Streszczenie

Lenzozyd Aβ (kwercetyna-3-O-[6-O-E-kofeilo)-β-D-glukopiranozylo(1→2)]-β-D galaktopiranozylo-7-O-β-D-glukuropiranozyd) jest pochodną kwercetyny i należy do flawonoidów, związków powszechnie występujących w roślinach. W ostatnim czasie flawonoidy stały się przedmiotem licznych badań ze względu na ich różne właściwości biologiczne i farmakologiczne. Badania *in vitro*, jak *in vivo* potwierdzają ich pozytywne działanie, zarówno na poziomie komórki jak i całego organizmu. Mają one m.in. działanie przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, antyalergiczne i inne. Szczególnie istotna jest ich aktywność przeciwnowotworowa. Jednym z miejsc oddziaływania flawonoidów jest błona komórkowa. Jednocześnie lenzozyd Aβ jest nowo wyizolowanym związkiem z nadziemnych części soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) odmiany *Tina,* a do tej pory jest bardzo mało danych literaturowych na temat metabolitów wyizolowanych z liści i łodyg tej rośliny.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie zdolności lenzozydu Aβ do wchodzenia w interakcje z błonami (zarówno z lipidami i białkami błonowymi), określenie sposobu oddziaływania tego związku na membrany, poznanie lokalizacji i orientacji flawonoidu w błonach oraz ocena skutków jego działania na komórki. Aby wyjaśnić sposób interakcji flawonoidu z błonami oraz potwierdzić wpływ tych oddziaływań na zdrowe i nowotworowo zmienione komórki, posłużono się różnorodnymi metodami badawczymi takimi jak: absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), jądrowy rezonans magnetyczny (^{1}H NMR), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), patch-clamp, transmisyjna i skaningowa mikroskopia elektronowa (TEM, SEM), mikroskopia świetlna, mikroskopia fluorescencyjna i cytometria przepływowa. W doświadczeniach zastosowano różne modele badawcze takie jak liposomy wielowarstwowe (MLV), wielkie jednowarstwowe liposomy (GUV) sporządzone z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz hodowle komórek *in vitro*: linie nowotworowe raka szyjki macicy (HeLa) i raka krtani (Hep-2) oraz linię prawidłową fibroblastów skóry człowieka (HSF).

W badaniach wykazano, że lenzozyd Aβ istotnie wpływa na modelowe błony sporządzone z DPPC. Wbudowuje się do liposomów i wiąże się z głowami polarnymi

lipidów za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniem C–O–P–O–C a grupami hydroksylowymi flawonoidu.

Ponadto, wyniki otrzymane technikami ^{1}H NMR i DSC ujawniły, że badany flawonoid działa usztywniająco na błony DPPC oraz powoduje zmianę ich właściwości fizycznych. Stwierdzono niewielkie obniżenie temperatury przejścia fazowego, zanik przedprzejścia fazowego oraz obniżenie entalpi kalorymetrycznej i kooperatywności przejścia. Zastosowanie techniki FLIM wykazało planarną orientację badanego związku w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy lipidowej. Z kolei dzięki technice patch-clamp udało się stwierdzić modulujące działanie flawonoidu w stosunku do białek transportowych. Lenzozyd Aβ zmieniał bowiem aktywność kanałów potasowych komórek fibroblastów skóry człowieka, co przejawiło się ich zwiększonym otwieraniem się.

Badania za pomocą techniki FTIR wykonane na komórkach z hodowli *in vitro* potwierdziły, że badany związek oddziałuje, na poziomie molekularnym, zarówno z białkami jak i lipidami tych komórek. Badany flawonoid wchodzi w interakcje z głowami cholinowymi fosfolipidów komórek HeLa i Hep-2 poprzez tworzenie wiązań wodorowych z grupami – PO_2^- oraz ugrupowaniem C-O-P-O-C głów polarnych. Lenzozyd Aβ wyraźnie wpływa także na profil spektralny białek z regionu amidu I, co przejawiło się zmianami ich struktury drugorzędowej oraz obniżeniem ich ilości. Odmiennie oddziałuje na komórki prawidłowe linii HSF indukując wytworzenie dodatkowych białek przez te komórki i powodując niewielkie działanie usztywniające frakcji lipidowej głów cholinowych.

Wyniki uzyskane, za pomocą testu czerwieni obojętnej oraz testu LIVE/DEAD ujawniły, zależne od linii komórkowej obniżenie żywotności komórek. Wykazano, że lenzozyd Aβ w niewielkim stopniu wpływa na przeżywalność komórek. Najsilniej działa na komórki raka szyjki macicy człowieka. Jego cytotoksyczne działanie, skorelowane jest, z indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych linii HeLa i Hep-2 zaś fibroblasty skóry człowieka nie są wrażliwe na działanie badanego flawonoidu.

Analizy komórek z użyciem techniki mikroskopii elektronowej transmisyjnej i skaningowej jak również mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej ujawniły skutki działania lenzozydu Aβ na komórki nowotworowe. Obserwowano zmiany ich kształtu, powierzchni, parametrów morfometrycznych i ultrastruktury. Komórki posiadały cechy charakterystyczne dla komórek apoptotycznych takie jak: obkurczenie komórek i jąder, redukcja lub utrata mikrokosmków, pofragmentowanie chromatyny, silna wakuolizacja cytoplazmy, obecność autolizosomów, obecność uwpukleń błony oraz pojawienie się

ciałek apoptotycznych. Jednocześnie lenzozyd Aβ nie zmienił morfologii oraz ultrastruktury fibroblastów skóry człowieka.

Ostatni etap badań obejmował określenie wpływu LAβ na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach. Badania wykazały dualistyczne działanie związku. Flawonoid indukował stres oksydacyjny w komórkach linii HeLa i Hep-2 i jednocześnie wykazał działanie antyutleniające w stosunku do komórek prawidłowych skóry człowieka.

Podsumowując, wyniki zawarte w rozprawie potwierdziły oddziaływanie lenzozydu Aβ na błony komórkowe. Flawonoid wchodząc w interakcje z białkami i lipidami komórek, w tym lipidami membran, zmienia ich dynamiczne i strukturalne właściwości. W efekcie, jako skutki oddziaływania flawonoidu, obserwuje się inną niż w kontrolnych komórkach nowotworowych, morfologię i ultrastrukturę, w większości, zgodną z fenotypem komórek apoptotycznych. Jednocześnie związek nie indukuje apoptozy w komórkach prawidłowych, nie wykazuje działania cytotoksycznego wobec nich i wzmaga w nich syntezę białek. Takie właściwości lenzozydu Aβ czynią go potencjalnym środkiem terapeutycznym, samodzielnym lub stosowanym w terapii skojarzonej.

Słowa kluczowe:

flawonoidy, liposomy, komórki nowotworowe, mikroskopia elektronowa, FTIR

Justyna Kapral-Piotrowska