

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

Wydział Chemii Instytut Nauk Chemicznych

mgr Alicja Sęk

Rola związków powierzchniowo czynnych w modyfikacji wybranych właściwości modelowych błon biologicznych

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Szcześ, prof. UMCS

Lublin 2022

Serdeczne podziękowania kieruję w stronę **Pani dr hab. Aleksandry Szcześ, prof. UMCS** za opiekę promotorską i wszelką pomoc okazaną w trakcie powstawania niniejszej rozprawy.

Dziękuję Wszystkim, z którymi miałam szansę współpracować, za pokazanie pięknego świata Nauki.

Dziękuję Rodzinie, w szczególności **Mężowi i Mamie**, za nieustanne wsparcie i niegasnącą wiarę we mnie. Praca powstała we współpracy z Zakładem Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego i Institute of Active Polymers, Helmholtz Hereon Center, Teltow (Germany).

SPIS TREŚCI

| STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA | 6 |
|-------------------------------|-------|
| | |
| | |

1. Wprowadzenie i cel pracy......8

Część teoretyczna

| 2. Naturalne blony biologiczne | 10 |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| 2.1. Budowa błon biologicznych | 10 |
| 2.2. Struktura lipidowa błon biologicznych | |
| 3. Modelowe biony biologiczne | 14 |
| 3.1. Monowarstwy Langmuira | 15 |
| 3.1.1. Tworzenie monowarstw Langmuira | 16 |
| 3.1.2. Zastosowanie monowarstw Langmuira | 16 |
| 3.1.3. Metody badania monowarstw Langmuira | 18 |
| 3.1.3.1. Pomiar ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadają | cej na |
| pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym | |
| 3.1.3.2. Pomiar potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni przypada | jącej na |
| pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym | 21 |
| 3.1.3.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM) | 22 |
| 3.1.3.4. Testy penetracji monowarstw | 23 |
| 3.2. Liposomy | 23 |
| 3.2.1. Klasyfikacja liposomów | 24 |
| 3.2.2. Metody otrzymywania liposomów | 25 |
| 3.2.3. Zastosowanie liposomów | 27 |
| 3.2.4. Metody badania liposomów | 29 |
| 3.2.4.1. Pomiar rozkładu wielkości i współczynnika polidyspersyjności | 30 |
| 3.2.4.2. Potencjał dzeta | 31 |
| 3.2.4.3. Pomiar światła rozproszonego pod kątem 90° | 33 |
| 4. Związki powierzchniowo czynne jako substancje modyfikujące właś | ciwości |
| modelowych biomembran | 34 |
| 4.1. Klasyfikacja związków powierzchniowo czynnych | 35 |
| 4.2. Najważniejsze właściwości związków powierzchniowo czynnych | 38 |
| 4.3. Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych | 40 |

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

| 5. Stosowane odczynniki | 42 |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 6. Układy pomiarowe i metodyka pomiarów | 43 |
| 6.1. Wyznaczanie CMC surfaktantów | 44 |
| 6.2. Monowarstwy Langmuira | 44 |
| 6.2.1. Pomiar ciśnienia powierzchniowego | 44 |
| 6.2.2. Pomiar potencjału powierzchniowego | 45 |
| 6.2.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM) | 45 |
| 6.2.4. Testy penetracji | 45 |
| 6.3. Liposomy | 46 |
| 6.3.1. Preparatyka liposomów | 46 |
| 6.3.2. Pomiar dynamicznego rozpraszania światła | 47 |
| 6.3.3. Wyznaczanie potencjału dzeta liposomów | 48 |
| 6.3.4. Wyznaczanie potencjału i ładunku powierzchniowego, powierzchni przypada | jącej |
| na jednostkę ładunku oraz liczby ładunków elementarnych przypadających na | |
| pojedynczy liposom | 48 |
| 6.3.5. Pomiar światła rozproszonego pod kątem 90° | 49 |
| 7. Dyskusja wyników | 49 |
| 7.1. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego (Triton X-100) na | |
| właściwości modelowych błon biologicznych | 50 |
| 7.1.1. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego na właściwości | |
| monowarstwy DPPC | 51 |
| 7.1.2. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego na właściwości | |
| liposomów DPPC | 56 |
| 7.2. Badanie oddziaływania anionowego (SDS) i kationowych (DTAB, TTAB, CTAB) | |
| związków powierzchniowo czynnych o różnej długości łańcucha węglowego na | |
| właściwości modelowych błon biologicznych | 59 |
| 7.2.1. Wpływ budowy łańcucha hydrofobowego lipidu | 61 |
| 7.2.1.1. Wpływ na monowarstwę DPPC | 62 |
| 7.2.1.2. Wpływ na dwuwarstwę DPPC | 67 |
| 7.2.1.3. Wpływ na monowarstwę POPC | 73 |
| 7.2.1.4. Wpływ na dwuwarstwę POPC | 79 |
| 7.2.1.5. Wpływ na monowarstwę DOPC | 83 |
| 7.2.1.6. Wpływ na dwuwarstwę DOPC | 87 |
| 7.2.2. Wpływ obecności cholesterolu (30 mol %) w warstwie lipidowej | 90 |
| 7.2.2.1. Wpływ na dwuskładnikową monowarstwę DPPC/Chol | 90 |
| 7.2.2.2. Wpływ na dwuskładnikową dwuwarstwę DPPC/Chol | 98 |
| 8. Wnioski | . 102 |
| 9. Streszczenie | . 107 |
| 10. Summary | 110 |
| 11. Literatura | 113 |
| 12. Wykaz dorobku naukowego | . 137 |

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA

| a | – powierzchnia przekroju poprzecznego części hydrofilowej cząsteczki | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------|--|
| | w płaszczyźnie międzyfazowej | |
| a | promień analizowanych cząstek | |
| Α | powierzchnia przypadająca na pojedynczą cząsteczkę w filmie | |
| | powierzchniowym | |
| BAM | – mikroskopia kąta Brewstera | |
| c | – stężenie | |
| Chol | – cholesterol | |
| CMC | krytyczne stężenie micelizacji | |
| C_s^{-1} | moduł ściśliwości monowarstwy | |
| CTAB | - bromek heksadecylotrimetyloamoniowy | |
| Dh | – średnica hydrodynamiczna | |
| DLS | dynamiczne rozpraszania światła | |
| DOPC | - 1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina | |
| DPPC | – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina | |
| DTAB | - bromek dodecylotrimetyloamoniowy | |
| Dτ | – współczynnik dyfuzji | |
| e | – ładunek elementarny | |
| ELS | – elektroforetyczne rozpraszanie światła | |
| F | - siła | |
| F | – stała Faradaya | |
| FT-IR | spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera | |
| g | – stała grawitacji | |
| G | – stan gazowy | |
| GUV | olbrzymie liposomy jednowarstwowe | |
| h | – głębokość zanurzenia | |
| HIV | – ludzki wirus niedoboru odporności | |
| ITO | – tlenek cyny indu | |
| k | – stała Boltzmanna | |
| l, L | – długość | |
| LC | stan ciekły skondensowany | |
| LE | – stan ciekły rozprężony | |
| LUV | duże liposomy jednowarstwowe | |
| Lα | – nieuporządkowana faza ciekłokrystaliczna | |
| Lβ | – uporządkowana faza żelowa | |
| MLV | liposomy wielowarstwowe | |
| n | liczba jonów w jednostce objętości (m³) | |
| n | współczynnik załamania światła | |
| Р | – parametr upakowania | |
| PC | – fosfatydylocholina | |

| PCS | spektroskopia korelacji fotonów |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| PDI | – współczynnik polidyspersyjności |
| PE | – fosfatydyloetanoloamina |
| PI | – fosfatydyloinozytol |
| POPC | - 2-oleoilo-1-palmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina |
| PS | – fosfatydyloseryna |
| R | – stała gazowa |
| RALS | – prawokątowe rozpraszanie światła |
| S | – stan stały |
| SDS | dodecylosiarczan sodu |
| SLBs | – membrany na podłożach stałych |
| SLS | – statyczne rozpraszania światła |
| SUV | małe liposomy jednowarstwowe |
| t | – grubość |
| Τ | – temperatura |
| Tm | temperatura przejścia fazowego |
| TTAB | bromek tetradecylotrimetyloamoniowy |
| UV | liposomy jednowarstwowe |
| UV-Vis | spektroskopia z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego |
| V | – objętość |
| W | – szerokość |
| X | – odległość wskazująca płaszczyznę poślizgu, przy której rozważany jest |
| | potencjał dzeta |
| Zi | – ładunek danego jonu |
| γ | napięcie powierzchniowe |
| ΔV | zmiana potencjału powierzchniowego |
| 3 | – przenikalność elektryczna |
| ζ | – potencjał elektrokinetyczny, potencjał dzeta |
| η | – lepkość rozpuszczalnika |
| θв | – kąt Brewstera |
| θο | – kąt zwilżania |
| К-1 | – grubość podwójnej warstwy elektrycznej |
| μe | – ruchliwość elektroforetyczna |
| μz | – składowa wektora momentu dipolowego prostopadła do powierzchni |
| | subfazy |
| π | - ciśnienie powierzchniowe |
| $\pi_{	ext{zal}}$ | - krytyczne ciśnienia powierzchniowe |
| ρ | - gęstość |
| σ_0 | - ładunek powierzchniowy |
| ψ0 | – potencjał powierzchniowy |
| | |

1. Wprowadzenie i cel pracy

Badania prowadzone na poziomie komórkowym przy użyciu żywych organizmów i rzeczywistych próbek tkanek są niezwykle złożone i skomplikowane. Natomiast wyniki uzyskane z takich eksperymentów są często zarówno niejednoznaczne, jak i trudne do wyjaśnienia. Uzasadnione jest więc uproszczenie badanego układu w pierwszym etapie eksperymentu, a następnie jego odpowiednie modyfikowanie w celu weryfikacji postawionych pierwotnie hipotez badawczych. Nauka zdążyła opracować idealne narzędzie do tego celu w postaci modelowych błon lipidowych, których unikatową cechą jest analogia strukturalna w porównaniu z naturalnymi błonami komórkowymi. Ze względu na swoje zalety, modelowe membrany cieszą się w dzisiejszych czasach dużym zainteresowaniem wśród Badaczy z wielu dziedzin nauki – począwszy od biologii molekularnej, poprzez medycynę, a skończywszy na nauce o środowisku. Natomiast ilość badań z ich udziałem wykazuje nieprzerwanie tendencję wzrostową, co jeszcze bardziej podkreśla ich ogromną przydatność w rozwoju nauki i poznaniu świata. Jednak czy wszyscy mają świadomość, jak łatwo właściwości układów modelowych zmieniają się pod wpływem niewielkiego dodatku substancji tak wszechobecnych we współczesnym świecie, jak surfaktanty?

W aspektach aplikacyjnych zjawisko modyfikacji powierzchni liposomów poprzez dodatek surfaktantów jest niezwykle pozytywne, ponieważ umożliwia dostosowanie właściwości pęcherzyków lipidowych do określonych celów. Taki zabieg usprawnia na przykład system dostarczania leków. Warto podkreślić, że liposomowe formulacje leków odgrywają obecnie znaczenie kluczowe, co potwierdza wysoka liczba prac naukowych (~15 tysięcy) opublikowanych w 2021 roku i powiązanych według bazy Scopus z hasłem: "liposomes in drug delivery system" ("liposomy w systemie dostarczania leków"; dane z 13.06.2022). Jednak pomimo rozwoju liposomowych nośników leków, wpływ związków powierzchniowo czynnych na właściwości pęcherzyków lipidowych pozostaje częściowo niejasny. Powszechnie znane jest zjawisko solubilizacji dwuwarstw lipidowych pod wpływem surfaktantów o stężeniu przewyższającym krytyczne stężenie micelizacji. Natomiast wpływ addycji niewielkich ilości surfaktantów do uprzednio zsyntezowanej zawiesiny liposomów pozostaje kwestią otwartą. Są to zagadnienia bardzo istotne, ponieważ niewielkie ilości surfaktantów mogą zostać wprowadzone do układu pomiarowego nieświadomie i w ten sposób wpływać na wyniki uzyskane podczas doświadczeń. Z drugiej strony, zaobserwowanie korzystnych zmian we właściwościach gotowych liposomów w wyniku dodatku surfaktantów stanowi szansę zoptymalizowania standardowej procedury poprawy systemu dostarczania leków do organizmu.

Standardowa procedura modyfikacji powierzchni liposomów polega na dodaniu surfaktantu do układu już na etapie otrzymywania pęcherzyków lipidowych. Oznacza to, że przy każdorazowej konieczności zmiany charakterystyki liposomów, ich preparatykę należy przeprowadzić od nowa. Niewatpliwym ułatwieniem byłoby niejako rozdzielnie tej procedury na dwa etapy, z których pierwszy dotyczyłby preparatyki liposomów o żądanym składzie lipidowym, a drugi - dostrojenia właściwości liposomów poprzez dodatek odpowiedniego związku powierzchniowo czynnego. Dlatego też głównym celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy było zweryfikowanie możliwości wbudowywania się niewielkich ilości surfaktantów w strukturę modelowej błony biologicznej. Jako układy modelowe zastosowano monowarstwy lipidowe (monowarstwy Langmuira) oraz dwuwarstwy lipidowe w postaci liposomów. Dla pełnej analizy tego zagadnienia do badań wybrano surfaktanty zróżnicowane pod względem natury chemicznej (surfaktant niejonowy, anionowy i kationowy) i długości łańcucha węglowego (surfaktanty kationowe o 12-, 14- i 16-węglowym łańcuchu alifatycznym). Ponieważ oddziaływania surfaktantu z biomembraną zależą prawdopodobnie od składu lipidowego samej błony, do badań włączono układy modelowe utworzone z lipidów o zróżnicowanym stopniu nasycenia łańcuchów acylowych oraz zawierające cholesterol. Celem pracy było ponadto porównanie wpływu surfaktantów jonowych zbudowanych z 12-węglowego łańcucha hydrofobowego na potencjał elektrokinetyczny liposomów w zależności od metody ich otrzymania oraz momentu dodania surfaktantu do układu.

W eksperymentach zastosowano dodatki tylko znikomych ilości związków powierzchniowo czynnych, by równolegle przeanalizować wpływ nieumyślnego zanieczyszczenia układu pomiarowego surfaktantami na uzyskane wyniki. Rozważanymi lipidami i surfaktantami były związki tradycyjne, często stosowane w badaniach naukowych oraz w życiu codziennym jako detergenty.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2. Naturalne błony biologiczne

Organizm człowieka zbudowany jest z różnorodnych typów komórek, których łączna liczba w pojedynczym organizmie podawana jest w bilionach [1]. Kluczowym elementem każdej prawidłowo funkcjonującej komórki jest z kolei błona komórkowa, oddzielająca jej wnętrze od środowiska zewnętrznego i chroniąca tym samym komórkę przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych. Błona komórkowa reguluje ponadto transport substancji, umożliwia reakcję na bodźce, czy też bierze udział w katalizie reakcji metabolicznych [2]. O specyficznych właściwościach biomembran decyduje przede wszystkim ich skład lipidowo-białkowy, który jest zróżnicowany zarówno wśród różnych organizmów żywych, jak i pomiędzy odrębnymi przedziałami tych samych komórek [3]. Może być również niejednolity w obrębie tej samej błony komórkowej [4].

2.1. Budowa błon biologicznych

Błonę komórkową tworzą lipidy oraz białka porządkujące się w organizmie w model tak zwanej płynnej mozaiki lipidowo-białkowej [5]. Model ten, obowiązujący od 1972 roku do dnia dzisiejszego, zakłada, że białka błonowe zanurzone są w nadmiarze cząsteczek lipidów zorganizowanych w formę dwuwarstwy [6]. Białka błonowe mogą przenikać taką dwuwarstwę (białka integralne), być luźno połączone z jej powierzchnią (białka peryferyjne), jak również być związane wiązaniami kowalencyjnymi z lipidami tworzącymi dwuwarstwę (białka zakotwiczone) [7,8] (Rysunek 1).



Rysunek 1. Model struktury błony komórkowej [9].

Najbardziej rozpowszechnionymi w komórkach ssaków grupami lipidów, a zarazem klasami lipidów o największym znaczeniu biologicznym, są glicerofosfolipidy, sfingolipidy i sterole [10]. Glicerofosfolipidy to wszechobecne w przyrodzie polarne związki chemiczne składające się z rdzenia w postaci glicerolu związanego z jednym bądź dwoma długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi oraz z resztą fosforanową połączoną z cząsteczką alkoholu. W komórkach eukariotycznych glicerofosfolipidy współtworzone są zwykle przez następujące alkohole: cholinę, etanoloaminę, serynę oraz inozytol, które to wchodzą w skład kolejno: fosfatydylocholiny (PC), fosfatydyloetanoloaminy (PE), fosfatydyloseryny (PS) oraz fosfatydyloinozytolu (PI) [11]. Cechą wyróżniającą tę klasę lipidów jest ich aktywne uczestnictwo w regulacji procesów metabolicznych, a także udział w sygnalizacji komórkowej [12]. Do grupy glicerofosfolipidów zalicza się: 1,2dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholine (DPPC), 2-oleoilo-1-palmitoilo-sn-glicero-3fosfocholine (POPC) oraz 1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholine (DOPC) (Rysunek 2). Związki te różnią się między sobą stopniem nasycenia kwasów tłuszczowych i zmieniają się od formy całkowicie nasyconej (DPPC), poprzez półnienasyconą (POPC) do nienasyconej (DOPC). To właśnie wymienione lipidy są zazwyczaj wybierane do badań modelowych, przez co są prawdopodobnie najlepiej scharakteryzowanymi glicerofosfolipidami błonowymi ssaków.



Rysunek 2. Wzory strukturalne wybranych glicerofosfolipidów.

Kolejną ważną grupę lipidów budujących komórki ssaków stanowią sfingolipidy. Cechą wspólną tych związków jest występowanie w ich strukturze wielowęglowodorowego szkieletu będącego nienasyconą zasadą sfingoidową [13]. Szkielet ten łączy się z resztą kwasu tłuszczowego oraz z grupą funkcyjną. Znanych jest kilka podklas sfingolipidów, które odznaczają się dużą różnorodnością chemiczną, wynikającą bezpośrednio z mnogości kombinacji połączeń różnego typu zasad sfingoidowych z szeregiem grup funkcyjnych, czy też z różnymi łańcuchami alifatycznymi [14]. W układach biologicznych sfingolipidy odgrywają rolę bioaktywnych molekuł, które działają jak wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe przekaźniki [13]. Zaangażowane są w takie procesy komórkowe jak: proliferacja [15], różnicowanie [16], apoptoza [17,18], autofagia [19], sygnalizacja wapniowa [20] i odpowiedź immunologiczna [21,22].

Ostatnią grupą lipidów, która zostanie omówiona w tym rozdziale, są sterole. Związki te zbudowane są z czteropierścieniowego rdzenia steroidowego, węglowodorowego łańcucha bocznego oraz grupy hydroksylowej [23]. Najbardziej znanym przedstawicielem tej klasy lipidów jest cholesterol (Chol) (Rysunek 3).



Rysunek 3. Wzór strukturalny cholesterolu.

Cholesterol występuje w błonach komórkowych ssaków w znacznej ilości (ok. 25% w stosunku do masy wszystkich lipidów) i warunkuje ich prawidłowe funkcjonowanie [24]. Jego głównym zadaniem jest utrzymanie integralności i płynności błon komórkowych oraz pełnienie funkcji prekursora w syntezie niezbędnych dla organizmu substancji, takich jak: hormony steroidowe, kwasy żółciowe i witamina D [25]. Istotę wyższości tego lipidu podkreśli zapewne fakt, iż nazywany on jest: "centralnym lipidem komórek ssaków" [26]. Cholesterol wykorzystywany jest w badaniach modelowych błon lipidowych jako regulator stabilności, płynności i przepuszczalności błon [27].

2.2. Struktura lipidowa błon biologicznych

Lipidy rozmieszczone są w błonach biologicznych asymetrycznie [28]. Oznacza to, że wewnętrzna warstwa biomembran charakteryzuje się odmiennym w stosunku do warstwy zewnętrznej składem. W przypadku błon komórkowych eukariotów fosfatydylocholina oraz sfingolipidy występują głównie w zewnętrznej warstwie membrany, a fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloinozytol gromadzą się w jej wewnętrznej części [29]. Z kolei lokalizacja cholesterolu w błonach komórkowych nie jest określona jednoznacznie. Sugeruje się, że może on być częścią zarówno wewnętrznej warstwy cytozolowej, jak i gromadzić się na zewnętrznej niecytozolowej powierzchni błony [30,31].

Asymetria w rozłożeniu lipidów w biomembranach niesie za sobą pewne konsekwencje. Jedną z nich jest zagęszczenie ujemnego ładunku w wewnętrznej warstwie błony związane z obecnością PS i PI, a inną – różnoraki stopień pofałdowania dwuwarstwy. Wynika on z odmiennej geometrii molekularnej składników lipidowych błon biologicznych. Zdefiniowanie kształtu cząsteczki lipidowej, a jednocześnie określenie preferowanej formy strukturalnej, jaką cząsteczka przyjmuje w środowisku wodnym, opiera się na wyznaczeniu parametru upakowania (P) ze wzoru [32]:

$$P = \frac{V}{a \cdot L} \tag{1}$$

gdzie: V oznacza objętość części niepolarnej cząsteczki, a oznacza powierzchnię przekroju poprzecznego części hydrofilowej cząsteczki w płaszczyźnie międzyfazowej, a L to długość części hydrofobowej.

Gdy parametr upakowania równy jest jedności, to cząsteczki lipidu przyjmują kształt cylindra i w środowisku wodnym tworzą płaskie dwuwarstwy. Gdy P > 1, to cząsteczki mają kształt stożka i w środowisku wodnym formują odwrócone micele. Natomiast, gdy P < 1, to cząsteczki przybierają kształt odwróconego stożka i w środowisku wodnym tworzą micele sferyczne. Uściślając zakresy zmienności parametru upakowania i rozważając sytuację, gdy $\frac{1}{2} < P < 1$ okaże się, że w tym przypadku cząsteczki lipidu w środowisku wodnym preferencyjnie utworzą sferyczne pęcherzyki dwuwarstwowe [33]. Opisane wyżej zależności obrazuje Rysunek 4.



Rysunek 4. Preferowana forma strukturalna cząsteczki w środowisku wodnym w zależności od wielkości parametru upakowania [34].

Inną ważną cechą lipidów tworzących błonę komórkową jest ich ciągły ruch, polegający na dyfuzji lateralnej, dyfuzji rotacyjnej lub na zjawisku flip-flop [35,36]. Dyfuzję lateralną należy rozumieć jako przemieszczanie się cząsteczek lipidów w płaszczyźnie błony, dyfuzję rotacyjną jako ruch cząsteczek wokół własnej osi (prostopadłej do powierzchni błony), a ruch flip-flop – jako przemieszczanie się cząsteczek lipidów pomiędzy warstwami biomembrany [37]. Możliwe są również ruchy jedynie hydrofobowych łańcuchów alkilowych cząsteczek lipidów.

Istotny wpływ na charakterystykę dwuwarstwy lipidowej, w tym również na ruchliwość lipidów ją tworzących, ma stan fizyczny tych lipidów [38]. Lipidy, w zależności od temperatury, występują bowiem w uporządkowanej fazie żelowej (L_{β}) lub w nieuporządkowanej fazie ciekłokrystalicznej (L_{α}). Faza żelowa cechuje się ciasnym upakowaniem cząsteczek, w którym ruchliwość jest ograniczona i występuje w temperaturze niższej od tzw. temperatury przejścia fazowego (T_m). Temperatura ta jest cechą indywidualną każdego lipidu. Faza ciekłokrystaliczna zaś wyróżnia się luźnym ułożeniem mobilnych cząsteczek i występuje w temperaturach wyższych od temperatury przejścia fazowego. Należy zaznaczyć, iż w warunkach fizjologicznych błony komórkowe zazwyczaj występują w fazie ciekłokrystalicznej. Choć w szczególnych przypadkach modyfikacji składu lipidowego mają miejsce zmiany w ich uporządkowaniu [39]. Co ważne, konsekwencją spontanicznych ruchów składników biomembrany jest jej płynność [40].

3. Modelowe blony biologiczne

Modelowe błony biologiczne cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem wśród badaczy z różnorodnych dziedzin nauki. Szczególnie tych, w których kluczowym punktem

badań jest rzetelne odwzorowanie warunków panujących wewnątrz żywych organizmów. Ze względu na ich analogię strukturalną w porównaniu z naturalnymi błonami komórkowymi zastosowanie układów modelowych błon jako materiał badawczy umożliwia bowiem formułowanie istotnych wniosków na temat złożonych, często skomplikowanych procesów biologicznych [41].



