Załącznik 2a

Autoreferat

przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy oraz osiągnięcie naukowe, zgłaszane jako przedmiot postępowania habilitacyjnego oraz pozostałe osiągnięcia naukowe

Dr Marta Arczewska

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Wydział Inżynierii Produkcji Zakład Biofizyki

Lublin 2019

Spis treści

1. Prezentacja informacji ogólnych dotyczących habilitantki	2
1.1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	2
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
3. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora	3
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. 65, poz. 595 ze zm.)	. nr 3
4. 1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4. 2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego	3
 4. 3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	۱ 5 6 7
4.4. Podsumowanie	. 23
4.5. Spis cytowanej literatury (z wyłączeniem prac stanowiących cykl prac habilitacyjnyc	:h) 25
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	. 28
5. 1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	. 28
5. 2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	. 30
5. 3. Zestawienie prac dokumentujących pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze	. 32
5. 4. Plany przyszłych badań	. 33
6. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych	34

Dr Marta Arczewska

Zakład Biofizyki Wydział Inżynierii Produkcji Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin email: marta.arczewska@up.lublin.pl tel.: +48 602886105

1. Prezentacja informacji ogólnych dotyczących habilitantki

Imię i nazwisko: Marta Katarzyna Arczewska (nazwisko panieńskie: Zimnicka)

1.1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł licencjata – 2000 r.: Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, kierunek: fizyka medyczna. Temat pracy: *"Zastosowanie metody* ¹*H MRS w charakterystyce rozkładu metabolitów mózgowych na granicy istota szara-istota biała*". Promotor: Prof. dr hab. Maria Sokół.

Tytuł magistra – 2002 r.: Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, kierunek: fizyka, specjalność: fizyka medyczna. Temat pracy: *"Badanie mikrokalorymetryczne fotoporfiryn"*. Promotor: Prof. dr hab. Zofia Drzazga.

Dyplom ukończenia studiów podyplomowych (dwa semestry) – 2009 r. na kierunku *Public Relations w Badaniach Naukowych* w Wyższej Szkole Ekonomii i Innowacji w Lublinie. Studia realizowane przez Polską Fundację Ośrodków Wspomagania Rozwoju Gospodarczego "OIC Poland".

Stopień doktora – 25.10.2010 r.: Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, dziedzina: nauki fizyczne, dyscyplina: fizyka. Temat pracy: *"Spektroskopowe badania organizacji molekularnej antybiotyku polienowego amfoterycyny B w środowisku jonów K⁺ i Na⁺"*. Promotor: Prof. dr hab. Mariusz Gagoś.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

3.11.2003 – 31.12.2005 specjalista fizyk w Zakładzie Biofizyki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
1.02.2006 – 30.09.2011 asystent w Katedrze Fizyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
01.10.2011 – do chwili obecnej adiunkt w Zakładzie Biofizyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Dodatkowe informacje o dłuższych przerwach w pracy: W okresie 18.02.2013 – 30.06.2013 urlop dla poratowania zdrowia W okresie 1.08.2014 – 29.01.2015 urlop macierzyński

3. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora stanowi:

- **17** pełnotekstowych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)
- **14** doniesień zjazdowych zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (7) i krajowych (7)
- Sumaryczny *impact factor* (IF) opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 42,049. Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 465 pkt.

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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4. 1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie sześciu publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

Mechanizmy molekularne i uwarunkowania fizykochemiczne determinujące oddziaływania biologicznie czynnych związków pochodzenia naturalnego z błonami lipidowymi

4. 2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to **6** oryginalnych prac eksperymentalnych [**H1** – **H6**], których sumaryczny *impact factor* (IF) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **16,604** (zgodnie z rokiem 2019 IF₂₀₁₉: **16,241**). Łączna ilość punktów według wykazu MNiSW zgodnie z rokiem ukazania się wszystkich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **170 pkt**.

[H1] Gagoś M., **Arczewska M.**, *FTIR spectroscopic study of molecular organization of the antibiotic amphotericin B in aqueous solution and in DPPC lipid monolayers containing the sterols cholesterol and ergosterol*, European Biophysics Journal 2012, 41 (8) 663-673

IF₂₀₁₂: 2,274/20 pkt MNiSW/ IF₂₀₁₉: 1,935 /20 pkt MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, wykonaniu doświadczeń z formowaniem warstw jednocząsteczkowych z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira i nanoszeniu ich techniką Langmuira-Blodgett na podłoże stałe w celu dalszej analizy z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni ATR-FTIR, wykonaniu doświadczeń z wstrzykiwaniem antybiotyku amfoterycyny B pod dwuskładnikowe warstwy lipidowo-sterolowe, opracowaniu wyników w formie tabel i rysunków, udziale w interpretacji wyników, napisaniu tekstu manuskryptu do publikacji oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów i korekcie pracy po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 60%. **[H2]** Arczewska M.*, Czernel G., Gagoś M., Effect of the amphotericin B and its copper complex on a model of the outer leaflet of human erythrocyte membrane, Journal of Physical Chemistry B 2016, 120 (43) 11191-11204

IF₂₀₁₆: 3,177/30 pkt MNiSW/IF₂₀₁₉: 3,146/30 pkt MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu próbek do analiz, wykonaniu wszystkich doświadczeń z formowaniem izoterm sprężania z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira w układach wieloskładnikowych naśladujących zewnętrzną warstwę błony erytrocytu pod względem składu lipidowego, wykonaniu analizy termodynamicznej na podstawie uzyskanych izoterm oraz obrazowaniu morfologii otrzymanych filmów przy wykorzystaniu mikroskopii kąta Brewstera (BAM), opracowaniu wszystkich wyników, napisaniu tekstu manuskryptu do publikacji oraz odpowiedzi na recenzję i korekcie pracy po recenzji. W publikacji występowałam w charakterze autora korespondencyjnego. Badania współfinansowano z grantu, którego byłam głównym wykonawcą. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

[H3] Arczewska M., Kamiński D.**, Górecka E., Pociecha D., Rój E., Sławińska-Brych A., Gagoś M., *The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies*, Biochimica Biophysica Acta- Biomembranes 2013, 1828 (2) 213-222

IF2013: 3,431/35 pkt MNiSW/ IF2019: 3,438/35 pkt MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu wszystkich próbek do dalszych analiz, wykonaniu doświadczeń z formowaniem wielowarstw lipidowych domieszkowanych ksantohumolem i ich analizy z wykorzystaniem techniki ATR-FTIR w dwóch cyklach grzania, wyniki te zamieszczono w rozdziale "Results and Discussion" (Tabela 1 i Rys. 4, 5, 7) oraz w współudziale w tworzeniu poglądowego modelu lokalizacji ksantohumolu w wielowarstwie uformowanej z DPPC w zależności od stanu fazowego filmu lipidowego (Rys. 6), przygotowaniu i napisaniu rozdziałów manuskryptu dotyczących interpretacji i dyskusji wyników uzyskanych z spektroskopii w podczerwieni, przygotowaniu tekstu manuskryptu do druku, odpowiedzi na recenzję i korekcie pracy po recenzji. Badania współfinansowano z grantu, którego byłam współwykonawcą. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

[H4] Arczewska M.*, Kamiński D., Gieroba B., Gagoś M., Acid-base properties of xanthohumol: a computational and experimental investigation, Journal of Natural Products 2017, 80 (12) 3194-3202 IF_{2017/2019}: 3,885/35 pkt MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu doświadczeń z określeniem właściwości kwasowo-zasadowych ksantohumolu na podstawie miareczkowania potencjometrycznego i pomiarów widm absorpcji elektronowej techniką spektroskopii UV-Vis w warunkach zmiennego pH, obliczeniu stałych pK_a ksantohumolu przy wykorzystaniu oprogramowania HyperQuad 2013, zaplanowaniu obliczeń kwantowo-mechanicznych z użyciem funkcjonałów gęstości elektronowej B3LYP i CAM-B3LYP, w połączeniu z bazą funkcyjną 6-31G(2d,2p) i współudziale w ich interpretacji, napisaniu i przygotowaniu tekstu manuskryptu do publikacji oraz odpowiedzi na recenzję i korekcie pracy po recenzji. W publikacji występowałam w charakterze autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

[H5] Arczewska M.*, Gieroba B., Gładyszewska B., Rój E., Gagoś M., *Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na właściwości spektroskopowe ksantohumolu*, Przemysł Chemiczny 2018 T. 97 (4) 624-628

IF2018/2019: 0,399/15 pkt MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń oraz ich interpretacji, napisaniu i przygotowaniu tekstu manuskryptu do publikacji oraz odpowiedzi na recenzję i korekcie pracy po recenzji. W publikacji występowałam w charakterze autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

[H6] Budziak I., Arczewska M., Sachadyn-Król M., Matwijczuk A., Waśko A., Gagoś M., Terpiłowski K., Kamiński D., *Effect of polyols on the DMPC lipid monolayers and bilayers*, Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes 2018, 1860 (11) 2166-2174

IF_{2018/2019}: 3,438/35 punktów MNiSW

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu próbek do badań, udziale w wykonaniu pomiarów widm absorpcyjnych z wykorzystaniem spektroskopii ATR-FTIR, przeprowadzeniu pomiarów z określeniem kinetyki adsorpcji alkoholi cukrowych do monowarstwy lipidowej, samodzielnym wykonaniu eksperymentów grubości i morfologii warstw lipidowych modyfikowanych wybranymi alkoholami cukrowymi z zastosowaniem techniki monowarstw Langmuira i mikroskopii kąta Brewstera (BAM), udziale w interpretacji większości wyników, napisaniu i przygotowaniu tekstu manuskryptu do publikacji oraz odpowiedzi na recenzję i korekcie pracy po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

- * autor korespondencyjny
- ** równy wkład

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego udokumentowano w **załączniku nr 5**.

4. 3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4. 3. 1. Wprowadzenie – przedmiot badań

Zainteresowanie produktami pochodzenia naturalnego przeżywa obecnie swój renesans ponieważ stanowią one potencjalne źródło związków biologicznie czynnych, które mogą być materiałem wyjściowym przy poszukiwaniu nowych leków. Znalezienie właściwej biomolekuły o zdefiniowanej aktywności terapeutycznej jest niezwykle trudnym wyzwaniem pomimo całego spektrum dostępnych eksperymentalnych technik pomiarowych czy metod obliczeniowych (QSAR, dynamika molekularna). Chociaż każda grupa związków naturalnych posiada swój indywidualny cel molekularny, to ich wspólnym mianownikiem jest dotarcie do miejsca działania. Na poziomie molekularnym problem sprowadza się do wbudowania się cząsteczek związku do hydrofobowej ze swej natury błony komórkowej. Aby związek biologicznie czynny mógł oddziaływać z celem molekularnym musi posiadać również odpowiednią strukturę przestrzenną czy cechować się specyficznymi właściwościami fizykochemicznymi, które warunkują zdolność do wchodzenia w interakcje z dwuwarstwą lipidową. Ograniczenie się do badania mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność biologiczną związków pochodzenia naturalnego tylko na poziomie membran lipidowych jest w znacznym stopniu uproszczonym podejściem. Uwarunkowane jest to ogromną różnorodnością składu lipidowo-białkowego i struktury naturalnych błon komórkowych, których wykorzystanie w doświadczeniach daje informacje jedynie o uogólnionym efekcie badanego związku na właściwości membrany. Nie mniej jednak w ostatnich latach powstało kilka prac poglądowych rekomendujących zastosowanie modelu błony biologicznej w celu poznania mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za aktywność prozdrowotną wielu związków [1]. Taki układ modelowy to szeroko rozumiane sztuczne błony lipidowe z wykorzystaniem np. liposomów, membran osadzanych na stałych podłożach oraz monowarstw lipidowych jako układów naśladujących naturalne membrany.

Doskonałym narzędziem umożliwiającym analizę interakcji pomiędzy związkami aktywnymi a lipidami błonowymi jest technika warstw jednocząsteczkowych Langmuira stanowiąca prosty model *in vitro* imitujący błonę biologiczną, która jest złożeniem dwóch warstw lipidowych [2-5]. Mechaniczna kompresja warstw jednocząsteczkowych (filmów Langmuira) jest bezpośrednim analogiem kompresji hydrostatycznej w trzech wymiarach dającym obraz zmian fazowych w układzie modelowym [6]. Warto w tym miejscu przytoczyć fakt, że już w 1925 roku Görter i Grendel wykorzystując technikę monowarstw Langmuira wykazali, że utworzona na powierzchni wody lipidowa monowarstwa charakteryzowała się dwa razy większą powierzchnią od powierzchni wyjściowej krwinek czerwonych, z których lipidy te zostały wyekstrahowane. W oparciu o uzyskane wyniki przedstawili oni pierwszy model błony biologicznej jako podwójnej warstwy lipidowej [7].

Obecnie, technika Langmuira niesie za sobą szereg możliwości, filmy jedno- lub kilku składnikowe naśladujące swym składem lipidowym rzeczywiste układy biologiczne osadzane na podłożach stałych metodą Langmuira-Blodgett (L-B) stanowią doskonały materiał do dalszych badań biofizycznych [8]. Największą zaletą takich dwuwymiarowych systemów jest możliwość modyfikacji w sposób kontrolowany i bez ograniczeń parametrów fizykochemicznych podczas eksperymentu, takich jak rodzaj subfazy, temperatura oraz upakowanie cząsteczek, co pozwala odwzorować warunki najbardziej zbliżone do fizjologicznych. W taki sposób przygotowane filmy cechujące się dokładnie zdefiniowanym składem, grubością oraz określoną orientacją molekularną mogą być analizowane z zastosowaniem innych komplementarnych technik: spektroskopii w podczerwieni FTIR, mikroskopii kąta Brewstera (BAM) oraz dyfrakcji rentgenowskiej [9]. Wiedza jaką dostajemy na podstawie analizy wyników uzyskanych przy zastosowaniu metod fizycznych wydaje się być niezwykle pomocna do opisu sposobu organizacji i modyfikacji błon przez aktywne biologicznie związki, co z kolei przełożyć się może na lepsze poznanie ich mechanizmów działania na poziomie molekularnym.

4. 3. 2. Cel naukowy prowadzonych badań

Zakres tematyczny prac przedstawionych w cyklu habilitacyjnym wpisuje się w nurt badań dotyczących poznania mechanizmów molekularnych warunkujących oddziaływania między związkami pochodzenia naturalnego a lipidami błonowymi. Motywacją do podjęcia badań w tym obszarze był fakt, że niektóre wyniki dotyczące interakcji w membranach lipidowych dla wybranych związków były niespójne lub wymagały dalszej weryfikacji eksperymentalnej oraz doprecyzowania bądź nie było tego rodzaju doniesień naukowych. Wobec powyższego, podjęte przeze mnie badania pozwoliły na realizację celu poznawczego poprzez określenie rodzaju interakcji, lokalizacji oraz organizacji molekularnej amfoterycyny B, antybiotyku z grupy makrolidów polienowych, ksantohumolu będącego prenylowanym flawonoidem oraz wybranych alkoholi cukrowych w modelowych układach biologicznych (monowarstwach i wielowarstwach lipidowych oraz w liposomach).

