analizę oddziaływań można uzyskać na podstawie wartości pozornej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych korzystając z teoretycznych modeli oddziaływań międzyfazowych.

Model histerezy kąta zwilżania Chibowskiego (CAH)

W celu ilościowego oszacowania zmian swobodnej energii powierzchniowej warstewek γ_s wykorzystano zmierzone wstępujące θ_a i cofające θ_r kąty zwilżania wody (W), formamidu (F) i dijodometanu (DM) o znanych wartościach napięcia powierzchniowego γ_L (tab. 2) oraz zaproponowane przez Chibowskiego teoretyczne podejście uwzględniające histerezę kąta zwilżania (CAH) (rów. 7) [49]:

$$\gamma_S = \frac{\gamma_L (1 + \cos\theta_a)^2}{(2 + \cos\theta_r + \cos\theta_a)} \tag{7}$$

Całkowitą wartość pozornej swobodnej energii powierzchniowej (γ_S^{tot}) wyrażono jako średnią arytmetyczną wartości określonych osobno na podstawie histerezy kąta zwilżania wody (γ_S^W), formamidu (γ_S^F) i dijodometanu (γ_S^{DM}) [H2, H8, H10, H16, H18]. γ_S^W i γ_S^F odzwierciedlają zarówno oddziaływania dyspersyjne jak i poprzez wiązania wodorowe, podczas gdy γ_S^{DM} wskazuje praktycznie jedynie na oddziaływania natury dyspersyjnej. Jeśli różnica pomiędzy γ_S^W lub γ_S^F i γ_S^{DM} jest ujemna (co nie ma znaczenia fizycznego) to dowodzi, że woda i formamid oddziałują jedynie poprzez siły dyspersyjne, które są słabsze niż w przypadku dijodometanu. γ_S^{tot} zawiera informacje o uśrednionych oddziaływaniach występujących na powierzchni i jest użyteczna przy porównaniu wartości określonych z innych modeli.

Wśród jednoskładnikowych monowarstw jedynie DPPC wykazuje niższe wartości γ_S^W (27,1 mJ/m²) i γ_S^F (28,5 mJ/m²) niż γ_S^{DM} (34,6 mJ/m²), co sugeruje ścisłą strukturę filmu, który oddziałuje jedynie poprzez siły dyspersyjne i nie tworzy wiązań wodorowych z cieczami polarnymi [H1, H8, H16]. Podobną zależność zaobserwowano także w przypadku niemodyfikowanych polimerów PEEK i PET, oraz układu PET/chitosan potwierdzając apolarny charakter powierzchni [H17, H18]. W pozostałych przypadkach monowarstw osadzonych na mice (DPPG, POPC i DOPC, Chol, LG) [H8, H11, H16], PEEK-u (DPPC, LG) [H17] oraz PET/chitosan (DPPC) [H18] oba typy oddziaływań determinują wartości swobodnej energii powierzchni, ponieważ wartości γ_S^W i γ_S^F są większe od γ_S^{DM} . Szczególnie widoczny jest wpływ rodzaju nośnika na oddziaływania osadzonej monowarstwy DPPC. Zmiany w upakowaniu błony DPPC i/lub niejednorodność pokrycia nią PEEK-u indukują możliwość oddziaływań z cieczami poprzez wiązania wodorowe powodując wzrost γ_S^W i γ_S^F [H17].

W układach dwuskładnikowych brak innych oddziaływań oprócz dyspersyjnych można stwierdzić dla monowarstw mieszanych DPPC-DPPG [H11] oraz DPPC-Chol $x_{Chol} = 0.25$ [H8]. Dodanie Chol lub LG do monowarstwy DPPC, DPPG, POPC i DOPC wpływa na oddziaływania z wodą, formamidem i dijodometanem, które zmieniają się zależnie od składu [H8, H16, H17]. Na uwagę zasługuje znaczny wzrost γ_s^W dla DPPC-Chol przy $x_{Chol} = 0.5$, zaś dla POPC-Chol i DOPC-Chol przy $x_{Chol} = 0.75$, w obszarze separacji faz składników przy podanym składzie [H8]. Te wyniki dobrze korelują z badaniami hydratacji lipidów, wykazujących, że liczba cząsteczek wody związanych przez fosfolipidy znacznie wzrasta, gdy cholesterol wytrąca się w postaci krystalicznej [122, 123]. Film DPPC/Chol $x_{Chol} = 0.25$ oddziałuje tylko dyspersyjnie, a jego struktura jest zwarta, co potwierdza hipotezę tworzenia kompleksów skondensowanych przy tym składzie (minimum A_{exc} [H8] i ΔG_{exc} [H5]). W większości przypadków luźniej upakowanych filmów fosfolipidów nienasyconych (POPC, DOPC) i DPPG [H11], Chol [H8], lub LG [H16] swobodna energia powierzchniowa mieszanych warstw jest wyższa niż energia warstw zawierających nasycony DPPC, niezależnie od użytej cieczy do pomiaru kątów zwiłżania.

Ponadto γ_s monowarstw hybrydowych chitozan/DPPC zależy od metody ich preparatyki [H18]. Film DPPC otrzymany techniką LB przez wynurzanie (LB↑) posiada najwyższą wartość γ_s^W i γ_s^F , odpowiednio 71,8 mN/m i 57,3 mN/m, oraz najniższą γ_s^{DM} , 37,2 mN/m. Sugeruje to znaczny udział wiązań wodorowych, które pochodzą głównie od części polarnych cząsteczek DPPC, skierowanych na zewnątrz warstwy, podczas gdy części węglowodorowe są ukryte wewnątrz warstwy lub przesłonięte przez ugrupowania polarne. Podczas osadzania subfaza wodna uczestniczy w kreowaniu takiego nietypowego zachowania się cząsteczek DPPC na lub w warstwie chitozanu, w wyniku którego cząsteczki DPPC "zakotwiczają się" w warstewce chitozanu i zmieniają orientację. Zwiększenie swobodnej energii powierzchniowej warstewki chitozanu poprzez pokrycie jej DPPC wydaje się istotne z punktu widzenia zastosowania w preparatyce protez naczyniowych na bazie PET [H18].

Następnie korzystając z wartości swobodnej energii powierzchniowej, oraz uwzględniając powierzchnię przypadającą na cząsteczkę (*A*) przy ciśnieniu 35 mN/m [H8] lub uzyskaną przez ekstrapolację odcinka izotermy π -A do zerowej wartości ciśnienia powierzchniowego [H1], obliczono energię oddziaływań Gibbsa jednego mola cząsteczek lipidów ($\gamma_{mol} = -(\Delta G_{mol})$) z wodą, formamidem i dijodometanem [H1, H8]. Wyznaczone wartości wskazują, że molowa energia oddziaływań jednoskładnikowej monowarstwy DPPC i dwuskładnikowej DPPC/Chol przy $x_{Chol} = 0.25$ z wodą γ_{mol}^W jest niższa niż z dijodometanem γ_{mol}^{DM} , co sugeruje udział tylko oddziaływań dyspersyjnych, a więc ściślejsze upakowanie monowarstwy. Dla pozostałych układów PL-Chol mogą występować polarne oddziaływania poprzez mostki wodorowe. Analizując zależności energii oddziaływań jednego mola cząsteczek lipidów z wodą γ_{mol}^W od składu monowarstw, można zauważyć wyraźne minima energii lub przegięcia przy $x_{Chol} = 0,25$ dla DPPC-Chol i DPPG-Chol oraz przy $x_{Chol} = 0,5$ dla POPC-Chol i DOPC-Chol, które korelują ze zmianami nadmiarowej energii Gibbsa ΔG_{exc} , gdzie minima pojawiają się przy analogicznym składzie monowarstw [H5] (rys. 10).



Rys. 10. (a) Nadmiarowa energia Gibbsa mieszania (ΔG_{exc}) wyznaczona dla dwuskładnikowych monowarstw Langmuira PL-Chol [H5] oraz (b) energia oddziaływań jednego mola lipidów z wodą ($\gamma_{mol} = -(\Delta G_{mol})$) wyznaczona dla dwuskładnikowych monowarstw Langmuira-Blodgett PL-Chol na mice [H8], zależnie od ułamka molowego cholesterolu (x_{chol}). Literami A, B, C, D oznaczono uprzywilejowany skład monowarstw dwuskładnikowych.