Monowarstwa Langmuira Jednowarstwowy liposom

Rysunek 5. Schemat najpopularniejszych modeli błon biologicznych [42,43].

Najczęściej wykorzystywanymi modelami biomembran są monowarstwy Langmuira oraz liposomy, których schematyczny wygląd ilustruje Rysunek 5. Innymi modelami błon są błony lipidowe na podłożu stałym i czarne filmy lipidowe [6].

3.1. Monowarstwy Langmuira

Monowarstwy Langmuira, nazywane także filmami Langmuira, są jednowarstwowym modelem błon biologicznych, tworzonym przez pojedyncze warstwy substancji filmotwórczej ułożone na granicy faz ciecz-gaz [44]. Pomimo, że model jednowarstwowy odzwierciedla w zasadzie tylko połowę biomembrany i nie oddaje jej w całości, jest on chętnie wykorzystywany w badaniach naukowych. W niektórych przypadkach dostrzega się nawet przewagę jednowarstwowego modelu nad modelem dwuwarstwowym z powodu jego zalet, takich jak: przewyższająca biwarstwy stabilność oraz możliwość tworzenia błon w szerszym zakresie stężeń lipidów [45]. Wyżej wymienione cechy w połączeniu z wiedzą, iż w odpowiednich warunkach właściwości monowarstw lipidowych i dwuwarstw lipidowych są wysoce skorelowane, zachęcają do wykorzystywania tego modelu błon [46]. Z kolei najlepszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie dwóch systemów modelowych w jednym eksperymencie tak, by skorzystać z mocnych stron obu z nich i sformułować niepodważalne wnioski.

3.1.1. Tworzenie monowarstw Langmuira

Monowarstwy Langmuira tworzone są przy użyciu tzw. wagi Langmuira [47]. Obowiązkowym wyposażeniem takiej wagi jest termostatowana wanienka, którą wypełnia się cieczą stanowiącą fazę nośną (inaczej subfazę), czujnik ciśnienia powierzchniowego oraz ruchome barierki, umożliwiające kompresję monowarstwy. Schemat wagi Langmuira przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Schematyczne przedstawienie wagi Langmuira [48].

Procedura utworzenia nierozpuszczalnej monowarstwy Langmuira nie jest skomplikowana i można ją podzielić na dwa etapy. W pierwszym kroku substancję filmotwórczą rozpuszcza się w niepolarnym rozpuszczalniku organicznym. W drugim zaś substancję tę, w odpowiednich ilościach, zależnych między innymi od powierzchni wanienki, nanosi się na powierzchnię subfazy. Jako, że związki tworzące monowarstwy Langmuira charakteryzują się amfifilową strukturą, po odparowaniu rozpuszczalnika cząsteczki zorientują się na granicy faz w specyficzny sposób [49]. Część hydrofilowa, oddziałując chętnie z cząsteczkami wody, ulokuje się w warstwie powierzchniowej subfazy. Natomiast, część hydrofobowa unika kontaktu z cząsteczkami wody, więc ustawi się w stronę fazy gazowej. Tak powstały dwuwymiarowy film Langmuira jest stabilny wówczas, gdy zachowana jest odpowiednia równowaga oddziaływań hydrofilowo–hydrofobowych. Na stabilność monowarstwy ma również wpływ temperatura, pH i siła jonowa fazy nośnej [50–52].

3.1.2. Zastosowanie monowarstw Langmuira

Przez wzgląd na ogromne znaczenie procesów fizykochemicznych zachodzących na granicy faz ciecz–powietrze, monowarstwy Langmuira znajdują zastosowanie w wielu

dziedzinach nauki. Zwłaszcza, że stanowią one użyteczną platformę do szczegółowego badania oddziaływań międzycząsteczkowych na granicy faz [53]. Zapewniają przy tym dużą różnorodność materiału badawczego i pozwalają na precyzyjną kontrolę upakowania cząsteczek w strukturze błony [54].

Model jednowarstwowy błon biologicznych przydatny jest szczególnie do określenia interakcji pomiędzy cząsteczkami lipidów [55,56], a także między cząsteczkami lipidów i substancjami biologicznie czynnymi [57–61]. Czyni to tym samym monowarstwy Langmuira narzędziem wielokrotnie wykorzystywanym w chemii medycznej czy farmakologii przy projektowaniu nowych leków, gdyż w oparciu o badania modelowe możliwe jest zrozumienie mechanizmu ich działania [62,63]. Ostatnio, poprzez zastosowanie modelu Langmuira dostarczono na przykład nowych informacji na temat procesów determinujących wchłanianie leków przeciwnowotworowych [64,65]. Układy monowarstwowe stosowane są powszechnie w biologii molekularnej do wyjaśnienia aktywności enzymów oraz białek [66–68], a także w nanotechnologii – do badania wpływu nanocząstek na właściwości błon lipidowych [69–71]. Okazuje się na przykład, że badania podstawowe, dotyczące wpływu nanocząstek chityny na zachowanie odpowiedniej monowarstwy Langmuira, są źródłem informacji o toksyczności tych nanocząstek wobec ludzkich płuc [72]. Przytoczony przykład łączy nanotechnologie z zagadnieniami chemii środowiskowej i medycznej, i jest tylko jednym z wielu w całej puli prac badawczych podobnie interdyscyplinarnych. Monowarstwy Langmuira stosowane są również w badaniach z zakresu szybko rozwijającej się w dzisiejszych czasach chemii polimerów, w których stanowią metodę analizy procesu degradacji biodegradowalnych materiałów polimerowych [73,74].

Nie można w tym miejscu nie wspomnieć o niejako drugiej gałęzi możliwości aplikacyjnych monowarstw Langmuira, jaką jest tworzenie membran na podłożach stałych (SLBs, ang. *Supported Lipid Bilayers*) [75]. Struktury te powstają w wyniku wyniesienia klasycznej monowarstwy Langmuira z powierzchni subfazy na podłoże stałe, np. szkło borokrzemowe, mikę czy złoto [76]. Wynurzeniu z roztworu wodnego podlegają zwykle dwie monowarstwy, które finalnie tworzą układ dwuwarstwowy. Co ciekawe, poprzez zapewnienie różnego składu lipidowego każdej z monowarstw możliwe jest utworzenie struktur jeszcze lepiej naśladujących właściwości naturalnych błon biologicznych [77].

3.1.3. Metody badania monowarstw Langmuira

Monowarstwy Langmuira analizuje się różnorodnymi technikami eksperymentalnymi, takimi jak: pomiar ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej [78,79], pomiar potencjału powierzchniowego [80,81], testowanie penetracji monowarstwy [82], mikroskopia fluorescencyjna [83,84], mikroskopia kąta Brewstera [85], spektroskopia UV–Vis [86], odbiciowa spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z modulacją polaryzacji [87,88], wibracyjna spektroskopia generacji sumy częstości [89,90], dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego [91–93], czy też reologia międzyfazowa [94,95]. Poniżej zostaną omówione techniki wykorzystane w badaniach stanowiących podstawę niniejszej pracy.

3.1.3.1. Pomiar ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym

Podstawową metodą oceny właściwości monowarstw Langmuira jest analiza zmian ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym (A) [96]. Analiza przeprowadzana jest w stałej temperaturze i odbywa się poprzez kompresję monowarstwy wymuszoną automatycznym ruchem barierek w kierunku środka wagi Langmuira. Pomiaru ciśnienia powierzchniowego, będącego różnicą napięcia powierzchniowego czystej subfazy (γ_{θ}) i napięcia powierzchniowego subfazy pokrytej monowarstwą (γ_m), dokonuje się zazwyczaj metodą Wilhelmy'ego [97]. Metoda ta polega na określeniu siły wywieranej na specjalną płytkę (płytkę Wilhelmy'ego) zawieszoną na ramieniu wagi i częściowo zanurzoną w subfazie [97]. Na prostokątną płytkę o długości l, szerokości w i grubości t wykonaną z materiału zwilżalnego przez ciecz o gęstości ρ_P (np. platyna, bibuła filtracyjna) działa bowiem siła F_{θ} [98]:

$$F_0 = \rho_P g l w t + 2\gamma_0 (t + w) cos \theta_0 - \rho_L g t w h$$
⁽²⁾

gdzie: g oznacza stałą grawitacji, θ_0 kąt zwilżania płytki przez czystą subfazę, ρ_L gęstość cieczy, w której zanurzona jest płytka, natomiast h – głębokość zanurzenia płytki. W przypadku naniesienia na subfazę monowarstwy Langmuira siła F_m wywierana na tę samą płytkę Wilhelmy'ego będzie wynosiła:

$$F_m = \rho_P g l w t + 2\gamma_m (t + w) cos \theta_m - \rho_L g t w h$$
(3)

gdzie: θ_m oznacza kąt zwilżania płytki przez subfazę pokrytą monowarstwą. Po uproszczeniu różnicy wynikającej z równań (3) i (2), otrzymamy następującą prawidłowość:

$$\Delta F = 2w(\gamma_m - \gamma_0) \tag{4}$$

Wyrażenie pozwalające wyznaczyć ciśnienie powierzchniowe przyjmie zatem postać:

$$\pi = -\frac{\Delta F}{2w} \tag{5}$$

Wynikiem pomiaru ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej jest krzywa nazywana izotermą π –A, której schematyczny przebieg przedstawia Rysunek 7. Wygląd takiej izotermy niesie bezpośrednią informację na temat stanu fizycznego monowarstwy w danych warunkach eksperymentalnych i zależy od rodzaju substancji filmotwórczej, składu subfazy oraz temperatury [99].



Rysunek 7. Przebieg modelowej izotermy π -A przedstawiający różne stany fazowe monowarstwy Langmuira (A) wraz ze schematyczną ilustracją stopnia uporządkowania cząsteczek na granicy faz w poszczególnych stanach monowarstwy (B) [100].

Tuż po naniesieniu badanego związku na powierzchnię subfazy obserwowany jest stan gazowy (G) monowarstwy, charakteryzujący się prawie zerowymi wartościami ciśnienia powierzchniowego. W tym stanie cząsteczki, mając do dyspozycji dużą powierzchnię, są od siebie znacznie oddalone i orientują się chaotycznie wobec granicy faz. Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami są tu bardzo słabe. W wyniku sprężania powierzchnia cząsteczkowa monowarstwy zmniejsza się, а oddziaływania międzycząsteczkowe przybierają na sile, czemu towarzyszy stopniowy wzrost ciśnienia powierzchniowego i przejście fazowe do stanu ciekłego rozprężonego (LE, ang. Liquid Expanded). Warto zaznaczyć, iż punkt, w którym ciśnienie powierzchniowe zaczyna przewyższać wartość zerową, nazywany jest "punktem *lift-off*". Dalej, w przebiegu izotermy π -A obserwować można plateau. Jest ono związane z zachodzącą przemianą fazową ze stanu ciekłego rozprężonego do stanu ciekłego skondensowanego (LC, ang. Liquid Condensed). W stanie LC następuje gwałtowny wzrost wartości ciśnienia powierzchniowego. Tutaj odległości między cząsteczkami są niewielkie, przez co oddziałują one ze sobą silnie. Części hydrofobowe porządkują się wyraźnie na granicy faz, ustalając jednakowy kąt odchylenia od pionu. Dalsza redukcja powierzchni cząsteczkowej doprowadzić może do idealnie prostopadłej orientacji cząsteczek substancji filmotwórczej na powierzchni subfazy, co jest cechą stanu stałego (S), a następnie do załamania monowarstwy. Załamanie następuje na skutek przekroczenia wytrzymałości mechanicznej utworzonej monowarstwy Langmuira, co jest związane z osiągnięciem krytycznego ciśnienia powierzchniowego (π_{zal}) [101].

Rejestracja izoterm π -A umożliwia również monitorowanie wartości modułu ściśliwości monowarstwy (C_s^{-1}), pomocnego do jednoznacznego określenia jej stanu fizycznego. Definiowany jest on jako:

$$C_s^{-I} = -A \left(\frac{d\pi}{dA}\right)_T \tag{6}$$

i przyjmuje różne wartości w zależności od fazy monowarstwy (Tabela 1) [102].

| Stan fizyczny monowarstwy | Moduł ściśliwości [mN/m] |
|---------------------------|--------------------------|
| gazowy | < 12,5 |
| ciekły rozprężony | 12,5-50 |
| ciekły skondensowany | 100 - 250 |
| stały | > 1000 |

Tabela 1. Zmiany modułu ściśliwości monowarstwy w zależności od jej stanu fizycznego [102].

Jak wspominano, pomiar ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej jest powszechną metodą analizy filmów Langmuira [103]. Zazwyczaj to właśnie na podstawie przebiegu izoterm π -A formowane są pierwsze wnioski na temat takich właściwości monowarstw jak: stabilność, stan fizyczny, ściśliwość monowarstwy, oddziaływania międzycząsteczkowe czy też mieszalność składników monowarstwy. Szereg informacji, jakie niesie ta technika, jest powodem jej częstego powielania w badaniach naukowych [104–106].

3.1.3.2. Pomiar potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym

Inną, ważną metodą dedykowaną do charakterystyki monowarstw Langmuira jest analiza zmian potencjału powierzchniowego (ΔV) w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym [107,108]. Analiza, tak jak w przypadku badania zmian ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej, przeprowadzana jest z wykorzystaniem wagi Langmuira i odbywa się w stałej temperaturze. Jednak elementem niezbędnym do wykonania pomiaru jest dodatkowe wyposażenie wagi w specjalny czujnik potencjału powierzchniowego. Zadaniem takiego czujnika jest pomiar różnicy potencjałów występujących pod i nad utworzoną monowarstwą.

Kluczowi producenci mierników potencjału powierzchniowego (KSV NIMA, Kibron) w swoich urządzeniach do pomiaru potencjału wykorzystują metodę wibrującej elektrody [109]. Układ pomiarowy składa się tu ze wspomnianej elektrody wibrującej, którą umieszcza się w odległości kilku milimetrów od powierzchni subfazy oraz z przeciwelektrody zanurzonej w subfazie. Wibracje elektrody ulokowanej nad monowarstwą Langmuira wywołują zmiany pojemności układu prowadzące do powstania prądu zmiennego. Wielkość generowanego prądu jest ściśle zależna od różnicy potencjałów pomiędzy elektrodą wibrującą i powierzchnią subfazy [110]. Inną możliwością pomiaru potencjału powierzchniowego jest zastosowanie elektrody jonizującej wykonanej z substancji emitującej cząstki α (np. elektrody polonowej) [110,111]. W tym przypadku to jonizacja powietrza pomiędzy powierzchnią subfazy a elektrodą wywołuje dostateczne przewodnictwo pozwalające na pomiar różnicy potencjałów między elektrodami [111].

Ilościowy opis różnicy potencjałów pod i nad utworzoną monowarstwą opisuje równanie Helmholtza [112]:

$$\Delta \mathbf{V} = \frac{\mu_z}{\varepsilon} \cdot \frac{l}{A} \tag{7}$$

w którym: μ_z to składowa wektora momentu dipolowego prostopadła do powierzchni subfazy, ε to przenikalność elektryczna ośrodka, a A – powierzchnia przypadająca na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym. Jak pokazuje równanie (7), ΔV zależy od orientacji cząsteczek w monowarstwie Langmuira, a również od gęstości ich upakowania. Równanie to ujawnia tym samym najważniejsze zastosowanie pomiaru zmian potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej, którym jest badanie zmian orientacji cząsteczek w filmach Langmuira [74,113].

3.1.3.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM)

Mikroskopia kąta Brewstera (BAM, ang. *Brewster Angle Microscopy*) jest techniką umożliwiającą wizualizację morfologii monowarstw Langmuira w czasie rzeczywistym [97]. Metoda ta opiera się na zjawisku załamania i odbicia promienia świetlnego przy przejściu przez granicę fazową, której ośrodki charakteryzują się różnymi współczynnikami załamania światła (n_1 i n_2) [114]. Dla każdej granicy faz wyznaczyć można tzw. kąt Brewstera (θ_B), który zdefiniowany jest następująco:

$$tg \ \theta_B = \frac{n_2}{n_1} \tag{8}$$

przy czym: n_2 to współczynnik załamania światła ośrodka, w którym prędkość propagacji światła jest mniejsza.

Kierując spolaryzowane liniowo światło laserowe na granicę faz woda–powietrze dokładnie pod tym kątem, w tym przypadku 53°, obserwuje się ponowną polaryzację wiązki, co skutkuje wytłumieniem światła odbitego [115]. Jednakże, kiedy na granicy faz woda– powietrze utworzona jest monowarstwa, zmianie ulega współczynnik załamania światła fazy wodnej, co wiąże się również ze zmianą kąta Brewstera. Wobec tego, w wyniku nakierowania tego samego światła laserowego na układ woda–powietrze wzbogacony o monowarstwę, tym razem tłumienie światła odbitego nie nastąpi, lecz pojawi się promień odbity od monowarstwy. Promień ten jest źródłem obrazu w mikroskopii Brewstera. Omówione wyżej zjawiska ilustruje Rysunek 8.



Rysunek 8. Schemat obrazujący zasadę mikroskopii kąta Brewstera [114].

Morfologię monowarstwy Langmuira monitoruje się zwykle w trakcie jej kompresji, dzięki czemu pozyskuje się wiedzę na temat uporządkowania filmu w kolejnych stanach fizycznych [116]. Obrazy BAM pomagają ponadto scharakteryzować przejścia fazowe monowarstwy, tworzące się domeny i proces załamania monowarstwy [117–119]. Stanowią też cenną informację o grubości monowarstwy, gdyż poziom szarości uzyskanego obrazu uwarunkowany jest właśnie tą właściwością [114]. Przez wzgląd na powyższe, mikroskopia BAM jest aktualnie standardowym narzędziem wykorzystywanym do badania monowarstw lipidowych.

3.1.3.4. Testy penetracji monowarstw

Chcąc przeanalizować interakcje substancji rozpuszczalnych w wodzie z błoną biologiczną za pomocą jednowarstwowego układu modelowego, przeprowadzić można test penetracji monowarstwy [120,121]. Procedura eksperymentu sprowadza się do utworzenia nierozpuszczalnego filmu Langmuira na powierzchni subfazy (analogicznie jak w punkcie 3.1.1.), a następnie na kompresji danej monowarstwy do analizowanego ciśnienia powierzchniowego. W przypadku naśladowania membran biologicznych i/lub prowadzenia eksperymentu komplementarnego z modelem dwuwarstwowym, ciśnienie powierzchniowe powinno mieścić się w zakresie 30-35 mN·m⁻¹, ponieważ wykazano, że wówczas właściwości takie jak: upakowanie cząsteczek w monowarstwie, ściśliwość monowarstwy czy też jej stan fazowy odpowiadają tym, jakie obserwuje się w przypadku dwuwarstwy lipidowej o takim samym składzie [46,122]. Po osiągnięciu odpowiedniego ciśnienia, do subfazy ostrożnie wstrzykuje się zadaną ilość substancji hydrofilowej, która to będzie oddziaływała z monowarstwą Langmuira. Następnie rozpoczyna się rejestrację zmian ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu. Pomiar przeprowadza się przy zapewnieniu stałej wartości powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym.

Wyniki otrzymane z testu penetracji w jednoznaczny sposób określają, czy badane związki hydrofilowe oddziałują ze składnikami monowarstwy Langmuira [123–128].

3.2. Liposomy

Liposomy to zamknięte, pęcherzykowate struktury, których szkielet zewnętrzny zbudowany jest z co najmniej jednej dwuwarstwy lipidowej [129]. Możliwość formowania się liposomów wynika bezpośrednio z amfifilowości związków, które je tworzą. Związki te,

w kontakcie ze środowiskiem wodnym charakteryzują się tendencją do uprzywilejowanego tworzenia podwójnej warstwy lipidowej. Powstała w ten sposób płaska, bimolekularna warstwa, dążąc do osiągnięcia minimalnej energii brzegowej, przekształca się samoczynnie w sferyczne liposomy. Skutkuje to tym samym odgraniczeniem się regionu hydrofilowego cząsteczki od regionu hydrofobowego.

Dzięki unikalnym cechom, takim jak: biokompatybilność, biodegradowalność czy nietoksyczność, liposomy od momentu odkrycia w 1965 r. [130] zdążyły zrewolucjonizować świat nauki, a także niektóre gałęzie przemysłu [131,132].

3.2.1. Klasyfikacja liposomów

Liposomy klasyfikuje się najczęściej biorąc pod uwagę ilość warstw lipidowych tworzących pęcherzyki lub bazując na ich wielkości. W pierwszym podejściu wyróżnia się:

- liposomy jednowarstwowe (UV, ang. Unilamellar Vesicles),
- liposomy wielowarstwowe (MLV, ang. *Multilamellar Vesicles*).

W przypadku liposomów jednowarstwowych w skład liposomu wchodzi pojedyncza dwuwarstwa lipidowa, zaś w przypadku liposomów wielowarstwowych – wiele dwuwarstw.

Z kolei ze względu na rozmiar, liposomy dzieli się na [133]:

- małe liposomy jednowarstwowe (SUV, ang. *Small Unilamellar Vesicles*) o rozmiarach od 20 do 200 nm,
- duże liposomy jednowarstwowe (LUV, ang. Large Unilamellar Vesicles), których wielkość jest większa od 200 nm,
- olbrzymie liposomy jednowarstwowe (GUV, ang. *Giant Unilamellar Vesicles*), których średnica jest nie mniejsza niż 1000 nm.

Poszczególne typy liposomów przedstawione są na Rysunek 9. Co istotne, charakteryzują się one odmiennymi właściwościami i możliwościami aplikacyjnymi, a także otrzymywane są różnorodnymi technikami [134].



Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie liposomów różniących się liczbą warstw lipidowych i wielkością [135].

3.2.2. Metody otrzymywania liposomów

Istnieje szereg metod prowadzących do otrzymania liposomów. Między innymi są to: hydratacja cienkiego filmu lipidowego, sonikacja, ekstruzja, wstrzykiwanie alkoholowego lub eterowego roztworu lipidów do fazy wodnej, odparowywanie techniką faz odwróconych, dializa detergentowa, czy elektroformacja. Wybór odpowiedniej metody zależny jest od tego, jaki typ liposomów chcemy pozyskać.

W celu otrzymania liposomów wielowarstwowych wykorzystuje się najczęściej metodę zwaną hydratacją cienkiego filmu lipidowego, odparowywanie techniką faz odwróconych lub dializę detergentową [136]. W pierwszym etapie hydratacji cienkiego filmu lipidowego wybrany do eksperymentu lipid należy rozpuścić w rozpuszczalniku organicznym, po czym rozpuszczalnik całkowicie odparować [137]. Kolejnym krokiem jest umieszczenie takiego lipidu w systemie próżniowym w celu jego dokładnego osuszenia z pozostałości rozpuszczalnika. Następnie, powstały suchy film lipidowy należy uwodnić i wytrząsać w odpowiedniej temperaturze, co w efekcie doprowadzi do utworzenia liposomów. Na tym preparatykę można zakończyć, mając do dyspozycji liposomy typu MLV, lub też procedurę rozszerzyć o kolejne etapy prowadzące na przykład do zmniejszenia warstw liposomów. W tym celu pomocna byłaby technika cyklicznego zamrażania–

rozmrażania [138]. Odparowywanie techniką faz odwróconych polega na krótkiej sonikacji dwufazowej mieszaniny składającej się z lipidu rozpuszczonego w rozpuszczalniku organicznym i buforu wodnego. Następnie, faza organiczna usuwana jest pod niskim ciśnieniem, co finalnie prowadzi do uzyskania wodnej zawiesiny liposomów [139]. Natomiast metoda dializy detergentowej polega na solubilizacji lipidu w roztworze detergentu o stężeniu przewyższającym krytyczne stężenie micelizacji (CMC, ang. *Critical Micelle Concentration*) i kontrolowanym usuwaniu tego detergentu [140]. W ten sposób micele detergentu stają się coraz bardziej nasycone w lipid, co skutkuje utworzeniem się liposomów. Powyższa metoda stosowana jest niekiedy do produkcji liposomów typu LUV.