Na podstawie wyników uzyskanych z w/w prac zgłębiłam szereg następujących zagadnień, a mianowicie:

- poznanie charakteru oddziaływań antybiotyku polienowego amfoterycyny B (AmB) ze składnikami monowarstw lipidowo–sterolowych, stanowiących model błony komórkowej zwierzęcej i grzybowej [H1].
- analiza interakcji antybiotyku AmB oraz jej kompleksu z jonami Cu²⁺ (AmB–Cu²⁺) ze składnikami membrany wieloskładnikowej naśladujących zewnętrzną błonę erytrocytu ludzkiego [H2].
- badanie wpływu prenylowanego flawonoidu ksantohumolu (XN) na dynamiczne i strukturalne własności wielowarstw lipidowych oraz zaproponowanie miejsc lokalizacji tego związku w membranie lipidowej [H3].
- zaproponowanie schematu dysocjacji, wyznaczanie stałych dysocjacji pK_a ksantohumolu oraz badanie organizacji molekularnej ksantohumolu w środowisku rozpuszczalników o różnej polarności [H4, H5].
- badanie molekularnego mechanizmu interakcji alkoholi cukrowych z membraną lipidową [H6].

4. 3. 3. Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

W niniejszym podrozdziale nie zawarłam szczegółowego omówienia wszystkich wyników (te znajdują się w tekstach załączonych kopii prac zamieszczonych w **załączniku nr 6),** lecz dokonałam przeglądu przeprowadzonych badań oraz najważniejszych, sformułowanych na ich podstawie wniosków w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy.

Amfoterycyna B

Amfoterycyna B (AmB) jest najpowszechniej stosowanym makrolidowym antybiotykiem z grupy polienów syntetyzowanym przez geofilne promieniowce Streptomyces nodosus. Pomimo uznania tego polienu w praktyce klinicznej jako złoty standard w leczeniu ciężkich grzybic systemowych, ciągle pozostaje on jednym z najbardziej toksycznych farmaceutyków [10, 11]. Złożoność struktury chemicznej AmB przedstawionej na Rys. 1 jest odpowiedzialna za unikatowe właściwości biologiczne. Jak wynika z wielu danych literaturowych, selektywność cząsteczek AmB względem błon związana jest głównie z obecnością steroli, które występują zarówno w błonach komórkowych grzybów (ergosterol) jak i ssaków (cholesterol) [12-15]. Orientacja mykozaminy względem pierścienia makrolaktonowego odgrywa znaczącą rolę w oddziaływaniu AmB ze sterolami, ułatwianiu formowania kanałów oraz selektywnej toksyczności związku [16, 17]. Część ta jest także składową chitynowych ścian komórkowych grzybów, co niewątpliwie ułatwia włączanie AmB (poprzez mechanizm rozpoznawania) do ściany komórkowej drobnoustroju. Jest również aktywnym powierzchniowo związkiem z uwagi na amfifilowy charakter budowy cząsteczki warunkowany przez obecność w strukturze chemicznej jonizowalnych grup: karboksylowej – COOH i aminowej – NH₂. Na podstawie ogólnie akceptowanych hipotez i aktualnego stanu wiedzy, aktywność biologiczna AmB odbywa się na poziome błon cytoplazmatycznych. Upośledzenie funkcji barierowej błony jest prawdopodobnie realizowane przez powstawanie transmembranowch struktur w postaci porów formowanych przez molekuły AmB. Niemniej jednak, precyzyjne dane dotyczące mechanizmów interakcji molekularnych AmB z błonami biologicznymi, wciąż nie są dostatecznie poznane a ich interpretacja pozostaje nadal niewyjaśnionym zagadnieniem.



Rys. 1. Struktura chemiczna cząsteczki AmB. Pierścień makrolaktonowy składa się z hydrofobowego fragmentu, tworzonego przez heptaenowy chromofor oraz hydrofilowego łańcucha polihydroksylowego. Makrocykliczny lakton, połączony jest poprzez wiązanie β -glikozydowe, na atomie węgla C–19, z resztą aminocukru – D-mykozaminą, która razem z grupą karboksylową (C–16) stanowi tzw. "głowę polarną" cząsteczki antybiotyku.

Amfipatyczny charakter struktury chemicznej sprawia, że cząsteczki AmB wykazują tendencję do samoasocjacji zarówno w mediach wodnych jak i w niepolarnym środowisku błon lipidowych [18-21]. Wobec powyższego stopień zagregowania antybiotyku w roztworach wodnych, czyli zanim jeszcze zwiąże się on z błoną, może mieć znaczenie dla selektywności jego działania. W związku z tym poznanie mechanizmów agregacji cząsteczek AmB ściśle koreluje z określeniem charakteru oddziaływania tego antybiotyku z błonami lipidowymi.

Chcąc przeprowadzić bardziej szczegółową analizę powyższej tematyki na poziomie molekularnym wspólnie z prof. dr hab. Mariuszem Gagosiem stworzyłam koncepcję badań, której rezultaty opisałam w artykule opublikowanym w 2012 roku na łamach czasopisma European Biophysics Journal [H1]. W pracy tej podjęłam się wyjaśnienia mechanizmów wbudowywania się AmB do warstw lipidowych uformowanych z 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfatydylocholiny (DPPC) zawierających sterole błonowe: cholesterol oraz ergosterol w stosunku molowym 1:1. Możliwość chemoterapeutycznej aktywności AmB wynika ze sposobu oddziaływania z błoną i jest uzależniona od rodzaju obecnych w niej steroli. Jak wynika z wielu danych literaturowych, selektywność cząsteczek AmB względem błon związana jest głównie z obecnością steroli, które występują zarówno w błonach komórkowych grzybów (ergosterol) jak i ssaków (cholesterol). W oparciu o różne modele błon lipidowych stwierdza się dużo wyższe powinowactwo cząsteczek AmB do membran bogatych w ergosterol [12-14]. Ponieważ wyniki prezentowane w literaturze wyjaśniające mechanizm selektywnego działania AmB są często niespójne i nieprecyzyjne zmotywowało mnie to do podjęcia badań w tym obszarze tematycznym [22].

Jednym z ważniejszych aspektów przeprowadzonego eksperymentu było określenie wpływu pH na molekularną organizację antybiotyku wykorzystując do tego podejście łączące technikę monowarstw Langmuira ze spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera z zastosowaniem metody całkowitego wewnętrznego odbicia ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Wyniki te były kluczowe dla wyjaśnienia mechanizmu wbudowywania się AmB w modelowe układy lipidowe zawierające sterole. Opracowana przeze mnie w rozprawie doktorskiej charakterystyka kwasowo-zasadowa dla antybiotyku AmB wskazuje, że w roztworach wodnych cząsteczka posiada dwa punkty pKa, pierwszy pKa1 występuje przy pH 2,3. Przy wartości pH 10 (pK_{a2}) AmB jest mieszaniną form deprotonowanej i obojnaczej w stosunku 1:1 [19]. W warunkach pH 6-7 (punkt izoelektryczny) cząsteczki związku występują W postaci jonów obojnaczych i poprzez grupy jonizowalne mogą ze sobą asocjować w formy dimerów oraz większych agregatów molekularnych. Analiza widm ATR-FTIR dla monowarstw AmB osadzonych na podłożu stałym (kryształ germanu) przy dwóch wartościach pH subfazy (pH 7 i 11) oraz dwóch wartościach ciśnienia

powierzchniowego ujawniła istotne różnice, zależnie od stanu jonowego i orientacji cząsteczek AmB względem fazy nośnej (**Rys. 2**). Informacje na temat zmian w konformacji cząsteczek AmB można



Rys. 2. Widma ATR-FTIR monowarstw AmB osadzonych techniką L-B na powierzchni kryształu germanu przy ciśnieniu powierzchniowym 5 mN/m (A) oraz 20 mN/m (B). Wstawki obrazują sposób orientacji (horyzontalnej i wertykalnej) molekuł AmB na granicy faz woda – powietrze w zależności od wartości ciśnienia powierzchniowego. Rysunek opublikowano w [H1].

wywnioskować z pasm pochodzących od drgań wiązań C=C (w chromoforze cząsteczki) oraz grup: C=O, -COO⁻ oraz -NH₃⁺, które to wykazują największą wrażliwość na reorientację cząsteczek antybiotyku [23]. Zgodnie z moimi oczekiwaniami, przy wartości pH 11 pasmo przypisane drganiom grupy C=O w estrze i protonowanej grupie -COOH nie jest obecne w widmie FTIR, podczas gdy dla pH 7 intensywność jego wzrasta i przesuwa się w stronę niższych liczb falowych gdy cząsteczki AmB przyjmują położenie wertykalne. Pojawienie się silnego pasma przy 1260 cm⁻¹ charakterystycznego dla drgań walencyjnych (C–O) oraz pasma przy 1372 cm⁻¹ drgań deformacyjnych grupy –COO⁻, wydaje się potwierdzać moje przypuszczenia. Przy pH 11, z powodu całkowitej deprotonacji grupy karboksylowej, para intensywnych pasm przy 1665 i 1631 cm⁻¹ była wyraźnie widoczna, co jest bezpośrednim wskaźnikiem dla drgań asymetrycznych ugrupowania –COO⁻ wchodzącego w interakcje z powierzchnią. Podczas sprężania monowarstwy do ciśnienia powierzchniowego 20 mN/m, drugie pasmo tej pary przesuwa się w kierunku niskich częstotliwości o 8 cm⁻¹. W środowisku neutralnym grupa aminowa jest częściowo deprotonowana. Może na to wskazywać obecność dwóch różnych drgań rozciągających karboksylanów, jak podano w przypadku aminokwasów, jeden powstały z protonowanej grupy aminowej około 1630 cm⁻¹, drugi z deprotonowanej aminy przy 1560 cm⁻¹. Ze względu na wpływ wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między sąsiednimi grupami karboksylowymi, pasmo odpowiadające asymetrycznym drganiom grupy – COO⁻ przesuwa się w stronę wyższych częstości. Przy pH 7 cząsteczka AmB przyjmuje formę jonu obojnaczego, co stwarza idealne warunki do agregacji. Pasmo zjonizowanej grupy karboksylowej występujące przy 1655 cm⁻¹ (dla 5 mN/m) zanika wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego oraz zmianą orientacji AmB w monowarstwie. Ten efekt posłużył mi powiązać to z procesem agregacji oraz udziałem w nim grup

jonizowalnych. Było też oczywiste, że pasmo przy ok. 1560 cm⁻¹, które jest nałożeniem drgań rozciągających grupy karboksylowej, deformacyjnych grupy aminowej i drgań rozciągających wiązań C=C było obecne tylko przy pH 7. Ten efekt został interpretowany jako agregacja za pośrednictwem chromoforów AmB zarówno w położeniu horyzontalnym jak i wertykalnym cząsteczek antybiotyku. Co ciekawe, inne techniki spektroskopowe, w tym rezonansowe rozproszenie światła (RLS), również wskazują ten typ agregacji [24]. Szczególnie interesowało mnie pasmo przy ok. 1010 cm⁻¹, powiązane z agregacją cząsteczek AmB i posłużyło mi za ważny marker spektroskopowy w badaniu tego procesu. Absorbancja tego pasma wzrasta przy pH 7 wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego, co zostało połączone ze zmianami odległości między chromoforami AmB prowadzącymi do procesów asocjacyjnych [20]. Zorientowane horyzontalnie cząsteczki AmB na powierzchni subfazy (5 mN/m) mogą wchodzić w interakcje za pośrednictwem wiązań wodorowych dając silne i szerokie pasma w rejonie 3000–3500 cm⁻¹, szczególnie widoczne przy pH 7, kiedy cząsteczki wykazują największą tendencję do agregacji. Przy ciśnieniu powierzchniowym odpowiadającym położeniom wertykalnym cząsteczek AmB, mogą one tworzyć struktury w formie porów na powierzchni subfazy. Z drugiej strony przy tym samym ciśnieniu, ale przy wartości pH 11 kiedy cząsteczki AmB występują w większości w formie monomerów nie zaobserwowałam zmian w widmach FTIR typowych dla procesu agregacji. Dotyczyło ta zwłaszcza braku ostrego pasma przy ok. 1010 cm⁻¹. Wyniki te posłużyły mi do interpretacji udziału grup funkcjonalnych w interakcjach między cząsteczkami AmB a membraną lipidową zawierającą sterole. Obecność steroli błonowych a zwłaszcza ergosterolu ma znaczący wpływ na wbudowywanie AmB do błony lipidowej. Świadczą o tym zobrazowane rezultaty badań z rejestracją kinetyki adsorpcji AmB po iniekcji jej pod powierzchnię monowarstw uformowanych z mieszaniny DPPC/cholesterol i DPPC/ergosterol. Tak jak się spodziewałam największy przyrost ciśnienia powierzchniowego był w przypadku błon wzbogaconych ergosterolem. Strukturalne różnice między cząsteczkami tych steroli mają istotny wpływ na fizyczne własności błony lipidowej. Dodatko wa grupa metylowa w ruchomym fragmencie cząsteczki ergosterolu może mieć wpływ nie tylko na zmiany płynności, ale także na przestrzenne efekty umożliwiające lepsze wchodzenie i upakowanie AmB w hydrofobowym obszarze błony lipidowej [13, 25]. Dodatkowo obecność dwóch nienasyconych wiązań w łańcuchu bocznym i w pierścieniu w cząsteczce ergosterolu czyni ten fragment molekuły bardziej sztywny i ograniczony na wszelkie zmiany konformacyjne. W rezultacie możliwości interakcji między cząsteczkami fosfolipidu i ergosterolu są ograniczone w porównaniu z cholesterolem [25].

Aby sprawdzić jakie grupy funkcyjne uczestniczą tym razem w procesie wbudowywania się antybiotyku do membran lipidowych zawierających sterole przeprowadziłam analizę zmian spektralnych za pomocą spektroskopii w podczerwieni ATR-FTIR. W tym celu na powierzchnię kryształu germanu metodą L-B nanosiłam monowarstwy lipidowo-sterolowe przy ciśnieniu powierzchniowym odpowiadającym maksymalnej penetracji błony przez antybiotyk, tj. 35 mN/m dla błon modyfikowanych ergosterolem i 26 mN/m dla błon lipidowej z cholesterolem. Warto w tym miejscu wspomnieć, że dla ciśnień powierzchniowych 25 – 35 mN/m istnieje duże podobieństwo właściwości fizycznych monowarstwy (ciśnienie lateralne, stan fizyczny, współczynnik ściśliwości) do dwuwarstwy lipidowej [26].

Analizując widma FTIR można zauważyć, że obszar spektralny od 1615 do 1510 cm⁻¹ przyporządkowany drganiom rozciągającym pochodzącym od wiązań C=C obecnych w łańcuchu polienowym chromoforu cząsteczki AmB oraz drganiom grupy aminowej jest znacznie mniej intensywny niż dla monowarstwy DPPC/ergosterol. Jest to konsekwencją wcześniejszych rozważań dotyczących różnic w budowie steroli. Bardziej sztywny i płaski układ pierścieniowy cząsteczki ergosterolu ma strukturę bardziej komplementarną do struktury AmB. Wzrost intensywności pasm w

tym rejonie wynika z oddziaływań π-elektronowych pomiędzy hydrofobową częścią sąsiadujących cząsteczek AmB i ergosterolu [27]. W ten sposób w widmach FTIR można zaobserwować różne rodzaje efektów związanych z mechanizmami odpowiedzialnymi za interakcje molekularne między cząsteczkami AmB i wzbogaconymi sterolami błonami lipidowymi. Natomiast analizując widma różnicowe FTIR można było zauważyć, ze pasma z obszaru 1750-1640 cm⁻¹ przesuwają się w kierunku niższych liczb falowych w monowarstwie DPPC/cholesterol w porównaniu do membrany lipidowej bogatej w ergosterol, co już wskazuje na inny rodzaj organizacji AmB w tych układach (**Rys. 3**). Przesunięcie pasma sugeruje udział grup karbonylowych w procesie oddziaływania, szczególnie poprzez wiązanie wodorowe z grupą karbonylową a cząsteczką AmB. Pasmo z maksimum przy 1563 cm⁻¹ wynikające z nakładających się drgań grupy aminowej i wiązań C=C nie jest obserwowane dla monowarstwy z cholesterolem z uwagi na silny efekt agregacji antybiotyku. W zgodzie z wynikami literaturowymi, mniejsza penetracja AmB do błon zawierających cholesterol w porównaniu z membranami złożonymi z ergosterolu można wytłumaczyć większą stabilnością kompleksu DPPC-cholesterol [28].