Silniejsze oddziaływania pomiędzy cząsteczkami promują bardziej skondensowaną strukturę monowarstwy, która staje się mniej przepuszczalna dla wody. Stąd skład filmów, przy którym pojawiają się najniższe wartości γ_{mol}^W może wskazywać na uprzywilejowaną proporcję składników w monowarstwach lub tworzenie kompleksów dwuskładnikowych [H8]. Ponadto korzystając z podejścia CAH wyznaczono molową energię oddziaływań filmów DPPC-DOPC, o różnym składzie, z wodą i dijodometanem [H1]. Podobnie jak dla układu DPPC-Chol energia oddziaływań mola lipidów z wodą jest większa niż z dijodometanem, za wyjątkiem ściśle upakowanej warstwy DPPC. Cząsteczki wody nie mogą jej penetrować i oddziałują głównie poprzez siły dyspersyjne. Zmiany wartości energii zależnie od składu filmu odzwierciedlają różnice w upakowaniu i uporządkowaniu filmów wieloskładnikowych.

Powyższe wyniki wyraźnie wskazują, że siła oddziaływań powierzchni monowarstw zależy od rodzaju, siły oddziaływań oraz wielkości cząsteczek cieczy używanej do pomiaru kątów zwilżania i wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej. Im mniejsze są cząstecz-

ki cieczy, tym łatwiej mogą one wypełniać zagłębienia w monowarstwie i wnikać do jej wnętrza. Pomimo, że obliczone w ten sposób wartości są względne, ich zmiany odzwierciedlają zmiany w oddziaływaniach międzycząsteczkowych z określoną cieczą.

Model van Ossa, Gooda i Chaudhury'ego (Lifshitz-van der Waals - Acid-Base, LWAB)

Podejście LWAB [45, 46] wyraża całkowitą swobodną energię powierzchniową γ_S^{tot} jako sumę składowej apolarnej Lifshitza-van der Waalsa, γ_S^{LW} , i polarnej kwasowo-zasadowej Lewisa, γ_S^{AB} :

$$\gamma_S^{tot} = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \tag{8}$$

Składowa γ_S^{LW} uwzględnia oddziaływania dyspersyjne Londona (nie mniej niż 97%), dipol-dipol Keesoma i dipol-dipol indukowany Debye'a. Składowa γ_S^{AB} jest średnią geometryczną parametru elektrono-donorowego γ_S^- (zasady Lewisa) i elektrono-akceptorowego γ_S^+ (kwasu Lewisa):

$$\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_S^+} \tag{9}$$

W myśl podejścia Lewisa składowa γ_s^{AB} odzwierciedla oddziaływania przez wiązania wodorowe i pary elektronów π . Na rysunku 11 przedstawiono różne typy oddziaływań uwzględnione w teorii LWAB oraz schemat potencjalnych oddziaływań pomiędzy lipidami i cieczami użytymi do pomiarów kąta zwilżania.

W oparciu o analizę układów PL-Chol [H5, H13], PL-LG [H16, H17] stwierdzono, że zmiany swobodnej energii powierzchniowej γ_S^{tot} zależą od rodzaju układu i wzajemnej proporcji składników. Wprowadzenie wzrastającej ilości Chol do monowarstwy PL wywołuje stopniowy wzrost jej γ_S^{tot} (rys. 12) [H5]. Natomiast energia monowarstw zbudowanych z nasyconego DPPC jest zawsze niższa niż monowarstw zawierających nienasycony POPC czy DOPC. Zmiany powiązano z gęstością upakowania, uporządkowaniem i nachyleniem cząsteczek (rys. 12) [H5]. Przy określonym składzie mogą tworzyć się kompleksy dwuskładnikowe. Zachodzące ze wzrostem stężenia Chol zmiany nachylenia ugrupowań polarnych i/lub łańcuchów węglowodorowych zakłócają lokalne upakowanie cząsteczek stanowiąc siłę napędową do formowania domen wzbogaconych i zubożałych w Chol lub wytrącania się Chol w postaci mikrokryształów [H12]. Wpływa to na przepuszczalność membrany w stosunku do cieczy użytych do pomiarów kątów zwilżania [H12].



Rys. 11. Rodzaje oddziaływań w teorii LWAB oraz schemat potencjalnych oddziaływań pomiędzy DOPC, Chol i cieczami: wodą, formamidem i dijodometanem [H13].



Rys. 12. Całkowita swobodna energia powierzchniowa, γ_S^{tot} , wyznaczona z podejścia LWAB dla dwuskładnikowych monowarstw osadzonych na mice przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m w zależności od ułamka molowego cholesterolu (x_{Chol}) wraz ze schematami ilustrującymi organizację cząsteczek przy niskiej (u góry) i wysokiej (na dole) zawartości cholesterolu [H5].

Przeprowadzono także analizę wartości pozornej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych określonych dla biwarstw DOPC-Chol w 20°C i 37°C zależnie od ułamka molowego komponentów [H13]. Ogólnie γ_S^{tot} w temperaturze 20°C jest nieco większa niż w temperaturze fizjologicznej, ze względu na niższą energię cieplną cząsteczek.

Natomiast rozważając składowe swobodnej energii powierzchniowej w badanych układach monowarstw można stwierdzić, że oddziaływania elektrono-akceptorowe γ_s^+ nie

występują albo są bardzo słabe. Jest to ogólna właściwość większości rzeczywistych układów wskazująca na zasadowy charakter powierzchni. Ponadto, jeśli podczas obliczania tego parametru uzyskuje się ujemną wartość pierwiastka kwadratowego z γ_S^+ , co nie ma sensu fizykochemicznego, przyjmuje się jego zerową wartość [H11, H16]. W wielu przypadkach, PL-LG [H16], biwarstwy DOPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$ [H13], wywołuje to zaniżenie wartości γ_S^{tot} (LWAB), ponieważ oddziaływania γ_S^- i γ_S^+ są komplementarne zgodnie z równaniem 9. Zerowa wartość parametru γ_S^+ generuje zerową wartość składowej kwasowo-zasadowej (γ_S^{AB}), a to prowadzi do zrównania wartości $\gamma_S^{tot} = \gamma_S^{LW}$, pomimo występowania silnych oddziaływań elektrono-donorowych (γ_S^-). W związku z tym, bardziej miarodajne informacje dotyczące oddziaływań monowarstw z cieczami polarnymi uzyskuje się na podstawie zmian parametru γ_S^- . Jego wartość faktycznie wynika z oddziaływań polarnych ugrupowań fosfolipidowych (PC i PG), grupy –OH cholesterolu oraz grup –OH i estrowej LG, z wodą i formamidem.

Wykazano, że wartość parametru γ_s^- gwałtownie rośnie w ciągu pierwszych 2 minut kontaktowania monowarstwy DPPC z wodą z 6,7 mJ/m² do 83,9 mJ/m² [H4]. Z powodu silnej tendencji do tworzenia wiązań wodorowych występuje przegrupowanie cząsteczek DPPC prowadzące do tworzenia biwarstw, które są uprzywilejowane ze względu na cylindryczny kształt cząsteczek fosfolipidu. Aby zapobiec reorientacji cząsteczek lipidów w kontakcie z cieczą pomiary wstępującego kąta zwilżania wykonywano w ciągu kilku sekund od postawienia kropli, zapewniając w ten sposób powtarzalne i wiarygodne wyniki.

Na dalszych etapach badań stwierdzono, że γ_s^- zależy od składu warstewek, ich stanu fizycznego oraz oddziaływań pomiędzy poszczególnymi komponentami, które to warunkują zwartość filmu [H11, H13, H16, H17, H19]. Najniższe wartości γ_s^- uzyskano dla ściśle skondensowanych monowarstw DPPC, DPPC-DPPG [H11], DPPC-LG $x_{LG} = 0,25$ [H16], co dowiodło, że gęsto upakowane łańcuchy węglowodorowe skutecznie ekranują oddziaływania cieczy z ugrupowaniami polarnymi. Ważnym czynnikiem determinującym wartość γ_s^- jest rodzaj podłoża. Monowarstwa DPPC na mice wykazuje niższą wartość γ_s^- niż na aktywowanym PEEK-u, natomiast monowarstwa LG oraz DPPC-LG znacząco wyższą [H16, H17]. Wzrost parametru γ_s^- wynika z łatwiejszego i bliższego kontaktu między filmem a cieczą. Z tego względu, że sam DPPG wykazuje silne oddziaływania γ_s^- (γ_{DPPG}^- = 37,2 mJ/m²), znaczny ich wzrost obserwuje się już przy x_{DPPG} = 0,25 w monowarstwach PC, który wyraźnie wzmacnia się w obecności nienasyconych fosfolipidów [H11]. Zarówno monowarstwy dwuskładnikowe POPC-DPPG i DOPC-DPPG [H11], jak i DPPC-DOPC [H1, H20] oraz DPPG-LG [H14] wykazują częściową mieszalność przejawiającą się we współistnieniu domen, co zmniejsza uporządkowanie filmu w porównaniu do jednoskładnikowych filmów, odpowiednio DPPG i DPPC. Ponadto wprowadzenie nienasyconych fosfolipidów POPC lub DOPC zwiększa średnią powierzchnię przypadającą na cząsteczkę. Powstałe warstwy mieszane są luźniej upakowane i bardziej przepuszczalne dla wody i innych małych cząsteczek. W efekcie zmian w organizacji molekularnej, polarne ugrupowania PL są bardziej dostępne dla polarnych cieczy prowadząc do wzrostu oddziaływań elektrono-donorowych γ_s^- [H11]. Zmniejszeniu ścisłości monowarstw towarzyszy osłabienie oddziaływań między cząsteczkami filmów potwierdzone dodatnimi wartościami nadmiarowej energii Gibbsa mieszania ΔG_{exc} [H11, H14]. Rozważając oddziaływania biwarstw DOPC-Chol z polarnymi cieczami również stwierdzono najwyższą wartość parametru γ_s^- przy zawartości $x_{Chol} = 0,25$ [H13], co można powiązać ze wiązania wodorowe w efekcie rozluźnienia biwarstwy [124]. Jednak ze wzrostem zawartości Chol kąt nachylenia cząsteczek względem normalnej do biwarstwy maleje, prowadząc do kompresji łańcuchów acylowych [125].