Natomiast, aby otrzymać liposomy jednowarstwowe typu SUV lub LUV stosuje się modyfikacje metody hydratacji cienkiego filmu lipidowego i technikę wstrzykiwania alkoholowego lub eterowego roztworu lipidu do fazy wodnej [141]. Wspomniane modyfikacje metody hydratacji polegają na rozszerzeniu preparatyki liposomów o etap sonikacji zawiesiny typu MLV (z użyciem łaźni ultradźwiękowej bądź sonikatora zanurzeniowego) lub też o etap homogenizacji pęcherzyków poprzez ich kalibrację z wykorzystaniem membran poliwęglanowych o zdefiniowanym rozmiarze porów. Dużą zaletą takiej kalibracji jest uzyskanie liposomów charakteryzujących się niewielkim rozrzutem wielkości.

Olbrzymie jednowarstwowe liposomy powstają zaś w wyniku procesu elektroformacji, kiedy to przyłożone zewnętrzne pole elektryczne aktywuje spontaniczne pęcznienie lipidu w roztworze wodnym [142]. Metoda polega na naniesienia lipidu rozpuszczonego w rozpuszczalniku organicznym na elektrody platynowe, tytanowe bądź szkło powlekane tlenkiem cyny indu (ITO, ang. *Indium Tin Oxide*), dokładnego osuszenia lipidu, skontaktowaniu elektrod z roztworem wodnym i podłączenia prądu elektrycznego. Proces elektroformacji prowadzi się zwykle przez dwie godziny z zachowaniem odpowiedniego napięcia i częstotliwości przyłożonego pola elektrycznego [143]. Warto zaznaczyć w tym momencie, iż mimo że poszczególne techniki preparatyki liposomów znacznie różnią się od siebie, mają również cechę wspólną. Jest nią zapewnienie wymaganej temperatury podczas preparatyki. Temperatura ta powinna przewyższać temperaturę przejścia fazowego używanego lipidu, gdyż lipidy występując w fazie żelu (w temperaturze niższej niż temperatura przejścia fazowego) mogą nie utworzyć zamkniętych, ciągłych struktur [132].

3.2.3. Zastosowanie liposomów

Liposomy są obecnie szeroko wykorzystywane między innymi w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz w medycynie. W przemyśle spożywczym pełnią funkcję nośników aromatów, enzymów, barwników, konserwantów, witamin czy też przeciwutleniaczy [144]. Dzięki swojej budowie zdolne są do transportu zarówno substancji o charakterze hydrofilowym, jak i o charakterze hydrofobowym. Ta właściwość w połączeniu z biokompatybilnością, biodegradowalnością, zdolnością do poprawy stabilności i rozpuszczalności zamykanych w nich substancji oraz możliwością dostrajania właściwości liposomów, zwłaszcza ładunku powierzchniowego, w zależności od aktualnych potrzeb determinują dużą popularność liposomów w dzisiejszym świecie [135,145,146]. Ciekawym, a zarazem innowacyjnym doniesieniem z zakresu przemysłu spożywczego jest na przykład, potwierdzony eksperymentem, korzystny wpływ zastosowania liposomów w produkcji sera. Okazuje się, że enkapsulacja proteinaz w liposomach skraca czas dojrzewania serów o 30-50%, co w efekcie generuje znaczne korzyści finansowe [147,148]. Eksperymentalne zamykanie witamin E i C w pęcherzykach lipidowych potwierdziło natomiast hipotezę, iż formulacje liposomowe pełnią funkcję ochronną witamin nawet w warunkach pasteryzacji [149]. Inne badania dowiodły, że zastosowanie liposomów poprawia rozpuszczalność i biodostępność kurkuminy – związku wykazującego nie tylko właściwości przeciwutleniające, ale i przeciwbakteryjne oraz przeciwproliferacyjne [150].

W przemyśle kosmetycznym liposomy są ważnym składnikiem preparatów do pielęgnacji skóry, przy czym najprostszą formą liposomów stosowanych w kosmetykach są tak zwane liposomy puste, czyli liposomy bez dodatku substancji aktywnej [151]. Pozwalają one na wyrównanie poziomu lipidów w skórze [152]. Natomiast substancjami dodatkowymi, kluczowymi w pielęgnacji i podawanymi często w postaci liposomalnej są: proteiny (kolagen, elastyna), witaminy, ekstrakty roślinne, koenzym Q10 i kwas hialuronowy. Formy liposomowe tych substancji charakteryzują się bowiem istotnie zwiększoną przyswajalnością w porównaniu z formami nieliposomowymi [153]. Powodem tego zjawiska są niewielkie rozmiary liposomów oraz ich strukturalne podobieństwo do budowy skóry [151]. Bazując na stabilnej zawiesinie liposomowej, udało się na przykład opracować alternatywę dla niewygodnych maści z witaminą K1, ponieważ nowa formuła charakteryzowała się efektywniejszą akumulacją substancji aktywnej zarówno w naskórku, jak i w skórze właściwej [154]. Inne badania pokazały, że zastosowanie nośników

lipidowych zwiększa zarówno penetrację koenzymu Q10 przez skórę, jak i ogólną stabilność fizykochemiczną przygotowanej emulsji [155].

W przemyśle farmaceutycznym i medycynie pęcherzyki lipidowe mają zastosowanie terapeutyczne i diagnostyczne [156]. Używane są często jako nośniki leków [157], nośniki materiału genetycznego [158], a także jako nośniki środków kontrastowych do badań rezonansem magnetycznym, czy też do tomografii komputerowej i ultrasonografii [159]. Obrazowe przedstawienie liposomów jako nośników różnorodnych substancji wraz z uwzględnieniem lokalizacji transportowanego związku w dwuwarstwie lipidowej pokazano na Rysunku 10.



Rysunek 10. Schematyczne przedstawienie liposomu jako nośnika różnorodnych substancji wraz z uwzględnieniem ich rozmieszczenia w dwuwarstwie lipidowej [160].

Wśród zastosowań farmakologicznych na uwagę zasługuje przede wszystkim podawanie liposomalnych zawiesin leków w terapii przeciwnowotworowej, w terapii przeciw wirusowi HIV oraz w przypadku leczenia ciężkich infekcji grzybiczych. Jak wykazano, zastosowanie pęcherzyków lipidowych powoduje wyraźne zmniejszenie kardiotoksyczności leków onkologicznych przy jednoczesnym zwiększeniu ich cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych [161,162]. Poza tym użycie preparatów liposomowych zwiększa stopień dostarczania leku do obszarów zmienionych chorobowo, co związane jest z wysoką przepuszczalnością wobec liposomów naczyń krwionośnych zasilających guzy nowotworowe i z długim czasem krążenia liposomów w krwiobiegu [163]. Przykładem są opracowane specjalne układy liposomowe, które transportują leki przeciwnowotworowe na bazie platyny [164]. Ważnym aspektem jest również możliwość modyfikowania powierzchni liposomów w celu nakierowania ich na odpowiednie tkanki, czy też w celu optymalizacji procesów zamykania i uwalniania leku [165–167]. Takie dostrajanie liposomów może polegać na pokryciu struktury liposomów polimerem obojętnym chemicznie (np. glikolem polietylenowym), przyłączeniu dodatkowego ligandu (np. przeciwciało, białko, peptyd) lub przyłączeniu ugrupowania wrażliwego na bodźce (np. wrażliwego na zmianę temperatury czy zmianę pH) [168]. Znanym rozwiązaniem jest na przykład kierunkowe przenoszenie doksorubicyny do komórek raka płuc poprzez specyficzne przeciwciała przyłączone do powierzchni liposomów [169,170].

Jak wcześniej wspomniano, formulacje liposomowe są również pomocne w przypadku terapii przeciw wirusowi HIV i w leczeniu ciężkich infekcji grzybiczych. Udowodniono, że zastosowanie pęcherzyków lipidowych zwiększa aktywność leków przeciwretrowirusowych [171]. Wzmianki na temat zastosowania liposomów jako nośników środków przeciwwirusowych w leczeniu HIV pojawiły się w literaturze już w 1991 roku, kiedy sprawdzono użyteczność liposomowej formy pierwszego zatwierdzonego do leczenia HIV leku [172]. Z kolei stosowalność liposomów w terapii infekcji grzybiczych wynika przede wszystkim ze zwiększenia efektywności i zmniejszenia toksyczności leków przeciwgrzybiczych, gdy aplikowane są w formie zawiesiny liposomowej [173–175]. Wydaje się to szczególnie istotne w przypadku amfoterycyny B – leku należącego do grupy farmaceutyków ratujących życie i stosowanego mimo powodowania poważnych skutków ubocznych. Na przestrzeni lat prowadzono liczne badania, które potwierdziły pozytywny efekt zamykania amfoterycyny B w pęcherzyki lipidowe [176–179]. Obok obniżenia toksyczności leku, jako zaletę wymieniano poprawę skuteczności leczenia związaną z możliwością podania wyższych dawek leku [180].

3.2.4. Metody badania liposomów

Istnieje wiele technik badania różnych właściwości liposomów, takich jak: rozmiar, rozkład wielkości, potencjał elektrokinetyczny, ilość i struktura dwuwarstw lipidowych, morfologia, struktura krystaliczna, właściwości termiczne, efektywność enkapsulacji i przepuszczalność dwuwarstw lipidowych. Często podejmowane są również próby wyjaśnienia procesu solubilizacji liposomów. Poniżej zostaną szerzej przedstawione metody badania liposomów, które zostały wykorzystane w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.

3.2.4.1. Pomiar rozkładu wielkości i współczynnika polidyspersyjności

W celu określenia wielkości cząstek rozproszonych w układzie koloidalnym oraz ich współczynników polidyspersyjności (PDI, ang. Polydispersity Index) stosuje się najczęściej technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. Dynamic Light Scattering) znaną również jako spektroskopia korelacji fotonów (PCS, ang. Photon Correlation Spectroscopy) [181]. Technika ta, bazując na zjawisku elastycznego rozpraszania światła przez cząstki poruszające się ruchami Browna, pozwala na wyznaczenie (zależnych od wielkości) współczynników dyfuzji tych cząstek. Małe cząstki dyfundują szybko, dlatego też w ich przypadku detektor w danym przedziale czasowym zarejestruje gwałtowne zmiany rozproszonego promieniowania. Natomiast intensywności duże cząstki będą charakteryzowały się wolniejszą dyfuzją, więc fluktuacje intensywności światła rozproszonego będą mniejsze. Mając określony współczynnik dyfuzji, wielkość cząstek, a ściślej – ich średnicę hydrodynamiczną (D_h), wyznacza się z równania Stokesa-Einsteina [182]:

$$D_{\tau} = \frac{kT}{3\pi\eta D_h} \tag{9}$$

w którym: D_{τ} to współczynnik dyfuzji, k – stała Boltzmanna, T – temperatura, a η – lepkość rozpuszczalnika.

Aparatura badawcza, taka jak Zetasizer Nano ZS firmy Malvern w jednoczesnym pomiarze wielkości cząstek dokonuje pomiaru współczynnika polidyspersyjności. Na podstawie jego wartości ocenia się stopień jednorodności cząstek w analizowanej próbce [183]. Minimalną wartością PDI jest 0, a maksymalną 1. Ogólnie przyjęto, że kiedy współczynnik polidyspersyjności jest mniejszy od 0,1 – układ jest monodyspersyjny. Gdy przyjmuje wartości z zakresu od 0,1 do 0,7 – jest układem bliskim monodyspersyjności. Natomiast, jeśli PDI jest większy od 0,7 – układ jest polidyspersyjny, co przejawia się szerokim rozkładem rozmiarów cząstek w roztworze [181].

Pomiary rozmiaru oraz współczynnika polidyspersyjności znajdują zastosowanie między innymi do badania jednorodności białek, kwasów nukleinowych, kompleksów białko-białko, kompleksów białko-kwas nukleinowy czy też do badania oddziaływań białek z małymi cząsteczkami [181,184,185]. Są też niezwykle przydatne w badaniach liposomów – szczególnie tych, które dotyczą projektowania potencjalnych nośników leków. Dzieje się tak, ponieważ w wielu przypadkach to właśnie rozmiar liposomów decyduje o efektywności terapeutycznej oraz skuteczności liposomowej formulacji leku [186–189].

3.2.4.2. Potencjał dzeta

Potencjał elektrokinetyczny, zwany też potencjałem dzeta (potencjał ζ) jest potencjałem elektrycznym cząstki poruszającej się pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, który występuje w płaszczyźnie poślizgu [190]. Badania dowodzą, iż płaszczyzna ta w większości przypadków znajduje się w części dyfuzyjnej podwójnej warstwy elektrycznej i jest niejako łącznikiem między nieruchomą warstwą adsorpcyjną a poruszającą się warstwą dyfuzyjną [191]. Schematyczną definicję potencjału dzeta opartą na modelu Sterna podwójnej warstwy elektrycznej oraz położenie płaszczyzny poślizgu przedstawia Rysunek 11.



Rysunek 11. Schematyczna definicja potencjału dzeta [192].

Potencjał elektrokinetyczny wyznacza się poprzez pomiar ruchliwości elektroforetycznej analizowanych cząstek [193]. Standardowo dokonuje się tego techniką elektroforetycznego rozpraszanie światła (ELS, ang. *Electrophoretic Light Scattering*), gdzie w wyniku działania pola elektrycznego naładowane cząstki zaczynają się poruszać i w związku z tym rozpraszać padające na nie światło laserowe. Takie rozproszone światło będzie charakteryzowało się zmienioną w stosunku do wiązki lasera częstotliwością, zaś

różnica między nimi będzie proporcjonalna do prędkości migracji cząstki. W konsekwencji umożliwi to wyznaczenie wspomnianej ruchliwości elektroforetycznej. Ta przeliczana jest dalej na potencjał elektrokinetyczny poprzez zastosowanie równań: Henry'ego – równanie (10), Helmholtza-Smoluchowskiego – równanie (11) lub Hückla – równanie (12) [194]:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \tag{10}$$

$$\mu_e = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \tag{11}$$

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \tag{12}$$

W powyższych równaniach: μ_e to ruchliwość elektroforetyczna, ε to przenikalność elektryczna roztworu, η to lepkość roztworu, a wyrażenie $f(\kappa a)$ – funkcja Henry'ego, w której: κ , a dokładniej κ^{-1} to grubość podwójnej warstwy elektrycznej, a a to promień analizowanych cząstek [195].

Grubość podwójnej warstwy elektrycznej wylicza się z następującej zależności [195]:

$$\kappa^2 = \frac{F^2 \sum c_i z_i}{\varepsilon_r \varepsilon_0 RT} \tag{13}$$

w której: F oznacza stałą Faradaya, c_i stężenie jonu *i*-tego w roztworze, z_i ładunek jonu *i*-tego w roztworze, ε_r względną przenikalność elektryczną, ε_{θ} przenikalność elektryczną próżni, R stałą gazową, T temperaturę.

Wybór równania odpowiedniego do przeliczenia ruchliwości elektroforetycznej na potencjał dzeta zależny jest od stosunku grubości podwójnej warstwy elektrycznej do promienia badanej cząstki [191].

Znajomość potencjału elektrokinetycznego liposomów dostarcza informacji na temat oddziaływań elektrostatycznych występujących pomiędzy cząstkami układu koloidalnego, a tym samym umożliwia kontrolowanie ich właściwości stabilizacyjno–flokulacyjnych [132]. Są to cechy kluczowe przy rozważaniach na temat aspektów aplikacyjnych błon liposomowych. Badania dotyczące potencjału elektrokinetycznego liposomów opierają się najczęściej na dwóch aspektach: badany jest potencjał elektrokinetyczny liposomów o różnych rozmiarach oraz o różnym składzie warstwy lipidowej, a także analizowana jest zmiana potencjału dzeta w wyniku dodatku do układu substancji trzeciej [196–201]. Zwykle dodatek ten wpływa pozytywnie na właściwości liposomów, co otwiera nowe perspektywy wykorzystania. Ponadto, znając potencjał elektrokinetyczny liposomów, można wyliczyć potencjał powierzchniowy, a następnie ładunek powierzchniowy liposomów, co pozwala na pełniejszy opis badanych układów [202]. Do obliczeń potencjału powierzchniowego, ψ_{θ} , stosuje się równanie (14) [203]:

$$\frac{\tanh\left(\frac{z_iF}{4RT}\zeta\right)}{\tanh\left(\frac{z_iF}{4RT}\psi_0\right)} = \exp(-\kappa x)$$
(14)

W równaniu tym: x to odległość wskazująca płaszczyznę poślizgu, przy której rozważany jest potencjał dzeta, a pozostałe symbole mają swoje standardowe znaczenie. Zgodnie z danymi literaturowymi przyjmuje się, że x wynosi 0,24 nm [204]. Natomiast w celu obliczenia ładunku powierzchniowego, σ_0 , stosować można równanie (15) lub równanie (16) [202]:

$$\sigma_0 = \left(8RTc\varepsilon_r\varepsilon_0\right)^{\frac{1}{2}} \sinh\left(\frac{z_iF}{2RT}\psi_0\right) \tag{15}$$

$$\sigma_0 = (8n\varepsilon_r\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}} \left[\sinh\left(\frac{e\psi_0}{2kT}\right) + \frac{2}{\kappa_a} \tanh\left(\frac{e\psi_0}{4kT}\right) \right]$$
(16)

Równanie (15) jest odpowiednie dla płaskiego modelu podwójnej warstwy elektrycznej, a równanie (16) dla modelu sferycznego [202]. W równaniu (16) n oznacza liczbę jonów w jednostce objętości (m³). Pozostałe symbole mają swoje standardowe znaczenia.

3.2.4.3. Pomiar światła rozproszonego pod kątem 90°

Technika zwana prawokątowym rozpraszaniem światła (RALS, ang. *Right-Angle Light Scattering*) jest specyficzną formą metod opartych na zjawisku statycznego rozpraszania światła (SLS, ang. *Static Light Scattering*), w której pomiaru rozpraszania dokonuje się pod kątem 90° [205]. Główną różnicą między metodą statycznego rozpraszania światła a opisaną wcześniej metodą DLS jest to, iż w metodach statycznych obserwacji i rejestracji podlega uśredniona w czasie intensywność światła rozproszonego, podczas gdy w dynamicznym rozpraszaniu światła analizuje się, jak intensywność rozproszonego światła zmienia się w funkcji czasu [205]. Pomiar statycznego rozpraszania światła jest techniką stosowaną przede wszystkim do wyznaczania masy cząsteczkowej makrocząsteczek, takich jak białka czy polimery. Jednakże technika RALS, najefektywniej sprawdza się w analizie makromolekuł o rozmiarach stosunkowo małych, gdyż dla takich materiałów prawdziwe

jest założenie, iż sygnał rozpraszania zmierzony pod kątem 90° jest taki sam jak sygnał zmierzony pod kątem 0°. Przy czym szczególny potencjał wykorzystania RALS dostrzega się we wczesnym wykrywaniu procesu agregacji makromolekuł [206–208].

Z kolei w badaniu liposomów technika RALS pomocna jest w monitorowaniu procesu solubilizacji pęcherzyków lipidowych [209,210]. Proces ten zachodzi z udziałem detergentu i szerzej opisany jest w dalszej części niniejszej rozprawy. W tym miejscu warto zaznaczyć, że z powodu mniejszego rozpraszania światła przez micele w trakcie obserwacji procesu solubilizacji liposomów pod wpływem związków powierzchniowo czynnych będzie miała miejsce wyraźna zmiana intensywności rejestrowanego sygnału w stosunku do sygnału generowanego pierwotnie przez liposomy.

4. Związki powierzchniowo czynne jako substancje modyfikujące właściwości modelowych biomembran

Właściwości modelowych błon biologicznych podatne są na zmiany spowodowane obecnością w układzie doświadczalnym substancji trzecich. Bardzo często dodatkowe substancje są włączane do układu celowo, by na przykład poprawić właściwości użytkowe liposomów [211]. Może się jednak zdarzyć, że zostały dodane nieświadomie, przez co zakłamują wynik eksperymentu. Substancjami, które mają istotny wpływ na właściwości błon biologicznych są, chociażby: guanidyny [212,213], karotenoidy [214,215] i związki powierzchniowo czynne [216,217].

Związki powierzchniowo czynne, znane również jako surfaktanty czy detergenty, są związkami chemicznymi, które gromadzą się na granicy faz i już przy niskich stężeniach obniżają napięcie powierzchniowe cieczy, w której są rozpuszczone i/lub napięcie międzyfazowe z innymi fazami [218,219]. Przyczyną takiego zachowania jest budowa cząsteczki środków powierzchniowo czynnych zawierających dwie strukturalnie odrębne części: niepolarną lub słabo polarną oraz silnie polarną, orientujące się różnorako na granicy międzyfazowej. Część niepolarną stanowi zwykle alifatyczny łańcuch węglowodorowy. Zawiera on od 8 do 18 atomów węgla i może być rozgałęziony, nierozgałęziony lub utworzony przez węglowodór aromatyczny [220]. Z kolei ugrupowanie polarne w większości przypadków tworzą reszty kwasowe lub zasadowe wymienione w Tabeli 2.

| Grupy kwasowe | Grupy zasadowe |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| karboksylowa –COOH siarczanowa –OSO ₃ H sulfonowa –SO ₃ H fosforanowa –OPO(OH) ₂ | aminowa pierwszorzędowa –NH ₂ aminowa drugorzędowa –NHR aminowa trzeciorzędowa –NR ₂ amoniowa czwartorzędowa [–NR ₃] ⁺ pirydynowa [–NC ₅ H ₅] ⁺ |

Tabela 2. Grupy hydrofilowe występujące najczęściej w strukturze surfaktantów [221].

Mogą to być również: grupa alkoholowa, tiolowa czy też reszty cukrów prostych lub złożonych [221]. W obrębie cząsteczki surfaktantu mogą występować także dodatkowe grupy, których funkcją jest łączenie jej elementów strukturalnych [221]. Są to: grupa estrowa, amidowa, iminowa, eterowa oraz tioeterowa.

4.1. Klasyfikacja związków powierzchniowo czynnych

Surfaktanty dzieli się w zależności od następujących kryteriów: pochodzenie surowców stosowanych do produkcji surfaktantów (surfaktanty oparte na surowcach nieodnawialnych i surfaktanty oparte na surowcach odnawialnych), właściwości aplikacyjne surfaktantów (surfaktanty zwilżające, dyspergujące, pieniące, piorące, emulgatory, antyemulgatory i solubilizatory), oddziaływanie surfaktantów na środowisko (surfaktanty chemodegradowalne, biodegradowalne, trudnodegradowalne i niedegradowalne) oraz natura chemiczna surfaktantów (surfaktanty jonowe i niejonowe) [222]. Ostatnia z wymienionych klasyfikacji bazuje na zdolności związków powierzchniowo czynnych do dysocjacji w roztworach wodnych i pośród surfaktantów jonowych wyróżnia: surfaktanty anionowe, surfaktanty kationowe oraz surfaktanty amfoteryczne [223].

Surfaktanty anionowe są to związki amfifilowe, które w środowisku wodnym dysocjują, tworząc przy tym powierzchniowo czynny anion [224]. Ich grupa hydrofilowa posiada zatem ładunek ujemny. Surfaktanty anionowe charakteryzują się prostotą otrzymywania, niskim kosztem produkcji, korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi oraz dobrą biodegradowalnością, co czyni je grupą surfaktantów o istotnym znaczeniu użytkowym [225]. Reprezentantem tej grupy związków jest dodecylosiarczan sodu (SDS), który jest analizowany w części eksperymentalnej niniejszej pracy. Składa się on z 12-węglowego łańcucha alifatycznego i grupy siarczanowej. Jego strukturę przedstawia Rysunek 12.



Rysunek 12. Wzór strukturalny wybranego surfaktantu anionowego.

Surfaktanty kationowe to z kolei substancje, których grupa hydrofilowa charakteryzuje się ładunkiem dodatnim [218]. W środowisku wodnym tworzą więc powierzchniowo czynny kation. Produkcja tego typu surfaktantów jest już bardziej skomplikowana i wymaga poniesienia zdecydowanie większych kosztów, niż to było w przypadku surfaktantów anionowych [226]. W związku z tym są one rzadziej stosowane. Do surfaktantów kationowych należą: bromek dodecylotrimetyloamoniowy (DTAB) – zbudowany z 12-węglowego łańcucha alifatycznego i czwartorzędowej grupy amoniowej, bromek tetradecylotrimetyloamoniowy (TTAB) – tworzony przez 14-węglowy łańcuch alifatyczny i tę samą grupę amoniową, a także bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) – w skład którego wchodzi 16-węglowy łańcuch alifatyczny i czwartorzędowa grupa amoniowa. Struktury tych surfaktantów przedstawiono na Rysunku 13.



Rysunek 13. Wzory strukturalne wybranych surfaktantów kationowych.