W przeciwieństwie do tego proces AmB wbudowania do monowarstwy lipidowej zawierajacej ergosterol iest wynikiem zmian stopnia uporządkowania łańcuchów lipidowych. Pasma z maksimum przy 1466 cm⁻¹ oraz 1457 cm⁻¹ uwidocznione na widmie różnicowym są pasmami charakterystycznymi dla nożycowych drgań deformacyjnych grupy metylenowej. Zmiany w tym obszarze wskazują na wpływ antybiotyku na hydrofobową część błony lipidowej poprzez zmiany konformacyjne łańcuchów acylowych (gauche - trans). Dodatkowym potwierdzeniem tej hipotezy jest wzrost intensywności pasm z obszaru cm⁻¹ pomiędzy od 2800 3000 do przypisanego drganiom rozciągającym grup CH₂ (symetrycznych oraz asymetrycznych). Wynika to z głębszej lokalizacji cząsteczek



Rys. 3. Widma różnicowe otrzymane przez odjęcie od widm zarejestrowanych dla mieszanych filmów z AmB widm monowarstw lipidowo-sterolowych. Dla porównania pokazano widmo FTIR monowarstwy AmB naniesionej na kryształ germanu przy ciśnieniu powierzchniowym 30 mN/m. Rysunek opublikowano w [H1].

AmB w obrębie węglowodorowego rdzenia monowarstwy. Obecność ergosterolu w monowarstwie lipidowej powoduje usytuowanie się cząsteczek antybiotyku w położeniu wertykalnym w jej wnętrzu. Wynik ten stanowi podstawę selektywnej aktywności błonowej AmB w zależności od obecności steroli w błonie komórkowej. Zapewnienie prostopadłej orientacji długiej osi pierścienia laktonowego antybiotyku jest prawdopodobnie niezbędne do odpowiedniej asocjacji cząsteczek AmB w formowaniu struktur transmembranowych. Widmo różnicowe FTIR dla AmB wbudowanej w monowarstwę lipidową bogatą w ergosterol wykazuje duże podobieństwo do widma FTIR czystego antybiotyku. Silna intensywność pasma przypisanego drganiom w chromoforze antybiotyku wskazuje, że pula cząsteczek AmB wbudowanych do błony lipidowej modyfikowanej ergosterolem była największa. Uzyskane wyniki mają kluczowe znaczenie poznawcze, stanowią bowiem ważny wkład do dyskusji dotyczącej wyjaśnienia zróżnicowanej selektywność oddziaływania AmB z błoną lipidową zawierającą sterole błon zwierzęcych i grzybiczych.

W związku z faktem, że amfoterycyna B nie jest idealnym preparatem terapeutycznym, wiele ośrodków naukowych podjęło próby poprawy cech farmakokinetycznych, między innymi poprzez modyfikację struktury chemicznej w celu obniżenia poziomu agregacji antybiotyku. Wiadomo, że wiele biologicznie czynnych związków stosowane jako leki posiada zmodyfikowane potencjały farmakologiczne i toksykologiczne, gdy podawane są w postaci kompleksów z metalami. Wychodząc na przeciw takim potrzebom w zespole prof. M. Gagosia syntetyzowano kompleks AmB z jonami Cu²⁺ (AmB–Cu²⁺), który z chemicznego punktu widzenia jest nowym związkiem o odmiennych właściwościach fizykochemicznych [29], oraz posiada zmienioną aktywność biologiczną w porównaniu do substancji macierzystej [30].

Wyniki badań spektroskopowych pozwoliły stwierdzić, że w roztworze wodnym powstaje stabilny kompleks AmB z jonami miedzi(II) w stosunku stechiometrycznym 2:1 [29]. W badaniach na szczepach *Candida albicans* zaobserwowano zwiększenie aktywności grzybobójczej kompleksu AmB–Cu²⁺ w porównaniu do czystej formy AmB i komercyjnie stosowanego preparatu *Fungizone* [30]. Na podstawie analizy profilu ekspresji genów związanych w komórkach RPTEC inkubowanych antybiotykiem wykazano dwukrotnie mniejszą toksyczność AmB–Cu²⁺ w stosunku do czystej AmB [31].

Ponieważ sposób podawania antybiotyku AmB odbywa się przez iniekcję dożylną, jednym z pierwszych układów biologicznych jaki staje na drodze antybiotyku stanowi błona zewnętrzna erytrocytu. Pomimo unikatowej pozycji antybiotyku w praktyce klinicznej, nie można uznać jej za lek całkowicie bezpieczny i wobec tego aplikacja go musi odbywać się pod stalą kontrolą lekarską. Wśród bezpośrednich skutków ubocznych po jego aplikacji należy wymienić zapalenie żył w miejscu iniekcji, destabilizację układu przewodzenia w sercu, co w następstwie powoduje migotanie komór, które może doprowadzić do zgonu w trakcie podawania leku. W związku z tym podjęłam się zbadania wpływu AmB i jej kompleksu tym razem na bardziej złożony układ lipidowy, który stanowiła modelowa membrana odpowiadająca swym składem lipidowym zdrowej błonie erytrocytu człowieka. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w pracy [H2], a podjęta tematyka była jednym z zadań badawczym projektu badawczego, którego byłam głównym wykonawcą [I.3, załącznik nr 3]. Analogicznie jak w poprzednich publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego do badania oddziaływania pomiędzy antybiotykiem AmB oraz kompleksem AmB-Cu²⁺ a składnikami modelowej błony zastosowałam technikę monowarstw Langmuira. Wyniki doświadczalne zostały też uzupełnione poprzez badania morfologii otrzymanych filmów przeprowadzonych z zastosowaniem mikroskopii kata Brewstera (BAM).

Modelowa monowarstwa utworzona była z cząsteczek głównych lipidów występujących naturalnie w zewnętrznej warstwie ludzkich erytrocytów w stosunku procentowym 44,9% 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfatydylocholiny (POPC), 43,1% sfingomieliny (SM), 12% 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoetanoloaminy (POPE), gdzie stosunek molowy dla mieszaniny SM/PC wynosił 0,95, a dla mieszaniny SM/PE trzymany był na poziomie 3,6. Wzajemna proporcja lipidów w układzie ustalona została na podstawie danych literaturowych [32, 33]. Tak przygotowane mieszane monowarstwy lipidowe domieszkowano antybiotykiem w odpowiednich ułamkach molowych (X_{AmB} i X_{AmB-Cu}²⁺= 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 i 0,9) względem czystego lipidowego filmu. Własności takiego trójskładnikowego układu lipidowego w zależności od zawartości AmB i AmB–Cu²⁺ w mieszaninie analizowano za pomocą parametrów obliczonych bezpośrednio z izoterm sprężania π -A.

Szczegółowe analiza uzyskanych wyników pozwoliła wykazać różnice w organizacji molekularnej na granicy faz woda–powietrze tych dwóch form antybiotyku i mające odzwierciedlenie w mniejszych powierzchniach właściwych zajmowanych przez molekuły w położeniu horyzontalnym i wertykalnym. Obserwowane różnice dotyczyły również wartości ciśnień powierzchniowych przy którym występuje ciśnienie kolapsu. Według moich założeń było to związane z odmienną organizacją molekularną AmB i kompleksu AmB z jonami Cu²⁺ na powierzchni subfazy wodnej będącą wynikiem procesów agregacji. Przyjmuje się, że toksyczność AmB w układach biologicznych jest związana z tworzeniem struktur zagregowanych. Można przypuszczać, że uformowany kompleks AmB–Cu²⁺ o stechiometrii 2:1 cechuje się wyższym stopniem monomeryzacji i wykazuje mniejszą zdolność do tworzenia struktur zasocjowanych w środowisku wodnym, w wyniku większej odległości między chromoforami cząsteczek [29]. Odzwierciedleniem tego efektu były również różnice w zarejestrowanych zdjęciach BAM, widoczne szczególnie w regionie poprzedzającym reorganizację antybiotyku. Wydłużone struktury kształtem przypominające ziarna ryżu w trakcie kompresji monowarstwy tworzą uporządkowane skupiska dla π = 5 mN/m. Kształty obserwowanych domen są bardziej regularne i jednolite w porównaniu do tych obserwowanych dla czystej AmB przy takich samych wartościach ciśnienia powierzchniowego.

Wyniki uzyskane dla lipidowych układów mieszanych odzwierciedlających zewnętrzną błonę erytrocytu, do których zostały wbudowane AmB oraz AmB-Cu²⁺ wskazują na korzystniejsze termodynamicznie oddziaływania między kompleksem AmB a składnikami lipidowymi filmu. W całym zakresie badanych ułamków molowych odnotowano zmianę ciśnienia kolapsu, co może świadczyć o mieszalności składników w takim układzie. Skrócenie regionu plateau odpowiedzialnego za przejście LE-LC charakterystyczne dla AmB w przypadku mieszaniny lipidów z kompleksem AmB w zakresie $X_{AmB-Cu}^{2+} = 0.5 - 0.9$ dowodzi, że przejście fazowe związane z reorientacją molekuł na powierzchni zachodzi przy wyższych wartościach ciśnienia powierzchniowego w porównaniu do czystego antybiotyku. Obserwowane na izotermach sprężania przejście pseudo-plateau przesunięte było w stronę wyższych ciśnień powierzchniowych w porównaniu do ciśnienia powierzchniowego kompleksu. Na podstawie tego niewielkiego przesunięcia wnioskowałam, że składniki mieszanego filmu lipidowego utrudniają zmianę orientacji molekuł z położenia horyzontalnego do wertykalnego. Dowodziło to istnieniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy składnikami filmu. Efekt ten jest łączony z inną strukturą przestrzenną kompleksu AmB-Cu²⁺. Na podstawie zmian w widmach zarejestrowanych techniką spektroskopii FTIR pokazano, że w tworzeniu kompleksu AmB-Cu²⁺ uczestniczy grupa karboksylowa umiejscowiona przy atomie węgla C – 16 cząsteczki AmB. Wiązanie jonu Cu²⁺ z grupą –COO⁻ wymusza bliskie sąsiedztwo tego jonu z grupą aminocukrową AmB i w konsekwencji oddziaływań elektrostatycznych między nimi możliwa jest rotacja mykozaminy [34].

Z drugiej strony, dla AmB również odnotowano niewielkie przesunięcie przejścia fazowego w stosunku do przejścia czystego antybiotyku. Jednakże na podstawie opisu wzajemnej mieszalności w układach mieszanych obserwowano dużo mniejsze odchylenia od wartości teoretycznych obliczonych w oparciu o relacje addytywności z minimum dla $X_{AmB} = 0,3$ dla małych ciśnień powierzchniowych niż w przypadku kompleksu. Tutaj monowarstwy mieszane AmB–Cu²⁺/PC/SM/PE wykazywały ujemne odchylenia od przebiegu prostoliniowego, prawie w całym zakresie badanych ułamków i dla małych wartości ciśnień były największe dla zawartości $X_{AmB-Cu}^{2+} = 0,5 - 0,9$. Wskazuje to na dużo silniejsze oddziaływania między składnikami w mieszanych monowarstwach zawierających AmB–Cu²⁺ w porównaniu do tych z AmB.

Wiadomo, że oddziaływania między cząsteczkami w systemach wieloskładnikowych są wypadkową oddziaływań pomiędzy hydrofobowymi ogonami cząsteczek oraz oddziaływań ich hydrofilowych grup oraz zależą zarówno od ładunku elektrycznego związków tworzących film jak i od ich struktury (budowy głowy polarnej, długości łańcucha węglowodorowego oraz obecności w nim wiązań nienasyconych). Jest możliwe, że obecność nienasyconych wiązań w hydrofobowym łańcuchu

lipidów POPC i POPE będących składnikami mieszanej monowarstwy uniemożliwia molekułom AmB osiągnięcie orientacji wertykalnej na powierzchni i dlatego polarne grupy tych lipidów są mniej osiągalne dla antybiotyku. W konsekwencji następuje osłabienie siły oddziaływań dla czystego antybiotyku. Potwierdza to też hipotezę, że AmB w głównej mierze wbudowuje się w region głów polarnych na powierzchni czystej monowarstwy lipidowej. Warto też zauważyć, że POPE który stanowił w mieszaninie mniejszościowy składnik posiada mniejszą głowę polarną w porównaniu do POPC czy SM co może mieć znaczący wpływ na upakowanie tych trzech składników w mieszanym filmie. Bazując kompleksu AmB-Cu²⁺ powyższej dyskusji, mechanizm wbudowywania się na w monowarstwę PC/SM/PE oraz jego aktywność powierzchniowa musi się różnić od czystej formy antybiotyku. W wyniku wiązania koordynacyjnego, polarność jonu metalu zostaje zredukowana poprzez częściowy podział dodatniego ładunku liganda. Dodatkowo następuje zmiana polaryzowalności chromoforu cząsteczki przez co kompleks AmB–Cu²⁺ posiada właściwości hydrofobowe i w rezultacie wchodzi w interakcje z rdzeniem węglowodorowym filmu lipidowego.

Na podstawie przeprowadzonej analizy przebiegu funkcji nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania ΔG^{exc} zauważyłam, że pomiędzy AmB i AmB–Cu²⁺ a cząsteczkami lipidów budujących modelową błonę istnieją oddziaływania o innej charakterystyce oraz sile. Przy ciśnieniu π =35 mN/m, o podobnej wartości jak w błonach plazmatycznych istniały korzystniejsze oddziaływania między AmB–Cu²⁺ a składnikami modelowej błony dla ułamka molowego X_{AmB-Cu}²⁺ = 0,7–0,9 w porównaniu do AmB, gdzie największa stabilność termodynamiczna występowała dla X_{AmB}= 0,3. Siła oddziaływań wyrażona była poprzez dużo większe ujemne wartości ΔG^{exc} dla AmB–Cu²⁺ w szerokim zakresie ułamków molowych. Jednak dla dużej zawartości AmB w mieszanym filmie odnotowano wartości dodatnie w całym zakresie ułamków molowych. Istnienia oddziaływań bardziej odpychających dla X_{AmB} > 0,7 było prawdopodobnie związane z separacją faz i wytrąceniem antybiotyku z mieszaniny, co było obserwowane w przebiegu krzywych sprężania i na obrazach BAM (**Rys. 4B**).