Powierzchnia układów hybrydowych chitozan/DPPC wykazała zwiększoną polarność (wzrost $\gamma_s^- i \gamma_s^+$), gdy monowarstwę przygotowano przez rozpływanie lub techniką LB przez wynurzanie nośnika PET/chitozan [H19]. Wzrost polarności można tłumaczyć nietypowym mechanizmem tworzenia się monowarstwy DPPC z cząsteczkami zorientowanymi częściami polarnymi w kierunku powietrza. Takie specyficzne zachowanie cząsteczek dowiedziono techniką TOF-SIMS na podstawie stosunku intensywności pików 184/57 oraz 86/57 pochodzących od grupy fosfocholinowej (184 u) i cholinowej (86 u) oraz łańcucha weglowodorowego (57 u). Dane TOF-SIMS w powiązaniu ze zwilżalnością potwierdziły, że siłą napędową odpowiedzialną za tworzenie monowarstwy DPPC na nośniku PET/chitozan są oddziaływania kwasowo-zasadowe Lewisa pomiędzy grupami aminowa/amoniową lub hydroksylową chitozanu oraz grupami fosforanowymi/amoniowymi DPPC. Narzucają one specyficzną organizację strukturalną mieszanej warstwy chitozan/DPPC wpływając na zwilżalność powierzchni. Drastyczny wzrost oddziaływań γ_s^- pochodzi od atomów tlenu grup estrowych i/lub fosforanowych DPPC, na których skupiony jest cząstkowy ładunek ujemny, który może być odpowiedzialny za tworzenie ujemnego potencjału zeta powierzchni. Przypuszcza się, że tak zmodyfikowana powierzchnia polimeru będzie redukować kumulowanie płytek krwi na stentach wykonanych lub pokrytych PET, polepszając tym samym ich kompatybilność z krwią. Cząsteczki DPPC modyfikując gęstość ładunku w powłoce chitozanu mogą poprawić jego właściwości hemostatyczne. Dlatego otrzymane powierzchnie PET wydają się obiecujące w uzyskaniu pozytywnej oceny atrombogeniczności, a tym samym biokompatybilności [H19].

Weryfikacja podejść do wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej w odniesieniu do modelowych błon biologicznych

Niezależnie od metody przygotowania filmów wartości wyznaczonej (*apparent*) całkowitej swobodnej energii powierzchniowej γ_S^{tot} z modelu LWAB są na ogół niższe niż wartości γ_S^{tot} z modelu CAH jako średnia arytmetyczna wartości γ_S obliczonych na podstawie histerezy kąta zwilżania wody γ_S^W , formamidu γ_S^F i dijodometanu γ_S^{DM} [H11, H16, H17-H19]. Model LWAB uwzględnia tylko wstępujący kąt zwilżania, model CAH zarówno wstępujący, jak i cofający. Również wartości γ_S^{DM} (CAH) są wyższe od wartości składowej Lifshitza-van der Waalsa γ_S^{LW} (LWAB), choć przebieg zmian jest analogiczny. Ponadto wartości γ_S^F (CAH) bardzo dobrze korelują z γ_S^{tot} (LWAB), choć są nieco wyższe. W związku z tym zastosowanie jedynie γ_S^F (CAH) pozwala scharakteryzować uśrednioną całkowitą swobodną energię powierzchniową γ_S^{tot} z dość dobrą dokładnością [H11, H16, H17-H19].

Wyższe wartości γ_s i γ_s^{tot} wyznaczone z histerezy kąta zwilżania (CAH) wynikają z faktu, że podczas pomiaru cofającego kąta zwilżania ciecz kontaktuje się z monowarstwą przez dłuższy okres czasu niż podczas pomiaru wstępującego kąta zwilżania. Jak dyskutowano powyżej wydłużony czas kontaktu sprzyja penetracji cieczy polarnych w strukturę monowarstwy [126, 127]. Z drugiej strony, przyczyną takiego stanu rzeczy może być obecność filmu cząsteczek cieczy pozostałego poza kroplą po cofnięciu się linii trójfazowego kontaktu [118, H2]. W obu przypadkach efektem jest wzrost histerezy kąta zwilżania i określonej na jej podstawie wartości swobodnej energii powierzchniowej [126, 127]. Zastosowanie jedynie wstępującego kąta zwilżania w modelu LWAB nie uwzględnia tych efektów. Dlatego podejście CAH odzwierciedla silniejsze oddziaływania danej cieczy z warstwą, wyznaczone dla bliższych odległości międzycząsteczkowych [126, 127, H2]. Jednak nie pozwala obliczyć oddzielnie parametrów elektrono-donorowego i elektrono-akceptorowego, które w wielu przypadkach okazują się pomocne dla lepszego zrozumienia oddziaływań międzyfazowych.

Wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych jest nadal problematyczne, tym bardziej w przypadku układów naturalnych i imitujących je błon modelowych. Jednakże, dopóki nie ma bezpośredniej i jednoznacznej metody określania rzeczywistych wartości swobodnej energii powierzchniowej, nawet względne jej wartości lub zmiany mogą być pomocne w zrozumieniu procesów zachodzących w skomplikowanych układach biologicznych. Do cyklu habilitacyjnego zostały włączone 3 prace przeglądowe [H2, H9, H10]. Zawierają one kompleksowe omówienie właściwości zwilżających, swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych oraz struktury warstw lipidowych otrzymanych różnymi technikami: rozpływania, *spin-coating*, Langmuira-Blodgett (LB) lub Langmuira-Schaefera (LS), na wybranych podłożach stałych. Zmiany właściwości powierzchniowych zostały przedyskutowane w aspekcie grubości filmów, metody ich otrzymywania a także modyfikacji z wykorzystaniem enzymów lipolitycznych lub liposomów, co dodatkowo podkreśla ich charakter aplikacyjny. Prace te, pomimo iż są wieloautorskie, stanowią rodzaj podsumowania pewnego zakresu mojej działalności naukowej, ponieważ zawierają głównie moje własne dokonania badawcze na tle obecnego stanu wiedzy i w odniesieniu do prac innych autorów. Uwzględniają one również osiągnięcia omówione powyżej w ramach prac typowo badawczych [H1, H4, H5, H7]. Prace te zostały napisane w odpowiedzi na zaproszenie skierowane od edytorów do prof. Emiliana Chibowskiego, dlatego On pełni w nich funkcję autora korespondującego.

Podsumowanie osiągnięć naukowych objętych cyklem prac habilitacyjnych

1. Wyznaczenie izoterm zależności ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (izotermy π -A) dla jedno- i wieloskładnikowych monowarstw Langmuira zbudowanych z fosfolipidów (PL), cholesterolu (Chol), α -tokoferolu (TF) i/lub galusanu laurylu (LG), utworzonych na subfazie ciekłej.