Znane są również surfaktanty, które w swojej strukturze posiadają jednocześnie grupę anionową oraz grupę kationową. Są to tak zwane surfaktanty amfoteryczne [226]. Stanowiąc nośnik zarówno dodatniego, jak i ujemnego ładunku, związki te oddziałują z szeroką gamą substancji. Jednak, ze względu na kosztowność produkcji, ich aplikacja
ograniczona jest do zastosowań specjalnych. Warto wspomnieć, iż surfaktantami amfoterycznymi są glicerofosfolipidy, których charakterystyka została przedstawiona w rozdziale 2.1. [227].

Natomiast surfaktanty niejonowe to związki amfifilowe zawierające w swojej budowie niejonowe grupy hydrofilowe [218]. Substancje te cechują się brakiem zdolności do dysocjacji elektrolitycznej w roztworach wodnych i zerowym ładunkiem. Są chętnie wykorzystywane przemysłowo, co rzutuje na ich duże zapotrzebowanie produkcyjne. Przedstawicielem tej grupy związków jest używany w niniejszej pracy Triton X-100. Jego część hydrofobową stanowi podstawnik węglowodorowy wraz z pierścieniem fenolowym, a część hydrofilową – grupa polioksyetylenowa (Rysunek 14).



Rysunek 14. Wzór strukturalny wybranego surfaktantu niejonowego.

Najbardziej ogólna klasyfikacja surfaktantów jest jednak podział na: surfaktanty naturalne i surfaktanty syntetyczne. Surfaktanty naturalne, zwane również biosurfaktantami, to surfaktanty syntezowane przez żywe komórki, które w porównaniu z syntezowanymi metodami chemicznymi surfaktantami syntetycznymi cechują się lepszą biodegradowalnością i biokompatybilnością oraz mniejszą toksycznością, mimo że bywają równie skuteczne [228]. Dlatego też uważa się, że są one zieloną alternatywą surfaktantów syntetycznych [229,230]. Niemniej jednak ze względu na wysoki koszt i problematyczne oczyszczanie produkcja biosurfaktantów pozostaje na razie ograniczona. Jak podano, światowy rynek surfaktantów w 2012 roku osiągnął około 26,9 mld dolarów amerykańskich, z czego rynek biosurfaktantów stanowił nie więcej niż 12% [231]. Procentowy wkład poszczególnych podkategorii związków powierzchniowo czynnych w ogólny światowy rynek surfaktantów w 2012 roku ilustruje Rysunek 15.

Światowy rynek surfaktantów w 2012 roku:





Jak widać, najważniejszymi grupami surfaktantów były wówczas surfaktanty niejonowe oraz anionowe. W badaniu przewidywano wzrost wartości rynku surfaktantów, w którym procentowy udział kolejnych grup surfaktantów zostałby, przynajmniej do 2020 roku, zachowany na analogicznym poziomie [231]. Szacunki okazały się prawidłowe, gdyż światowy rynek surfaktantów w 2020 roku wyniósł blisko 39,5 mld dolarów [232], gdzie udział biosurfaktantów stanowił około 3,7 mld dolarów [233]. Zatem, surfaktanty syntetyczne wciąż determinują światowy rynek surfaktantów i prawdopodobnie jeszcze długo będą tworzyły jego trzon.

4.2. Najważniejsze właściwości związków powierzchniowo czynnych

Omawiając charakterystykę związków powierzchniowo czynnych, wspomnieć należy o ich specyficznych właściwościach: zdolności do asocjacji micelarnej oraz zdolności do solubilizacji substancji hydrofobowych. W roztworach wodnych o niewielkim stężeniu cząsteczki surfaktantów przybierają bowiem formę monomeryczną. Jednak, gdy tylko stężenie surfaktantu przekroczy pewną maksymalną wartość, zwaną krytycznym stężeniem micelizacji (CMC), ulegają one procesowi samoasocjacji i zaczynają tworzyć większe agregaty – micele [234]. Micele mogą przyjmować różne kształty np. kształt sfery, cylindra czy też dysku [235], a proces ich tworzenia–rozpadania się jest dynamiczny i ściśle zależny od koncentracji związku powierzchniowo czynnego [236,237]. Wartość stężenia

odpowiadająca CMC jest cechą charakterystyczną danego surfaktantu. Aczkolwiek zmienia się w zależności od rodzaju rozpuszczalnika, temperatury i ciśnienia [221].

Tworzenie micel przez cząsteczki surfaktantów determinuje zdolność związków powierzchniowo czynnych do solubilizacji substancji hydrofobowych, w tym pęcherzyków lipidowych. Pojęcie: "solubilizacja" należy rozumieć jako samorzutne wchłanianie substancji hydrofobowych przez agregaty micelarne związku powierzchniowo czynnego, mające na celu utworzenie termodynamicznie stabilnego roztworu charakteryzującego się zmniejszoną aktywnością termodynamiczną [238]. Proces ten opisuje, pokazany na Rysunku 16, trójstopniowy model solubilizacji dwuwarstw lipidowych, w którym [239–242]:

- Etap I → obejmuje podział detergentu pomiędzy dwuwarstwę i fazę wodną bez tworzenia struktur micelarnych,
- Etap II → odnosi się do współistnienia mieszanych dwuwarstw detergentowolipidowych z micelami detergentowo-lipidowymi,
- Etap III → obejmuje rozpad dwuwarstw lipidowych, gdy stężenie surfaktantu przewyższa jego CMC.



Rysunek 16. Schematyczne przedstawienie trójstopniowego modelu solubilizacji dwuwarstwy lipidowej [243].

Znaczenie procesu solubilizacji jest szczególnie istotne w przypadku dążenia do zwiększenia rozpuszczalności związków naturalnie nierozpuszczalnych w danym środowisku [244,245].

Surfaktanty mają również inne unikalne właściwości, które warunkują ich możliwości aplikacyjne, takie jak: aktywność biologiczna, biostatyczna i biobójcza

[246,247], właściwości pianotwórcze [248], właściwości zwilżające [249,250], właściwości zmiękczające [251], właściwości emulgujące [252,253] oraz antystatyczne [254,255].

4.3. Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych

Związki powierzchniowo czynne występują powszechnie w dzisiejszym świecie jako niezbędne składniki środków myjących, kosmetyków, produktów do powlekania (farb, lakierów) oraz produktów papierowych i celulozowych [256-258]. Znajdują również zastosowanie w ochronie roślin i zwalczaniu szkodników [259], a także w usuwaniu różnego rodzaju zanieczyszczeń [260]. Jak podano, takie surfaktanty jak dodecylobenzenosulfonian sodu i Tween 20 skutecznie usuwają chlorowane lotne związki organiczne z gazów spalinowych [261]. Z kolei zastosowanie membrany polieterosulfonowej i anionowego SDS posłużyło do wydajnego i opłacalnego usuwania zanieczyszczeń organicznych o niskiej masie cząsteczkowej z wody [262]. Co ciekawe, w badaniu zwrócono uwagę na synergistyczny efekt działania SDS i Brij 35 w usuwaniu aniliny [262]. Idac dalej, surfaktanty wykorzystywane są także w różnorodnych procesach chemicznych – zarówno w postaci reagentów, jak i katalizatorów reakcji chemicznych [263-265]. W obrębie zagadnień katalitycznych okazują się być efektywną platformą wspomagającą syntezę fotokatalizatorów, gdzie ich rola dotyczy zwiększania aktywności fotokatalicznej fotokatalizatorów oraz regulacji morfologii i struktury fotokatalizatorów [266]. Ponadto, związki powierzchniowo czynne zajmują ważne miejsce w medycynie i badaniach biomedycznych, gdzie są angażowane między innymi w izolację białek oraz projektowanie produktów o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwdrobnoustrojowych [267,268].

Środki powierzchniowo czynne są także często włączane w strukturę pęcherzyków lipidowych transportujących substancje bioaktywne w organizmie, w celu skorygowania ich właściwości i usprawnienia systemu dostarczania leków [269–271]. Korzystne działanie dodatku surfaktantów do suspensji liposomów wynika przede wszystkim z ich zdolności do modyfikowania ładunku elektrostatycznego pęcherzyków lipidowych [217]. Jest to szczególnie istotne ze względu na fakt, że ładunek liposomów wpływa bezpośrednio na ich stabilność [272]. Stwierdzono na przykład, że duży ładunek ujemny jest korzystny w przypadku optymalizacji elastycznych liposomów używanych do transdermalnego dostarczania pentoksyfiliny [273]. Włączenie anionowego środka powierzchniowo czynnego do pęcherzyków lipidowych zapewniło ponadto skuteczne przenikanie insuliny przez barierę przepuszczalności skóry ssaków [274]. Z drugiej strony, poprzez nowatorskie

użycie kationowych środków powierzchniowo czynnych jako wektorów do dostarczania genów, surfaktanty przyczyniły się do rozwoju terapii genowej [275–277]. Z kolei, mieszane liposomy utworzone z lipidu POPC i z ramnolipidów polecono do użycia jako systemu nanonośników w celu zwiększenia aktywności przeciwbakteryjnej peptydów [278], a biosurfaktant z grupy mannolipidów okazał się wzmacniać efekt przeciwnowotworowy pęcherzyków niosących kwas betulinowy [279]. Surfaktanty mogą też stanowić specjalne powłoki dla nanocząstek, które poprawiają ich elastyczność i zdolność dystrybucji farmaceutyków [280,281].

Wspomniane w tym paragrafie ważne zastosowania surfaktantów zachęciły do przeprowadzenia eksperymentów opisanych w części doświadczalnej niniejszej rozprawy. Wiedząc bowiem, że niejednokrotnie surfaktanty celowo dodawane są do liposomowej formulacji leku, zweryfikować należy czy ich nieznaczne ilości (takie, które mogą być wprowadzone do układu nieświadomie) również wpływają znacząco na właściwości użytkowe modelowych błon. Zwłaszcza że jest to dotąd nierozwiązane pytanie.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

5. Stosowane odczynniki

Do przeprowadzenia eksperymentów opisywanych w niniejszej pracy użyto następujących odczynników:

• lipidy:

 – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DPPC), czystość >99%, Avanti Polar Lipids (USA),

 2-oleoilo-1-palmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (POPC), czystość >99%, Avanti Polar Lipids (USA),

 – 1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DOPC), czystość >99%, Avanti Polar Lipids (USA),

– cholesterol, czystość >99%, Avanti Polar Lipids (USA).

Substancje te były używane bez dodatkowego oczyszczania.

• surfaktanty:

– Triton X-100, czystość >99%, Chempur (Polska),

- dodecylosiarczan sodu (SDS), czystość >99%, Fluka (USA),
- bromek dodecylotrimetyloamoniowy (DTAB), czystość >99%, Sigma-Aldrich (USA),

bromek tetradecylotrimetyloamoniowy (TTAB), czystość >98%, Sigma-Aldrich (USA),

bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB), czystość >96%, Sigma-Aldrich (USA).

Surfaktanty były używane bez dodatkowego oczyszczania.

• rozpuszczalniki organiczne:

- chloroform (99,9%), Sigma-Aldrich (USA),

- metanol (99,9%), Sigma-Aldrich (USA),
- etanol (>99,8%), Avantor Performance Materials Poland S.A (Polska),
- izopropanol (p.p.a.), P.P.H. "STANLAB" Sp. z o.o. (Polska).
- bufor: do sporządzenia roztworu buforowego użyto:
 - Tricine (>99%), Sigma-Aldrich (USA),
 - KCl (p.p.a), Chempur (Polska),

- KOH (p.p.a), Chempur (Polska).

Do badań stosowano wodę oczyszczoną w systemie Milli-Q (Millipore, USA), której oporność wynosiła 18,2 M Ω ·cm.

6. Układy pomiarowe i metodyka pomiarów

Wykonany eksperyment polegał na zbadaniu wpływu niewielkich ilości związków powierzchniowo czynnych zróżnicowanych pod względem natury chemicznej i długości łańcucha hydrofobowego na wybrane właściwości modelowych błon biologicznych. Jako modele biomembran zastosowano:

- monowarstwy Langmuira,
- liposomy typu SUV (oraz porównawczo typu GUV).

Ponieważ oddziaływania różnych substancji z błoną biologiczną zależą między innymi od składu lipidowego samej błony, do badań włączono układy modelowe utworzone z lipidów o zróżnicowanym stopniu nasycenia oraz zawartości cholesterolu. Zestawienie stosowanych układów pomiarowych zawarto w Tabeli 3.

| | DPPC | РОРС | DOPC | DPPC + 30 mol % Chol |
|------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Monowarstwy lipidów | + Triton X-100 + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB |
| Liposomy | + Triton X-100 + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB | + SDS + DTAB + TTAB + CTAB |

Tabela 3. Badane układy pomiarowe.

6.1. Wyznaczanie CMC surfaktantów

Przewodność właściwą i napięcie powierzchniowe roztworów surfaktantów o różnych stężeniach mierzono odpowiednio za pomocą wielofunkcyjnego urządzenia Elmetron CX-601 (Elmetron, Polska) i automatycznego tensjometru KSV Sigma 700 (KSV, Finlandia) z użyciem pierścienia du Nouya. Miernik przewodnictwa skalibrowano za pomocą dwupunktowej kalibracji przy użyciu standardowych roztworów kalibracyjnych o przewodności właściwej 84 i 1413 µS/cm (VWR Chemicals, USA). Pomiary wykonano w temperaturze 25°C.

6.2. Monowarstwy Langmuira

Określano następujące właściwości monowarstw Langmuira: stan fizyczny monowarstwy, ściśliwość monowarstwy, zmiany orientacji cząsteczek substancji filmotwórczej podczas kompresji monowarstwy, morfologię monowarstwy oraz zmiany ciśnienia powierzchniowego odpowiednio skompresowanej monowarstwy na skutek inkorporacji związku powierzchniowo czynnego. Procedury wykonania poszczególnych eksperymentów opisano poniżej.

6.2.1. Pomiar ciśnienia powierzchniowego

Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym rejestrowano za pomocą wagi Langmuira (KSV NIMA) składającej się z teflonowej wanienki, ruchomych barierek, portu iniekcyjnego i mieszadła magnetycznego. Do pomiaru ciśnienia powierzchniowego zastosowano tensjometr Wilhelmy'ego (KSV NIMA) z bibułą filtracyjną (Whatman, UK), która pełniła funkcję czujnika ciśnienia powierzchniowego. Podczas pomiarów utrzymywano stałą temperaturę (25°C), do czego posłużył termostat cyrkulacyjny firmy Julabo (Niemcy). Rejestrację kolejnych izoterm poprzedzało dokładne wyczyszczenie każdego z elementów wagi.

Roztwory poszczególnych lipidów o stężeniu w zakresie 0,2–0,4 mg/ml przygotowano poprzez ich rozpuszczenie w mieszaninie chloroform/metanol (9:1, v:v). Z kolei mieszaninę DPPC/Chol przygotowywano poprzez połączenie odpowiednich objętości roztworów wyjściowych lipidów tak, by zostały zachowane wymagane proporcje poszczególnych składników. Następnie odpowiednią objętość roztworu lipidu/lipidów rozprowadzano na granicę faz powietrze/roztwór wodny za pomocą mikrostrzykawki (Hamilton). Po odparowaniu rozpuszczalników (10 minut), do subfazy wstrzykiwano

roztwory surfaktantów o stężeniu wyjściowym 0,01 M w takich ilościach, by osiągnąć początkowe stężenia w subfazie wodnej równe 2,3 μM i 9,1 μM. Składniki subfazy mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego. Następnie, po 10 minutach od nastrzyku rozpoczynano pomiar, który powtarzano co najmniej dwukrotnie, aby uzyskać zgodne wyniki. Szybkość kompresji monowarstwy wynosiła 10 mm/min.

6.2.2. Pomiar potencjalu powierzchniowego

Zmiany potencjału powierzchniowego filmów Langmuira mierzono za pomocą czujnika potencjału powierzchniowego KSV NIMA sprzężonego z wagą Langmuira tej samej firmy. Elektroda wibrująca znajdowała się 2 mm nad powierzchnią subfazy buforowej, podczas gdy przeciwelektroda była zanurzona w subfazie. Dziesięć minut po napełnieniu korytka wagi świeżym roztworem buforowym wartość potencjału powierzchniowego została wyzerowana. Następnie z subfazy pobrano 1 ml buforu i w tej objętości przygotowano roztwór surfaktantu o odpowiednim stężeniu, który kolejno dodano do subfazy buforowej. Analizowane całkowite początkowe stężenia środka powierzchniowo czynnego w subfazie wynosiły 2,3 μ M i 9,1 μ M. Pięć minut po nastrzyku, na granicy faz bufor/powietrze rozprowadzono roztwór lipidowy, a następnie po 10 minutach odparowywania rozpuszczalników, rozpoczynano kompresję monowarstwy z szybkością 10 mm/min. Temperatura pomiarów wynosiła 25°C. Jako kontrolę zarejestrowano izotermę Δ V–A bez nastrzyku surfaktantu.

6.2.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM)

Eksperyment BAM przeprowadzono przy użyciu mikroskopu UltraBAM (Accurion GmbH, Niemcy) zintegrowanego z wagą Langmuira (NIMA). Mikroskop wyposażony był w laser o mocy 50 mW (długość fali 658 nm) spolaryzowany liniowo w płaszczyźnie padania, obiektyw z 10-krotnym powiększeniem, polaryzator, analizator oraz kamerę CCD. Rozdzielczość przestrzenna wynosiła 2 μm. Procedura pomiarów była analogiczna do opisanej powyżej (sekcja 6.2.1.).

6.2.4. Testy penetracji

Aparatura i procedura opisane w punkcie 6.2.1. zostały również wykorzystane do przeprowadzenia eksperymentów penetracyjnych. Jedyną różnicą było to, że zaraz po odparowaniu rozpuszczalników organicznych z powierzchni subfazy rozpoczynano sprężanie monowarstwy, które prowadzono do momentu osiągnięcia zadanej wartości

ciśnienia powierzchniowego (32 mN/m). Jak bowiem wykazano, w zakresie ciśnień powierzchniowych 30–35 mN/m właściwości takie jak: upakowanie cząsteczek w monowarstwie, ściśliwość monowarstwy czy też stan fazowy monowarstwy są skorelowane z właściwościami dwuwarstw lipidowych o tym samym składzie [46]. Po 20 minutach stabilizacji takiego układu do subfazy ostrożnie wstrzykiwano surfaktant i od tej pory monitorowano zmiany ciśnienia powierzchniowego nie w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym, lecz w funkcji czasu.

6.3. Liposomy

Analiza liposomów obejmowała pomiary rozmiaru i potencjału dzeta pęcherzyków lipidowych po dodaniu surfaktantów zróżnicowanych pod względem natury chemicznej i długości łańcucha węglowego. Standardowa, znana z literatury procedura modyfikacji powierzchni liposomów surfaktantami polega na ich dodaniu do układu na etapie preparatyki liposomów. Z kolei w zaprezentowanej rozprawie związki powierzchniowo czynne włączano do układu zawierającego już przygotowane pęcherzyki lipidowe.

6.3.1. Preparatyka liposomów

Liposomy otrzymano dwiema metodami:

- metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego uzupełnioną o ekstruzję,
- metodą elektroformacji.

Dokładne procedury zastosowane do przygotowania liposomów ilustruje Rysunek 17. Preparatykę przeprowadzono w roztworze buforowym o pH=7,6 składającym się z 20 mM Tricine i 10 mM KCl. Temperatura procesu hydratacji, a także elektroformacji została dobrana tak, by była wyższa od temperatury przejścia fazowego używanego lipidu i wynosiła odpowiednio 47°C w przypadku liposomów otrzymywanych z DPPC i 25°C dla liposomów otrzymywanych z POPC i DOPC. W metodzie hydratacji lipidy rozpuszczano w mieszaninie chloroform/metanol (2:1, v:v), a w metodzie elektroformacji funkcję rozpuszczalnika pełnił etanol. Stężenie lipidów w przygotowanych liposomach wynosiło 2 mg/ml.



Rysunek 17. Schemat preparatyki liposomów.

W celach porównawczych dla lipidu DPPC przeprowadzono eksperyment, w którym dwa surfaktanty (SDS i DTAB) dodano do układu w trakcie preparatyki liposomów. Przygotowano wówczas wyjściowe roztwory SDS i DTAB w mieszaninie chloroform/metanol (2:1, v:v), które dodano w odpowiednich ilościach do roztworu lipidu w pierwszym etapie preparatyki liposomów. Ilości dobrano tak, by stężenia surfaktantów w badanych próbkach wynosiły 2,3 µM i 9,1 µM.

6.3.2. Pomiar dynamicznego rozpraszania światła

Do wyznaczenia wielkości i współczynnika polidyspersyjności liposomów zastosowano analizator Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) wyposażony w laser emitujący promieniowanie o długości fali równej 633 nm. Detektor ustawiony był pod kątem 173°, a pomiary prowadzono w kuwetach typu DTS1060. Analizę przeprowadzono w temperaturze 25°C w roztworze buforowym, który wcześniej zastosowano do uzyskania pęcherzyków lipidowych (20 mM Tricine, 10 mM KCl, pH 7,6). Podczas pomiarów stężenie lipidu wynosiło zawsze 0,078 mg/ml. Związek powierzchniowo czynny dodawany był zazwyczaj do świeżo zsyntezowanej zawiesiny liposomów. Po dodaniu r-ru surfaktantu próbkę mieszano ręcznie przez 1 minutę, przenoszono do kuwety pomiarowej i dokonywano pomiaru. Początkowe stężenia surfaktantów w zawiesinie liposomów wynosiły: 2,3 μM, 4,5 μM i 9,1 μM. W celach porównawczych dwa surfaktanty zostały dodane do układu w trakcie

preparatyki liposomów DPPC. Wówczas próbkę należało tylko przenieść do kapilary pomiarowej i rozpocząć pomiar. Dla każdej próbki wykonano od 3 do 5 pomiarów.

6.3.3. Wyznaczanie potencjału dzeta liposomów

Ruchliwość elektroforetyczną zawiesin liposomów mierzono techniką dynamicznego rozpraszania światła, używając urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). W rozdziale 3.2.4.2. wspomniano, że do przeliczenia ruchliwości elektroforetycznej na potencjał dzeta stosować można: równanie Helmholtza-Smoluchowskiego, równanie Henry'ego bądź równanie Hückla, a wybór odpowiedniego równania zależy od stosunku grubości podwójnej warstwy elektrycznej do promienia badanej cząstki, tj. [194]:

kiedy $\kappa a > 20$, to zastosować należy równanie Helmholtza-Smoluchowskiego,

kiedy $20 > \kappa a > 1$, to zastosować należy równanie Henry'ego,

kiedy $\kappa a < 1$, to zastosować należy równanie Hückla.

Ponieważ *ka* otrzymanych liposomów przewyższało 20, potencjał dzeta wyliczano poprzez zastosowanie równania Helmholtza-Smoluchowskiego (równanie 11).

6.3.4. Wyznaczanie potencjału i ładunku powierzchniowego, powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku oraz liczby ładunków elementarnych przypadających na pojedynczy liposom

Na podstawie otrzymanych wartości średniej średnicy hydrodynamicznej i potencjału dzeta poszczególnych liposomów wyznaczono ich potencjał powierzchniowy (równanie 14), a następnie ładunek powierzchniowy (równanie 15). Do obliczenia ładunku powierzchniowego wybrano płaski model podwójnej warstwy elektrycznej, ponieważ jak wcześniej wykazano, zastosowanie modelu płaskiego i sferycznego podwójnej warstwy elektrycznej prowadzi do otrzymania zbieżnych wyników [202]. Uzyskana wartość ładunku powierzchniowego została następnie wykorzystana do obliczenia powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku oraz liczby ładunków elementarnych przypadających na pojedynczy liposom. Dane teoretyczne niezbędne do przeprowadzenia obliczeń zestawiono w Tabeli 4.

| Wartość | Symbol |
|------------------------------|----------------|
| 96485,33 C/mol | F = |
| 8,314 J×K ⁻¹ /mol | R = |
| 298 K | T = |
| 0,24 nm | $\mathbf{x} =$ |
| 30 mM | c = |
| 8,85×10 ⁻¹² F/m | $\epsilon_0 =$ |
| 78,4 | $\epsilon_r =$ |
| 1,6×10 ⁻¹⁹ C | e = |
| | |

Tabela 4. Stałe wykorzystane do obliczenia potencjału i ładunku powierzchniowego liposomów.