Wiadomo, że antybiotyki polienowe posiadają właściwości hemolityczne w zależności od ich stężenia i formulacji [35]. W świetle przeprowadzonej dyskusji i danych literaturowych wydaje się prawdopodobne, że kompleks AmB z jonami Cu²⁺ wiążą się wydajniej na zasadzie oddziaływań jonowych z naładowanymi resztami lipidów obecnych w błonie erytrocytu. Może to również tłumaczyć faktem, że niezwiązane jony Cu²⁺mogą oddziaływać z grupą fosforanową lipidów reprezentującymi zewnętrzną błonę erytrocytalną. Hydrofobowość kompleksu zwiększa możliwość dużo efektywniejszego oddziaływania składnikami modelowej ze błony, i daje wkład w wytłumaczenie kolejnego rezultatu uzyskanego w niniejszej pracy odnośnie wytrącenia z fazy podłużnych struktur o wymiarach ok. 10-90 µm zarejestrowanych na zdjęciach BAM tylko w przypadku dużej zawartości AmB w mieszanym filmie. Tworzenie się trójwymiarowych struktur obserwowanych na zdjęciach BAM próbowałam wyjaśnić w dwojaki sposób; formowaniem się krystalitów w mieszanym filmie z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność AmB w środowisku lipidowym lub faktem, że badany skład lipidowy mieszaniny może indukować proces krystalizacji antybiotyku. To drugie wyjaśnienie może nieść za sobą poważne konsekwencje i może być niezwykle istotne z punktu widzenia wyjaśnienia toksyczności AmB. Ponieważ analizowana modelowa błona naśladowała zewnętrzną warstwę erytrocytu ludzkiego, przy znacznej akumulacji antybiotyku w organizmie człowieka może dochodzić do jego wykrystalizowania również w naturalnej błonie komórkowej.



Rys. 4. Zdjęcia z mikroskopu BAM przedstawiające stan monowarstwy PC/SM/PE modyfikowanej AmB zarejestrowane przy różnych ciśnieniach powierzchniowych (A). Obraz BAM (432 μ m x 326 μ m) dla zawartości AmB X_{AmB} = 0,9 w mieszanym filmie zarejestrowany przy 10 mN/m. Zaznaczony odcinek odpowiada długości 100 μ m (B). Rysunki opublikowano w [H2].

Taka hipoteza została już wyciągnięta w badaniach z moim udziałem nad organizacją molekularną jodoacetylowej pochodnej AmB, których rezultaty z wykorzystaniem technik FTIR oraz Ramana pozwoliły zidentyfikować pasmo (1010 cm⁻¹) charakterystyczne dla struktury krystalicznej antybiotyku [36, 37]. *W świetle powyższych badań można wnioskować, że w modelowych układach lipidowych AmB tworzy struktury zagregowane, poprzez silne wzajemne oddziaływanie chromoforowe, których struktura jest podobna jak w krysztale*. Pragną nadmienić, że przedstawione powyżej wyniki były też upublicznione na zaproszenie w formie prezentacji ustnej na międzynarodowej konferencji biofizycznej XVI Meeting of Polish Biophysical Society w 2016 r.

Ksantohumol

W ostatnich latach coraz większą popularność zyskują składniki chmielu, które stanowią potencjalne źródło naturalnych substancji aktywnych biologicznie i mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle oraz medycynie. Na największą uwagę, ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej i działania farmakologicznego, zasługuje prenyloflawonoid ksantohumol (XN), który stanowi aż 80–90% całkowitej masy polifenoli zawartych w chmielu [38, 39]. Pod względem strukturalnym należy on do grupy chalkonów, będących produktami pośrednimi w biosyntezie flawonoidów (**Rys. 5**). Podstawienie pierścienia flawonoidowego przez grupę –OCH₃ zwiększa lipofilowość i nadaje cząsteczce silne powinowactwo do błon biologicznych [40]. XN ze względu na wolną grupę hydroksylową może uczestniczyć w cyklizacji pierścienia, co skutkuje powstaniem izomerów [41].

Badania *in vitro* dowiodły, że chalkon XN jest nieenzymatycznie konwertowany do flawanonu izoksantohumolu (IXN) i enzymatycznie do fitoestrogenów [42]. XN może być łatwo przekształcony w izoksantohumol przez polimeryzację w niskim i wysokim pH w roztworze wodnym [43]. Ksantohumol w stężeniach mikromolowych wykazuje działanie przeciwnowotworowe na wszystkich etapach procesu nowotworzenia – w fazie inicjacji, promocji i progresji oraz jest związkiem chemoprewencyjnym, biorącym udział m.in. w hamowaniu procesu zapalnego, angiogenezy, blokowaniu aktywacji metabolicznej kancerogenów i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa\beta$ oraz indukcji enzymów detoksyfikujących [41, 44].

Wysoka lipofilność ksantohumolu określona przez współczynnik podziału P (logP = 4,38) w stosunku do innych prenylowanych flawonoidów może sugerować, że związek ten łatwo penetruje

błony biologiczne i modyfikuje dwuwarstwę lipidową [45]. Jednakże brak podstawowych badań spektroskopowych dotyczących właściwości fizykochemicznych XN w środowisku wodnym w zmiennych warunkach pH powoduje problemy ze zrozumieniem adsorpcji, stabilności i metabolizmu tego związku w ludzkim ciele.



Rys. 5. Struktura chemiczna cząsteczki XN. Szkielet strukturalny związku stanowią dwa pierścienie aromatyczne (acetofenonowy A i benzenowy B) podstawione przez grupy hydroksyfenolowe w pozycji C-2', C-4 i C-4' i grupę metoksylową w pozycji C-6', połączone wiązaniem podwójnym w konfiguracji trans-(E) oraz jednostkę izoprenylową w pozycji C-3'.

Moją przygodę naukową w badaniu aktywności błonowej XN zainicjowała współpraca z prof. Edwardem Rojem (INS Puławy), dzięki której wspólnie z prof. M. Gagosiem uzyskaliśmy projekt badawczy NCN pt. "Opracowanie metody otrzymywania ksantohumolu z odpadów poekstrakcyjnych chmielu oraz poprawy jego rozpuszczalności w środowisku wodnym" (N N209 032440), który był realizowany w latach 2011-2014. Efektem tej współpracy i w ramach realizacji zadań badawczych w/w projektu powstała praca [H3], w której wykorzystałam połączenie techniki ATR-FTIR z dyfrakcją rentgenowską w celu określenia wpływu XN na właściwości strukturalne i dynamiczne wielowarstw uformowanych z DPPC w funkcji temperatury. Dokładne pomiary widm w podczerwieni dla różnych stężeń molowych XN pozwoliły na wykrycie zmian spektralnych w widmie FTIR i dały możliwość określić oddziaływania pomiędzy grupami funkcyjnymi cząsteczek XN i DPPC. Korelacja uzyskanych danych spektroskopowych i dyfrakcyjnych w szerokim zakresie temperatur i przy różnych wartościach wilgotności względnej wielowarstw z DPPC doprowadziła mnie do stworzenia modelu lokalizacji XN w dwuwarstwie lipidowej. Według zaproponowanego modelu cząsteczki XN poniżej przedprzejścia fazowego lokują się w obszarze głów polarnych w wielowarstwie DPPC. W rejonie przedprzejścia fazowego, XN przemieszcza się w rejon polarno-niepolarny cząsteczek fosfolipidu. Taką zmianę lokalizacji można było wywnioskować z danych rentgenowskich jako silne obniżenie stosunku współczynników załamania między strefami lipidu. Po przedprzejściu fazowym odstęp między warstwami lipidów jest mniejszy, a interakcja XN z grupą fosforanową staje się słabsza.

Szczegółowa analiza widm FTIR oraz efektów refrakcyjnych w funkcji temperatury ujawnia, że molekuły XN silnie oddziałują z polarnymi grupami DPPC, zwłaszcza z grupą fosforanową (–PO₂[–]). Zmiany widoczne były także w hydrofobowym fragmencie cząsteczki lipidu, dotyczyło to głównie zmian w rejonie drgań deformacyjnych grup –CH₂. Oddziaływania cząsteczek XN z tymi grupami są odpowiedzialne za dynamiczne zmiany w wielowarstwach lipidowych z DPPC, które obserwowane były również w badaniach za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej.

W początkowej fazie doświadczenia dokładnej analizie poddałam efekt XN w różnych frakcjach molowych na zmiany zarejestrowane w widmach FTIR w temperaturze pokojowej (Rys. 6). Kształt i położenie pasm obserwowanych w widmach FTIR zmieniały się przy dużej zawartości XN w DPPC (20–50 %mol XN). Na podstawie danych literaturowych i spektroskopii ¹H NMR przyporządkowałam pasma drganiom grup funkcyjnych obecnym w cząsteczce XN [46]. Takie zestawienie dało możliwość wskazanie lokalizacji XN jak i rodzaju interakcji w membranie lipidowej. Przesunięcie pasma przy 1626 cm⁻¹ przypisanego drganiom rozciągającym wiązania C=O w cząsteczce XN w kierunku niższych częstości wskazuje, że XN wiąże się z częścią polarną modelowej membrany poprzez wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonylowymi DPPC i grupami hydroksylowymi XN. Ponad to, pasmo przy 1545 cm⁻¹ pochodzące od drgań w wiązaniu –C=C– jest przesunięte w kierunku wyższych częstotliwości dla XN w wielowarstwie DPPC. Prawdopodobnie następuje osłabienie oddziaływań van der Waalsa między pierścieniami cząsteczek XN. Z drugiej strony wiadomo, że grupy metylenowe w prenylowej jednostce XN wykazują możliwość obrotu względem aromatycznego pierścienia A [47]. Ten fragment cząsteczki XN może być zlokalizowany w polarno-apolarnym rejonie wielowarstw DPPC. Przesuniecie spektralne pasma przy 1440 cm⁻¹ w kierunku wiekszych liczb falowych w przypadku 50 %mol XN w DPPC podtrzymuje koncepcję lokalizacji chalkonu w membranie na granicy polarnoapolarnej, ponieważ pasmo to świadczy o drganiach grupy C=O w cząsteczce XN jak i drgania deformacyjne N⁺(CH₃)₃ reszty cholinowej lipidu. Stopniowe przesunięcie pasma przy 1346 cm⁻¹ reprezentującego drgania deformacyjne C-OH w XN w kierunku niskich częstości, sugeruje zaangażowanie grup hydroksylowych chalkonu w wiązanie poprzez wiązanie wodorowe z błoną lipidową.



Rys. 6. Widma ATR-FTIR XN rozpuszczonego w metanolu (A) mieszane wielowarstwy uformowane z DPPC i XN w stężeniu od 1 %mol do 50 %mol (B) w formie suchych filmów usadzonego na powierzchni kryształu ZnSe. Rysunek opublikowano w [H3].

Oddziaływanie między XN a regionem polarnym DPPC było monitorowane poprzez zmiany w paśmie przy 1246 cm⁻¹ odpowiadającym drganiom rozciągającym PO₂⁻. Po wykonaniu widm różnicowych mogłam wyodrębnić pasmo przy ok. 1260 cm⁻¹, które jak związane przypuszczam jest z tworzeniem kompleksu między XN a DPPC. Taka struktura, niezwiązana z krystaliczną postacią XN była widoczna również w badaniach dyfrakcyjnych jako refleks przy ok. $2\theta = 2,3^{\circ}$ [48]. Aby uzyskać lepszy wgląd w molekularną interakcję między cząsteczkami XN i DPPC, porównałam otrzymane widma z widmami FTIR chalkonu wykonane środowisku polarnym (metanol) w

i niepolarnym (CCl₄). W efekcie pasmom w widmie różnicowym mogłam przyporządkować określone drgania grup funkcyjnych XN wchodzących w relacje poprzez wiązania wodorowe bądź organizujące się w hydrofobowej części modelowej membrany. W rejonie przynależącym do drgań antysymetrycznym i symetrycznym CH₂, które powszechnie są stosowane do monitorowania stanu uporządkowania i zaburzeń układu lipidowego, a w konsekwencji do obserwowania przejść fazowych, nie zaobserwowałam istotnych zmian. Analizując zmiany spektralne dla rejony grupy fosforanowej

DPPC w funkcji temperatury, odnotowałam przesunięcie tego pasma w kierunku mniejszych liczb falowych, co wskazuje na silne oddziaływanie przez wiązania wodorowe pomiędzy grupą fosforanową i grupami –OH od XN w rejonie przedprzejścia fazowego. Po analizie zmian położenia maksimum absorbcji dla grupy karbonylowej C=O (1738 cm⁻¹) XN prawdopodobnie bardziej selektywnie oddziałuje z grupami PO₂⁻. W temperaturze głównego przejścia fazowego zaobserwowano przesunięcia tych pasm w stronę wyższych częstości.

Analizując zmiany termotropowe na podstawie zmian grubości warstwy dwuwarstwy lipidowej i współczynników załamania stref hydrofilowej i hydrofobowej (n_1/n_2) lipidu w funkcji temperatury dla mieszaniny 1, 5, 10 i 20 %mol XN w DPPC obserwowano wyraźny wpływ XN na przedprzejście fazowe DPPC. Z uwagi na warunki w jakich wykonywano eksperyment ("suche filmy"), temperatury przejść fazowych w czystym lipidzie były przesunięte względem tych obserwowanych w uwodnionych filmach. Dodatkowo, w prezentowanej pracy wspólnie z dr hab. Danielem Kamińskim z Zakładu Krystalografii UMCS w Lublinie opracowaliśmy schemat przejść fazowych obserwowanych dla czystego DPPC przy udziale techniki w podczerwieni i dyfrakcji rentgenowskiej w zależności od RH i szybkości cyklu grzania wielowarstw DPPC. Grubość warstwy lipidowej w fazie żelowej z 1% XN była prawie taka sama jak dla czystego DPPC. Wraz ze wzrostem stężenia XN grubość warstwy lipidowej wyraźnie malała do wartości ~56 Å, tym zmianom towarzyszyły również zmiany refrakcji, poprzez obniżenie stosunku współczynników załamania stref lipidu n₁/n₂ w rejonie przedprzejścia fazowego. Świadczyć to mogło o przemieszczaniu się XN w obrębie hydrofilowej części lipidu w funkcji temperatury (**Rys. 7A**).



Rys. 7. Zmiany grubości dwuwarstwy lipidowej uformowanej z DPPC w zależności od stężenia XN i temperatury (A). Zmiana stosunku współczynników refrakcji strefy hydrofilowej i hydrofobowej (n_1/n_2) lipidu świadczy o przemieszczaniu się XN w obrębie fragmentu hydrofilowego dwuwarstwy lipidowej w funkcji temperatury (B). Rysunek opublikowano w [H3].

Reasumując, obecność XN obniża temperaturę głównego przejścia fazowego lipidu wraz ze wzrostem jego zawartości w wielowarstwie lipidowej. Poniżej temperatury przejścia fazowego cząsteczki XN gromadzą się w części polarnej lipidów, natomiast powyżej przejścia fazowego mogą tworzyć formy zagregowane i wytrącać się poza dwuwarstwę lipidową (Rys. 7B). Warto podkreślić, że pomimo dużej ilości prac odnoszących się do aktywności biologicznej XN, te badania były pierwszymi poruszającymi kwestię wpływu XN na własności membrany lipidowej.