2. Analiza termodynamiczna izoterm π -A, która pozwoliła na uzyskanie informacji na temat przejść fazowych i przemian konformacyjnych oraz stanu modelowych membran przy określonym ciśnieniu powierzchniowym. Umożliwiła wyznaczenie rodzaju i wielkości oddziaływań w wieloskładnikowej warstwie monomolekularnej oraz pozwoliła na wskazanie składu układów o największej stabilności. Na tej podstawie:

- zaproponowano skład modelowych błon PC/DPPG do badania lateralnej organizacji oraz stabilności filmu surfaktantu płucnego;
- potwierdzono, że cholesterol wykazuje większe powinowactwo do nasyconej fosfatydylocholiny PC, a powinowactwo to maleje ze wzrostem nienasycenia łańcuchów acylowych PC;

- oszacowano skład najbardziej stabilnych kompleksów dwuskładnikowych, tj. DPPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,25$; POPC-Chol przy $x_{Chol} = 0,5$. W przypadku układów DOPC-Chol oraz DPPG-Chol zasugerowano tworzenie się mniej trwałych kompleksów lub ich brak;
- wyjaśniono mechanizm zachowania TF w monowarstwach fosfatydylocholiny PC w zależności od składu poprzez tworzenie się kompleksów PC/TF odpowiedzialnych za maksymalną stabilność układów ($x_{TF} = 0,25$);
- wykazano, że TF i LG preferencyjnie asocjują z nienasyconymi fosfolipidami, a cząsteczki obu antyutleniaczy mogą lokować się bliżej wiązań nienasyconych, tj. będą głębiej zanurzone w monowarstwie DOPC niż w POPC lub w DPPC. Wzajemne położenie ugrupowań cząsteczek w monowarstwach dwuskładnikowych DPPC-LG i DOPC-LG przy $x_{LG} = 0,25$, po przeniesieniu filmów na mikę, potwierdzono przy zastosowaniu techniki TOF-SIMS. Taka struktura jest powiązana z działaniem antyoksydacyjnym. Związki te nie penetrują matrycy węglowodorowej, ale znajdując się w obszarze międzyfazowym lipid/woda, w pobliżu wiązań nienasyconych PL, zapewniają skuteczną ochronę lipidów przed utlenianiem;
- uzasadniono różny mechanizm stabilizacji błon fosfolipidowych DPPC-DOPC przez Chol i LG. Cholesterol wywiera efekt kondensacyjny na monowarstwy PC. Natomiast LG wzmacnia stabilność monowarstw mieszanych oddziałując z polarnymi częściami PC poprzez wiązania wodorowe, w ten sposób zwiększając barierę ochronną przed utlenianiem ze względu na redukcję dostępu utleniaczy do błony.

3. Bezpośrednia wizualizacja mikrostruktury monowarstw PL-TF, PL-LG, DPPC-DOPC-Chol i DPPC-DOPC-LG na subfazie wodnej, dzięki zastosowaniu mikroskopu kąta Brewstera (BAM), potwierdziła stan fizyczny filmów przy danym ciśnieniu powierzchniowym, mieszalność składników lub częściową mieszalność przejawiającą się we współistnieniu domen, i tworzenie struktur wielowarstwowych po załamaniu filmu. Technika pozwoliła na określenie wpływu składu jakościowego i ilościowego filmów na ich strukturę.

4. Preparatyka filmów PL, PL-PL, PL-Chol, PL-LG, o kontrolowanej grubości (mono- lub biwarstwy) i orientacji molekuł na stałym nośniku (mika, PEEK, PET) metodą Langmuira-Blodgett, Langmuira-Schaefera lub przez rozpływanie roztworu.

5. Zastosowanie nowoczesnej metodyki otrzymywania materiałów biokompatybilnych na bazie polimerów PEEK i PET poprzez modyfikację plazmą przy użyciu różnych gazów,

a następnie pokrycie zmodyfikowanej powierzchni modelową błoną zawierającą substancję o aktywności biologicznej DPPC, DPPC-LG lub warstwą mieszaną (hybrydową) chitozan/DPPC.

6. Zbadanie jakości, homogeniczności i struktury filmów na podłożu stałym za pomocą różnych technik mikroskopowych (mikroskopii sił atomowych, mikroskopii optycznej, profilometrii optycznej), dzięki którym:

- wykazano, że struktura filmów Langmuira PL-LG zostaje zachowana po przeniesieniu ich na mikę (LB),
- wykazano, że użycie podłoża o chropowatości w skali mikrometrów (PEEK) wpływa na zmianę morfologii filmów,
- powiązano wartości parametrów chropowatości powierzchni ze wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami, a także upakowaniem i uporządkowaniem filmów PL-Chol i PL-LG.

7. Scharakteryzowanie zwilżalności i określenie charakteru hydrofilowo-hydrofobowego modelowych błon osadzonych na powierzchniach stałych na podstawie pomiarów wstępujących i cofających kątów zwilżania cieczy testowych o znanych składowych napięcia powierzchniowego oraz wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych przy wykorzystaniu wybranych modeli teoretycznych. W oparciu o otrzymane wyniki:

- dowiedziono, że na zwilżalność i swobodną energię powierzchniową ma wpływ sposób preparatyki warstw (techniki S, LB, LS), skład jakościowy i ilościowy, homogeniczność, rodzaj podłoża stałego (mika, PEEK, PET) oraz jego chropowatość;
- określono mechanizm zachowania się cieczy pomiarowych względem modelowej błony na podstawie zmian wartości histerezy kąta zwilżania determinowanych wnikaniem cieczy w strukturę błony, jej reorganizacją w kontakcie z cieczą i/lub obecnością filmu cieczy poza kroplą;
- wykazano, że ściśle upakowane i uporządkowane monowarstwy zawierające nasycone fosfolipidy są słabiej przepuszczalne dla wody i innych cieczy w porównaniu z układami zbudowanymi z nienasyconych fosfolipidów. Znaczny wzrost hydrofilowości monowarstw mieszanych PL-Chol obserwuje się po przekroczeniu progu rozpuszczalności Chol, gdy jego nadmiar wytrąca się z układu, w układach PL-LG o częściowej mieszalności składników (DPPG-LG), oraz w układach PC-DPPG o zwiększonym nieuporządkowaniu przy $x_{DPPG} = 0,25$;

- oszacowano wielkość oddziaływań polarnych oraz dyspersyjnych modelowych błon z cieczami o różnym charakterze imitującymi właściwości środowiska zewnętrznego;
- stwierdzono, że energia oddziaływań błon z cieczami ściśle zależy od składu filmu, wielkości oddziaływań między składnikami oraz uporządkowania i upakowania cząsteczek, co jest związane z ekspansją lub kontrakcją średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwach mieszanych Langmuira;
- wykazano, że najbardziej racjonalne informacje dotyczące oddziaływań modelowych błon z cieczami polarnymi uzyskuje się na podstawie zmian parametru γ_s^- , którego wartość wynika z oddziaływań ugrupowań polarnych z wodą i formamidem (tworzenia mostków wodorowych);
- zaproponowano indukowany obecnością chitozanu charakterystyczny mechanizm reorientacji cząsteczek DPPC podczas osadzania techniką LB przez wynurzanie (LB¹) lub techniką S, w którym ważną rolę odgrywają cząsteczki wody.

8. Zastosowanie i równocześnie weryfikacja modeli teoretycznych do wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej, co w efekcie pozwala na lepsze zrozumienie oddziaływań występujących na różnych granicach faz w układach biologicznych.

Wyniki badań dostarczają nowych informacji pozwalających na pełniejszą charakterystykę oraz poznanie mechanizmów biofizycznych i czynników odpowiedzialnych za oddziaływanie antyutleniaczy (TF, LG) i/lub polimerów/biopolimerów z najważniejszymi lipidami błon biologicznych (DPPC, POPC, DOPC, DPPG) zwłaszcza w aspekcie farmakologicznym. Poszerzenie wiedzy na ten temat może zaowocować bardziej racjonalnym i naukowym podejściem do projektowania bezpiecznych i skutecznych środków o charakterze przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym, przeciwbakteryjnym i przeciwwirusowym oraz lepszym poznaniem fizjologii i patologii komórki.

Podjęte badania mogą przynieść nie tylko korzyści poznawcze, ale również praktyczne ze względu na ich potencjalne zastosowania biomedyczne. Znajomość oddziaływań w modelowych układach jest niezbędna dla zrozumienia i przewidywania procesów fizykochemicznych oraz oddziaływań międzycząsteczkowych zachodzących w skomplikowanych układach biologicznych. Badania modelowych błon zawierających Chol, TF lub LG powinny przyczynić się do lepszego zrozumienia ich udziału w formowaniu i organizacji domen lipidowych. Dlatego też badania układów lipidowych o kontrolowanym składzie mogą być pomocne w wyjaśnieniu zależności pomiędzy tworzeniem domen lipidowych a funkcjonalnymi właściwościami błony.

Z drugiej strony, badania oddziaływań są także kluczowym czynnikiem oceny biokompatybilności materiałów. Mają zasadnicze znaczenie w inżynierii tkankowej, ponieważ odgrywają istotną rolę w przyleganiu, rozprzestrzenianiu, proliferacji i migracji komórek. Tego typu badania mogą być pomocne w zrozumieniu procesów chemicznych i biologicznych w aspekcie aplikacyjnym, np. projektowania biomateriałów o zdefiniowanych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych, biokompatybilnych implantów i biosensorów oraz ukierunkowanego dostarczania leków.