6.3.5. Pomiar światła rozproszonego pod kątem 90°

Pomiaru światła rozproszonego pod kątem 90° dokonano za pomocą spektrofotometru fluorescencyjnego Cary Eclipse (Varian Inc., USA) przy długości fal wzbudzenia i emisji równym 450 nm. Szerokość szczeliny podczas pomiarów wynosiła 2,5 nm. Badaniu podlegały buforowe roztwory SDS i DTAB o objętości równej 1,5 ml i stężeniu 9,1 μM, do których porcjami dodawano świeżo przygotowaną zawiesinę liposomów DPPC, otrzymując układy o stężeniu lipidów wynoszącym: 0,027 mg/ml; 0,053 mg/ml; 0,08 mg/ml oraz 0,016 mg/ml. Stężenie lipidu w wyjściowej zawiesinie pęcherzyków wynosiło 2 mg/ml. Po dodatku liposomów próbkę delikatnie wymieszano i odczekano 5 minut. Analizę przeprowadzono w temperaturze 25°C.

7. Dyskusja wyników

Przedstawione badania dotyczyły analizy wpływu przedstawicieli dwóch głównych grup surfaktantów: niejonowego związku powierzchniowo czynnego (Triton X-100) i surfaktantów jonowych na właściwości modelowych błon biologicznych. Jako surfaktanty jonowe wybrano zarówno surfaktant anionowy (SDS), jak i surfaktanty kationowe (DTAB, TTAB, CTAB), które zostały dobrane tak, by zweryfikować czy wpływ związków powierzchniowo czynnych na właściwości biomembran zależny jest od długości łańcucha hydrofobowego surfaktantu.

7.1. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego (Triton X-100) na właściwości modelowych błon biologicznych

W przeprowadzonych badaniach określono wpływ niejonowego surfaktantu Triton X-100 na właściwości modelowych błon DPPC. Ten niejonowy związek powierzchniowo czynny często pojawia się w literaturze między innymi dlatego, że prowadzi do efektywnej, a przy tym łagodnej lizy komórek [282,283]. W przeprowadzonych badaniach użyto niewielkich stężeń Tritonu X-100, które w przybliżeniu są 100 razy niższe od jego CMC. Wyznaczona z pomiarów napięcia powierzchniowego wartość CMC Tritonu X-100 w wodzie i buforze Tricine o pH=7,6 wynosi 0,16 mM (Rysunek 18) i jest zbliżona do wartości literaturowych [284].



Rysunek 18. Zmiany napięcia powierzchniowego roztworów Triton X-100 w wodzie (A) i buforze Tricine o pH=7,6 (B).

Ponadto, przy zastosowanych stężeniach lipidu i surfaktantu początkowy stosunek molowy surfaktantu do lipidu w analizowanych pęcherzykach był niski i wynosił mniej n 0,1. Oznacza to, że w opisywanych eksperymentach nastąpił podział detergentu między dwuwarstwę i fazę wodną bez tworzenia struktur micelarnych (etap I procesu solubilizacji), a obserwowane wyniki z pewnością nie są generowane przez micele surfaktantu.

7.1.1. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego na właściwości monowarstwy DPPC

W pierwszym etapie badań analizie poddano wpływ Tritonu X-100 na kształt izotermy π -A lipidu DPPC. Izotermy π -A zarejestrowane dla tego lipidu naniesionego na czystą subfazę wodną, czystą subfazę buforową bez i w obecności niejonowego surfaktantu przedstawiono na Rysunku 19A. Jak widać, izoterma π -A monowarstwy DPPC zarejestrowana na wodzie wykazuje typowy kształt obserwowany wcześniej w literaturze [285,286]. Punkt *lift-off* monowarstwy występuje przy powierzchni wynoszącej około 85 Å²/cząsteczkę, a obszar współistnienia faz LE–LC pomiędzy 50–65 Å²/cząsteczkę [P1]. Dalsza kompresja monowarstwy DPPC prowadzi do gwałtownego wzrostu ciśnienia powierzchniowego aż do osiągnięcia wartości maksymalnej w momencie załamania filmu [P1]. Kształt izotermy π -A lipidu DPPC zarejestrowanej na subfazie buforowej jest podobny



Rysunek 19. Izotermy π -A zarejestrowane dla monowarstwy DPPC w obecności surfaktantu niejonowego (A) oraz zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm (B) [P1].

do izotermy DPPC na subfazie wodnej [P1]. Izoterma przesunięta jest jednak w kierunku większych powierzchni przypadających na pojedynczą cząsteczkę DPPC [P1]. Pierwszy wzrost ciśnienia powierzchniowego pojawia się, gdy powierzchnia cząsteczkowa wynosi około 115 Å²/cząsteczkę, a obszar przejścia fazowego ze stanu LE do LC między 60–80 Å²/cząsteczkę i jest on mniej widoczny niż w przypadku izotermy zarejestrowanej na subfazie wodnej [P1]. Załamanie monowarstwy ma miejsce przy ciśnieniu

powierzchniowym równym około 55 mN/m, co odpowiada powierzchni 33 Å²/cząsteczkę [P1]. Podobną izotermę π -A dla DPPC uzyskali Sández i in. [287] stosując jako subfazę bufor zawierający cytrynian sodu, fosforan sodu i boran sodu (pH=7), a także Gong i in. [51] wykorzystujący PBS jako subfazę (pH=7,4).

Obecność surfaktantu niejonowego Triton X-100 w subfazie buforowej znacząco wpływa na przebieg izotermy π -A lipidu DPPC. Zmiany obejmują przede wszystkim położenie punktu *lift-off*, który jest przesunięty w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych. Dalej przebieg izoterm jest podobny, jednak dla poszczególnych wielkości powierzchni osiągane są niższe wartości ciśnienia powierzchniowego. Skutkuje to ostatecznie załamaniem monowarstwy DPPC przy znacznie niższym ciśnieniu, niż to było w przypadku czystej subfazy buforowej. Oznacza to, że badany surfaktant gromadzi się na granicy międzyfazowej i oddziałuje z cząsteczkami lipidu. Co istotne, opisane zmiany są bardziej wyraźne przy wyższym stężeniu surfaktantu.

Dodatek Tritonu X-100 do subfazy buforowej wpływa również na zależności współczynnika ściśliwości monowarstwy od ciśnienia powierzchniowego (Rysunek 19B), które zostały wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm π –A. W przypadku monowarstw DPPC naniesionych na subfazę wodną oraz na czystą subfazę buforową zaobserwować można wyraźne minimum, które potwierdza występowanie przejścia fazowego [P1]. Porównanie maksymalnych wartości współczynnika ściśliwości przed i za minimum świadczy, że jest to przejście LE-LC [P1]. Maksymalna wartość współczynnika ściśliwości monowarstwy DPPC naniesionej na subfazę wodną osiągana za minimum wynosi około 250 mN/m [P1] i oznacza, że badana monowarstwa występuje w wysoce uporządkowanym stanie cieczy skondensowanej [102]. Zastąpienie subfazy wodnej buforem powoduje znaczne obniżenie maksymalnej wartości modułu ściśliwości [P1], a obecność Tritonu X-100 prowadzi do dalszego zmniejszania tej wartości, co wskazuje na spadek stopnia uporządkowania łańcuchów alkilowych DPPC oraz na wzrost płynności tej monowarstwy [288]. Po dodatku niejonowego surfaktantu zanika ponadto charakterystyczne dla przejścia fazowego minimum.

Dla rozważanego układu zarejestrowano również zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej, które przedstawiono jako zależność zmian potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie. Taka reprezentacja danych umożliwia dokładną obserwację zmian orientacji cząsteczek na granicy faz podczas eksperymentu, ponieważ zgodnie z przedstawionym wcześniej równaniem (7) nachylenie krzywej wykreślonej na takim wykresie jest wprost proporcjonalne do składowej wektora momentu dipolowego prostopadłej do powierzchni subfazy. Oznacza to, że każda zmiana nachylenia wykresu ΔV –1/A jest równoznaczna zmianie orientacji cząsteczek w monowarstwie [P3].

W przypadku monowarstwy DPPC naniesionej zarówno na subfazę wodną, jak i na subfazę buforową na początku procesu kompresji ΔV wykazuje wartość stałą, po czym następuje gwałtowny wzrost potencjału powierzchniowego, który świadczy o pierwszej reorganizacji cząsteczek DPPC na granicy faz (Rysunek 20) [P3]. Jest ona spowodowana zmniejszeniem powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie. Po skokowym wzroście ΔV ma miejsce przegięcie krzywych i zmniejszenie ich nachylenia, co oznacza, że składowe wektora momentu dipolowego prostopadłe do powierzchni subfazy przyjmują mniejsze wartości [P3]. Następnie, począwszy od 1/A ~ 0,017 cząsteczka/Å² nachylenie analizowanych krzywych ponownie wzrasta aż do osiągnięcia maksymalnej wartości ΔV [P3].



Rysunek 20. Zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym zarejestrowane dla monowarstwy DPPC w obecności surfaktantu niejonowego [P3].

Maksymalna wartość potencjału powierzchniowego odpowiada najbardziej pionowej orientacji cząsteczek w filmie lipidowym i zazwyczaj pokrywa się z maksymalnym stopniem kondensacji monowarstwy [113]. Należy zaznaczyć, że sekwencja zarejestrowanych zmian potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej jest analogiczna do obserwowanych wcześniej zmian ciśnienia powierzchniowego i może być przypisana zmianom stanu fizycznego monowarstwy DPPC.

Dalsza analiza Rysunku 20 wskazuje na znaczący wpływ surfaktantu niejonowego na przebieg zmian potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej otrzymanych dla monowarstwy DPPC, co jest równoznaczne wpływowi tego surfaktantu na organizację molekularną filmu DPPC. Uzyskane wyniki pokazują, że powierzchnia subfazy już przy maksymalnym położeniu barierek wagi Langmuira jest bogata w cząsteczki związków powierzchniowo aktywnych, co wymusza ich uporządkowanie względem siebie.

Tworzenie domen DPPC na powierzchni czystej subfazy buforowej obserwowano z wykorzystaniem techniki BAM (Rysunek 21). Zarejestrowane obrazy pokazują, że w obszarze przemian fazowych LE-LC, przy ciśnieniu powierzchniowym równym około 12,6 mN/m, zaczynają tworzyć się małe kwiatopodobne domeny, które rosną wraz z dalszym sprężaniem monowarstwy [P1]. Jednak, mimo że wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego zmniejszają się odległości między obserwowanymi strukturami, nawet przy wysokich ciśnieniach nie tworzy się całkowicie jednorodny film DPPC. Widoczne są natomiast obszary o różnych odcieniach szarości. Świadczy to o zjawisku anizotropii optycznej, które jest związane z niejednorodnym azymutem kąta odchylenia cząsteczek lipidu w stosunku do granicy międzyfazowej [289].



Rysunek 21. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC na powierzchni subfazy buforowej [P1]. Skala oznacza 100 µm.

Morfologię monowarstwy DPPC w obecności niejonowego środka powierzchniowo czynnego w subfazie buforowej przedstawiono na Rysunku 22. Zauważyć można, że w obecności Triton X-100 domeny DPPC tworzą się przy ciśnieniu powierzchniowym nieco wyższym niż w przypadku czystej subfazy buforowej. Potwierdza to zwiększoną płynność



Rysunek 22. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC w obecności surfaktantu niejonowego w subfazie buforowej. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM. Skala oznacza 100 µm.

monowarstwy DPPC w obecności tego surfaktantu, co sugerowała wcześniej zmniejszona maksymalna wartość modułu ściśliwości. W miarę postępu kompresji domeny zwiększają swoje rozmiary i zaczynają przypominać kwiaty. Następnie łączą się ze sobą i przekształcają w jednorodną strukturę o cechach anizotropii optycznej [289]. Co ciekawe, ma to miejsce już przy ciśnieniu powierzchniowym wynoszącym 20,2 mN/m.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono test penetracji monowarstwy DPPC przez niejonowy surfaktant przy ciśnieniu powierzchniowym równym 32 mN/m. Przy takim ciśnieniu monowarstwy lipidowe imitują dwuwarstwy lipidowe [122]. Eksperyment obejmował dwa stężenia surfaktantu – 2,3 µM oraz 9,1 µM, a otrzymane wyniki przedstawiono na Rysunku 23. Jak można zauważyć, w przypadku mniejszego stężenia Tritonu X-100 nie obserwuje się zmiany ciśnienia powierzchniowego w wyniku nastrzyku surfaktantu. Z kolei po nastrzyku jego większej ilości (9,1 µM w objętości subfazy buforowej) ma miejsce gwałtowna, choć niewielka, dodatnia zmiana ciśnienia powierzchniowego, utrzymująca się na stałym poziomie aż do zakończenia eksperymentu.



Rysunek 23. Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu po nastrzyku surfaktantu niejonowego do monowarstwy DPPC skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m.

Oznacza to, że Triton X-100 zostaje trwale wbudowany w tak skompresowaną monowarstwę DPPC [290,291]. Jednak jego obecność powoduje tylko niewielkie zmiany ciśnienia powierzchniowego, które zaczynają być widoczne dopiero w momencie zastosowania wyższego stężenia surfaktantu.

7.1.2. Wpływ niejonowego związku powierzchniowo czynnego na właściwości liposomów DPPC

W kolejnym etapie badań przeanalizowano wpływ dodatku Tritonu X-100 na właściwości dwuwarstw lipidowych, stosując małe jednowarstwowe liposomy DPPC otrzymane metodą hydratacji suchego filmu lipidowego. Rozważane początkowe stężenia środka powierzchniowo czynnego odpowiadały stężeniom zastosowanym w części 7.1.1., przy czym zbadano również wpływ dodatkowego, pośredniego stężenia surfaktantu (4,5 µM). Do badań wykorzystano liposomy o średnicy równej 116,9 nm i współczynniku polidyspersyjności wynoszącym 0,52. Rozmiar ten jest adekwatny do zastosowanych podczas kalibracji membran poliwęglanowych, których średnica porów wynosiła 100 nm. Z kolei wielkość współczynnika polidyspersyjności wskazuje na otrzymanie zawiesiny liposomów bliskiej monodyspersyjności [181]. W wyniku dodania do zawiesiny liposomów niewielkiej ilości surfaktantu niejonowego obserwuje się tylko nieznaczną zmianę średnicy, jednak współczynnik polidyspersyjności istotnie maleje (Rysunek 24). Oznacza to, że

dodatek tego surfaktantu nie wpływa na rozmiar otrzymanych liposomów DPPC, jednak zwiększa ich jednorodność.



Rysunek 24. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) i współczynnika polidyspersyjności (PDI) liposomów DPPC otrzymanych metodą hydratacji w obecności surfaktantu niejonowego.

Potencjał dzeta czystych liposomów DPPC otrzymanych metodą hydratacji wynosił $-3,2 \pm 1,4$ mV [P1] i jak oczekiwano, nie zmieniał się po dodaniu niejonowego surfaktantu (Rysunek 25A). Z uwagi na czas potrzebny na wymieszanie próbki oraz jej przeniesienie do kapilary pomiarowej przedstawione wyniki dotyczą potencjału elektrokinetycznego wyznaczonego około dwóch minut po dodatku surfaktantu, co traktowane jest jako pomiar "0". Sprawdzono również zmiany potencjału dzeta w czasie od momentu dodania surfaktantu do układu. Zmiany te zarejestrowano dla stężenia Tritonu X-100 równego 2,3 μ M i przedstawiono na Rysunku 25B. Potencjał dzeta nie uległ zmianie w czasie eksperymentu trwającego godzinę. Oznacza to, że obecność badanego surfaktantu nie wpływa na potencjał elektrokinetyczny liposomów DPPC.



Rysunek 25. Zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC w zależności od stężenia surfaktantu niejonowego (A) oraz zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC w funkcji czasu w obecności surfaktantu niejonowego o stężeniu 2,3 μ M (B).

Dysponując rozmiarem i potencjałem dzeta otrzymanych liposomów DPPC, obliczono potencjał powierzchniowy, ładunek powierzchniowy, powierzchnię przypadającą na jednostkę ładunku oraz liczbę ładunków elementarnych przypadającą na liposom. Obliczone wielkości wskazują na niewielki wpływ niejonowego surfaktantu na zmiany właściwości powierzchniowych analizowanych liposomów (Tabela 5).

Tabela 5. Zmiany parametru κa , potencjału powierzchniowego (ψ_{θ}), ładunku powierzchniowego (σ_{θ}), powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku i liczby ładunków elementarnych *e* przypadających na pojedynczy liposom uzyskane dla liposomów DPPC w obecności surfaktantu niejonowego.

| Surfaktant | Csurf. [µM] | ка | ψ ₀ [mV] | σ ₀ [C/nm ² ×10 ²¹] | Powierzchnia na jednostkę ładunku [nm²/e₀] | Liczba ładunków <i>e</i> na liposom |
|--------------|----------------|--------------|------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | 0 | 33,3 | -3,7 | 1,5 | 190,0 | 226 |
| T 1/ N 100 | 2,3 | 33,3 | -3,2 | 1,3 | 126,5 | 339 |
| Triton X-100 | 4,5 9,1 | 34,1 33,6 | -3,8 -2,6 | 1,5 1,0 | 106,5 155,7 | 423 280 |

W układzie zawierającym surfaktant zachodzi oddziaływanie cząsteczek surfaktantu z warstwą lipidową. Ładunek na powierzchniach pęcherzyków lipidowych jest zatem wypadkową ładunku lipidu oraz surfaktantu [217]. Brak wyraźnych zmian potencjału elektrokinetycznego, potencjału powierzchniowego oraz ładunku powierzchniowego w obecności surfaktantu niejonowego nie powinien zatem dziwić, gdyż ten charakteryzuje się brakiem ładunku. Wcześniej zauważono jednak, że początkowo wysoki, ujemny potencjał dzeta pęcherzyków zawierających 800 mg fosfoliponu 90G i 100 mg pentoksyfiliny ($\zeta \sim -26,9$ mV) zmienia wartość na dodatnią w obecności 50 mg surfaktantów Tween 20 ($\zeta \sim 1,6$ mV) i Tween 21 ($\zeta \sim 1,7$ mV) [273]. We wspomnianych badaniach surfaktanty dodawano do układu na etapie produkcji liposomów.

7.2. Badanie oddziaływania anionowego (SDS) i kationowych (DTAB, TTAB, CTAB) związków powierzchniowo czynnych o różnej długości łańcucha węglowego na właściwości modelowych błon biologicznych

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ dodatku niewielkiej ilości surfaktantów jonowych na właściwości modelowych błon biologicznych. Jako anionowy surfaktant wybrano SDS, który jest powszechnym składnikiem przemysłowych i handlowych preparatów czyszczących [292]. Jego dodatnio naładowanym odpowiednikiem jest DTAB, który tak samo, jak SDS zbudowany jest z 12-weglowego łańcucha alifatycznego. Kolejne badane surfaktanty to surfaktanty kationowe: TTAB oraz CTAB charakteryzujące się odpowiednio 14-węglowym, oraz 16-węglowym łańcuchem alifatycznym. Jak już wspomniano, solubilizacja dwuwarstwy lipidowej w wyniku działania środka powierzchniowo czynnego jest powszechnie znanym procesem [241]. Jednak przy stężeniu surfaktantu znacznie niższym niż jego CMC następuje podział związku powierzchniowo czynnego pomiędzy dwuwarstwę lipidową a fazę objętościową, bez rozpadu dwuwarstwy [242]. Pomimo że wartości krytycznego stężenia micelizacji surfaktantów jonowych analizowanych w toku niniejszych badań są dostępne w literaturze, to zasadne wydało się dokładne wyznaczenie ich wartości w stosowanych warunkach eksperymentalnych. CMC wyznaczono na podstawie zmian przewodności właściwej oraz napięcia powierzchniowego. Na Rysunku 26 przedstawiono zmiany tych parametrów w funkcji stężenia SDS i DTAB. W analizie CMC nie uwzględniono TTAB oraz CTAB, gdyż znając krytyczne stężenie micelizacji DTAB i bazując na strukturze hydrofobowej tych trzech surfaktantów, z dobrym przybliżeniem określić można CMCTTAB i CMCCTAB w warunkach obranych wcześniej dla DTAB.

Wyznaczone na podstawie zmian przewodności krytyczne stężenia micelizacji SDS i DTAB są odpowiednio równe: 5 mM i 11,5 mM, a CMC określone poprzez zmiany napięcia powierzchniowego są nieco niższe i odpowiednio wynoszą: 2 mM i 8 mM [P2]. Podobne wartości były raportowane, gdy rozważano CMC tych surfaktantów w buforze fosforanowym o pH=7 [293,294]. Ponieważ zgodnie z ogólną zasadą CMC surfaktantów jonowych maleje dwukrotnie, gdy długość łańcucha surfaktantu zwiększa się o jedną grupę metylenową [295], to można założyć, że krytyczne stężenie micelizacji w buforze Tricine o pH=7,6 będzie wynosiło około 4-6 mM dla TTAB oraz 2-3 mM dla CTAB.

59



Rysunek 26. Zmiany przewodności właściwej (A,B) i napięcia powierzchniowego (A',B') roztworów SDS i DTAB w buforze Tricine o pH=7,6 [P2].

Zatem stosowane w przedstawionych badaniach stężenia jonowych związków powierzchniowo czynnych są w przybliżeniu 1000 razy niższe od CMC tych surfaktantów. Oznacza to, że w opisywanych eksperymentach z pewnością nie tworzą się micele surfaktantów, a obserwowane zmiany potencjału dzeta oraz wielkości dotyczą liposomów. Potwierdzeniem tego jest również pokazany na Rysunku 27 prostoliniowy wzrost intensywności światła rozproszonego pod kątem 90° wraz ze wzrostem stężenia liposomów DPPC w analizowanych próbkach zarejestrowany dla najwyższego rozważanego stężenia SDS i DTAB, tj. 9,1 μM.



Rysunek 27. Zmiany intensywności światła rozproszonego pod kątem 90° buforowych roztworów SDS (A) i DTAB (B) o stężeniu 9,1 µM w obecności liposomów DPPC.

W przypadku rozerwania struktur dwuwarstwowych pod wpływem surfaktantów intensywność światła rozproszonego pozostawałaby bowiem na stałym poziomie [210]. Niebieskie obszary zaznaczone na wykresach wskazują punkty, w których stężenie DPPC w liposomach jest równe 0,078 mg/ml (stężenie lipidu w pęcherzykach badanych za pomocą technik DLS i ELS).

7.2.1. Wpływ budowy łańcucha hydrofobowego lipidu

Oddziaływania różnorodnych substancji z błoną biologiczną zależą zarówno od właściwości i aktywności tychże substancji, jak i właściwości błon. Kluczowe znaczenie ma skład lipidowy membrany, który determinuje jej właściwości, np. stopień płynności. Dlatego też w poniższym rozdziale dyskusji poddano wpływ jonowych związków powierzchniowo czynnych na układy modelowe utworzone z lipidów o zróżnicowanym stopniu nasycenia łańcuchów hydrofobowych: DPPC, POPC i DOPC. DPPC jest przykładem lipidu całkowicie nasyconego. Zbudowany jest z dwóch nasyconych łańcuchów palmitynowych o konformacji *trans*, przez co tworzy upakowaną warstwę lipidową. Z kolei POPC jest przykładem lipidu półnienasyconego, a DOPC – przykładem lipidu nienasyconego. Część hydrofobową POPC tworzą: nasycony łańcuch palmitynowy oraz nienasycony łańcuch oleinowy, a DOPC charakteryzuje się obecnością w strukturze dwóch nienasyconych łańcuchów oleinowych. Wiązanie podwójne o konformacji *cis* jest powodem wygięcia

łańcucha oleinowego i uniemożliwia gęste upakowanie cząsteczek w warstwie lipidowej. W rezultacie warstwa lipidowa odznacza się większym stopniem płynności.

7.2.1.1. Wpływ na monowarstwę DPPC

Izotermy π -A zarejestrowane dla lipidu DPPC naniesionego na czystą subfazę buforowa oraz na subfaze buforowa wzbogaconą w surfaktanty jonowe przedstawione są na Rysunek 28. Można zaobserwować, że dodatek surfaktantów jonowych do subfazy Tricine każdorazowo przesuwa izotermę DPPC w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych [P1]. W przypadku SDS przesunięcie to wzrasta wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu [P1]. DTAB, surfaktanty o Rozważając SDS i jako odmiennej naturze, lecz o tej samej długości łańcucha weglowego, większy wpływ na przebieg izotermy DPPC ma surfaktant kationowy [P1]. Jednak zarówno SDS, jak i DTAB wyraźnie zmieniają przebieg izotermy DPPC, co uwidacznia się również zanikiem charakterystycznego dla DPPC obszaru plateau i obniżeniem wartości ciśnienia powierzchniowego, przy którym zachodzi załamanie monowarstwy [P1]. Na uwage zasługuje ponadto nieco zmniejszone, zwłaszcza dla DTAB, nachylenie izotermy π -A lipidu DPPC obserwowane w zakresie wyższych ciśnień powierzchniowych, co oznacza częściową desorpcję surfaktantów do subfazy buforowej [P1].