Chociaż aktywność biologiczna ksantohumolu jest obecnie szeroko badana, a wiedza dotycząca jego metabolizmu i farmakokinetyki jest stale rozwijana, nie było informacji na temat właściwości kwasowo-zasadowych tego związku. Ograniczona biodostępność XN podawanego doustnie jest wynikiem słabej przyswajalności, szybkiego wydalania lub jego ekstensywnego metabolizmu. Wiązanie XN z białkami błonowymi poprzez miejsca elektrofilowe, np. α , β - nienasyconą grupą karbonylową, również silnie wpływa na jego dystrybucję. Mechanizm kowalencyjnego wiązania XN z określonymi białkami może być odpowiedzialny za jego aktywność biologiczną, a szczególnie działanie antynowotworowe. Równowagi kwasowo-zasadowe związków biologicznie czynnych odgrywają kluczową rolę w przewidywaniu wzajemnych stosunków ilościowych form o różnym stopniu protonowania w płynach fizjologicznych o określonych wartościach pH. Zależności te, ściśle wiążą się z możliwością transportu przez błony biologiczne, ponieważ relacje pomiędzy stałymi dysocjacji, a stężeniem związku związanego z białkami osocza, są ważnym czynnikiem wpływającym na jego dystrybucję, metabolizm oraz wydalanie [49]. Błona komórkowa ze względu na swoją strukturę lipidowo-białkową jest lepiej przepuszczalna dla niezdysocjowanych cząsteczek niż dla jonów, wobec tego dyfuzja związków aktywnych przez membranę jest funkcją ich wartości p K_a [50]. W tym kontekście, przewidywanie biodostępność cząsteczki podatnej na jonizację, a także jej specyficzność interakcji z enzymami, zależy w dużej mierze od właściwości kwasowo-zasadowych. Z naszkicowanym powyżej problemem zmierzyłam się w publikacji, która została opublikowana na łamach czasopisma Journal of Natural Products w 2017 roku [H4]. Pragnę nadmienić, że obliczone stałe dysocjacji są według obecnego stanu wiedzy pierwszymi tego rodzaju wynikami, a wiedza ta jest niezbędna w kontekście interakcji ksantohumolu z błonami biologicznymi. W pracy przeprowadziłam analize parametrów fizykochemicznych, która pozwoliła mi na ocenę kwasowości grup hydroksylowych ksantohumolu uczestniczących w procesie dysocjacji. Z wykorzystaniem metod analitycznych (spektroskopia UV-Vis, miareczkowanie potencjometryczne) oraz obliczeniowych metod kwantowych (TD DFT) zaproponowałam schemat dysocjacji i wyznaczyłam stałe dysocjacji pK_a ksantohumolu. W strukturze cząsteczki XN występują trzy podatne na jonizację grupy hydroksylowe umieszczone w pozycji C-2', C-4', i C-4 (Rys. 5), które mogą przechodzić reakcje deprotonowania do tworzenia monoanionu, dianionu, i trianionu. Sekwencja w jakiej dysocjują protony grup hydroksyfenolowych wg wykonanych obliczeń teoretycznych była następująca: 2'–OH> 4'–OH> 4–OH, która również pokazała dobrą zgodność z pomiarami eksperymentalnymi. Na podstawie przeprowadzonych analiz wnioskowałam, że obojętna forma XN jest najtrwalsza, podczas, gdy najmniej stabilną strukturą jest forma trianionowa. Ksantohumol jest słabym kwasem z pierwszą wartością pK1 = 7,4, (pozostałe wartości pK₂ = 8,5 oraz pK₃ = 9,0), co oznacza, że w osoczu 2'- monoanion jest w równowadze z obojętną postacią XN (w stosunku 1:1). Jego maksymalna aktywność błonowa występuje przy pH niższych niż pK₁ z powodu trudniejszej dyfuzji przez błony plazmatyczne jego ujemnie naładowanej formy niż w postaci neutralnej. Ostatnio zasugerowano, że mitochondria są głównym celem komórkowym działania XN [51]. Związek ten może działać jako rozprzęgacz mitochondrialny prowadzący do znoszenia potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej [52]. Wiadomo, że chalkony, w szczególności hydroksychalkony są skutecznym induktorem apoptozy. Zasugerowano, że

grupa 2'–OH (która jako pierwsza ulega dysocjacji) jest niezbędna do reaktywności chalkonu [53], a jej obecność w cząsteczce XN może być kluczowa dla interakcji z mitochondrialnym łańcuchem transferu elektronów I (dehydrogenaza NADH). XN bezpośrednio hamuje aktywność kompleksu I i powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS) odpowiedzialnych za apoptozę w komórkach nowotworowych HeLa i A549 [51].

W celu poparcia wyników eksperymentalnych i oszacowania energii różnych zjonizowanych form XN, wykonałam wspólnie z dr hab. Danielem Kamińskim z Zakładu Krystalografii UMCS w Lublinie analizę obliczeń kwantowych w programie Gaussian 09 w ramach zależnej od czasu metody funkcjonału gęstości, TD-DFT, używając funkcjonałów B3LYP i CAM-B3LYP. Chalkony mogą przyjmować konfigurację typu *trans* lub *cis* [54]. Najbardziej stabilną postacią jest izomer *trans* ze względu na silne efekty steryczne między pierścieniem B i grupą karbonylową [55]. Dodatkowo, po optymalizacji geometrycznej struktury w fazie gazowej i w środowisku wodnym wnioskowałam, że *jednostka prenylowa i pierścień B nie leżą w płaszczyźnie z pierścieniem A, ale mogą przyjmować dwie konformacje: powyżej i poniżej pierścienia A.*

Wyniki przestawione w pracy [H5] stanowią kontynuację powyższych badań i dotyczą analizy efektów solwatochromowych XN w rozpuszczalnikach o zmiennej polarności. Na podstawie pomiarów widm absorpcji i emisji XN zaobserwowałam, że ze wzrostem polarności rozpuszczalnika występował efekt batochromowy, czyli przesunięcie widm absorpcji i emisji ku czerwieni. Przy zastosowaniu skali polarności Δf opartej na równaniu Lipperta i Matagi wyznaczyłam zmianę momentu dipolowego w stanie wzbudzonym. Duża różnica pomiędzy momentem dipolowym stanów wzbud zonego i podstawowego ($\Delta \mu$ = 5,8 D) mogła być spowodowana przez redystrybucję ładunków atomowych w stanie wzbudzonym, co może następować dzięki wewnątrzcząsteczkowemu przesunięcie ładunku w obrębie cząsteczki XN. Przedstawione efekty spektroskopowe wraz wyliczeniem molowych współczynników ekstynkcji XN w wybranych rozpuszczalnikach mogą dostarczyć wskazówek do opracowania efektywnych metod izolacji ksantohumolu z surowca naturalnego. Jednocześnie będą stanowić cenną bazę dla badaczy przy wyborze odpowiedniego rozpuszczalnika do przeprowadzania wydajnej procedury oczyszczania tego związku.

Podsumowując, określenie przeze mnie podstawowych parametrów fizykochemicznych ksantohumolu jest pierwszym krokiem w kierunku wyjaśnienia zależności między jego strukturą a aktywnością biologiczną. W związku z rosnącym zainteresowaniem fitoterapią, wielokierunkowe działanie XN pozwala prognozować, że w najbliższych latach związek ten może stanowić uzupełnienie, a nawet alternatywę dla leczenia chemioterapeutycznego.

Alkohole cukrowe

Alkohole cukrowe (poliole) zwane także uwodornionymi węglowodanami mają niską masę cząsteczkową i w przeciwieństwie do opisanych powyżej związków charakteryzują się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Występują naturalnie w małych ilościach w różnych rodzajach owoców, warzyw i grzybów, ale w większości muszą być wytwarzane w drodze katalitycznego uwodornienia cukrów lub poprzez zastosowanie technik mikrobiologicznych [56, 57]. Wśród polioli D-sorbitol, D - mannitol, ksylitol i erytrytol są szeroko stosowane jako substancje słodzące oraz stabilizujące w produktach spożywczych, farmaceutykach i suplementach diety. Stosowane jako substraty w syntezie związków aktywnych biologicznie mają na celu poprawę specyficzności leków oraz ograniczyć ich niepożądaną cytotoksyczność wobec innych komórek organizmu. Poliole wykorzystane są również do opracowania systemów dostarczania genów terapeutycznych oraz przeciwciał monoklonalnych [58].

Z uwagi na obecność wielu grup hydroksylowych w cząsteczce substancje te mogą pełnić rolę solubilizatorów dla substancji leczniczych o charakterze lipofilowym. Kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej alkoholi cukrowych ma struktura molekularna [59]. Rozmiar i symetria cząsteczki alkoholu cukrowego oraz liczba grup hydroksylowych obecnych w cząsteczce mają odzwierciedlenie w rodzaju interakcji ze składnikami błon komórkowych [60, 61]. Wpływają korzystnie na stabilizację błon i białka komórkowe, nie zakłócając jednocześnie centralnego metabolizmu komórki [62]. Pomimo, że zrozumieniu działania prewencyjnego alkoholi cukrowych na błony komórkowe w ekstremalnych warunkach termicznych i mechanicznych w literaturze naukowej poświęcono wiele uwagi to szczegółowe molekularne mechanizmy tych efektów nie są w pełni wyjaśnione.

W pracy [H6] badałam wpływ wybranych alkoholi cukrowych (D-mannitol, ksylitol i erytrytol; **Rys. 8**) na własności dynamiczne modelowych błon lipidowych w postaci wielowarstwowych liposomów (MLV) oraz monowarstw uformowanych z 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfatydylocholiny (DMPC).





Wzajemne oddziaływania pomiędzy DMPC a wybranymi alkoholami cukrowymi zostały analizowane w funkcji stężenia polioli oraz ilości grup hydroksylowych w ich łańcuchu węglowym za pomocą klasycznej różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC, spektroskopii ATR-FTIR oraz techniki monowarstw Langmuira w powiązaniu z mikroskopią kąta Brewstera.

Wyniki badań kalorymetrycznych wykazały niewielkie obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego lipidów (T_m) z fazy żelu w fazę ciekłokrystaliczną jedynie dla D-mannitolu, natomiast dla pozostałych polioli praktycznie nie stwierdzono zmian. W większym stopniu natomiast związki te wpływały na stopniową zmianę temperatury przedprzejścia lipidu, likwidując je przy większej ich zawartości i nieznacznie obniżając temperaturę przy domieszkowaniu liposomów mannitolem. Brak wyraźnego wpływu polioli na temperaturę głównego przejścia fazowego dowodzi, że nie zmieniają one struktury i organizacji dwuwarstwy lipidowej, czyli nie wnikają do obszaru hydrofobowego membrany. Zmiany temperatury przedprzejścia i poszerzenie głównego piku przejścia fazowego świadczą o lokalizacji tych związków tylko na powierzchni błon w jej polarnej części skutkując rozluźnieniem jej struktury.

W celu zweryfikowania wyników uzyskanych techniką DSC przeprowadzono analogiczne eksperymenty w funkcji temperatury dla uwodnionych filmów uformowanych z DMPC przy użyciu spektroskopii w podczerwieni. Analizie poddano zmiany widmowe na poziomie łańcuchów acylowych (3000–2800 cm⁻¹), grupy fosforanowej (1228–1240 cm⁻¹) i cholinowej (970 cm⁻¹). Zgodnie z przypuszczeniami, alkohole cukrowe nie powodowały zmian w części hydrofobowej błon liposomów w zakresie częstości odpowiadającej drganiom grup CH₂ i CH₃ łańcuchów węglowodorowych lipidu. Z kolei brak zmian spektralnych w rejonie drgań charakterystycznych dla reszty cholinowej $-N^+(CH_3)_3$ można było wytłumaczyć silnym oddziaływaniem grupy cholinowej oraz dipoli cząsteczek wody. Ta interakcja jest znacznie silniejsza niż obserwowana pomiedzy poliolem a resztą cholinową. W części widma odpowiadającej asymetrycznym drganiom rozciągającym grup fosforanowych zaobserwowano przesunięcia pasma ~1230 cm⁻¹ w kierunku większych liczb falowych. Przesunięcie spektralne było najbardziej widoczne w przypadku erytrytolu, podczas gdy prawie nie obserwowano zmian dla mannitolu. Wyniki te wskazują na prawdopodobieństwo *wiązania się cząsteczek polioli z główkami polarnymi lipidów, ograniczające ich ruchliwość poprzez redukcję cząsteczek wody w regionie polarnym błony*. Rezultat ten wskazuje na tworzenie wiązań wodorowych między grupą fosforanową i grupami –OH polioli. *Efekt ten jest uzależniony od ilości grup hydroksylowych w łańcuchu węglowym alkoholi cukrowych i silniejszy dla krótko-łańcuchowych polioli* [63]. Obserwacja ta była potwierdzona badaniami teoretycznymi dotyczącymi glikolu i glicerolu, na podstawie których zasugerowano, że długość łańcucha poliolowego jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za penetrację monowarstw lipidowych przez te związki [64].

W kolejnym etapie wykonanych doświadczeń analizowałam jaki wpływ miała obecność alkoholi cukrowych w subfazie na przebieg rejestrowanych izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę podczas kompresji filmów DMPC. Wszystkie izotermy wykazały słabe przesunięcie w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych. Efekt ten powiązałam ze wzrostem średnich odległości międzycząsteczkowymi na granicy międzyfazowej, który korelował z długością łańcucha poliolowego badanych związków. Możliwą interpretacją takich przesunięć jest fakt, że związki te mogą przyczyniać się do formowania bardziej płynnych filmów lipidowych. Odpowiadało to wcześniejszym badaniom dotyczących roztworów glicerolu [61]. Podobne zachowanie zaobserwowano też dla monowarstwy DPPC z innymi związkami wielowodorotlenowymi w subfazie [46]. Wyjaśnieniem tego zjawiska jest zwiększenie rozmiaru powłoki solwatacyjnej po inkorporacji cząsteczek polioli do filmu lipidowego. Ponadto inne badania dotyczące węglowodanów wykazały, że ich obecność w subfazie prowadzi do tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych w molekułach lipidów [63]. Postulowano, że węglowodany mogą wiązać się z otoczką hydratacyjną fosfolipidu, zamiast konkurować lub zastąpić cząsteczki wody w polarnym regionie poprzez tworzenie wiązań wodorowych [65].

Aby lepiej zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za różnice obserwowane w przebiegu izoterm sprężania zarejestrowanych na różnych subfazach przeprowadziłam analizę grubości i morfologii monowarstw DMPC podczas procesu sprężania za pomocą mikroskopii kąta Brewstera (Rys. 9A). Wartość grubości filmu lipidowego w obszarze o wysokiej gęstości upakowania była wyższa niż oczekiwana dla czystego DMPC. Podobny efekt zarejestrowałam dla monowarstwy DMPC utworzonej na granicy roztwór mannitolu - powietrze. Według doniesień literaturowych podczas sprężania monowarstwy DMPC do ciśnienia kolapsu może dochodzić do tworzenia wielowarstw na granicy faz woda-powietrze [66], co było obserwowane w moim doświadczeniu. Jest to dodatkowo uzasadnione brakiem jednorodności na zdjęciach BAM rejestrowanych dla monowarstw DMPC, kiedy subfazę stanowiła woda. Obserwowane były tylko niewielkie jasne domeny fazy skondensowanej, a ich liczba i rozmiary były stałe w trakcie dalszego sprężania aż do punktu załamania monowarstwy. W pobliżu ciśnienia kolapsu, optyczny kontrast rejestrowanych zdjęć BAM stopniowo zmniejszał się, co wskazywało na stosunkowo szybką reorganizację cząsteczek lipido wych na powierzchni. Jest to zgodne z obserwowanym wcześniej wzrostem grubości pojedynczej warstwy i może być wyjaśnione przez początkowy proces tworzenia dwuwarstwy DMPC (Rys. 9B). Z kolei przy kompresji monowarstw DMPC, kiedy subfazę stanowiły roztwory wodne polioli, zdjęcia BAM były prawie jednorodne w szerokim zakresie ciśnień powierzchniowych. Dla kontrastu, dla monowarstw sprężanych na subfazie zawierającej roztwory wodne erytrytolu lub ksylitolu grubość monowarstwy lipidowej była bliska oczekiwanej wartości (~2,3 nm [67]), co sugeruje, że krótkołańcuchowe poliole ograniczają

możliwości spontanicznego tworzenie się dwuwarstw DMPC, stabilizując tym samym membranę lipidową.

Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty mają znaczenie poznawcze, ale mogą mieć także implikacje praktyczne. Ponieważ subfazy zawierające roztwory alkoholi cukrowych można wykorzystać do stabilizacji monowarstw uformowanych z lipidów posiadających krótsze niż 16-węglowe łańcuchy acylowe (jak w przypadku DMPC). Taki stabilizujący efekt wszystkich badanych polioli był w szerokim przedziale ciśnień powierzchniowych. Wyniki te sugerują, że oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami alkoholi cukrowych i lipidów poprzez wiązania wodorowe jest zasadniczym elementem mechanizmu stabilizacji dwuwarstw lipidowych. Ponadto wiązanie wodorowe między cząsteczkami alkoholi cukrowych i cząsteczkami wody otaczającymi główki polarne lipidu pomaga utrzymać warstwę hydratacyjną na dwuwarstwach lipidowych. Z drugiej strony istnienie stabilnych dwuwarstw lipidowych powyżej ciśnienia kolapsu, jak w przypadku D-mannitolu w subfazie niesie ze sobą inne interesujące możliwości. Dwuwarstwa uformowana na granicy faz woda–powietrze pojawia się jako nowy układ modelowy, który przybliża nas coraz bardziej do rzeczywistych błon komórkowych.



Rys. 9. Grubość monowarstwy uformowanej z DMPC stosując jako subfazę wodę i wodne roztwory alkoholi cukrowych w stężeniu 10 mmol/L w funkcji ciśnienia powierzchniowego (A). Zdjęcia z mikroskopu BAM wykonane podczas kompresji monowarstwy DMPC kiedy subfazę stanowiła woda (górny rząd) i wodny roztwór erytrytolu (dolny rząd). Rysunek opublikowano w [H6].

4.4. Podsumowanie

Przeprowadzone eksperymenty oraz wyniki uzyskane podczas realizacji badań opisanych w cyklu sześciu prac pozwoliły na wskazanie szeregu najważniejszych osiągnięć naukowych stanowiących przedmiot habilitacji, do których zaliczam:

- Wykazanie, że proces wbudowania antybiotyku amfoterycyny B do monowarstwy lipidowosterolowej jest wynikiem zróżnicowanego stopnia uporządkowania łańcuchów acylowych. W wyniku oddziaływania AmB z błoną lipidowo-cholesterolową stanowiącą model komórki zwierzęcej cząsteczki antybiotyku organizują się głównie w jej hydrofilowej części. W obecności cholesterolu w monowarstwie lipidowej molekuły AmB tworzą większe struktury zagregowane [H1].
- Wykazanie, że obecność ergosterolu w membranie lipidowej powoduje usytuowanie się cząsteczek antybiotyku w położeniu wertykalnym w obrębie węglowodorowego rdzenia

monowarstwy. Prostopadła orientacja pierścienia laktonowego antybiotyku jest niezbędna do odpowiedniej organizacji molekularnej cząsteczek AmB w formowaniu struktur transmembranowych [H1].

- Wykazanie, że inkorporacja antybiotyku amfoterycyny B do mieszanego filmu naśladującego zewnętrzną błonę erytrocytu ludzkiego jest termodynamicznie mniej korzystna niż kompleksu AmB–Cu²⁺a otrzymane mieszane monowarstwy są mniej stabilne [H2].
- Wskazanie, że ograniczona mieszalność AmB ze składnikami lipidowymi imitującymi błonę erytrocytarną może tłumaczyć toksyczność antybiotyku wobec komórek ludzkiego gospodarza [H2].
- Analiza obrazów uzyskanych za pomocą mikroskopii kąta Brewstera wskazuje na wytrącenia AmB w formie trójwymiarowych struktur z mieszanych filmów bogatych w antybiotyk. W modelowych układach lipidowych AmB tworzy struktury zagregowane, poprzez silne wzajemne oddziaływanie chromoforowe, których struktura jest podobna jak w krysztale [H2].
- Wykazanie, że obecność ksantohumolu obniża temperaturę głównego przejścia fazowego lipidu wraz ze wzrostem jego zawartości w wielowarstwie lipidowej. Poniżej temperatury przedprzejścia fazowego cząsteczki XN gromadzą się w części polarnej lipidów. W rejonie przedprzejścia fazowego, XN przemieszcza się w rejon polarno-niepolarny cząsteczek fosfolipidu, natomiast powyżej przedprzejścia fazowego molekuły XN mogą tworzyć formy zagregowane i wytrącać się poza dwuwarstwę lipidową [H3].
- Wykazanie, że XN wiąże się z częścią polarną modelowej membrany lipidowej poprzez wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonylowymi i grupą fosforanową DPPC a grupami hydroksylowymi cząsteczki chalkonu [H3].
- Wykazanie, że ksantohumol jest słabym kwasem z pierwszą wartością pK1 = 7,4, (pozostałe wartości pK2 = 8,5 oraz pK3 = 9,0), co oznacza, że w osoczu 2'-monoanion jest w równowadze z obojętną postacią XN (w stosunku 1:1). Sekwencja w jakiej dysocjują protony grup hydroksyfenolowych wg wykonanych obliczeń teoretycznych jest następująca: 2'-OH> 4'-OH> 4-OH [H4].
- Wykazanie na podstawie optymalizacji geometrii struktury XN w fazie gazowej i w środowisku wodnym, że jednostka prenylowa i pierścień B w cząsteczce chalkonu nie leżą w płaszczyźnie z pierścieniem A, ale mogą przyjmować dwie konformacje: powyżej i poniżej pierścienia A [H4].
- Wykazanie, że ze wzrostem polarności rozpuszczalnika następuje przesunięcie widm absorpcji i emisji XN w kierunku większych długości fali. Duża różnica pomiędzy momentem dipolowym stanów wzbudzonego i podstawowego XN jest spowodowana redystrybucją ładunków atomowych w stanie wzbudzonym, co może następować dzięki wewnątrzcząsteczkowemu przesunięcie ładunku w obrębie cząsteczki XN [H5].
- Wykazanie, że cząsteczki polioli oddziałują z główkami polarnymi lipidów, ograniczające ich ruchliwość poprzez redukcję cząsteczek wody w regionie polarnym błony. Tworzenie wiązań wodorowych między grupą fosforanową lipidu a grupami –OH polioli jest uzależnione od ilości grup hydroksylowych w łańcuchu węglowym alkoholi cukrowych i silniejsze dla krótkołańcuchowych polioli [H6].
- Pokazanie, że krótkołańcuchowe poliole (ksylitol, erytrytol) ograniczają możliwości spontanicznego tworzenie się dwuwarstw DMPC powyżej ciśnienia kolapsu, stabilizując tym samym membranę lipidową [H6].

4.5. Spis cytowanej literatury (z wyłączeniem prac stanowiących cykl prac habilitacyjnych)

- [1] C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar, *Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery*, Mol Pharm, 6 (2009) 1264-1276.
- [2] P. Dynarowicz-Łątka, A. Dhanabalan, O.N. Oliveira, Jr., *Modern physicochemical research on Langmuir monolayers*, Adv Colloid Interface Sci, 91 (2001) 221-293.
- [3] R. Maget-Dana, *The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes*, Biochim Biophys Acta, 1462 (1999) 109-140.
- [4] H. Brockman, *Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?*, Curr Opin Struct Biol, 9 (1999) 438-443.
- [5] M. Eeman, M. Deleu, From biological membranes to biomimetic model membranes, Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 14 (2010) 719-736.
- [6] V.M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Structure and phase transitions in Langmuir monolayers*, Rev. Mod. Phys., 71 (1999) 779-819.
- [7] E. Gorter, F. Grendel, On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood, J Exp Med, 41 (1925) 439-443.
- [8] C.G. Siontorou, G.P. Nikoleli, D.P. Nikolelis, S.K. Karapetis, *Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future*, Membranes, 7 (2017) 1-24.
- [9] G. Brezesinski, H. Mohwald, *Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces*, Adv Colloid Interface Sci, 100-102 (2003) 563-584.
- [10] S. Hartsel, J. Bolard, Amphotericin B: new life for an old drug, Trends Pharmacol Sci, 17 (1996) 445-449.
- [11] D. Ellis, *Amphotericin B: spectrum and resistance*, J Antimicrob Chemother, 49 Suppl 1 (2002) 7-10.
- [12] B. de Kruijff, R.A. Demel, Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of Acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes, Biochim Biophys Acta, 339 (1974) 57-70.
- [13] J. Czub, M. Bagiński, *Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol*, Biophys J, 90 (2006) 2368-2382.
- [14] K.C. Gray, D.S. Palacios, I. Dailey, M.M. Endo, B.E. Uno, B.C. Wilcock, M.D. Burke, *Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol*, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012) 2234-2239.
- [15] D.M. Kamiński, G. Czernel, B. Murphy, B. Runge, O.M. Magnussen, M. Gagoś, Effect of cholesterol and ergosterol on the antibiotic amphotericin B interactions with dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers: X-ray reflectivity study, Biochim Biophys Acta, 1838 (2014) 2947-2953.
- [16] N. Matsumori, Y. Sawada, M. Murata, Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: sterol-dependent activity of conformation-restricted derivatives with an amino-carbonyl bridge, J Am Chem Soc, 127 (2005) 10667-10675.
- [17] M. Bagiński, H. Resat, E. Borowski, *Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels*, Biochim Biophys Acta, 1567 (2002) 63-78.
- [18] M. Bagiński, Cybulska, B., Gruszecki, W. I., Interaction of polyene macrolide antibiotics with lipid model membranes, in: A. Ottova-Liu (Ed.), Advances in planar lipid bilayers and liposomes, vol. 3, Elsevier Science Publ., Amsterdam, 2006, 269-329.
- [19] M. Gagoś, Hereć, M., Arczewska, M. Czernel, G. Dalla Serra, M. Gruszecki, W. I., Anomalously high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: implications for the biological action, Biophys Chem, 136 (2008) 44-49.
- [20] M. Gagoś, M. Arczewska, Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers, Biochim Biophys Acta, 1798 (2010) 2124-2130.
- [21] P. Millié, Langlet, J., Bergès, J., Caillet, J., Demaret, J.-Ph., *Self-Association of Amphotericin B in Water*. *Theoretical Energy and Spectroscopy Studies*, J Phys Chem B, 103 (1999) 10883–10891.
- [22] J. Zielińska, M. Wieczor, T. Baczek, M. Gruszecki, J. Czub, *Thermodynamics and kinetics of amphotericin B* self-association in aqueous solution characterized in molecular detail, Sci Rep, 6 (2016) 19109.
- [23] M. Gagoś, M. Arczewska, Influence of K⁺ and Na⁺ ions on the aggregation processes of antibiotic amphotericin B: electronic absorption and FTIR spectroscopic studies, J Phys Chem B, 115 (2011) 3185-3192.

- [24] M. Gagoś, R. Koper, W.I. Gruszecki, Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B, Biochim. Biophys. Acta, 1511 (2001) 90-98.
- [25] A. Neumann, J. Czub, M. Baginski, On the possibility of the amphotericin B-sterol complex formation in cholesterol- and ergosterol-containing lipid bilayers: a molecular dynamics study, J Phys Chem B, 113 (2009) 15875-15885.
- [26] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, Biochim Biophys Acta, 1286 (1996) 183-223.
- [27] M. Bagiński, Borowski, E., *Distribution of electrostatic potential around amphotericin B and its membrane targets*, Theochem. J. Mol. Struct., 389 (1997) 139–146.
- [28] P. Dynarowicz-Łątka, R. Seoane, J. Minones Jr., M. Velo, J. Minones, *Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 27 (2002) 249-263.
- [29] M. Gagoś, G. Czernel, D.M. Kamiński, K. Kostro, *Spectroscopic studies of amphotericin B-Cu*²⁺ complexes, Biometals, 24 (2011) 915-922.
- [30] B. Chudzik, I.B. Tracz, G. Czernel, M.J. Fiołka, G. Borsuk, M. Gagoś, Amphotericin B-copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against Candida albicans, Eur J Pharm Sci, 49 (2013) 850-857.
- [31] J. Gola, A. Skubis, B. Sikora, C. Kruszniewska-Rajs, J. Adamska, U. Mazurek, B. Strzalka-Mrozik, G. Czernel, M. Gagoś, Expression profiles of genes related to melatonin and oxidative stress in human renal proximal tubule cells treated with antibiotic amphotericin B and its modified forms, Turkish Journal of Biology 39 (2015) 856-864.
- [32] Y. Yawata, Cell membrane : the red blood cell as a model, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [33] P. Wydro, *The influence of cholesterol on multicomponent Langmuir monolayers imitating outer and inner leaflet of human erythrocyte membrane*, Colloids Surf B Biointerfaces, 103 (2013) 67-74.
- [34] N. Matsumori, Sawada, Y., Murata, M., Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: Sterol-dependent activity of conformation-restricted derivatives with an aminocarbonyl bridge, J Am Chem Soc, 127 (2005) 10667–10675.
- [35] J. Brajtburg, S. Elberg, D.R. Schwartz, A. Vertut-Croquin, D. Schlessinger, G.S. Kobayashi, G. Medoff, *Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B*, Antimicrob Agents Chemother, 27 (1985) 172-176.
- [36] K.N. Jarzembska, D. Kamiński, A.A. Hoser, M. Malińska, B. Senczyna, K. Woźniak, M. Gagoś, Controlled Crystallization, Structure, and Molecular Properties of Iodoacetylamphotericin B, Crystal Growth and Design, 12 (2012) 2336-2345
- [37] M. Gagoś, D. Kamiński, M. Arczewska, B. Krajnik, S. Maćkowski, *Spectroscopic evidence for self-organization* of *N-iodoacetylamphotericin B in crystalline and amorphous phases*, J Phys Chem B, 116 (2012) 12706-12713.
- [38] C.H. Jiang, T.L. Sun, D.X. Xiang, S.S. Wei, W.Q. Li, Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (Humulus lupulus L.), Front Pharmacol, 9 (2018) 530.
- [39] M. Liu, P.E. Hansen, G. Wang, L. Qiu, J. Dong, H. Yin, Z. Qian, M. Yang, J. Miao, *Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (Humulus lupulus)*, Molecules, 20 (2015) 754-779.
- [40] M. Arczewska, D.M. Kamiński, E. Gorecka, D. Pociecha, E. Rój, A. Slawińska-Brych, M. Gagoś, The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies, Biochim Biophys Acta, 1828 (2013) 213-222.
- [41] J.F. Stevens, J.E. Page, Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!, Phytochemistry, 65 (2004) 1317-1330.
- [42] A.K. Żołnierczyk, W.K. Mączka, M. Grabarczyk, K. Wińska, E. Woźniak, M. Aniol, *Isoxanthohumol-Biologically active hop flavonoid*, Fitoterapia, 103 (2015) 71-82.
- [43] D.M. Kamiński, K. Gawęda, M. Arczewska, B. Senczna, M. Gagoś, *A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol A role of water*, Jounal of Molecular Structure, 1139 (2017) 10-16.
- [44] A. Albini, R. Dell'Eva, R. Vene, N. Ferrari, D.R. Buhler, D.M. Noonan, G. Fassina, *Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets*, Faseb J, 20 (2006) 527-529.
- [45] O. Wesołowska, J. Gąsiorowska, J. Petrus, B. Czarnik-Matusewicz, K. Michalak, *Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes*, Biochim. Biophys. Acta, 1838 (2014) 173-184.
- [46] N. Tabata, M. Ito, H. Tomoda, S. Omura, *Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from Humulus lupulus*, Phytochemistry, 46 (1997) 683-687.