Bibliografia

- [1] L. Stryer, Biochemia, PWN, Warszawa 1999.
- [2] M. Luckey, Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations, New York: Cambridge University Press, Cambridge **2008**.
- [3] M.O. Eze, Biochem. Educ. 19 (**1991**) 204-208.
- [4] R. Welti, M. Glaser, Chem. Phys. Lipids 73 (**1994**) 121-137.
- [5] K. Simons, E. Ikonen, Nature 387 (1997) 569-572.
- [6] R.N. McElhaney, in: M. Kates, L.A. Manson (eds), Membrane Fluidity, Plenum Press, New York **1984**, 249-278.
- [7] R.M. Epand, R.F. Epand, Mol. BioSyst. 5 (2009) 580-587.
- [8] J. Pérez-Gil, T.E Weaver, Physiology 25 (**2010**) 132-141.
- [9] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 8 (2004) 459-468.
- [10] K. Simons, D. Toomre, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 (2000) 31-41.
- [11] J. Fantini, N. Garmy, R. Mahfoud, N. Yahi, Expert Rev. Mol. Med. 4 (2002) 1-22.
- [12] Y.C. Li, M.J. Park, S.K. Ye, C.W. Kim, Y.N. Kim., Am. J. Pathol. 168 (2006) 1107-1118.
- [13] W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen, H.W. Huang, Biophys. J. 92 (2007) 3960-3967.
- [14] J. Pan, T.T. Mills, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Phys. Rev. Lett. 100 (2008) 198103.
- [15] J. Huang, G.W. Feigenson, Biophys. J. 76 (1999) 2142-2157.
- [16] R.F. Jacob, R.J. Cenedella, R.P. Mason, J. Biol. Chem. 274 (1999) 31613-31618.
- [17] W.K. Subczynski, M. Raguz, J. Widomska, L. Mainali, A. Konovalov, J. Membrane Biol. 245 (2012) 51-68.
- [18] R.P. Mason, T.N. Tulenko, R.F. Jacob, Biochim. Biophys. Acta 1610 (2003) 198-207.
- [19] M. Raguz, J. Widomska, J. Dillon, E.R. Gaillard, W.K. Subczynski, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 2380-2388.
- [20] G.E. Dobrestova, T.A. Borschevskaya, V.A. Petrov, Y.A. Vladimirov, FEBS Lett. 84 (1977) 125-128.
- [21] K. Yagi, Chem. Phys. Lipid 45 (**1987**) 337-351.
- [22] J.-M. Zingg, Mol. Aspects Med. 28 (2007) 400-422.
- [23] J. Atkinson, R.F. Epand, R.M. Epand, Free Radic. Biol. Med. 44 (2008) 739-764.
- [24] I. Kubo, N. Masuoka, T. J. Ha, K. Shimizu, K. Nihei, The Open Bioact. Compd. J. 3 (2010) 1-11.
- [25] C.A.S. de Cordova, C. Locatelli, L.S. Assunção, A. Mascarello, E. Winter, R.J. Nunes, B. Mattei, R.A. Yunes, T.B. Creczynski-Pasa, Toxicol. in Vitro 25 (**2011**) 2025-2034.
- [26] C. Locatelli, F.B. Filippin-Monteiro, T.B. Creczynski-Pasa, Eur. J. Med. Chem. 60 (2013) 233-239.
- [27] I. Kubo, K. Fujita, K. Nihei, N. Masuoka, Bioorg. Med. Chem. 11 (**2003**) 573-580.
- [28] C. Hurtado, M.J. Bustos, P. Sabina, M.L. Nogal, A.G. Granja, M.E. González, P. Gónzalez-Porqué, Y. Revilla, A.L. Carracosa, Antivir. Ther. 13 (2008) 909-917.
- [29] J. Atkinson, T. Harroun, S.R. Wassall, W. Stillwell, J. Katsaras, Mol. Nutr. Food Res. 54 (2010) 641-51.
- [30] E. Takai, A. Hirano, K. Shiraki, J. Biochem. 150 (2011) 165-171.
- [31] D. Marquardt, J. A. Williams, N. Kučerka, J. Atkinson, S. R. Wassall, J. Katsaras, T. A. Harroun, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 7523-7533.
- [32] D.K. Schwartz, Surf. Sci. Rep. 27 (**1999**) 241-334.

- [33] M. Eeman, M. Deleu, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14 (2010) 719-736.
- [34] G.L. Gaines Jr., Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces, Interscience Publishers, John Wiley and Sons INC, New York **1966**.
- [35] P. Dynarowicz-Łątka, K. Kita, Adv. Colloid Interface Sci. 79 (1999) 1-17.
- [36] J. M. Rodriguez Patino, C. Carrera Sánchez, M. R. Rodriguez Niño, Langmuir 15 (1999) 2484-2492.
- [37] K. Winsel, D. Hönig, K. Lunkenheimer, K. Geggel, C. Witt, Eur. Biophys. J. 32 (2003) 544-552.
- [38] K.B. Blodgett, I. Langmuir, Phys. Rev. 51 (1937) 964-982.
- [39] I. Langmuir, V.J. Schaefer, J. Am. Chem. Soc. 60 (**1938**) 1351-1360.
- [40] G. Qi, Y. Yang, H. Yan, L. Guan, Y. Li, X. Qiu, Ch. Wang, J. Phys. Chem. C 113 (2009) 204-207.
- [41] J. Lyklema, Fundamentals of interface and colloid science, vol. 3: Liquid-fluid interfaces, Academic Press, London 2000.
- [42] E. Chibowski, R. Perea-Carpio, Adv. Colloid Interface Sci. 98 (2002) 254-264.
- [43] E. Chibowski, Adsorpt. Sci. Technol. 35 (2017) 647-659.
- [44] F.M. Etzler, Characterization of surface free energies and surface chemistry of solids. in: KL Mittal (ed.), Contact Angle, Wettability and Adhesion, vol. 3, Leiden: VSP **2003**, 219-264.
- [45] C.J. van Oss, M.K. Chaudhury, R.J. Good, Chem. Rev. 88 (1988) 927-941.
- [46] C.J. van Oss, Interfacial forces in aqueous media, Marcel Dekker, New York **1994**.
- [47] B. Jańczuk, A. Zdziennicka, W. Wójcik, Wiadomości chemiczne 49 (**1995**) 301-326.
- [48] B. Jańczuk, A. Zdziennicka, W. Wójcik, Wiadomości chemiczne 49 (1995) 429-447.
- [49] E. Chibowski, Contact angle hysteresis due to a film present behind the drop, in K.L. Mittal (ed.), Contact Angle, Wettability and Adhesion, vol. 2, part 2, VSP, Utrecht, **2002**, 265-288.
- [50] E. Chibowski, A. Ontiveros-Ortega, R. Perea-Carpio, J. Adhesion Sci. Technol. 16 (2002) 1367-1404.
- [51] S. Köstler, A.V. Delgado, V. Ribitsch, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005) 339-348.
- [52] C.K. Akkan, M.E. Hammadeh, A. May, H.W. Park, H. Abdul-Khaliq, T. Strunskus, O.C. Aktas, Lasers Med. Sci. 29 (2014) 1633-1639.
- [53] S.M. Kurtz, J.N. Devine, Biomaterials 28 (2007) 4845-4869.
- [54] E.T.J. Rochford, A.H.C. Poulsson, J. Salavarrieta Varela, P. Lezuo, R.G. Richards, T.F. Moriarty, Colloids Surf. B 113 (2014) 213-222.
- [55] Y. Farhatnia, A. Tan, A. Motiwala, B.G. Cousins, A.M. Seifalian, Biotechnol. Adv. 31 (2013) 524-542.
- [56] D. Minion, Suppl. Endovasc. Today 9 (2015) 9-11.
- [57] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, Int. J. Food Microbiol. 144 (2010) 51–63.
- [58] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Prog. Polym. Sci. 36 (2011) 981-1014.
- [59] S. Sagnella, K. Mai-Ngam, Colloids Surf. B 42 (2005) 147-155.
- [60] P. Baldrick, Regul. Toxicol. Pharmacol. 56 (**2010**) 290-299.
- [61] J.T. Davies, E.K. Rideal, Interfacial Phenomena, second ed., Academic Press, New York 1963.
- [62] D. Marsh, Biochim. Biophys. Acta 1286 (**1996**) 183-223.
- [63] R. Wüstneck, J. Perez-Gil, N. Wüstneck, A. Cruz, V.B. Fainerman, U. Pison, Adv. Colloid Interface Sci. 117 (2005) 33-58.
- [64] E. Parra, A. Alcaraz, A. Cruz, V.M. Aguilella, J. Pérez-Gil, Biophys. J. 104 (2013) 146-155.
- [65] E.C. Smith, J.M. Crane, T.G. Laderas, S.B. Hall, Biophys. J. 85 (2003) 3048-3057.
- [66] H. Himeno, N. Shimokawa, S. Komura, D. Andelman, T. Hamada, M. Takagi, Soft Matter 10 (**2014**) 7959-7967.
- [67] J.B. Leathes, Lancet 208 (**1925**) 853-856.
- [68] R.A. Demel, L.L.M. van Deenen, B.A. Pethica, Biochim. Biophys. Acta 135 (1967) 11-19.
- [69] P.L.G. Chong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 10069-10073.
- [70] P. Somerharju, J.A. Virtanen, K.H. Cheng, Biochim. Biophys. Acta 1440 (1999) 32-48.
- [71] J. Huang, G.W. Feigenson, Biophys. J. 76 (1999) 2142-2157.
- [72] A. Parker, K. Miles, K.H. Cheng, J. Huang, Biophys. J. 86 (2004) 1532-1544.
- [73] A. Radhakrishnan, H.M. McConnell, Biophys. J. 77 (1999) 1507-1517.
- [74] H.M. McConnell, A. Radhakrishnan, Biochim. Biophys. Acta 1610 (2003) 159-173.
- [75] F. de Meyer, B. Smit, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 3654-3658.
- [76] A. Ivankin, I. Kuzmenko, D. Gidalevitz, Phys. Rev. Lett. 104 (**2010**) 108101.
- [77] W.K. Subczynski, M. Raguz, J. Widomska, L. Mainali, A. Konovalov, J. Membrane Biol. 245 (2012) 51-68.
- [78] S.L. Veatch, S. L. Keller, Phys. Rev. Lett. 89 (2002) 268101-1-4.
- [79] P.F.F. Almeida, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 72-85.
- [80] J.W. McLarty, Antioxidants and cancer: The epidemiologic evidence, in: H.S. Garewal (ed.), Antioxidants and Disease PreVention, CRC Press, Boca Raton **1997**, 45-65.
- [81] M.G. Traber, J. Atkinson, Free Radic. Biol. Med. 43 (2007) 4-15.
- [82] C. Lauridsen, S.K. Jensen, Genes Nutr. 7 (2012) 475-482.