Rysunek 28. Izotermy π -A zarejestrowane dla monowarstwy DPPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P1].

Izotermy zarejestrowane dla DPPC na subfazie z dodatkiem pozostałych surfaktantów kationowych (TTAB i CTAB) charakteryzują się nachyleniem podobnym do

izotermy wyjściowej, praktycznie niewidocznym obszarem *plateau* sygnalizującym współistnienie faz LE i LC i spadkiem ciśnienia powierzchniowego, przy którym następuje załamanie monowarstwy. Podobne całościowe przesunięcia izotermy DPPC zaobserwowano wcześniej podczas zastosowania 500 μM wodnego roztworu DTAB oraz 1 i 2 mM wodnego roztworu SDS jako subfazy [296,297]. Efekt wytłumaczono nieodwracalnym zintegrowaniem surfaktantów z monowarstwą DPPC [296].

Inkorporację badanych surfaktantów do struktury monowarstwy DPPC potwierdzają zmiany zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm sprężania (Rysunek 29). Jak widać, obserwowane maksymalne wartości współczynników ściśliwości mieszczą się w granicach 100-150 mN/m, co oznacza, że monowarstwy występują w stanie cieczy skondensowanej [P1]. W obecności SDS i DTAB następuje zauważalne obniżenie maksymalnej wartości modułu ściśliwości, większe dla DTAB, świadczące o obniżeniu uporządkowania monowarstw zarejestrowanych na subfazie wzbogaconej w te surfaktanty [P1]. Z kolei dodatek TTAB i CTAB zmienia maksymalną wartość współczynnika ściśliwości tylko nieznacznie, jednak osiągana jest ona przy mniejszych ciśnieniach powierzchniowych. Ponadto, w obecności TTAB i CTAB widoczne jest wyraźne minimum w przebiegu zależności współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego. W przypadku CTAB występuje ono przy niższych wartościach ciśnienia powierzchniowego.



Rysunek 29. Zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm sprężania monowarstw DPPC [P1].

Kolejnym dowodem interakcji surfaktantów jonowych z cząsteczkami DPPC w monowarstwie Langmuira są zmiany przebiegu izoterm ΔV –1/A, które zaprezentowano na Rysuneku 30 [P3]. Jak można zauważyć, wszystkie analizowane surfaktanty znacząco wpływają na wyniki przeprowadzonego eksperymentu, a ostateczny efekt surfaktantu różni się głównie w zależności od długości łańcucha węglowego związku. W miarę wzrostu jego długości widoczne jest bowiem przesunięcie krzywych ΔV –1/A w kierunku wyższych wartości potencjału powierzchniowego. Powodem tego zjawiska jest zwiększenie stężenia powierzchniowego dipoli w monowarstwie, determinowane przez wzrost aktywności powierzchniowej surfaktantów. Warto również zwrócić uwagę, że w przypadku analizy dodatku SDS o stężeniu 9,1 μ M oraz CTAB o stężeniu 2,3 μ M sekwencja zmian nachylenia krzywych nie pokrywa się z wynikiem otrzymanym dla monowarstwy DPPC osadzonej na czystej subfazie buforowej. Uściślając, w tych dwóch przypadkach zanika przejście fazowe gaz–ciecz rozprężona monowarstwy. W pozostałych widoczne jest zarówno przejście fazowe gaz–ciecz rozprężona, jak i przemiana cieczy rozprężonej w ciecz skondensowaną.



Rysunek 30. Zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym zarejestrowane dla monowarstwy DPPC w obecności surfaktantów jonowych [P3].

Wpływ jonowych związków powierzchniowo czynnych na morfologię monowarstwy DPPC obserwowano z użyciem mikroskopii kąta Brewstera (BAM). Tworzenie domen DPPC na powierzchni czystej subfazy buforowej pokazano wcześniej na Rysunku 21. Dla przypomnienia, kwiatopodobne domeny zaczynały pojawiać się przy ciśnieniu powierzchniowym równym około 12,6 mN/m i rosły wraz z dalszą kompresją monowarstwy, jednak monowarstwa DPPC nie przybierała nigdy formy całkowicie jednorodnej [P1]. Tworzenie domen DPPC po dodaniu do subfazy buforowej anionowego środka powierzchniowo czynnego przedstawiono na Rysunku 31. Zauważyć można, że w obecności SDS domeny tworzą się przy ciśnieniu powierzchniowym równym około 20,2 mN/m [P1]. Charakteryzują się ponadto mniejszymi wielkościami, a także położone są bliżej siebie w porównaniu z domenami DPPC obserwowanymi wcześniej na powierzchni buforu [P1]. Oznacza to, że SDS wywiera upłynniający efekt na skondensowany film DPPC [P1].



Rysunek 31. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC w obecności SDS w subfazie buforowej [P1]. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 μM. Skala oznacza 100 μm.

Morfologie monowarstwy DPPC w obecności kationowych związków powierzchniowo czynnych przedstawiono na Rysunku 32. Dodatek DTAB do subfazy buforowej spowodował, podobnie jak w przypadku SDS, tworzenie domen przy ciśnieniu powierzchniowym wyższym od 12,6 mN/m (ciśnienie, przy którym tworzyły się domeny DPPC, gdy subfaza nie zawierała żadnego surfaktantu), co świadczy o upłynniającym wpływie DTAB na film DPPC [P1]. Utworzone domeny charakteryzują się wielkością podobną do domen DPPC w czystej monowarstwie fosfolipidowej [P1]. Z drugiej strony obecność TTAB i CTAB w subfazie buforowej sprzyja formowaniu się niewielkich domen DPPC przy ciśnieniu powierzchniowym mniejszym od 12,6 mN/m. Gdy do układu dodany został TTAB, domeny zaczęły być widoczne przy ciśnieniu równym około 11,6 mN/m. Natomiast, w obecności CTAB – przy ciśnieniu 10,0 mN/m. Długołańcuchowe surfaktanty kationowe powodują zatem przesunięcie procesu kondensacji monowarstwy DPPC w kierunku niższych wartości ciśnienia powierzchniowego, co tłumaczyłoby zaobserwowane wcześniej analogiczne przesunięcie maksymalnej wartości modułu ściśliwości monowarstwy DPPC, gdy subfaza była wzbogacona w TTAB i CTAB. Zaznaczyć należy, że również w obecności surfaktantów jonowych monowarstwa DPPC nie wykazuje idealnej jednorodności nawet przy najwyższych ciśnieniach powierzchniowych. Na obrazach BAM widoczne są bowiem obszary o różnej skali szarości, które świadczą o wspomnianym w sekcji 7.1.1. zjawisku anizotropii optycznej.



Rysunek 32. Obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC w obecności DTAB (A) [P1], TTAB (B) i CTAB (C) w subfazie buforowej. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM. Skala oznacza 100 µm.

Kolejnym etapem badań było wykonanie testów penetracji monowarstwy DPPC przez jonowe surfaktanty. Wyniki poszczególnych eksperymentów przedstawiono na

Rysunku 33. Jak można zauważyć, tuż po nastrzyku surfaktantów ciśnienie powierzchniowe gwałtownie rośnie, by ostatecznie osiągnąć wartość stałą [P1]. Wartość ta okazuje się być zależna od natury surfaktantu, od długości jego łańcucha hydrofobowego oraz od stężenia. Większy wzrost ciśnienia powierzchniowego jest widoczny dla anionowego środka powierzchniowo czynnego niż dla surfaktantu kationowego o tej samej długości łańcucha węglowego [P1]. Ponadto, zmiana ciśnienia wzrasta wraz ze wzrostem stężenia SDS i DTAB



Rysunek 33. Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu po nastrzyku surfaktantu anionowego (A) i surfaktantów kationowych (B) do monowarstwy DPPC skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m [P1].

w subfazie [P1]. Rozważając jedynie surfaktanty kationowe o stężeniu w subfazie buforowej wynoszącym 2,3 μ M, widoczny jest wyraźny wzrost ciśnienia wraz ze wzrostem długości części niepolarnej surfaktantów. Co istotne, każdy surfaktant spowodował dodatnie zmiany ciśnienia powierzchniowego. Dowodzi to tendencji do spontanicznego wnikania cząsteczek surfaktantów do monowarstwy DPPC [290,291]. Warto również zauważyć, że surfaktanty jonowe wykazują efektywniejszą penetrację filmu DPPC niż analizowany wcześniej surfaktant niejonowy, co wynika z większych wartości $\Delta\pi$.

7.2.1.2. Wpływ na dwuwarstwę DPPC

W efekcie domieszkowania liposomów DPPC surfaktantami jonowymi udało się dostrzec pewne zmiany zarówno w rozmiarze [P2], jak i homogeniczności tych liposomów, mimo że dodawane ilości związków powierzchniowo czynnych były niewielkie, a surfaktant był dodawany do gotowych pęcherzyków lipidowych. Uzyskane wyniki zaprezentowane są w Tabeli 6.

| Surfaktant | Csurf. [µM] | D_h [nm] | PDI |
|------------|----------------|------------|------|
| | 0 | 116,9 | 0,52 |
| SDS | 2,3 | 105,0 | 0,19 |
| | 4,5 | 105,4 | 0,20 |
| | 9,1 | 103,3 | 0,24 |
| DTAB | 2,3 | 128,5 | 0,43 |
| | 4,5 | 138,7 | 0,41 |
| | 9,1 | 140,7 | 0,46 |
| TTAB | 2,3 | 137,5 | 0,23 |
| | 4,5 | 121,6 | 0,18 |
| | 9,1 | 113,1 | 0,18 |
| СТАВ | 2,3 | 115,8 | 0,16 |
| | 4,5 | 111,2 | 0,16 |
| | 9,1 | 107,8 | 0,16 |

Tabela 6. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) [P2] i współczynnika polidyspersyjności (**PDI**) liposomów DPPC otrzymanych metodą hydratacji w obecności surfaktantów jonowych.

Dodatek anionowego SDS do liposomów DPPC spowodował zmniejszenie ich średniej średnicy hydrodynamicznej, podczas gdy dodatek surfaktantu kationowego o tej samej długości łańcucha hydrofobowego (DTAB) przyczynił się do jej nieznacznego wzrostu [P2]. Można to wytłumaczyć specyficznymi oddziaływaniami pomiędzy najbardziej zewnętrzną, dodatnio naładowaną częścią głowy lipidowej DPPC a cząsteczkami surfaktantów. Surfaktant anionowy poprzez oddziaływania przyciągające spowodował bowiem zmniejszenie sił odpychających w dwuwarstwie, przez co rozmiar pęcherzyków się zmniejszył, a dodatek surfaktantu kationowego przyczynił się do indukcji sił odpychających w dwuwarstwie, powodując tym samym zwiększenie rozmiaru liposomów [298,299]. Ponadto, w przypadku SDS współczynnik polidyspersyjności liposomów znacząco zmalał, co świadczy o pozytywnym wpływie tego anionowego surfaktantu na jednorodność zawiesiny liposomowej DPPC. Jego kationowy odpowiednik utrzymywał PDI na przybliżonym poziomie w porównaniu z liposomami czystymi.

W literaturze można doszukać się doniesień o odwrotnym efekcie dodatku anionowego i kationowego surfaktantu na rozmiar liposomów, w którym dodatek surfaktantu anionowego zwiększa rozmiar liposomów, a dodatek surfaktantu kationowego – zmniejsza [300]. Jednak przytoczony przykład dotyczy pęcherzyków z wbudowanym anionowym lekiem [300]. Sugeruje to, że ostateczny wpływ surfaktantu na rozmiar liposomów jest ściśle zależny od składu chemicznego pęcherzyków.

Analiza wyników otrzymanych dla surfaktantów kationowych pozwala zauważyć, że rozmiar i współczynnik polidyspersyjności zmieniają się w zależności od długości łańcucha węglowego. Jak widać, w większości przypadków wraz ze wzrostem długości części niepolarnej surfaktantu następuje zmniejszenie zarówno D_h , jak i PDI. Wniosek ten jest zgodny z obserwacjami innych Naukowców, mimo że w eksperymencie literaturowym surfaktanty inkorporowane były w liposomy w trakcie ich preparatyki [300]. Efekt ten przypisuje się zwiększeniu sztywności pęcherzyków przez surfaktant o dłuższym łańcuchu węglowym z powodu jego głębszej inkluzji w dwuwarstwę lipidową [300]. Ponadto, wraz ze wzrostem stężenia DTAB liposomy charakteryzowały się coraz większymi rozmiarami [P2] oraz coraz większym PDI, natomiast wzrastające stężenia TTAB i CTAB powodowały obniżenie tych wartości. Oznacza to, że większe stężenia DTAB sprzyjają procesowi pęcznienia liposomów DPPC, a większe stężenia TTAB i CTAB go hamują [271].

Potencjał dzeta czystych liposomów DPPC otrzymanych metodą hydratacji wynosił -3,2 \pm 1,4 mV [P1]. Jak można było się spodziewać, naładowany ujemnie surfaktant zmienił wartość potencjału dzeta tych liposomów na bardziej ujemną, a surfaktanty naładowane dodatnio na bardziej dodatnią (Rysunek 34) [P1]. Ponadto, działanie związku powierzchniowo czynnego każdorazowo było tym większe im wyższe jego początkowe stężenie w próbce [P1]. Wpływ surfaktantu był też wyraźniejszy w miarę wzrostu długości łańcucha hydrofobowego. Jednak, co zaskakujące, nawet niewielka ilość jonowego środka powierzchniowo czynnego (2,3 μ M; 4,5 μ M i 9,1 μ M), stanowiąca 0,02; 0,04 i 0,08 część molową użytego lipidu, znacząco zmieniła wartość potencjału dzeta liposomów DPPC. Mając na uwadze dwa surfaktanty o odmiennej naturze chemicznej, lecz tej samej długości łańcucha węglowego, tj. SDS i DTAB, obserwowany efekt jest silniejszy w przypadku surfaktantów o stężeniu 2,3 μ M; 4,5 μ M i 9,1 μ M jest odpowiednio równa: 10,0 mV; 15,6 mV i 21,0 mV w przypadku SDS, 2,0 mV; 3,9 mV i 6,4 mV w przypadku DTAB, 18,3 mV; 26,3 mV i 36,4 mV w przypadku TTAB oraz 33,0 mV; 45,4 mV i 59,5 mV

w przypadku CTAB. Wyniki te jednoznacznie wskazują na interakcje surfaktantów z liposomami DPPC.



Rysunek 34. Zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P1].

W Tabeli 7 przedstawiono zmiany κa , potencjału powierzchniowego, ładunku powierzchniowego, powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku elementarnego i liczby ładunków *e* przypadających na jeden liposom dla liposomów DPPC po dodaniu surfaktantów jonowych [P2]. Jak można zauważyć, wszystkie analizowane liposomy DPPC charakteryzowały się parametrem κa >20, a potencjał powierzchniowy liposomów w obecności surfaktantów uległ zmianom analogicznym do opisanych przy dyskusji wyników dotyczących potencjału dzeta [P2]. Z kolei wartość ładunku powierzchniowego pęcherzyków najczęściej wzrastała w miarę dodatku coraz większej ilości surfaktantu [P2]. Tylko w przypadku DTAB ładunek powierzchniowy najpierw zmalał po to, by następnie postępowo wzrastać, czego powodem była początkowa neutralizacja ujemnego potencjału dzeta czystych liposomów DPPC [P2]. Co istotne, w wyniku domieszkowania liposomów surfaktantami jonowymi obserwuje się znaczące zmiany zarówno w powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku elementarnego, jak i w liczbie ładunków *e* przypadających na pojedynczy liposom.

| Surfaktant | Csurf. [µM] | ка | ψ0 [mV] | σ ₀ [C/nm ² ×10 ²¹] | Powierzchnia na jednostkę ładunku [nm²/e ₀] | Liczba ładunków <i>e</i> na liposom |
|------------|----------------|------|------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | 0 | 33,3 | -3,7 | 1,5 | 190 | 226 |
| | 2,3 | 29,9 | -15,1 | 6,1 | 26 | 1311 |
| SDS | 4,5 | 29,9 | -21,6 | 8,8 | 18 | 1902 |
| | 9,1 | 29,3 | -27,8 | 11,6 | 14 | 2414 |
| | 2,3 | 36,8 | -1,4 | 0,5 | 291 | 179 |
| DTAB | 4,5 | 39,6 | 0,8 | 0,3 | 501 | 121 |
| | 9,1 | 40,2 | 3,6 | 1,4 | 112 | 557 |
| | 2,3 | 39,2 | 13,8 | 5,5 | 29 | 2047 |
| TTAB | 4,5 | 34,7 | 23,4 | 9,6 | 17 | 2731 |
| | 9,1 | 32,2 | 35,4 | 15,1 | 11 | 3651 |
| | 2,3 | 33,0 | 26,7 | 11,0 | 15 | 2807 |
| СТАВ | 4,5 | 31,7 | 42,4 | 18,7 | 9 | 4314 |
| | 9,1 | 30,7 | 58,5 | 28,5 | 6 | 6082 |
| | | | | | | |

Tabela 7. Zmiany parametru κa , potencjału powierzchniowego (ψ_{θ}), ładunku powierzchniowego (σ_{θ}), powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku i liczby ładunków e przypadających na pojedynczy liposom uzyskane dla liposomów DPPC w obecności surfaktantów jonowych [P2].

Otrzymane dane potwierdzają znaczny wpływ surfaktantów jonowych na właściwości elektrokinetyczne liposomów DPPC. Warto zaznaczyć, że w przypadku czystych liposomów DPPC jednostkowy ładunek elementarny przypada na powierzchnię 190 nm² [P2]. Korzystając z uzyskanej wcześniej izotermy π –A monowarstwy DPPC, oznacza to, że statystycznie 1 z 423 cząsteczek DPPC niesie jednostkowy ładunek elektryczny [P2]. Wynika z tego, że powierzchnia liposomów DPPC jest naładowana w około 0,2% [P2]. Z kolei po dodatku najmniejszej ilości rozważanych jonowych surfaktantów wartości te wynoszą: 1,8%; 0,2%; 1,9% i 3,7% odpowiednio dla SDS, DTAB, TTAB i CTAB.

W celu zweryfikowania wpływu momentu dodania surfaktantu do układu na właściwości otrzymanych pęcherzyków metodą hydratacji otrzymano również mieszane liposomy DPPC/SDS i DPPC/DTAB poprzez dodatek surfaktantów w pierwszym etapie preparatyki liposomów. Uzyskane wyniki pokazuje Rysunek 35. Jak można zauważyć, dodatek jonowych surfaktantów w trakcie otrzymywania zawiesiny liposomów wpływa

w podobny sposób jak dodatek do gotowych liposomów zarówno na ich średnicę, jak i potencjał dzeta. Obecność surfaktantu anionowego zmniejsza rozmiar otrzymanych pęcherzyków i powoduje bardziej ujemny potencjał dzeta. Z kolei obecność surfaktantu kationowego zwiększa średnicę liposomów i powoduje bardziej dodatni potencjał dzeta. Efekt dodatku SDS na wielkość liposomów jest jednak w tym przypadku większy. Najniższe analizowane stężenie (2,3 μM) SDS dodane do gotowych liposomów powodowało zmianę ich średniej średnicy hydrodynamicznej ze 116,9 nm na 105,0 nm, a dodane w trakcie preparatyki ze 116,9 nm na 84,2 nm. Sugeruje to głębszą inkluzję tego anionowego surfaktantu w pęcherzyki lipidowe, kiedy związek powierzchniowo czynny dodano w trakcie preparatyki liposomów [300]. Przeciwnie, zmiany potencjału dzeta w wyniku addycji SDS w pierwszym etapie otrzymywania liposomów są mniejsze niż te widoczne, kiedy dodano go do gotowej zawiesiny pęcherzyków. Natomiast zmiany średnicy i potencjału elektrokinetycznego liposomów DPPC pod wpływem DTAB są niezależne od momentu addycji surfaktantu.



Rysunek 35. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) i potencjału dzeta (ζ) mieszanych liposomów: DPPC/SDS (A) i DPPC/DTAB (B) otrzymanych metodą hydratacji.

Z kolei w celu porównania wpływu surfaktantów jonowych na potencjał elektrokinetyczny liposomów otrzymanych różnymi metodami czyste liposomy DPPC otrzymano również metodą elektroformacji. Następnie, efekt dodatku surfaktantów zweryfikowano na przykładzie SDS i DTAB, dodając surfaktanty do świeżo zsyntezowanych pęcherzyków. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rysunku 36. Ponieważ metoda elektroformacji prowadzi do otrzymania liposomów o dużej niejednorodności [301], w rozprawie nie uwzględniono dyskusji na temat zmian rozmiaru i współczynnika polidyspersyjności uzyskanych pęcherzyków pod wpływem dodatku surfaktantów.


Rysunek 36. Zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC otrzymanych metodą elektroformacji w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantu kationowego (B) [P1].

Z Rysunku 36 wynika, że liposomy DPPC otrzymane metodą elektroformacji charakteryzowały się potencjałem dzeta równym $-4,7 \pm 0,7$ mV, co oznacza, że potencjał elektrokinetyczny czystych liposomów DPPC nie zależy od metody preparatyki pęcherzyków lipidowych [P1]. Dalsza analiza tego rysunku prowadzi do wniosków zbieżnych z tymi opisanymi dla liposomów otrzymanych metodą hydratacji. Dowodzi to interakcji niewielkich ilości surfaktantów również z liposomami otrzymanymi metodą elektroformacji. Co ciekawe, obserwowane bezwzględne zmiany potencjału dzeta są tu nawet nieco większe, wynosząc dla surfaktantów o stężeniu 2,3 μ M; 4,5 μ M i 9,1 μ M odpowiednio: 17,1 mV; 24,1 mV i 30,3 mV (SDS) i 3,2 mV; 5,4 mV i 9,2 mV (DTAB) [P1].

Zaobserwowane w toku przedstawionych badań zmiany potencjału dzeta liposomów spowodowane dodatkiem jonowych surfaktantów są zgodne z dostępną literaturą naukową, która dotyczyła dodatku surfaktantów do układu na etapie produkcji liposomów i miała na celu zwiększenie ich możliwości aplikacyjnych [300,302,303]. Wyszczególniono wówczas, że włączenie surfaktantów jonowych do liposomów zdaje się być najłatwiejszym sposobem na zwiększenie ich stabilności koloidalnej [303].

7.2.1.3. Wpływ na monowarstwę POPC

Izotermy π -A zarejestrowane dla lipidu półnienasyconego w obecności jonowych związków powierzchniowo czynnych przedstawiono na Rysunku 37. Jak można zauważyć, izoterma monowarstwy POPC naniesionej na subfazę składającą się z buforu Tricine w temperaturze 25°C wykazuje punkt *lift-off* w okolicach powierzchni cząsteczkowej równej 110 Å²/cząsteczkę [P3]. Następnie ciśnienie powierzchniowe sukcesywnie wzrasta do momentu załamania membrany przy powierzchni około 50 Å²/cząsteczkę, gdy ciśnienie powierzchniowe wynosi 43 mN/m [P3]. Podobne izotermy dla POPC zarejestrowano wcześniej, używając subfazy wodnej, jednak punkt *lift-off* przesunięty był wówczas w kierunku mniejszej powierzchni molekularnej [297,304]. Oznacza to, że zastąpienie subfazy wodnej subfazą buforu Tricine przesuwa izotermę POPC w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych. Jest to zgodne z oczekiwanym trendem, ponieważ w przypadku lipidu DPPC zaobserwowano ten sam efekt (rozdział 7.1.1.). Ponadto, należy zaznaczyć, że zarejestrowana krzywa cechuje się przebiegiem charakterystycznym dla monowarstwy w stanie cieczy rozprężonej [297].



Rysunek 37. Izotermy π -A zarejestrowane dla monowarstwy POPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P3].

Cząsteczki środka powierzchniowo czynnego obecne w subfazie buforowej silnie wpływają na przebieg izoterm kompresji filmu POPC nawet przy stężeniu surfaktantu mniejszym niż 10 µM. Wpływ ten przejawia się przesunięciem izoterm w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych [P3]. Biorąc pod uwagę SDS i DTAB jako przeciwnie naładowane surfaktanty o tej samej długości łańcucha węglowego, obserwowane przesunięcie jest większe dla surfaktantu anionowego [P3]. Przesunięcie zwiększa się również ze wzrostem stężenia środka powierzchniowo czynnego [P3]. Ponadto, wpływ surfaktantu na kształt izoterm POPC różni się w zależności od długości łańcucha

hydrofobowego surfaktantu, co widać z analizy krzywych zarejestrowanych na subfazie zawierającej cząsteczki DTAB, TTAB i CTAB [P3]. Zgodnie z przewidywaniami, surfaktant o najkrótszym łańcuchu węglowym (DTAB) najmniej zmienia izotermę, a ten o najdłuższym łańcuchu węglowym (CTAB) – najbardziej [P3]. Warto również zwrócić uwagę, że nachylenie izoterm zarejestrowanych w obecności surfaktantów jest nieco mniejsze niż nachylenie izotermy wyjściowej. To sugeruje obniżenie stopnia kondensacji monowarstw, gdy do układu dodane są surfaktanty.