- [47] L.R. Chadwick, D. Nikolic, J.E. Burdette, C.R. Overk, J.L. Bolton, R.B. Van Breemen, R. Frohlich, H.H. Fong, N.R. Farnsworth, G.F. Pauli, *Estrogens and congeners from spent hops (Humulus lupulus)*, J. Nat. Prod., 67 (2004) 2024-2032.
- [48] X. Wang, P.J. Quinn, *The structure and phase behaviour of alpha-tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine*, Biochimie, 88 (2006) 1883-1888.
- [49] K.R. Kunz, B.S. Iyengar, R.T. Dorr, D.S. Alberts, W.A. Remers, *Structure-activity relationships for mitomycin C and mitomycin A analogues*, J. Med. Chem., 34 (1991) 2281-2286.
- [50] R.B. Van Breemen, Y. Yuan, S. Banuvar, L.P. Shulman, X. Qiu, R.F. Alvarenga, S.N. Chen, B.M. Dietz, J.L. Bolton, G.F. Pauli, E. Krause, M. Viana, D. Nikolic, *Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops*, Mol. Nutr. Food Res., 58 (2014) 1962-1969.
- [51] B. Zhang, W. Chu, P. Wei, Y. Liu, T. Wei, Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I, Free Radic. Biol. Med., 89 (2015) 486-497.
- [52] J.S. Kirkwood, L.L. Legette, C.L. Miranda, Y. Jiang, J.F. Stevens, *A metabolomics-driven elucidation of the anti-obesity mechanisms of xanthohumol*, J. Biol. Chem., 288 (2013) 19000-19013.
- [53] S. Amslinger, N. Al-Rifai, K. Winter, K. Wormann, R. Scholz, P. Baumeister, M. Wild, *Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay*, Org. Biomol. Chem., 11 (2013) 549-554.
- [54] G.R. Wang, Y.S. Xue, L. An, Y.G. Zheng, Y.Y. Dou, L. Zhang, Y. Liu, *Theoretical study on the structural and antioxidant properties of some recently synthesised 2,4,5-trimethoxy chalcones*, Food Chem, 171 (2015) 89-97.
- [55] Y.S. Xue, X.D. Gong, *The conformational, electronic and spectral properties of chalcones: A density functional theory study*, J Mol Struc-Theochem, 901 (2009) 226-231.
- [56] M. Grembecka, Sugar alcohols-their role in the modern world of sweeteners: a review, Eur. Food Res. Technol., 241 (2015) 1-14.
- [57] O. Akinterinwa, R. Khankal, P.C. Cirino, *Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols*, Curr Opin Biotechnol, 19 (2008) 461-467.
- [58] S. Ni, Y. Liu, Y. Tang, J. Chen, S. Li, J. Pu, L. Han, *GABAB receptor ligand-directed trimethyl chitosan/tripolyphosphate nanoparticles and their pMDI formulation for survivin siRNA pulmonary delivery*, Carbohydr Polym, 179 (2018) 135-144.
- [59] K.K. Makinen, Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review, Int J Dent, 2010 (2010) 981072.
- [60] S. Nakata, A. Deguchi, Y. Seki, M. Furuta, K. Fukuhara, S. Nishihara, K. Inoue, N. Kumazawa, S. Mashiko, S. Fujihira, M. Goto, M. Denda, *Characteristic responses of a phospholipid molecular layer to polyols*, Colloids Surf B Biointerfaces, 136 (2015) 594-599.
- [61] J.H. Crowe, M.A. Whittam, D. Chapman, L.M. Crowe, *Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates*, Biochim Biophys Acta, 769 (1984) 151-159.
- [62] R. Shaltiel-Karyo, M. Frenkel-Pinter, E. Rockenstein, C. Patrick, M. Levy-Sakin, A. Schiller, N. Egoz-Matia, E. Masliah, D. Segal, E. Gazit, A blood-brain barrier (BBB) disrupter is also a potent alpha-synuclein (alpha-syn) aggregation inhibitor: a novel dual mechanism of mannitol for the treatment of Parkinson disease (PD), J Biol Chem, 288 (2013) 17579-17588.
- [63] L. Pocivavsek, K. Gavrilov, K.D. Cao, E.Y. Chi, D. Li, B. Lin, M. Meron, J. Majewski, K.Y. Lee, *Glycerol-induced* membrane stiffening: the role of viscous fluid adlayers, Biophys J, 101 (2011) 118-127.
- [64] C.J. Malajczuk, Z.E. Hughes, R.L. Mancera, Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO, mono- and polyhydroxylated cryosolvents with a hydrated phospholipid bilayer, Biochim Biophys Acta, 1828 (2013) 2041-2055.
- [65] I.D. Bianco, G.D. Fidelio, B. Maggio, *Effect of glycerol on the molecular properties of cerebrosides, sulphatides and gangliosides in monolayers*, Biochem J, 251 (1988) 613-616.
- [66] J. Saccani, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, *A phospholipid bilayer supported under a polymerized Langmuir film*, Biophys J, 85 (2003) 3781-3787.
- [67] F. d'Acapito, I. Emelianov, A. Relini, P. Cavatorta, A. Gliozzi, V. Minicozzi, S. Morante, P.L. Solari, R. Rolandi, Total External Reflection X-ray Absorption Spectroscopy Reveals a Zinc Coordination Shell in Phospholipid Langmuir–Blodgett Films, Langmuir, 18 (2002) 5277–5282.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Moja aktywność naukowo-badawcza obejmuje okres 13 lat, w czasie którego zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta (2006 – 2010), a następnie adiunkta (od 2011 – do chwili obecnej) w Katedrze Fizyki Akademii Rolniczej w Lublinie (aktualnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie). Niemniej jednak swoją trwającą do dziś przygodę z nauką rozpoczęłam będąc jeszcze na studiach licencjackich a później magisterskich na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach w zespole naukowym prof. dr hab. Zofii Drzazgi z Zakładu Fizyki Medycznej.

Osiągnięcia naukowo-badawcze i aktywność publikacyjną nie związaną z tematyką prac stanowiących podstawę habilitacji omówię dzieląc czas mojej działalności na dwa etapy: przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Listę publikacji dotyczącą tej części autoreferatu przywoływanych jako [**A1** – **A5**] oraz [**B1** – **B10**] zamieściłam w p. 5.3.

5. 1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Tematyka mojej pracy magisterskiej dotyczyła badania termicznej stabilności roztworów heminy i hematyny przy zastosowaniu techniki mikrokalorymetrii skaningowej DSC w kontekście wykorzystania tych porfiryn w terapii fotodynamicznej do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych. Rezultaty badań uzyskane w trakcie jej realizacji zostały opublikowane w 2002 roku w formie pełnotekstowego artykułu naukowego z listy JCR, którego jestem współautorką [**A1**].

W czerwcu 2002 roku uzyskałam tytuł magistra fizyki, specjalność fizyka medyczna i rozpoczęłam Studia Doktoranckie na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii UŚ w Katowicach. W tym czasie zdobyłam niezbędny warsztat badawczy, które ukierunkował mnie w stronę zgłębiania wzajemnych relacji między strukturą a aktywnością biologiczną związków pochodzenia naturalnego. Z przyczyn osobistych po pierwszym roku studiów doktoranckich musiałam z nich zrezygnować. W tym czasie zostałam zatrudniona na stanowisku technicznym w charakterze: specjalista Fizyk w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Pomimo, że moja działalność naukowobadawcza została nieco ograniczona, w okresie dwóch lat pracy nawiązałam cenną współpracę naukową, m in. z prof. dr hab. Hanną Trębacz.

W lutym 2006 roku skorzystałam z propozycji zatrudnienia na stanowisku asystenta w Katedrze Fizyki UP w Lublinie. Niemal od razu nawiązałam współpracę naukową z prof. dr hab. Mariuszam Gagosiem (wtedy jeszcze doktorem), który umożliwił mi na dalsze rozwijanie pasji naukowych poprzez przyjęcie mnie do swojej grupy badawczej. W tym okresie moje zainteresowania naukowe skupiły się wokół wspomnianej w p. 4.3.3 amfoterycyny B (AmB) i aspektów związanych z poznaniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za aktywność biologiczną tego antybiotyku.

W ramach pracy doktorskiej podjęłam się określenia wpływu jonów Na⁺ i K⁺ na proces agregacji AmB w środowisku wodnym i lipidowym przy zastosowaniu metod elektronowej spektroskopii absorpcyjnej, spektroskopii fluorescencyjnej, techniki RLS, spektroskopii w podczerwieni FTIR i Ramana oraz techniki monowarstw Langmuira. Wyniki przeprowadzonych badań dały informację, że w/w jony oddziałują z AmB, tworząc kompleksy jonowe, których rola może stanowić ważny element wyjaśniający molekularne mechanizmy oddziaływania antybiotyku z błoną lipidową. Jednym z ważniejszych osiągnięć było po raz pierwszy przedstawienie wyraźnego wpływu jonów K⁺ na wzrost poziomu dimeryzacji i agregacji molekuł antybiotyku. Zastosowanie unikalnej techniki mikroskopii czasów życia fluorescencji FLIM umożliwiło potwierdzenie znaczącej roli dimerów AmB w procesie agregacji antybiotyku w błonie lipidowej zawierającej ergosterol. Wyniki te udało się uzyskać dzięki współpracy ze zespołem prof. dr hab. Wiesława I. Gruszeckiego oraz z dr Ignacym Gryczyńskim i dr Zygmuntem Gryczyńskim z Center for Commercialization of Fluorescence Technologies, Health Science Center, University of North Texas, Fort Worth, USA.

Większość przeprowadzonych wówczas badań była finansowana w ramach grantu badawczego "Znaczenie jonów metali, ziem alkalicznych i przejściowych w procesie agregacji amfoterycyny B w modelowych układach biologicznych" (N N401 015035, lata: 2008-2011), w którym byłam jednym z głównych wykonawców.

Rozprawę doktorską pt. "Spektroskopowe badania organizacji molekularnej antybiotyku polienowego amfoterycyny B w środowisku jonów K⁺ i Na⁺, przygotowywałam pod kierunkiem prof. M. Gagosia w okresie trzech lat mojej pracy w Katedrze Fizyki UP w Lublinie. Po publicznej obronie, która odbyła się 4 października 2010 roku uzyskałam stopień doktora nauk fizycznych nadany dnia 25 października 2010 roku uchwałą Rady Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Na wniosek recenzentów moja praca doktorska została wyróżniona.

Zebrane podczas realizacji pracy doktorskiej rezultaty badań zostały opublikowane w formie sześciu pełnotekstowych artykułów naukowych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu [**A2-A4**, w tym po doktoracie **B1**, **B2**, **B4**], a także były prezentowane w formie posterów na międzynarodowych konferencjach naukowych.

W toku realizacji zadań badawczych w ramach pracy doktorskiej nabrałam niezbędnego doświadczenia w planowaniu doświadczeń i analizie uzyskanych wyników, ale co najważniejsze miałam okazję poznać możliwości jakie daje technika monowarstw Langmuira. Efektem tego była publikacja, która ukazała się dwa miesiące przed uzyskaniem stopnia doktora na łamach czasopisma Biochimica Biophysica Acta w 2010 r. i zawierała kwestie, które nie były przeze mnie poruszane w rozprawie doktorskiej. W pracy tej podjęłam się określenia charakteru oddziaływań prowadzących do tworzenia przez cząsteczki AmB zagregowanych form w wielowarstwach lipidowych uformowanych z DPPC wykorzystując do tego wspomnianą technikę monowarstw Langmuira w połączeniu ze spektroskopią ATR-FTIR. Analiza widm ATR-FTIR monowarstw AmB w obszarze spektralnym 950 – 3520 cm⁻¹ umożliwiła przeprowadzenie analizy reorientacji cząsteczek wywołanych mechaniczną kompresją w przedziale ciśnień od 5 do 30 mN/m. Wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego zmieniał się sposób wzajemnego oddziaływania cząsteczek antybiotyku, co przejawiało się wzrostem intensywności pasm w obszarze reprezentującym drgania od wiązań sprzężonych w chromoforze oraz grup jonizowalnych cząsteczki AmB. Uzyskane wyniki dla czystej AmB próbowałam skorelować ze zmianami, jakie były obserwowane w wielowarstwie uformowanej z DPPC i modyfikowanej 5 % mol AmB. Wiedza ta znacznie ułatwiła interpretacje obserwowanych zmian w widmach FTIR. Najważniejszymi rezultatami wynikającymi z tej pracy było nakreślenie jako prawdopodobny mechanizm oddziaływania AmB z membraną lipidową dotyczy elektrostatycznego oddziaływania grup jonizowalnych pochodzących od AmB z grupą fosforanową i resztą cholinową cząsteczki DPPC. Elementy podobieństwa odpowiednich fragmentów widm FTIR dla czystej AmB w sprężonej monowarstwie oraz w wielowarstwie lipidowej pozwoliły mi wnioskować o analogicznym mechanizmie agregacyjnym antybiotyku w obu układach.

W tym czasie uczestniczyłam również w badaniach, które nie były związane z tematyką doktoratu a dotyczyły udziału w krystalizacji związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli [**A4**].

5. 2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, uwzględniający również prace stanowiące osiągnięcie naukowe zgłoszone do oceny w postępowaniu habilitacyjnym, obejmuje 17 artykułów pełnotekstowych z listy JCR, w tym 2 prace w monografii naukowej, 14 doniesień zjazdowych, 1 zgłoszenie patentowe. Łączny IF prac opublikowanych po doktoracie wynosi 42,049, co odpowiada 465 pkt MNiSW.

Badania w tematyce związanej z poznaniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za działanie amfoterycyny B były przeze mnie kontynuowane także po uzyskaniu tytułu doktora. Poza pracami [**B1**, **B2**, **B4**], które były bezpośrednio związane z wynikami uzyskanymi w ramach pracy doktorskiej lub włączonymi w cykl prac habilitacyjnych [**H1**-**H2**] i omówionymi już szczegółowo w p.4.3.3, uczestniczyłam w powstaniu dwóch pełnotekstowych publikacji z listy JCR dotyczących AmB [**B3**, **B6**].

W ramach prac [**B1**, **B2**] przeprowadziłam badania określające sposób oddziaływania AmB z jonami Na⁺ i K⁺ w oparciu o spektroskopię FTIR i Ramana. Uzyskane wyniki wskazywały na oddziaływanie jonowe pomiędzy grupą karboksylową cząsteczki AmB a w/w jonami pośredniczące za pomocą słabych par jonowych. W środowisku wodnym o zmiennej kwasowości zaobserwowałam większy wpływ jonów K⁺ na proces formowania agregatów chromoforowych przez molekuły antybiotyku [**B1**]. Największym osiągnięciem było pokazanie jaką rolę odgrywają jony Na⁺ i K⁺ na proces wbudowania się AmB do modelowych membran lipidowych [**B4**]. Zaproponowałam również mechanizm interakcji AmB w mieszanych monowarstwach lipidowych uformowanych z DPPC i określiłam stechiometrię powstałych kompleksów AmB-DPPC w środowisku jonów K⁺ i Na⁺.