- [83] D. Bongiorno, L. Ceraulo, M. Ferrugia, F. Filizzola, A. Longo, A. Mele, A. Ruggirello, V. Turco Liveri, Int. J. Pharm. 312 (2006) 96-104.
- [84] W. Nitsch, R. Maksymiw, Colloid Polym. Sci. 268 (1990) 452-459.
- [85] P. Toimil, G. Prieto, J. Miñones Jr, J.M. Trillo, F. Sarmiento, J. Colloid Interface Sci. 388 (2012) 162-169.
- [86] I. Kubo, N. Masuoka, P. Xiao, H. Haraguchi, J. Agric. Food Chem. 50 (**2002**) 3533-3539.
- [87] L.A. Savi, P.C. Leal, T.O. Vieira, R. Rosso, R.J. Nunes, R.A. Yunes, T.B. Creczynski-Pasa, C.R.M. Barardi, C.M.O. Simoes, Arzneimittelforschung 55 (2005) 66-75.
- [88] H. Masaki, N. Okamoto, S. Sakaki, H. Sakurai, Bull. Pharm. Bull. 20 (1997) 304-308.
- [89] E. Ortega, M.C. Sadaba, A.I. Ortiz, C. Cespon, A. Rocamora, J.M. Escolano, G. Roy, L.M. Villar, P. Gónzalez-Porqué, Br. J. Cancer 88 (2003) 940-943.
- [90] A. Calcabrini, J.M. Garcia-Martinez, L. González, M. Julian Tendero, M.T. Agullo Ortuño, P. Crateri, A. Lopez-Rivas, G. Arancia, P. González-Porqué, J. Martín-Pérez, Carcinogenesis 27 (2006) 1699-1712.
- [91] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 2161-2168.
- [92] M.J. Paszek, N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, V.M. Weaver, Cancer Cells 8 (2005) 241-254.
- [93] E.L. Baker, J. Lu, D. Yu, R.T. Bonnecaze, M.H. Zaman, Biophys. J. 99 (2010) 2048-2057.
- [94] H. Brockman, Curr. Opin. Struc. Biol. 9 (**1999**) 438-43.
- [95] S.S. Feng, Langmuir 15 (**1999**) 998-110.
- [96] C.M. McQuaw, A.G. Sostarecz, L. Zheng, A.G. Ewing, N. Winograd, Langmuir 21 (2005) 807-813.
- [97] J. Miñones Jr., J.M. Rodríquez Patino, O. Conde, C. Carrera, R. Seoane, Colloids Surf. A 203 (2002) 273-286.
- [98] D. Marquardt, N. Kučerka, S.R. Wassall, T.A. Harroun, J. Katsaras, Chem. Phys. Lipids 199 (2016) 17-25.
- [99] P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, C. G. Fraga, Clin. Dev. Immunol. 12 (2005) 19-25.
- [100] E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M. Elewa, H.H. Soliman, J. Mater. Process. Technol. 123 (2002) 133-145.
- [101] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A.M. Baro, Rev. Sci. Instruments 78 (2007) 013705-1-013705-8.
- [102] T.S. Williams, H. Yu, R.F. Hicks, Rev. Adhes. Adhes. 1 (2013) 46-87.
- [103] T. Nau, P. Lavoie, N. Duval, J. Bone. Joint Surg. Br. 84 (2002) 356-360.
- [104] T. Young, Philos. Trans. R. Soc. 95 (1805) 65-87.
- [105] E.T. Dutkiewicz, Fizykochemia powierzchni, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998.
- [106] V.M. Starov, M.G. Velarde, J. Phys. Condens. Matter. 21 (2009) 464121.
- [107] D.A. Mannock, R.N.A.H. Lewis, T.P.W. McMullen, R.N. McElhaney, Chem. Phys. Lipids 163 (2010) 403-448.
- [108] N. Borochov, E.J. Wachtel, D. Bach, Chem. Phys. Lipids 76 (1995) 85-92.
- [109] R.N.A.H Lewis, B.D. Sykes, R.N. McElhaney, Biochemistry 27 (1988) 880-887.
- [110] R.P. Richter, N. Maury, A.R. Brisson, Langmuir 21 (2005) 299-304.
- [111] C. Scomparin, S. Lecuyer, M. Ferreira, T. Charitat, B. Tinland, Eur. Phys. J. E 28 (2009) 211-220.
- [112] P.S. Swain, D. Andelman, Langmuir 15 (1999) 8902-8914.
- [113] H.M. Seeger, A. Di Cerbo, A. Alessandrini, P. Facci, J. Phys. Chem. B 114 (2010) 8926-8933.
- [114] R.J. Good, J. Adhes. Sci. Technol. 6 (1992) 1269-1302.
- [115] N. Belman, K. Jin, Y. Golan, J.N. Israelachvili, N.S. Pesika, Langmuir 28 (2012) 14609-14617.
- [116] E. Bormashenko, Colloid Polym. Sci. 291 (2013) 339-342.
- [117] H. Tavana, D. Jehnichen, K. Grundke, M.L. Hair, A.W. Neumann, Adv. Colloid Interface Sci. 134-135 (2007) 236-248.
- [118] E. Bormashenko, Colloids Surf. A 324 (2008) 47-50.
- [119] I. Langmuir, Science 87 (**1938**) 493-500.
- [120] E.E. Meyer, K.J. Rosenberg, J. Israelachvili, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 15739-15746.
- [121] B. Cross, A. Steinberger, C. Cottin-Bizonne, J.-P. Rieu, E. Charlaix, Europhys. Lett. 73 (2006) 390-395.
- [122] D. Bach, E. Wachtel, Biochim. Biophys. Acta 1610 (2003) 187-197.
- [123] D. Bach, I.R. Miller, Chem. Phys. Lipids 136 (2005) 67-72.
- [124] K. Murzyn, T. Róg, G. Jezierski, Y. Takaoka, M. Pasenkiewicz-Gierula, Biophys. J. 81 (2001) 170-183.
- [125] M. Alwarawrah, J. Dai, J. Huang, J. Phys. Chem. B 114 (2010) 7516-7523.
- [126] E. Chibowski, Adv. Colloid Interface Sci. 113 (2005) 121-131.
- [127] F.M. Fowkes, Calculation of work of adhesion by pair potential summation, in: Hydrophobic surfaces, Academic Press, New York and London **1969**.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

1.10.1999 r. rozpoczęłam 5-letnie studia magisterskie na Wydziale Chemii UMCS. Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Chemii Organicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Michała Pietrusiewicza. Tematem mojej pracy była *Synteza P-chiralnej o-anizylo-m-anizylop-anizylofosfiny*. Egzamin magisterski złożyłam w dniu 23.06.2004 r. z wynikiem bardzo dobrym.