Analiza Rysunku 38 pokazującego zależność modułu ściśliwości monowarstwy POPC w funkcji ciśnienia powierzchniowego potwierdza oddziaływanie jonowych surfaktantów z monowarstwą lipidową. Jak można zauważyć, najwyższa maksymalna wartość współczynnika ściśliwości została uzyskana dla monowarstwy POPC zarejestrowanej na buforze wolnym od surfaktantów i wynosiła 93 mN/m [P3]. Wartość ta wskazuje na ciekły charakter monowarstwy, co jest zgodne z danymi literaturowymi [305– 307]. Po dodaniu środka powierzchniowo czynnego do subfazy buforowej maksymalna wartość współczynnika ściśliwości maleje [P3]. To pokazuje, że włączenie środka powierzchniowo czynnego do monowarstwy POPC prowadzi do spadku uporządkowania analizowanego filmu Langmuira [P3]. Siła tego efektu zależy od charakteru, stężenia i długości łańcucha alkilowego surfaktantu [P3]. Ponadto, obecność surfaktantów przesuwa maksymalną wartość modułu ściśliwości w kierunku niższych ciśnień powierzchniowych.



Rysunek 38. Zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm sprężania monowarstw POPC [P3].

Kolejnym krokiem badań był pomiar izoterm ΔV –A dla filmu POPC naniesionego na czystą subfazę buforową, a także na subfazę buforową wzbogaconą w jonowe związki powierzchniowo czynne (Rysunek 39). Jak można zauważyć, na początku procesu kompresji izoterma potencjału powierzchniowego POPC zarejestrowana na czystej subfazie buforowej wykazuje stromy, prawie liniowy wzrost ΔV od wartości początkowej równej w przybliżeniu 50 mV do około 350 mV [P3]. Zależność liniowa zostaje zachowana do odwrotności średniej powierzchni cząsteczkowej równej ~ 0,009 cząsteczka/Å² (A ~ 110 Å²/cząsteczkę), co odpowiada reorientacji cząsteczek lipidu związanej z przejściem fazowym ze stanu gazowego do stanu ciekłego monowarstwy [P3]. Dalsza kompresja filmu w stanie ciekłym charakteryzuje się znacznie mniejszą szybkością wzrostu potencjału powierzchniowego, oznaczając mniejszą wartość μ_z [P3].



Rysunek 39. Zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym zarejestrowane dla monowarstwy POPC w obecności surfaktantów jonowych [P3].

W obecności rozpatrywanych surfaktantów jonowych kształt krzywych ΔV –1/A jest inny [P3]. Izotermy charakteryzują się jednostajnym wzrostem potencjału powierzchniowego podczas całego procesu kompresji i zanikiem wyraźnego przejścia fazowego gaz – ciecz [P3]. Oznacza to, że cząsteczki szybciej orientują się na granicy faz, ponieważ powierzchnia subfazy jest zapełniona [P3]. Warto również zauważyć, że nachylenie krzywych zarejestrowanych na subfazie zawierającej surfaktanty kationowe o dłuższych łańcuchach węglowych (TTAB i CTAB) jest zauważalnie mniejsze [P3]. Sugeruje to przyspieszone nasycenie powierzchni międzyfazowej, gdy te surfaktanty są obecne w subfazie buforowej [P3]. Porównanie opisanych tu wyników z tymi, które uwzględniały monowarstwę utworzoną z DPPC, wskazuje na skuteczniejszą penetrację monowarstwy przez surfaktanty jonowe, gdy składa się ona z lipidu półnienasyconego.

Analizę techniką BAM monowarstwy POPC naniesionej na czystą subfazę buforową przedstawiono na Rysunku 40. Jak widać, otrzymane obrazy wykazują jednorodną teksturę fazową podczas całego procesu kompresji monowarstwy, co dowodzi, że membrana odznacza się charakterem ciekłym [P3]. Jest to zgodne zarówno z wynikami pokazanymi powyżej, jak i z dostępnymi danymi literaturowymi [307].



Rysunek 40. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy POPC na powierzchni subfazy buforowej [P3]. Skala oznacza 100 µm.

Po dodaniu surfaktantów jonowych do subfazy buforowej zarejestrowane obrazy BAM również charakteryzowały się całkowitą homogenicznością (Rysunek 41) [P3]. Oznacza to, że dodatek tych surfaktantów nie wpływa na morfologię monowarstwy POPC [P3].



Rysunek 41. Wybrane Obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy POPC w obecności SDS (A), DTAB (B), TTAB (C) i CTAB (D) w subfazie buforowej [P3]. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM. Skala oznacza 100 µm.

Wyraźny dowód oddziaływania surfaktantów jonowych z monowarstwą POPC przedstawiono na Rysunku 42, który ilustruje zmiany ciśnienia powierzchniowego wstępnie skompresowanej monowarstwy POPC po nastrzyku badanych surfaktantów do subfazy buforowej. Jak pokazano, po dodaniu surfaktantów (t=0) ciśnienie powierzchniowe natychmiast rośnie dla wszystkich analizowanych układów [P3], co wskazuje na spontaniczną penetrację membrany przez zastosowane środki powierzchniowo czynne [290,291]. Jednak należy zauważyć, że w przypadku SDS i DTAB zarejestrowane zmiany



Rysunek 42. Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu po nastrzyku surfaktantu anionowego (A) i surfaktantów kationowych (B) do monowarstwy POPC skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m [P3].

ciśnienia nieco maleją w czasie. Oznacza to, że wraz z upływem eksperymentu, część cząsteczek tych surfaktantów uległa desorpcji do fazy wodnej [291]. Co istotne, obserwowany początkowy wzrost wartości ciśnienia powierzchniowego zależał zarówno od stężenia surfaktantu, jak i długości jego łańcucha alkilowego, tj. im wyższe stężenie surfaktantu i im dłuższa część hydrofobowa związku, tym wyższa wartość $\Delta \pi$ [P3].

7.2.1.4. Wpływ na dwuwarstwę POPC

Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej i współczynnika polidyspersyjności liposomów POPC w obecności surfaktantów jonowych przedstawione są w Tabeli 8. Jak widać, otrzymane liposomy charakteryzowały się średnią średnicą hydrodynamiczną równą 126,9 nm i współczynnikiem polidyspersyjności wynoszącym 0,11 [P3]. Rozmiar ten jest

zgodny ze średnicą porów membran poliwęglanowych zastosowanych podczas procesu kalibracji pęcherzyków. Jednak, mimo jednakowej procedury preparatyki liposomów POPC i DPPC, rozmiary liposomów POPC okazują się być nieco większe. Może to wynikać z obecności wiązania podwójnego w łańcuchu alkilowym POPC, powodującego załamanie struktury lipidu, co ostatecznie uniemożliwia ścisłe upakowanie jego cząsteczek w dwuwarstwie [308]. Z kolei wielkość współczynnika polidyspersyjności wskazuje na otrzymanie jednorodnej zawiesiny liposomów [181].

| Surfaktant | Csurf. [µM] | D_h [nm] | PDI |
|------------|----------------|------------|------|
| | 0 | 126,9 | 0,11 |
| SDS | 2,3 | 130,0 | 0,08 |
| | 4,5 | 131,6 | 0,10 |
| | 9,1 | 130,8 | 0,12 |
| DTAB | 2,3 | 132,8 | 0,14 |
| | 4,5 | 137,0 | 0,14 |
| | 9,1 | 144,0 | 0,13 |
| TTAB | 2,3 | 122,6 | 0,16 |
| | 4,5 | 121,3 | 0,15 |
| | 9,1 | 120,3 | 0,13 |
| СТАВ | 2,3 | 123,7 | 0,13 |
| | 4,5 | 117,2 | 0,14 |
| | 9,1 | 114,2 | 0,15 |

Tabela 8. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) [P3]i współczynnika polidyspersyjności (PDI) liposomów POPCotrzymanych metodą hydratacji w obecności surfaktantów jonowych.

W obecności surfaktantów zbudowanych z 12-węglowego łańcucha hydrofobowego (SDS i DTAB) rozmiary liposomów POPC ulegają niewielkiemu zwiększeniu, co potwierdza, że surfaktanty są zintegrowane z analizowanymi dwuwarstwami lipidowymi [P3]. Efekt ten wyraźniejszy jest dla surfaktantu kationowego, w przypadku którego wzrost wielkości pęcherzyków obserwuje się również wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu [P3]. Dodatek kolejnych w szeregu homologicznym surfaktantów kationowych (TTAB i CTAB) powoduje z kolei obniżenie wartości D_h w taki sposób, że są one coraz mniejsze w miarę większej ilości związku powierzchniowo czynnego i w miarę wzrostu długości łańcucha

alkilowego surfaktantu [P3]. Tak więc najmniejszymi rozmiarami charakteryzują się pęcherzyki po dodaniu najwyższego stężeniem CTAB [P3]. Sugeruje to, iż surfaktanty o dłuższym łańcuchu hydrofobowym zwiększają sztywność dwuwarstwy lipidowej oraz hamują ich pęcznienie [300].

Wszystkie uzyskane wartości indeksu polidyspersyjności liposomów POPC są niewielkie (poniżej 0,2), co wskazuje na wysoką homogeniczność tych pęcherzyków. Jednakże zauważyć można, iż również w przypadku liposomów wytworzonych z tego półnienasyconego lipidu, surfaktant anionowy wykazuje tendencję do zwiększania ich jednorodności. Surfaktanty kationowe dają efekt przeciwny, gdyż w ich obecności następuje wzrost polidyspersyjności liposomów.

Potencjał elektrokinetyczny liposomów POPC otrzymanych metodą hydratacji wynosił -5,1±0,9 mV i jak wynika z Rysunku 43, zmienia się po dodaniu nawet niewielkiej ilości jonowych związków powierzchniowo czynnych [P3]. W zależności od natury chemicznej surfaktantu następuje wzrost lub spadek wartości potencjału dzeta [P3]. Co istotne, zarówno w miarę wzrostu stężenia surfaktantu, jak i długości łańcucha węglowego obserwowane zmiany są coraz większe [P3]. Uściślając, bezwzględne zmiany potencjału dzeta w obecności surfaktantów o stężeniu 2,3 μM; 4,5 μM i 9,1 μM są odpowiednio równe [P3]: 14,4 mV; 22,0 mV i 27,5 mV w przypadku dodatku SDS, 3,3 mV; 8,5 mV i 13,2 mV w przypadku DTAB, 15,5 mV; 23,7 mV i 34,6 mV w przypadku TTAB oraz 25,9 mV; 36,6 mV i 48,2 mV w przypadku CTAB.



Rysunek 43. Zmiany potencjału dzeta liposomów POPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P3].

Porównanie przedstawionych powyżej danych z tymi otrzymanymi wcześniej dla lipidu całkowicie nasyconego ujawnia, że efekt surfaktantów zbudowanych z 12-węglowego łańcucha hydrofobowego jest większy w przypadku lipidu półnienasyconego. To zachowanie jest prawdopodobnie związane ze strukturą molekularną badanych lipidów [297]. DPPC zawierający dwa nasycone łańcuchy acylowe w konformacji *trans* tworzy bardziej upakowaną warstwę lipidową w porównaniu z POPC zawierającym jeden nienasycony łańcuch acylowy [309]. Ponadto, w przeciwieństwie do POPC, DPPC podczas eksperymentu występuje w wysoce uporządkowanej fazie żelowej, ponieważ temperatura przejścia fazowego DPPC nie zostaje osiągnięta [310]. Zatem penetracja surfaktantów może być większa w przypadku nienasyconych warstw lipidowych. Z kolei efekt surfaktantów kationowych z 14- i 16-węglowym łańcuchem alifatycznym jest wyraźniejszy w przypadku ich interakcji z liposomami DPPC. Sugeruje to, że mechanizm obserwowanych oddziaływań zależny jest nie tylko od struktury molekularnej lipidowych składników błony i natury chemicznej związków powierzchniowo czynnych, ale także od budowy surfaktantów.

Na podstawie zaprezentowanych rozmiarów i potencjałów dzeta liposomów POPC wyliczone zostały kolejne wielkości charakteryzujące właściwości powierzchniowe otrzymanych pęcherzyków lipidowych (Tabela 9). Jak można zauważyć, dodatek surfaktantów do układu zawierającego liposomy znacząco modyfikuje wielkość powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku oraz liczbę ładunków *e* przypadających na pojedynczy liposom [P3]. Warto zauważyć, że liposomy POPC charakteryzują się znacznie zmniejszoną w stosunku do liposomów DPPC powierzchnią przypadającą na jednostkę ładunku elementarnego. Tutaj, jeden ładunek elementarny przypada na 69 nm² powierzchni, co oznacza, że statystycznie 1 na 122 cząsteczki POPC niesie jednostkowy ładunek elektryczny. Zatem powierzchnia liposomów POPC jest naładowana w około 0,6% [P3]. Po dodaniu 2,3 µM SDS, DTAB, TTAB i CTAB procent naładowania powierzchni wynosi odpowiednio 3,4%, 0,3%, 1,8% i 3,4% [P3].

| Surfaktant | Csurf. [µM] | ка | ψ ₀ [mV] | σ ₀ [C/nm ² ×10 ²¹] | Powierzchnia na jednostkę ładunku [nm²/e ₀] | Liczba ładunków <i>e</i> na liposom |
|------------|----------------|------|------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | 0 | 36,2 | -5,1 | 2,3 | 69 | 526 |
| | 2,3 | 37,1 | -22,4 | 9,2 | 18 | 3032 |
| SDS | 4,5 | 37,5 | -31,3 | 13,2 | 12 | 4522 |
| | 9,1 | 37,3 | -37,8 | 16,4 | 10 | 5498 |
| | 2,3 | 37,9 | -2,1 | 0,8 | 193 | 288 |
| DTAB | 4,5 | 39,0 | 3,9 | 1,5 | 103 | 570 |
| | 9,1 | 41,0 | 9,9 | 3,9 | 41 | 1608 |
| | 2,3 | 34,9 | 11,9 | 5,0 | 32 | 1471 |
| ТТАВ | 4,5 | 34,6 | 21,4 | 8,5 | 19 | 2432 |
| | 9,1 | 34,3 | 34,1 | 14,5 | 11 | 4110 |
| | 2,3 | 35,3 | 23,9 | 9,8 | 16 | 2962 |
| СТАВ | 4,5 | 33,4 | 36,5 | 15,7 | 10 | 2729 |
| | 9,1 | 32,5 | 50,4 | 23,4 | 7 | 6001 |

Tabela 9. Zmiany parametru κa , potencjału powierzchniowego (ψ_{θ}), ładunku powierzchniowego (σ_{θ}), powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku i liczby ładunków e przypadających na pojedynczy liposom uzyskane dla liposomów POPC w obecności surfaktantów jonowych [P3].

7.2.1.5. Wpływ na monowarstwę DOPC

Izotermy π –A zarejestrowane dla lipidu nienasyconego w obecności badanych surfaktantów jonowych przedstawiono na Rysunku 44. Można zauważyć, że izoterma monowarstwy DOPC naniesionej na czystą subfazę buforową charakteryzuje się punktem *lift-off* występującym przy powierzchni cząsteczkowej równej około 110 Å²/cząsteczkę [P3]. Następnie ciśnienie powierzchniowe wzrasta do momentu załamania monowarstwy przy powierzchni równej około 47 Å²/cząsteczkę, gdy ciśnienie powierzchniowe wynosi 40 mN/m [P3]. Tak więc analizowana krzywa cechuje się przebiegiem charakterystycznym dla monowarstwy w stanie cieczy rozprężonej [297] i różni się od pokazanej wcześniej izotermy POPC tylko nieznacznie. Silne podobieństwo pomiędzy izotermami POPC i DOPC zauważyli wcześniej Qiao i in., którzy badali monowarstwy tych lipidów osadzone na powierzchni czystej wody w temperaturze 22°C [311].



Rysunek 44. Izotermy π -A zarejestrowane dla monowarstwy DOPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P3].

Gdy w subfazie buforowej obecne są cząsteczki środków powierzchniowo czynnych, izotermy DOPC ulegają przesunięciu w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych [P3]. Rozważając SDS i DTAB jako przeciwnie naładowane surfaktanty o tej samej długości łańcucha węglowego, obserwowane przesunięcie jest większe dla surfaktantu anionowego, podobnie jak w przypadku monowarstwy POPC [P3]. Przesunięcie wzrasta wraz ze wzrostem stężenia środka powierzchniowo czynnego w subfazie oraz wraz z długością łańcucha hydrofobowego surfaktantu [P3]. Ponadto, należy podkreślić, że widoczny tu efekt związku powierzchniowo czynnego jest zdecydowanie większy, niż to było w przypadku monowarstwy DPPC czy POPC.

Dodatek surfaktantów jonowych wpływa także na wartości maksymalnych współczynników ściśliwości, które charakteryzują monowarstwę DOPC. Jak można zauważyć na Rysunku 45, obecność surfaktantu obniża maksymalną wartość modułu ściśliwości osiąganą przez monowarstwę, co pokazuje, że włączenie środka powierzchniowo czynnego do monowarstwy DOPC przeciwdziała formowaniu bardziej uporządkowanych struktur [P3]. Ponadto, uzyskane wyniki dowodzą, że zarówno monowarstwa DOPC zarejestrowana na czystej subfazie buforowej, jak i monowarstwy DOPC naniesione na subfazę buforową wzbogaconą w odpowiednie surfaktanty, wykazują cechy monowarstwy w stanie ciekłym [305].



Rysunek 45. Zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm sprężania monowarstw DOPC [P3].

Na Rysunku 46 zaprezentowano obrazy mikroskopowe monowarstwy DOPC naniesionej na czystą subfazę buforową. Można zauważyć, że otrzymane zdjęcia wykazują jednorodną teksturę fazową podczas całego procesu kompresji monowarstwy [P3]. Dowodzi to ciekłego charakteru monowarstwy DOPC, co jest zgodne z wynikami pokazanymi powyżej oraz z dostępnymi danymi literaturowymi [312].



Rysunek 46. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DOPC na powierzchni subfazy buforowej [P3]. Skala oznacza 100 µm.

Strukturę morfologiczną filmu DOPC zweryfikowano również po dodaniu do subfazy surfaktantów jonowych. Jak widać, obrazy BAM (Rysunek 47) w dalszym ciągu charakteryzują się całkowitą homogenicznością, co wskazuje, że morfologia monowarstwy nie ulega zmianie pod wpływem analizowanych surfaktantów [P3].

| | π = 5,1 mN/m | π = 12,8 mN/m | π = 15,0 mN/m |
|---|----------------------|---------------------------|-------------------|
| | | 1 e \$ | |
| | | | |
| Α | | | |
| | π = 17,3 mN/m | π = 28,8 mN/m | π = 38,3 mN/m |
| | | | |
| | 8 | | |
| | | | |
| | π = 5,1 mN/m | π = 12,4 mN/m | π = 15,1 mN/m |
| | | | |
| | | | |
| в | 100 | | |
| | π = 18,8 mN/m | π = 27,8 mN/m | π = 37,8 mN/m |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | <i>n</i> = 3,2 min/m | π = 13,1 mN/m | π = 15,2 miv/m |
| | | | * |
| | | | |
| С | π = 18.8 mN/m | $\pi = 30.3 \text{ mN/m}$ | π = 38.2 mN/m |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | π = 6,2 mN/m | π = 13,6 mN/m | π = 18,1 mN/m |
| | | | |
| | | | |
| - | | | |
| D | π = 20,1 mN/m | π = 28,4 mN/m | π = 35,3 mN/m |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Rysunek 47. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DOPC w obecności SDS (A), DTAB (B), TTAB (C) i CTAB (D) w subfazie buforowej [P3]. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM. Skala oznacza 100 µm.

Jak pokazują wyniki testu penetracji wstępnie skompresowanej monowarstwy DOPC (Rysunek 48), po każdym nastrzyku surfaktantu do subfazy buforowej następuje dodatnia zmiana ciśnienia powierzchniowego [P3], bezpośrednio związana badanych z oddziaływaniami związków z modelowa membrana [290]. DOPC Obserwowany przyrost ciśnienia jest tym większy, im wyższe jest stężenie anionowego surfaktantu w subfazie buforowej oraz im dłuższy łańcuch hydrofobowy surfaktantu kationowego [P3]. Z kolei końcowy efekt kationowego DTAB jest niezależny od zastosowanego stężenia, choć zauważalne są różnice w kinetyce zmian ciśnienia powierzchniowego w czasie [P3]. Nie mniej jednak uzyskane dane dowodzą, że analizowane surfaktanty ulegają włączeniu w strukturę monowarstwy DOPC.



Rysunek 48. Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu po nastrzyku surfaktantu anionowego (A) i surfaktantów kationowych (B) do monowarstwy DOPC skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m [P3].

7.2.1.6. Wpływ na dwuwarstwę DOPC

Otrzymane czyste liposomy DOPC charakteryzowały się rozmiarem równym 125,8 nm i współczynnikiem polidyspersyjności wynoszącym 0,13 [P3]. Rozmiar ten jest zatem zbieżny z rozmiarem pęcherzyków POPC. Analiza przedstawionych w Tabeli 10 zmian średniej średnicy hydrodynamicznej [P3] i współczynnika polidyspersyjności liposomów DOPC w obecności surfaktantów jonowych pokazuje, iż w obecności analizowanych surfaktantów wartości tych parametrów ulegają tylko minimalnym zmianom. Może to wynikać ze zwiększonej płynności liposomów DOPC [P3].

| Surfaktant | Csurf. [µM] | D_h [nm] | PDI |
|------------|----------------|------------|------|
| | 0 | 125,8 | 0,13 |
| SDS | 2,3 | 122,6 | 0,15 |
| | 4,5 | 123,7 | 0,12 |
| | 9,1 | 125,4 | 0,13 |
| DTAB | 2,3 | 125,8 | 0,15 |
| | 4,5 | 126,7 | 0,14 |
| | 9,1 | 127,6 | 0,13 |
| ТТАВ | 2,3 | 133,7 | 0,17 |
| | 4,5 | 133,1 | 0,18 |
| | 9,1 | 128,3 | 0,14 |
| СТАВ | 2,3 | 129,5 | 0,13 |
| | 4,5 | 124,6 | 0,13 |
| | 9,1 | 125,8 | 0,14 |

Tabela 10. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) [P3] i współczynnika polidyspersyjności (PDI) liposomów DOPC otrzymanych metodą hydratacji w obecności surfaktantów jonowych.

Potencjał dzeta czystych liposomów DOPC wynosił -3,3±0,9 mV [P3] i był bliski potencjałowi elektrokinetycznemu pęcherzyków utworzonych z DPPC. W obecności jonowych środków powierzchniowo czynnych potencjał dzeta liposomów DOPC uległ znaczącym zmianom (Rysunek 49) [P3]. Jak widać, obserwowane modyfikacje właściwości powierzchniowych liposomów zależały od charakteru, długości łańcucha węglowego oraz od stężenia surfaktantu [P3]. Jednak już najniższe analizowane stężenie związków powierzchniowo czynnych silnie wpłynęło na wartość ζ , a w przypadku surfaktantów kationowych – również na jego znak [P3]. Bezwzględne zmiany potencjału dzeta w obecności surfaktantów o stężeniu 2,3 μ M; 4,5 μ M i 9,1 μ M okazały się być bliskie tym obserwowanym dla liposomów otrzymanych z POPC i wynosiły odpowiednio [P3]: 14,5 mV; 21,8 mV i 30,2 mV dla SDS, 4,0 mV; 6,7 mV i 12,3 mV dla DTAB, 14,7 mV; 22,4 mV i 32,0 mV dla TTAB oraz 25,6 mV; 38,0 mV i 48,9 mV dla CTAB. Wskazuje to na porównywalny wpływ analizowanych surfaktantów na potencjał dzeta liposomów niezależnie od tego, czy składają się one z fosfolipidu półnienasyconego, czy nienasyconego.



Rysunek 49. Zmiany potencjału dzeta liposomów DOPC w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P3].