Tematyka badawcza podjęta w pracy [**B3**] dotyczyła wykazania różnic w widmach FTIR i Ramana pomiędzy formą amorficzną a jej krystalicznym odpowiednikiem w postaci jodoacetylowej pochodnej amfoterycyny B (AmB-I). Otrzymanie takich informacji miało na celu potwierdzić, że dyskutowane przeze mnie pasmo przy ok. 1010 cm⁻¹ w widmach FTIR monowarstw i wielowarstw lipidowych modyfikowanych AmB [**A5**, **H1**] można łączyć z agregacją antybiotyku. Uzyskane wyniki potwierdziły moje przypuszczenia, ponieważ pasmo to było specyficzne dla formy krystalicznej w obu technikach spektroskopowych. Na podstawie tego doświadczenia można było wnioskować, że struktury zagregowane AmB obserwowane w środowisku modelowych błon lipidowych mają podobną strukturę jak w kryształach. Z tego wynika, że AmB może tworzyć struktury krystaliczne również w błonach komórkowych. Badania fluorescencyjne formy krystalicznej AmB wykonane we współpracy z grupą prof. dr hab. Sebastiana Maćkowskiego z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pozwoliły przypuszczać, że moment dipolowy układa się wzdłuż najdłuższej osi kryształu a nie wzdłuż chromoforu (najdłuższej osi cząsteczki AmB-I), jak to ma miejsce w przypadku innych polienów. Wynik ten wskazuje na silne oddziaływania między warstwami w tym kierunku dla kryształu AmB.

W kolejnej pracy [**B6**] brałam udział w pomiarach wielowarstw lipidowych z AmB z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej i spektroskopii FTIR. Pomiary te zostały wykonane we współpracy z prof. dr hab. Ewą Górecką i dr hab. Damianem Pociechą z Uniwersytetu Warszawskiego. Wynikiem tej pracy, w której analizowałam dane uzyskane ze spektroskopii FTIR było scharakteryzowanie powstawanie kompleksu AmB-DPPC w funkcji temperatury. Na podstawie danych dla układu AmB-DPPC określiłam również przemiany termotropowe dla wielowarstw lipidowych z AmB modyfikowanych cholesterolem i ergosterolem. Na podstawie danych dyfrakcyjnych można wnioskować, że wielowarstwy kompleksu zawierające ergosterol charakteryzowały się większą

grubością dwuwarstw od tych zawierających cholesterol. Badania te potwierdziły również większą trwałość kompleksów AmB-sterol-DPPC, niż samego kompleksu AmB-DPPC.

Wymienione powyżej prace, których byłam współautorem były częściowo finansowane z projektu badawczego NCN "Badania aktywności biologicznej antybiotyku amfoterycyny B kompleksowanego jonami miedzi (II) oraz modyfikowanego oksydacyjnie na układach modelowych błon lipidowych oraz in vitro" (UMO-2012/05/B/NZ1/00037) na lata 2013-2016.

W ramach tematyki związanej z AmB, na uwagę zasługuje również zgłoszenie patentowe (P-403105), którego jestem współtwórcą pt. "Kompleks amfoterycyny B, sposób otrzymywania kompleksu amfoterycyny B oraz zastosowanie kompleksu amfoterycyny B do wytwarzania leku". Przedmiotem wynalazku był trwały kompleks AmB-Cu²⁺ w roztworach wodnych o fizjologicznym stężeniu jonów wodorowych mający zastosowanie jako nowa mniej toksyczna postać klasycznie stosowanych farmaceutyków na bazie amfoterycyny B.

W dalszej kolejności moja uwaga skupiła się na badaniu związków pochodzenia naturalnego ekstrahowanych z materiału roślinnego. Dzięki współpracy z dr Magdaleną Bartnik z Katedry i Zakładu Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych UM w Lublinie powstała praca mojego współautorstwa a dotycząca określenia struktury peucedaniny, furanokumaryny o dużej aktywności antynowotworowej [**B5**].

W 2011 roku, razem z prof. M. Gagosiem nawiązaliśmy współpracę z prof. dr hab. Edwardem Rojem z Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach, której wynikiem było uzyskanie projektu badawczego wspomnianego w p. 4.3.3. Od tego momentu zaczęłam prowadzić systematyczne badania w zakresie tematyki związanej z wyjaśnieniem mechanizmów molekularnych aktywności biologicznej flawonoidu prenylowanego - ksantohumolu. Związek ten wzbudził moje zainteresowanie z powodu braku podstawowych informacji na temat jego właściwości fizykochemicznych pomimo, że jego wielokierunkowe działanie biologiczne było/jest szeroko eksplorowane przez badaczy na całym świecie. Część uzyskanych rezultatów z tego okresu była przedstawiona jako przedmiot rozprawy habilitacyjnej dlatego pominę ich omówienie w tym miejscu. Na uwagę zasługują doświadczenia opublikowane w pracy [B9], w których uczestniczyłam w badaniu stabilności XN w wodnych roztworach. Otrzymane wyniki dawały praktyczną informację odnośnie procesu cyklizacji XN do izomerycznej formy izoksantohumolu (IXN) w środowisku o mniejszej zasadowości niż wskazują wcześniejsze doniesienia. Izomeryzacja XN w formie trianionu do trianionowej formy IXN to dwuetapowa reakcja polegająca na zamknięciu pierścienia bez obecności cząsteczek wody, podczas gdy ukończony proces wymaga jej obecności. Z tego powodu w trakcie przygotowania formulacji substancji leczniczych lub suplementów diety zawierających XN należy ograniczyć zawartość wody, aby zmniejszyć obecność innych izomerów XN w produkcie końcowym.

W marcu 2015 roku zaczęła się moja współpraca z zespołem naukowym z Zakładu Biologii Komórki UMCS w Lublinie, który dysponuje profesjonalnym mikroskopem kąta Brewstera (BAM). Technika ta może dostarczyć dodatkowych możliwości w badaniu filmów lipidowych poprzez obrazowanie formowanych monowarstw *in situ*. Podczas tego okresu objęłam funkcję opiekuna naukowego nad pracami: magisterską i doktorską realizowanymi w/w Zakładzie i dotyczących właśnie analizy interakcji pomiędzy XN a składnikami modelowych membran lipidowych. Chociaż możliwości do tworzenia jednocząsteczkowych filmów z XN są ograniczone, jednak obecność nawet niewielkich ilości lipidu w monowarstwach tego chalkonu znacznie poprawiała ich stabilność, co pozwoliło prowadzić dalsze badania dla mieszanych filmów wieloskładnikowych imitujących błony komórek prawidłowych i patologicznych. Po zaobserwowaniu większej selektywności w oddziaływaniu XN z membranami naśladującymi błony komórek nowotworowych odczułem potrzebę sprawdzenia tych wyników na rzeczywistych układach biologicznych. W tym celu zostały wykonane badania cytotoksyczności XN wobec dwóch nowotworowych linii komórkowych: nowotworu prostaty PC-3 oraz nowotworu piersi T47D łączące metody biologiczne (testy MTT i NR, analiza cytometryczna) z techniką spektroskopii ATR-FTIR. Rezultaty tych doświadczeń stanowiły tematykę pracy doktorskiej, w której pełniłam funkcje promotora pomocniczego. Aktualnie trwają ostatnie korekty artykułu odnoszącego się do powyższych wyników, który będzie wysłany do czasopisma BBA *Biomembranes*.

Uczestniczę również w badaniach realizowanych wspólnie z dr hab. Ewą Janik z Zakładu Biologii Komórki UMCS w Lublinie, które mają na celu zwiększenia rozpuszczalności chlorofilu *a* w medium wodnym w wyniku tworzenia układów micelarnych z niejonowymi surfaktantami (publikacja w przygotowaniu).

Oprócz tematów dotyczących zagadnień organizacji molekularnej związków pochodzenia naturalnego brałam również udział w realizacji celów badawczych skoncentrowanych na materiale biologicznym [**B10**, **B11**]. W tych badaniach wykorzystałam znajomość technik spektroskopowych: spektroskopii fluorescencyjnej do określenia poziomu pentozydyny i innych końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) w tkance łącznej [**B10**] oraz techniki FTIR do oceny zmian strukturalnych w tkance kostnej [**B11**].

5. 3. Zestawienie prac dokumentujących pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze

Przed uzyskaniem stopnia doktora

- [A1] Drzazga Z., Michnik A., Zimnicka M., Differential scanning calorimetry study of haemin thermal stability, Therm. Anal. Calorim. 2003 72 (2) 555–563
- [A2] Gagoś M., Hereć M., Arczewska M., Czernel G., Dalla Serra M., Gruszecki W. I., Anomalously high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: Implications for the biological action, Biophys. Chemist. 2008 136 (1) 44-49
- [A3] Gruszecki W. I., Luchowski R., Gagoś M., Arczewska M., Sarkar P., Hereć M., Myśliwa-Kurdziel B., Strzałka K., Gryczyński I., Gryczyński Z., Molecular organization of antifungal antibiotic amphotericin B in lipid monolayers studied by means of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Biophys. Chemist. 2009 143 (1-2) 95-101
- [A4] Gagoś M., Arczewska M., Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers, Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes 2010 1798 (11) 2124-2130
- [A5] Kamiński D., Hoser A., Gagoś G., Matwijczuk A., Arczewska M., Niewiadomy A., Woźniak K., Solvatomorphism of 2-(4-Fluorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxybenzeno)-1,3,4-thiadiazole Chloride, Cryst. Growth Des. 2010 10 (8) 3480-3488

Po uzyskaniu stopnia doktora

- [B1] Gagoś M., Arczewska M., Influence of K⁺ and Na⁺ Ions on the Aggregation Processes of Antibiotic Amphotericin B: Electronic Absorption and FTIR Spectroscopic Studies, J. Phys. Chem. B 2011 115 (12) 3185–3192
- [B2] Gagoś M., Arczewska M., and Gruszecki W. I. Raman Spectroscopic Study of Aggregation Process of Antibiotic Amphotericin B Induced by H(+), Na(+), and K(+) Ions, J. Phys. Chem. B 2011 115 (17) 5032–5036
- [B3] Gagoś M., Kamiński D., Arczewska M., Krajnik B., Mackowski S., Spectroscopic evidence for selforganization of N-lodoacetylamphotericin B in crystalline and amorphous phases, J. Phys. Chem. B 2012 116 (42) 12706-12713
- [B4] Arczewska M., Gagoś M., Molecular organization of antibiotic amphotericin B in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers induced by K⁺ and Na⁺ ions: The Langmuir technique study, Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2012 1818 (2) 2706-2713

- [B5] Bartnik M., Arczewska M., Hoser A., Mroczek T., Kamiński D., Głowniak K., Gagoś M., Woźniak K., Single crystal X-ray diffraction, spectroscopic and mass spectrometric studies of furanocoumarin Peucedanin, Nat. Prod. Commun. 2014 9 (1) 71-74
- [B6] Kamiński D., Arczewska M., Pociecha D., Górecka E., Stępniewski A., Gagoś M., Antibiotic amphotericin B-DPPC lipid complex: X-ray diffraction and FTIR studies, J. Mol. Struct. 2015 1080 57-62
- [B9] Kamiński D., Gawęda K., Arczewska M., Senczyna B., Gagoś M., A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol A role of water, J. Mol. Struct. 2017 1139 10-16
- [B10] Trębacz H., Szczęsna A, Arczewska M., Thermal stability of collagen in naturally ageing and in vitro glycated rabbit tissues, J. Therm. Anal. Calorim. 2018 134 (3) 1903-1911
- [B11] Muszyński S., Tomaszewska E., Dobrowolski P., Kwiecień M., Wiącek D., Świetlicka I., Skibińska M., Szymańska-Chargot M., Orzelska M., Świetlicki M., Arczewska M., Szymanek M., Zhyla M., Hułas-Stasiak M., Rudyk H., Tomczyk-Warunek A., Analysis of bone osteometry, mineralization, mechanical and histomorphometrical properties of tibiotarsus in broiler chickens demonstrates a influence of dietary chickpea seeds (Cicer arietinum L.) inclusion as a primary protein source, PloS One 2018 13 (12) art. no. e0208921

5. 4. Plany przyszłych badań

Moje najbliższe plany badawcze zakładają rozwijanie możliwości jakie niesie technika monowarstw Langmuira i mikroskopia kąta Brewstera w kontekście badania interakcji między związkami biologicznie czynnymi a składnikami modelowych membran lipidowych. W szczególności chciałabym się skupić na przeprowadzeniu systematycznej analizy rodzaju oddziaływań wybranych polifenoli mających udokumentowane działanie antynowotworowe in vitro i in vivo ze składnikami membran lipidowych imitujących błony komórek patologicznych. Ponad to nowym nurtem badawczym z jakim chciałabym się zmierzyć w przyszłości jest poszukiwanie efektywnych metod ulepszających rozpuszczalność m. in. ksantohumolu i innych chalkonów o podobnej budowie strukturalnej (izobawachalkon, kardamonina) w mediach wodnych. Niestety, ich słaba rozpuszczalność, a w rezultacie ograniczona biodostępność stoją na przeszkodzie w opracowaniu skutecznych i stabilnych preparatów farmaceutycznych czy suplementów diety. Problematyka przyszłych badań będzie dotyczyć modyfikacji właściwości tych wybranych chalkonów poprzez utworzenie układów dwuskładnikowych formie kokryształów w z substancjami nietoksycznymi i akceptowalnymi farmaceutycznie (m. in. amidy kwasów nikotynowych, alkaloidy oraz alkohole cukrowe). Kierunkiem badań, który również planuję zrealizować w najbliższym czasie jest sprawdzenie potencjału przeciwnowotworowego takich zmodyfikowanych form chalkonów na szerokim panelu linii komórek nowotworowych z zastosowaniem dobrze mi znanych metod spektroskopowych.

6. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 22 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR
- 2 pełnotekstowe rozdziały w monografiach
- jedno zgłoszenie patentowe
- promotor pomocniczy pracy doktorskiej realizowanej w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie
- współwykonawca w trzech projektach naukowych, w tym raz jako główny wykonawca
- sumaryczny impact factor zgodny z rokiem opublikowania wynosi 56,818
- ogólna liczba punktów wg wykazu MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 579
- łączna liczba cytowań według bazy Scopus: 198, (bez autocytowań: 164)
- Indeks Hirscha według bazy Scopus/WoS: 9

Powyższe dane zostały odczytane na podstawie baz Scopus i Web of Science (stan z dnia 7 lutego 2019 roku). Cały dorobek naukowy szczegółowo został opisany w **załączniku nr 3**, natomiast jego podsumowanie przedstawia poniższa tabela.

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW*	IF*
Przed uzyskaniem stopnia doktora			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	5	114	14,769
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)		-	-
Rozdziały w monografiach	0	0	0
Łącznie publikacje:	5	114	14,769
Po uzyskaniu stopnia doktora		ALC: CONTRACTOR	Read Lines
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	17	465	42,049
W tym stanowiące osiągnięcia naukowe	6	170	16,604
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR) W tym stanowiące osiągnięcia naukowe	-	-	-
Rozdziały w monografiach W tym stanowiące osiagniecie naukowe	2	0	0
Łącznie publikacje:	17	465	42,049
Komunikaty konferencyjne	11.1039.03.15		
- przed uzyskaniem stopnia doktora	11		_
- po uzyskaniu stopnia doktora	14		
Łącznie komunikaty naukowe:	25		
RAZEM: (oryginalne prace naukowe oraz komunikaty konferencvine)	47	579	56,818

^{*}zgodnie z rokiem opublikowania

merte Moneuska

podpis

Załącznik 2a Autoreferat