Następnie w latach 2004-2008 podjęłam 4-letnie studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMCS. Pracę doktorską Właściwości nanowarstewek fosfolipidów osadzonych na podłożu stałym i ich zmiany pod wpływem enzymów zrealizowałam w Zakładzie Zjawisk Międzyfazowych pod kierunkiem prof. dr hab. Emiliana Chibowskiego. Tematyka związana z układami biologicznymi lipidów i lipaz, była nowo podjętą tematyką badawczą i dotyczyła fizykochemicznych właściwości warstewek jedno- i dwuskładnikowych lipidów (DPPC, DOPC, trioleinianu glicerolu (TO)) na podłożu stałym. Badania ukierunkowano na określenie najpierw ich zwilżalności, swobodnej energii powierzchniowej oraz struktury a następnie zmian tych parametrów w wyniku reakcji hydrolizy katalizowanych enzymami: lipazy z grzybów Candida cylindracea (LCc), fosfolipazy A2 z trzustki wieprzowej (PLA2) i fosfolipazy C z bakterii Bacillus cereus (PLC). Preparatyka warstewek lipidowych, pojedynczych i mieszanych, na podłożu stałym wymagała opanowania różnych technik, m. in. metody rozpływania, spin-coating, a także techniki Langmuira-Blodgett lub Langmuira-Schaefera. Wanna LB została zakupiona w 2006 r., a więc w połowie studiów doktoranckich. Dopiero od tego czasu możliwe stało się kontrolowane przenoszenie mono- i biwarstw z subfazy wodnej na nośnik stały oraz ich modyfikacja enzymatyczna. Równolegle prowadziłam badania potencjału elektrokinetycznego i wielkości cząstek stałych pokrytych fosfolipidami i poddanych działaniu enzymu oraz stabilności suspensji. Część badań zrealizowałam w ramach promotorskiego projektu badawczego Właściwości nanowarstw fosfolipidów osadzonych na podłożu stałym i ich zmiany pod wpływem enzymów (N204 126 32/3186) finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, którego byłam głównym wykonawcą.

Efektem badań było scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych i struktury nanowarstewek w zależności od rodzaju nośnika stałego, techniki osadzania, grubości, a także modyfikowanych enzymatycznie w funkcji czasu. Dało to możliwość kontrolowanego otrzymywania filmów o określonych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych. Były to nowatorskie badania tych układów, dotychczas niespotykane w dostępnej literaturze. Pozwoliły na pełniejszą charakterystykę oddziaływań występujących w obszarze międzyfazowym z udzia-

54

łem lipidów, biofizycznego mechanizmu działania lipaz i fosfolipaz oraz kontrolowanego ich użycia jako nanonarzędzi. Jednocześnie badania umożliwiły lepsze poznanie właściwości powierzchni ciał stałych stosowanych jako nośniki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 7 pracach [A1-A5, C1, C2]^{*}.

Na wniosek dwóch recenzentów rozprawa doktorska brała udział w Wydziałowym Konkursie na najlepszą pracę doktorską obronioną na Wydziale Chemii w 2009 roku, zajmując III miejsce.

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po zatrudnieniu w Zakładzie Zjawisk Międzyfazowych (16.02.2009 r.) na stanowisku naukowo-dydaktycznym kontynuowałam tematykę hydrolizy enzymatycznej podjętą w ramach pracy doktorskiej. W tym czasie poszerzyłam moje zainteresowania badawcze o analizę układów dwuskładnikowych zawierających sfingolipid [A10], układów lipidów osadzonych na szkle [A8, A10], krzemie lub sproszkowanym kwarcu [A11], modyfikację enzymatyczną modelowych błon w funkcji temperatury, składu [A9, C3] i rodzaju roztworu (NaCl, bufor Tris), pH, siły jonowej [A11, C4], fuzję membran (biwarstw lipidowych z liposomami) [H10], w celu określenia czynników wpływających na przebieg tych procesów.

W latach 2009-2012 sprawowałam nieformalną opiekę naukową i monitorowałam przebieg eksperymentów ujętych w koncepcji pracy doktorskiej dr Moniki Gołąbek (wszczęcie przewodu doktorskiego 20.12.2010 r., obrona pracy 19.06.2012 r.). Promotorem rozprawy zatytułowanej *Badanie zwilżalności i swobodnej energii powierzchniowej warstewek substancji biologicznie czynnych naniesionych na powierzchnię ciał stałych*, była prof. dr hab. Lucyna Hołysz.

Część powyżej wspomnianych zagadnień została zrealizowana w ramach projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego *Kompleksowe badania fizykochemicznych właściwości modelowych błon komórkowych i ich liposomów* (N N204 272839) w latach 2010-2013, którego byłam głównym wykonawcą. Projekt był ukierunkowany na: (1) określenie stabilności oraz oddziaływań występujących w jedno- i wieloskładnikowych warstwach lipidowych na subfazie wodnej, (2) analogicznych warstw osadzonych na podłożu stałym oraz lipidów występujących w postaci liposomów, (3) zbadanie zależności pomiędzy właściwościami tych układów a przebiegiem procesu hydrolizy katalizowanej przez fosfolipazy, (4) wyznaczenie czynników wpływających na agregację i wzajemne przenikanie (fuzję) modelowych błon biologicznych.

^{*}dane bibliograficzne publikacji oznaczonych literami A i C znajdują się w załączniku 3a

Wyniki badań warstw lipidowych naniesionych na nośniki stałe i pęcherzyków liposomowych oraz czynników wpływających na ich połączenie ("fuzję") z modelowymi błonami biologicznymi mogą mieć praktyczne wykorzystanie, m. in. do otrzymywania trwałych i efektywnych liposomowych nośników substancji czynnych (np. lekarstw, kosmetyków), sensorów biologicznych i matryc dla enzymów, w procesach rozpoznania molekularnego zachodzących w organizmach żywych oraz lepszego poznania fizjologii i patologii komórki biologicznej w szerszym rozumieniu.

Uzyskane wyniki wskazują, że dzięki wrażliwości fosfolipaz na zmiany struktury błon już w skali nanometrów, można uzyskać kontrolę procesu hydrolizy enzymatycznej modyfikując błony pod względem ich składu. Doniesienia literaturowe dowodzą o istotnej roli fosfolipaz w leczeniu raka. Dlatego wykonane badania podstawowe, oprócz ich poznawczego charakteru, mogą być również pomocne w opracowaniu systemu nośnikowego leków opartego na wykorzystaniu zwiększonej aktywności PLA₂ w chorej tkance (tkanka w stanie zapalnym lub tkanka nowotworowa). Wymiernym efektem tego grantu było opublikowanie 13 artykułów naukowych, w większości w czołowych czasopismach o światowym obiegu, w tym rozdziału w książce [H9] i opracowanie obszernego hasła w Encyklopedii *The Encyclopedia of Surface and Colloid Science* [H2]. Poza tym wyniki były upowszechnione na konferencjach krajowych i zagranicznych w postaci 17 prezentacji (wykłady, komunikaty, postery).

Badania nad zwilżalnością warstw lipidowych osadzonych na nośniku stałym stanowiły jedno z zadań w projekcie międzynarodowym *Complex Wetting Phenomena (CoWet)*, nr projektu 607861, z programu FP7-PEOPLE-2013-ITN - Marie-Curie Action: Initial Training Networks, realizowanym w latach 2014-2017 w naszym Zakładzie. Byłam członkiem zespołu redakcyjnego projektu, a podczas realizacji występowałam w charakterze eksperta. Przeprowadziłam w języku angielskim szkolenie z zakresu preparatyki i właściwości warstw lipidowych na ciele stałym dla zatrudnionej w Zakładzie, w ramach projektu, doktorantki mgr Yingdi Yan. Obrona jej rozprawy doktorskiej odbyła się w roku 2017. Poprowadziłam również warsztaty pt. *Methods for model lipid membranes preparation and characterization* w czasie trwania *Training Course* (26-30.09.2016) dla innych doktorantów z projektu *CoWet*. Rezultatem mojej aktywności naukowej w ramach podjętej w grancie tematyki było opublikowanie 11 prac.

W 2013 r. wspólnie z dr hab. Agnieszką Ewą Wiącek, prof. UMCS, dr hab. Martą Worzakowską (Zakład Chemii Polimerów) oraz dr Konradem Terpiłowskim podjęliśmy badania mające na celu określenie wpływu niskotemperaturowej plazmy na zmianę właściwości objętościowych i powierzchniowych wybranych polimerów (polieteroeteroketonu (PEEK) i politereftalanu etylenu (PET)) w dwóch aspektach: specyficznych właściwości mechanicznych oraz ich właściwości adhezyjnych. Mimo szerokiego spektrum zastosowań plazmy i wielu opracowań na ten temat dość trudno znaleźć prace opisujące wpływ plazmy na właściwości polimerów w aspekcie ich połaczeń adhezyjnych ze składnikami błon biologicznych i substancjami bakteriobójczymi lub o znaczeniu farmakologicznym. Zastosowanie niskotemperaturowej plazmy uzyskanej z powietrza, tlenu, argonu, azotu oraz mieszanych układów gazów miało na celu znalezienie optymalnych parametrów zwiększających właściwości adhezyjne i biokompatybilność badanych polimerów. Z drugiej strony aktywację plazmą traktowano jako proces wstępny przed osadzeniem warstewek substancji biologicznie czynnych, głównie chitozanu z uwagi na jego potwierdzone właściwości antymikrobiologiczne. Wykazano, że aktywacja plazmą powietrzną, azotową i mieszaną zwiększa chropowatość powierzchni polimeru PEEK i jego hydrofilowość, co ułatwia adhezje chitozanu prowadząc do utworzenia upakowanego filmu, jednocześnie zachowując właściwości mechaniczne nośnika [A12-A14]. Przeprowadzono także badania fizykochemiczne próbek PET-u modyfikowanego i niemodyfikowanego skrobia, które poddano działaniu plazmy powietrznej [A15]. Stwierdzono, że charakter otrzymanych powierzchni ściśle zależy od czasu kontaktowania z plazmą (1 min lub 3 min), stopnia żelowania skrobi, sił adhezji i chropowatości. Zastosowanie plazmy poprawia adhezję skrobi do PET-u, co jest istotne w przemyśle spożywczym, ponieważ zmniejszenie przepuszczalności tlenu przez tego typu warstwę może zabezpieczać żywność i produkty farmaceutyczne przed zepsuciem [A15]. Substancje biologiczne służą jako warstwy ochronne lub warstwy mające na celu poprawienie i podniesienie biozgodności polimerów w wyniku zjawiska adhezji lub nadanie polimerom określonych właściwości o znaczeniu medycznym. Badania te mogą być pomocne w opracowaniu nowatorskich preparatów leczniczych i/lub opakowań na bazie naturalnych i syntetycznych związków wielkocząsteczkowych.

Wciąż podejmujemy starania o uzyskanie grantu z Narodowego Centrum Nauki na przeprowadzenie dalszych badań. W 2016 r. i 2017 r. wniosek o finansowanie został opracowany we współpracy z zespołem Pani prof. dr hab. Nadziei Dreli z Uniwersytetu Warszawskiego. Zakres planowanych badań rozszerzono o ocenę biokompatybilności uzyskanych biomateriałów na podstawie wybranych reakcji odpornościowych z udziałem leukocytów kluczowych w stanie zapalnym (makrofagi, neutrofile) i odporności nabytej (limfocyty T i B). Niestety złożone wnioski, w których występowałam jako główny wykonawca, nie zostały zakwalifikowane do finansowania: 1. OPUS **17.06.2014** Nr rej. 2014/13/B/ST5/02145 Id 259948 Badania wpływu plazmy niskotemperaturowej na właściwości powierzchniowe wybranych polimerów z pamięcią kształtu w aspekcie połączeń adhezyjnych z warstewkami substancji biologicznych.

2. OPUS **16.06.2015** Nr rej. 2015/17/B/ST4/04217 Id 295970 Charakterystyka fizykochemiczna warstewek substancji biologicznych o charakterze antybakteryjnym osadzonych na nośniku polimerowym "z pamięcią kształtu" modyfikowanym plazmą niskotemperaturową.

OPUS umowa konsorcyjna z Uniwersytetem Warszawskim 15.06.2016 Nr rej. 2016/21/B/ST4/03691 Id 336278 Charakterystyka fizykochemiczna i ocena biokompatybilności w zakresie odpowiedzi immunologicznej filmów substancji biologicznych o charakterze antybakteryjnym osadzonych na polimerze PEEK modyfikowanym plazmą niskotemperaturową.
OPUS umowa konsorcyjna z Uniwersytetem Warszawskim 22.06.2017 Nr rej. 2017/25/B/ST4/02816 Id 373708 Charakterystyka fizykochemiczna i ocena biokompatybilności w zakresie odpowiedzi immunologicznej implantów wykonanych z polieteroeteroketonu modyfikowanych plazmą niskotemperaturową pokrytych filmem wybranych substancji aktywnych biologicznie.

Zaangażowałam się również w badania oddziaływań TiO₂-chitozan-kwas hialuronowy w dyspersjach oraz tych składników z modelową błoną biologiczną techniką Langmuira. Badania te wchodzą w zakres pracy doktorskiej mgr Agaty Gozdeckiej pt. Charakterystyka oddziaływań TiO₂/biopolimer w układzie dyspersyjnym i na podłożu stałym w aspekcie biokompatybilności, realizowanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Ewy Wiącek, prof. UMCS, gdzie pełnię funkcję promotora pomocniczego (otwarcie przewodu 18.12.2017 r.). Wszystkie związki są nietoksyczne, biokompatybilne i biodegradowalne w organizmie ludzkim. Ze względu na te korzystne cechy stanowią potencjalne komponenty syntetycznego materiału skóropodobnego, do transplantacji tkanek ludzkich, zwłaszcza, że w połączeniu mogą wykazywać działanie synergistyczne. Dlatego podjęto charakterystykę wzajemnych oddziaływań poszczególnych komponentów sztucznej skóry i ich mieszanin z modelowymi błonami komórkowymi w celu lepszego zrozumienia procesów zachodzących w organizmie człowieka po bezpośrednim kontakcie biomateriału z tkankami. Badania dotyczące stabilności dyspersji TiO₂-chitozan w zależności od stężenia i pH opisano w pracy [A16]. Wykazały one, że chitozan adsorbuje się na powierzchni TiO₂ dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i efektom sterycznym zwiększając stabilność układu. Adsorpcja jest ściśle zależna od pH i może prowadzić do utworzenia trwałego biomateriału TiO2-chitozan przy określonym stosunku składników [A16]. Kolejne badania skoncentrowano na otrzymaniu innego typu biomateriałów

z wykorzystaniem bioszkła, kwasu hialuronowego i/lub alginianu oraz scharakteryzowaniu ich struktury, właściwości zwilżających i swobodnej energii powierzchniowej [A17]. Wyniki uzyskane w toku przeprowadzonych do tej pory badań były sukcesywnie prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci 4 komunikatów i 12 posterów.

W obszarze implantologii kolejnym obiektem moich zainteresowań stała się cyklosporyna A (CsA). Jest 11-aminokwasowym polipeptydem stosowanym jako lek immunosupresyjny zapobiegający odrzutowi przeszczepu. Wspólnie z dr hab. Agnieszką Ewą Wiącek i mgr. Kacprem Przykaza rozpoczęłam badania nad uzyskaniem układów hybrydowych, zawierających substancje biologicznie aktywne, immobilizowanych na wysoce biokompatybilnym podłożu polimerowym PEEK, o korzystnych właściwościach fizykochemicznych i mechanicznych. Do utworzenia warstewki mieszanej wykorzystano chitozan, CsA oraz lipidy. Wstępne badania układów PEEK/substancja biologiczna zostały omówione w pracy dyplomowej Pana Przykaza, której byłam promotorem (2015 r.). Preparatykę i charakterystykę zwilżalności układów PEEK/chitozan/lipid-cyklosporyna przedstawiono w Jego pracy magisterskiej. Obecnie bardziej zaawansowane badania tego typu układów stanowia jeden z aspektów pracy doktorskiej mgr. Kacpra Przykaza, której jestem promotorem pomocniczym (otwarcie przewodu 18.06.2018 r.). Sądzimy, że odpowiednie opracowanie biomateriału może zostać wykorzystane do uwalniania substancji o działaniu immunosupresyjnym (CsA) bezpośrednio z powierzchni implantów polimerowych. Wstępne badania zostały opublikowane w pracach [C5, C6] oraz upowszechnione na konferencjach w kraju i za granica (5 komunikatów, 2 postery).

We współpracy z dr hab. Martą Palusińską-Szysz z Zakładu Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS podjęłam także pilotażowe badania określenia wpływu peptydu LL-37 na fosfolipidy wydzielane z bakterii *Legionella micdadei*, stosując technikę Langmuira. Rezultaty są na etapie opracowania.

Mój dorobek jest doceniany na arenie międzynarodowej, o czym świadczą liczne imienne zaproszenia nadsyłane od organizatorów konferencji, wydawców i edytorów czasopism naukowych o światowym zasięgu. Również w odpowiedzi na zaproszenia edytorów wykonałam 19 recenzji prac naukowych w zakresie fizykochemii powierzchni.

21.06.2018 r. Matgonata Junah