Dodatkową charakterystykę otrzymanych liposomów DOPC prezentuje Tabela 11. Jak można zauważyć, potencjał powierzchniowy czystych pęcherzyków DOPC wynosi -3,8 mV i przyjmuje wartości bardziej ujemne, gdy w układzie obecny jest surfaktant anionowy [P3]. Z kolei dodatek już najmniejszej ilości surfaktantu kationowego o najkrótszym łańcuchu hydrofobowym powoduje zmianę znaku potencjału powierzchniowego na dodatnią [P3]. Znaczącym modyfikacjom pod wpływem obecności surfaktantów jonowych ulega również ładunek powierzchniowy liposomów DOPC. Jego wartość rośnie zarówno wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu, jak i w miarę zwiększania długości łańcucha weglowego surfaktantów kationowych [P3]. Wyjatek stanowi najmniejsze analizowane stężenie DTAB, co wynika z konieczności neutralizacji początkowo ujemnego potencjału elektrokinetycznego czystych pęcherzyków DOPC [P3]. Z kolei odwrotną tendencję zmian obserwuje się w przypadku powierzchni przypadającej na jednostkowy ładunek elementarny, co odzwierciedla zwiększanie stopnia naładowania powierzchni liposomów [P3]. Obliczenia oparte na danych zawartych w Tabeli 11 i zależnościach π -A zarejestrowanych dla monowarstwy DOPC wskazują, że powierzchnia czystych liposomów DOPC jest naładowana w około 0,5% [P3]. Natomiast liposomy wzbogacone w surfaktanty jonowe, których poczatkowe stężenie w układzie wynosiło 2,3 µM, charakteryzują się powierzchniami naładowanymi w 2,9% (SDS), 0,1% (DTAB), 2,2% (TTAB) i 4,8% (CTAB) [P3].

| Surfaktant | Csurf. [µM] | ка | ψ ₀ [mV] | σ _θ [C/nm ² ×10 ²¹] | Powierzchnia na jednostkę ładunku [nm²/e ₀] | Liczba ładunków <i>e</i> na liposom |
|------------|----------------|------|------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | 0 | 35,9 | -3,8 | 1,5 | 106 | 470 |
| | 2,3 | 35,1 | -20,5 | 8,3 | 19 | 2474 |
| SDS | 4,5 | 35,3 | -29,0 | 12,1 | 13 | 3658 |
| | 9,1 | 35,6 | -38,9 | 17,0 | 9 | 5219 |
| | 2,3 | 35,9 | 0,8 | 0,3 | 501 | 99 |
| DTAB | 4,5 | 36,2 | 3,9 | 1,6 | 103 | 490 |
| | 9,1 | 36,5 | 10,3 | 4,1 | 39 | 1322 |
| | 2,3 | 38,2 | 13,1 | 5,3 | 31 | 1848 |
| ТТАВ | 4,5 | 37,9 | 22,0 | 9,0 | 18 | 3120 |
| | 9,1 | 36,5 | 33,2 | 14,1 | 11 | 4553 |
| | 2,3 | 36,8 | 25,7 | 10,6 | 15 | 3460 |
| СТАВ | 4,5 | 35,6 | 40,3 | 17,7 | 9 | 5451 |
| | 9,1 | 35,9 | 53,5 | 25,4 | 6 | 7913 |
| | | | | | | |

Tabela 11. Zmiany parametru κa , potencjału powierzchniowego (ψ_{θ}), ładunku powierzchniowego (σ_{θ}), powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku i liczby ładunków e przypadających na pojedynczy liposom uzyskane dla liposomów DOPC w obecności surfaktantów jonowych [P3].

7.2.2. Wpływ obecności cholesterolu (30 mol %) w warstwie lipidowej

Badania naukowe potwierdzają, iż cholesterol znacząco modyfikuje właściwości błon biologicznych [313,314]. Z tego względu jego obecność w błonie może być kluczowa dla efektu wywołanego przez dodatek surfaktantów zarówno na model jednowarstwowy, jak i dwuwarstwowy błon. W niniejszej pracy przeanalizowano warstwy lipidowe zawierające 30% molowych cholesterolu. Taka ilość cholesterolu jest bliska stanowi fizjologicznemu błon komórek eukariotycznych i pełni funkcję chemoprotekcyjną dla lipidów błonowych [315,316].

7.2.2.1. Wpływ na dwuskładnikową monowarstwę DPPC/Chol

Zarejestrowane dla monowarstwy DPPC/Chol zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej przedstawiono na Rysunku 50. Jak widać, punkt *lift-off* mieszanej monowarstwy DPPC/Chol z 30% zawartością cholesterolu, która została naniesiona na powierzchnię buforu Tricine, występuje przy powierzchni cząsteczkowej

równej około 65 Å²/cząsteczkę [P2]. W efekcie dalszej kompresji monowarstwy ciśnienie powierzchniowe stopniowo wzrasta aż do momentu załamania monowarstwy przy powierzchni równej około 35 Å²/cząsteczkę [P2]. Czysta monowarstwa DPPC wykazywała punkt *lift-off* w obszarze 115 Å²/cząsteczkę. To specyficzne przesunięcie w kierunku mniejszych powierzchni cząsteczkowych ujawnia kondensacyjny efekt cholesterolu na cząsteczki fosfolipidu [317]. Podobne zachowanie opisano wcześniej w badaniu mieszanych monowarstw DPPC/Chol na powierzchni roztworu PBS [51]. Ponadto, włączenie cholesterolu do monowarstwy DPPC doprowadziło do zaniku obszaru współistnienia stanu ciekłego rozprężonego i ciekłego skondensowanego [P2].



Rysunek 50. Izotermy π -A zarejestrowane dla monowarstwy DPPC/Chol w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P2].

Po dodaniu surfaktantów jonowych do subfazy buforowej izotermy π -A monowarstw DPPC/Chol są przesunięte w kierunku większych powierzchni cząsteczkowych [P2]. Przesunięcie to jest większe dla anionowego środka powierzchniowo czynnego (SDS) niż dla kationowego środka powierzchniowo czynnego o tej samej długości łańcucha (DTAB) [P2]. Ponieważ izotermy π -A zarejestrowane w obecności surfaktantów wykazują to szczególne przesunięcie w punkcie *lift-off* i nie pokrywają się z izotermą DPPC/Chol zarejestrowaną na powierzchni wolnej od detergentu, można wywnioskować, że surfaktanty są zintegrowane z monowarstwą DPPC/Chol [P2]. Ponadto, wyniki pokazują, iż wzrost stężenia surfaktantu w subfazie buforowej z 2,3 do 9,1 μ M nie powoduje istotnych zmian zarówno w kształcie izotermy, jak i jej przesunięciu [P2]. Widoczna jest tylko niewielka różnica pomiędzy dwoma zastosowanymi stężeniami SDS, polegająca na występowaniu załamania monowarstwy przy niższym ciśnieniu powierzchniowym w przypadku zastosowania wyższego stężenia SDS [P2]. Jak można również zauważyć, zwiększenie długości łańcucha hydrofobowego surfaktantów kationowych powoduje mniejsze przesunięcie izoterm niż te zaobserwowane dla DTAB [P2]. Warto również dodać, że ciśnienie powierzchniowe, przy którym membrana ulega załamaniu, maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha hydrofobowego surfaktantu [P2].

Zarejestrowane izotermy π –A posłużyły do wyliczenia zmian zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego, które zaprezentowano na Rysunku 51. Najwyższa maksymalna wartość modułu ściśliwości obserwowana jest dla monowarstwy DPPC/Chol otrzymanej na czystej subfazie buforowej i wynosi ~ 250 mN/m [P2]. Wartość ta wskazuje na wysoce uporządkowany stan LC monowarstwy [102].



Rysunek 51. Zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego wyliczone na podstawie zarejestrowanych izoterm sprężania monowarstw DPPC/Chol [P2].

W przypadku analogicznej jednoskładnikowej monowarstwy DPPC maksymalna wartość współczynnika ściśliwości wynosiła około 150 mN/m [P1]. Znaczące podwyższenie tej wartości w obecności cholesterolu potwierdza raz jeszcze efekt kondensacyjny cholesterolu. Wskazuje również na zwiększoną sztywność mieszanej monowarstwy fosfolipidowo-sterolowej przy 30% zawartości sterolu w porównaniu z czystą monowarstwą fosfolipidową, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [318,319].

Maksymalne wartości współczynnika ściśliwości monowarstwy DPPC/Chol zmniejszają się, gdy w subfazie buforowej obecne są jonowe związki powierzchniowo czynne [P2]. Świadczy to o zwiększonej płynności monowarstwy DPPC/Chol związanej z inkorporacją surfaktantów w strukturę monowarstwy, gdyż uważa się, że im niższa maksymalna wartość modułu ściśliwości, tym większa płynność i elastyczność monowarstwy [288]. Otrzymane wyniki pokazują również, że takie czynniki jak: zwiększenie stężenia SDS i DTAB w subfazie buforowej oraz wzrost długości łańcucha alkilowego surfaktantu powodują przesunięcie maksimum współczynnika ściśliwości w kierunku niższych ciśnień powierzchniowych. Ponadto, obserwowana maksymalna wartość modułu ściśliwości wzrasta wraz z długością łańcucha alkilowego surfaktantu kationowego, sugerując, że wśród rozważanych surfaktantów kationowych to DTAB wykazuje największy efekt upłynniający.

Dla dwuskładnikowego filmu DPPC/Chol zarejestrowano również izotermy ΔV –A, które przedstawiono na Rysunku 52 [P3]. W początkowym etapie kompresji izoterma potencjału powierzchniowego monowarstwy DPPC/Chol naniesionej na czystą subfazę buforową wykazuje stromy, prawie liniowy wzrost ΔV , po czym następuje przegięcie krzywej, które uwidacznia zmianę orientacji cząsteczek w analizowanym filmie lipidowym. Dalsza kompresja monowarstwy cechuje się już mniejszym wzrostem potencjału powierzchniowego, oznaczając mniejszą wartość μ_z .



Rysunek 52. Zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym zarejestrowane dla mieszanej monowarstwy DPPC/Chol w obecności surfaktantów jonowych [P3].

Dodatek surfaktantów jonowych do subfazy buforowej każdorazowo znacząco modyfikuje przebieg zależności zmian potencjału powierzchniowego w funkcji odwrotności powierzchni cząsteczkowej. Zaobserwowane różnice obejmują zarówno położenie krzywej względem wartości osi rzędnych, które jak już wcześniej wspomniano, jest zależne od aktywności powierzchniowej związku, jak i występowanie (bądź zanik) wyraźnej zmiany w orientacji cząsteczek tworzących monowarstwę w efekcie przemiany fazowej filmu. Podobnie jak w przypadku monowarstwy DPPC, zwiększenie stężenia SDS z 2,3 do 9,1 µM oraz wprowadzenie do układu długołańcuchowego surfaktantu kationowego (tutaj również TTAB) są powodem zaniku wyraźnej reorientacji cząsteczek substancji filmotwórczych podczas przejścia monowarstwy w stan ciekły. Dzieje się tak, ponieważ zwiększona ilość zgromadzonych na powierzchni cząsteczek wymusza ich odpowiednie uporządkowanie jeszcze zanim kompresja monowarstwy zostanie rozpoczęta.

Zmiany morfologii badanych dwuskładnikowych monowarstw DPPC/Chol podczas kompresji określono techniką BAM i przedstawiono na poniższych Rysunkach 53 i 54.



Rysunek 53. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC/Chol na powierzchni subfazy buforowej [P2]. Skala oznacza 100 µm.

Obrazy BAM monowarstwy DPPC/Chol naniesionej na powierzchnię czystej subfazy buforowej w zakresie niskich ciśnień powierzchniowych wykazują współistnienie fazy gazowej (ciemne obszary) i ciekłej skondensowanej (jasne obszary) [P2]. Postępująca kompresja monowarstwy sprzyja utworzeniu jednorodnej tekstury, która utrzymuje się do momentu załamania filmu [P2]. Efekt ten przypisuje się wprowadzeniu cholesterolu do monowarstwy DPPC, ponieważ w przypadku czystej monowarstwy DPPC na obrazach BAM pojawiały się kwiatopodobne domeny [P2]. Wcześniej wyjaśniono, iż cząsteczki cholesterolu w monowarstwie rozpraszają się między cząsteczkami DPPC w celu zmniejszenia kontaktu hydrofobowych pierścieni cholesterolu z wodą, co prowadzi do molekularnej reorganizacji monowarstwy i zapobiega tworzeniu się domen DPPC [320].

W wyniku dodania do subfazy buforowej surfaktantów o odmiennej naturze chemicznej, lecz tej samej długości łańcucha hydrofobowego (SDS i DTAB) na początkowych etapach kompresji nie obserwuje się zmian morfologicznych monowarstwy DPPC/Chol w porównaniu z monowarstwą utworzoną na czystej subfazie buforowej [P2]. Należy jednak zauważyć, że w obszarze wysokich ciśnień powierzchniowych tworzą się bardzo małe domeny [P2]. Domeny te są lepiej widoczne po dodaniu do układu kationowych środków powierzchniowo czynnych o dłuższych łańcuchach alkilowych [P2]. W przypadku TTAB występują one przy ciśnieniu powierzchniowym równym ~ 33,8 mN/m, natomiast w obecności CTAB zaczynają się tworzyć przy ciśnieniu powierzchniowym równym około 13,3 mN/m i są wyraźnie widoczne, gdy ciśnienie osiąga wartość 16,8 mN/m [P2]. Wskazuje to na oddziaływania długołańcuchowego kationowego środka powierzchniowo czynnego z monowarstwą DPPC/Chol, wpływające na kohezyjne oddziaływania van der Waalsa między pierścieniami sterolowymi cholesterolu i łańcuchami alkilowymi DPPC, które w dwuskładnikowym układzie DPPC/Chol zapobiegały nukleacji domen DPPC [P2].



Rysunek 54. Wybrane obrazy BAM otrzymane dla monowarstwy DPPC/Chol w obecności SDS (A), DTAB (B), TTAB (C) i CTAB (D) w subfazie buforowej [P2]. Stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM. Skala oznacza 100 µm.

Rysunek 55 przedstawia wyniki otrzymane z testów penetracji dwuskładnikowej monowarstwy DPPC/Chol. Dodatek wszystkich analizowanych związków powierzchniowo subfazy buforowej spowodował gwałtowny ciśnienia czynnych do wzrost powierzchniowego zaraz po ich nastrzyku [P2]. Co ważne, ciśnienie powierzchniowe wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha weglowego środka powierzchniowo czynnego, co dobrze uwidacznia dodanie DTAB, TTAB i CTAB do układu doświadczalnego [P2]. Z kolei, efekt stężenia surfaktantu jest różny w zależności od natury chemicznej związku. Wraz ze zwiększeniem stężenia z 2,3 do 9,1 µM ciśnienie powierzchniowe znacznie wzrasta dla anionowego SDS, podczas gdy dla kationowego DTAB zmiany te są niewielkie [P2].



Rysunek 55. Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu po nastrzyku surfaktantu anionowego (A) i surfaktantów kationowych (B) do monowarstwy DPPC/Chol skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m [P2].

Otrzymane dane wskazują na inkorporację cząsteczek surfaktantów w strukturę monowarstwy DPPC/Chol. Porównując wyniki penetracji uzyskane dla jednoskładnikowego filmu DPPC i dla filmu mieszanego DPPC/Chol można stwierdzić, że obecność cholesterolu sprzyja penetracji SDS [P2]. Dowodem tego są wyższe wartości $\Delta \pi$ uzyskane dla monowarstwy DPPC/Chol po nastrzyku surfaktantu w porównaniu z wartościami otrzymanymi wcześniej dla monowarstwy DPPC. Powyższy wniosek jest zgodny z wynikami uzyskanymi ostatnio przez Nigam [297]. Stosując metodę cząstkowej powierzchni molowej oraz równanie Pethica stwierdzono bowiem, że w przypadku monowarstwy DPPC/Chol ze stosunkiem cholesterolu do DPPC równym 0,55 penetracja SDS jest ściśle skorelowana z ciśnieniem powierzchniowym monowarstwy [297]. Przy niskich ciśnieniach powierzchniowych zauważono mniejszą penetrację SDS, natomiast przy wysokich ciśnieniach – większą [297]. Wyliczono, że przy ciśnieniu powierzchniowym równym 32 mN/m i stężeniu SDS wynoszącym 0,1 mM, procent molowy SDS w mieszanej monowarstwie DPPC/Chol wynosi około 2,5%, a w monowarstwie DPPC około 1% [297]. Z drugiej strony, w przypadku surfaktantów kationowych zdolność penetracji monowarstw DPPC i DPPC/Chol utrzymuje się na porównywalnym poziomie.

7.2.2.2. Wpływ na dwuskładnikową dwuwarstwę DPPC/Chol

Liposomy otrzymane z wykorzystaniem mieszaniny DPPC/Chol o 30% zawartości cholesterolu miały średnią średnicę hydrodynamiczną równą 120,1 nm, a współczynnik polidyspersyjności wynosił 0,11 (Rysunek 56) [P2]. W porównaniu z opisanymi wcześniej liposomami DPPC, pęcherzyki z dodatkiem cholesterolu charakteryzują się nieco większym rozmiarem i znacznie mniejszą polidyspersyjnością. Zwiększenie rozmiarów pęcherzyków lipidowych wraz ze zwiększeniem zawartości cholesterolu znane jest w literaturze przedmiotu [211,321–324]. Wzrost wielkości pęcherzyków lipidowych wyjaśniono tym, iż wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu coraz więcej jego cząsteczek jest rozprowadzanych w podwójnej warstwie fosfolipidowej, zakłócając ścisłe upakowanie dwuwarstwy i powodując wzrost rozmiaru liposomów [324]. Natomiast niski współczynnik polidyspersyjności świadczy o jednorodności uzyskanej zawiesiny.



Rysunek 56. Rozkład wielkości czystych liposomów DPPC/Chol [P2].

Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej i współczynnika polidyspersyjności liposomów DPPC/Chol pod wpływem surfaktantów jonowych przedstawia Tabela 12 [P2]. Jak widać, w obecności anionowego SDS zarówno wielkość, jak i współczynnik polidyspersyjności liposomów DPPC/Chol zmieniają się nieznacznie w porównaniu z liposomami bez dodatku surfaktantu. Z kolei dodatek surfaktantów kationowych znacząco wpływa na ich wielkość oraz polidyspersyjność. Wraz ze wzrostem stężenia DTAB rozmiar i indeks polidyspersyjności liposomów się zwiększają. Natomiast w miarę wzrostu stężeń TTAB i CTAB wielkości te maleją. Tendencja obserwowanych zmian w zależności od stężenia kationowego surfaktantu jest tu zatem analogiczna do wpływu surfaktantów na rozmiar i polidyspersyjność liposomów DPPC. Należy jednak zauważyć, że w przypadku liposomów DPPC/Chol zachodzące zmiany są większe oraz wykazują wyraźną zależność od długości łańcucha alkilowego surfaktantu.

| Surfaktant | Csurf. [µM] | <i>D_h</i> [nm] | PDI |
|------------|----------------|---------------------------|------|
| | 0 | 120,1 | 0,11 |
| SDS | 2,3 | 119,9 | 0,11 |
| | 4,5 | 122,2 | 0,11 |
| | 9,1 | 122,5 | 0,12 |
| DTAB | 2,3 | 126,4 | 0,15 |
| | 4,5 | 135,3 | 0,19 |
| | 9,1 | 168,0 | 0,37 |
| ТТАВ | 2,3 | 1515,7 | 0,42 |
| | 4,5 | 755,5 | 0,39 |
| | 9,1 | 229,9 | 0,16 |
| СТАВ | 2,3 | 871,1 | 0,49 |
| | 4,5 | 185,7 | 0,17 |
| | 9,1 | 134,8 | 0,12 |

Tabela 12. Zmiany średniej średnicy hydrodynamicznej (D_h) [P2] i współczynnika polidyspersyjności (**PDI**) liposomów DPPC/Chol otrzymanych metodą hydratacji w obecności surfaktantów jonowych.

Potencjał dzeta otrzymanych pęcherzyków DPPC/Chol zawierających 30% cholesterolu wynosił -6,0 \pm 0,2 mV. Był on zatem bardziej ujemny niż ten uzyskany dla czystych liposomów DPPC (-3,2 \pm 1,4 mV) [P2]. Tendencja ta jest zgodna z literaturą i tłumaczona jest tym, że cząsteczki cholesterolu włączone do dwuwarstwy lipidowej zmniejszają powinowactwo powierzchniowego wiązania pomiędzy powierzchnią dwuwarstwy a kationami obecnymi w roztworze buforowym [321]. Stąd zmniejszenie potencjału elektrokinetycznego liposomów wówczas, gdy w układzie obecny jest

cholesterol. Zmiany potencjału dzeta mieszanych liposomów DPPC/Chol w obecności SDS, DTAB, TTAB i CTAB przedstawiono na Rysunku 57.



Rysunek 57. Zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC/Chol w obecności surfaktantu anionowego (A) oraz surfaktantów kationowych (B) [P2].

Z przedstawionych danych wynika, że surfaktant niosący ładunek ujemny zmienia wartość potencjału dzeta liposomów na bardziej ujemną, surfaktanty niosące ładunek dodatni na bardziej dodatnia, a wpływ surfaktantu wzrasta wraz ze wzrostem jego początkowego stężenia w układzie [P2]. Bezwzględna zmiana potencjału dzeta w obecności surfaktantów o stężeniu 2,3 µM; 4,5 µM i 9,1 µM jest bowiem równa [P2]: 15,9 mV; 21,9 mV i 24,8 mV w przypadku dodatku SDS, 3,7 mV; 8,0 mV i 13,1 mV w przypadku DTAB, 16,3 mV; 26,5 mV i 38,8 mV w przypadku TTAB oraz 24,8 mV; 39,8 mV i 60,1 mV w przypadku CTAB. Zatem, jak oczekiwano, wpływ kationowego środka powierzchniowo czynnego na potencjał dzeta liposomów silnie wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego surfaktantu. Warto jeszcze zaznaczyć, że zmiany potencjału dzeta liposomów DPPC/Chol obserwowane w obecności SDS i DTAB są większe niż te przedstawione wcześniej dla czystych liposomów DPPC. Wskazuje to na większy wpływ surfaktantów zbudowanych z 12-węglowego łańcucha alifatycznego na liposomy DPPC, gdy w dwuwarstwie lipidowej obecny jest cholesterol. Wpływ TTAB wydaje się być niezależny od dodatku cholesterolu do liposomów, a w przypadku CTAB tendencja jest różna w zależności od zastosowanego stężenia związku powierzchniowo czynnego.

Dalszą charakterystykę pęcherzyków DPPC/Chol zestawiono w Tabeli 13. Ze względu na duże rozmiary liposomów w obecności TTAB i CTAB, w zestawieniu

uwzględniono jedynie układy domieszkowane surfaktantami zbudowanymi z 12węglowego łańcucha alkilowego. Jak przewidywano, dodatek anionowego surfaktantu zmienia wartość potencjału powierzchniowego na bardziej ujemną, a addycja surfaktantu kationowego na bardziej dodatnią [P2]. Natomiast wielkość ładunku powierzchniowego liposomów znacząco wzrasta tylko w obecności SDS [P2]. W przypadku DTAB ładunek powierzchni liposomów najpierw maleje, a następnie nieco wzrasta, gdy znak potencjału dzeta zmienia się z ujemnego na dodatni [P2]. Analogiczną tendencję wykazują wartości liczby ładunków elementarnych przypadających na pojedynczy liposom. Natomiast odwrotna sytuacja ma miejsce przy analizie powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku.

Tabela 13. Zmiany parametru κa , potencjału powierzchniowego (ψ_{θ}), ładunku powierzchniowego (σ_{θ}), powierzchni przypadającej na jednostkę ładunku i liczby ładunków e przypadających na pojedynczy liposom uzyskane dla liposomów DPPC/Chol w obecności surfaktantów jonowych [P2].

| Surfaktant | Csurf. [µM] | ка | ψ0 [mV] | σ ₀ [C/nm ² ×10 ²¹] | Powierzchnia na jednostkę ładunku [nm²/e₀] | Liczba ładunków <i>e</i> na liposom |
|------------|----------------|------|------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | 0 | 34,2 | -6,7 | 2,7 | 60 | 751 |
| | 2,3 | 35,9 | -25,2 | 10,4 | 15 | 2936 |
| SDS | 4,5 | 38,5 | -32,1 | 13,6 | 12 | 3961 |
| | 9,1 | 47,9 | -35,6 | 15,3 | 11 | 4451 |
| | 2,3 | 34,2 | -2,6 | 1,0 | 156 | 320 |
| DTAB | 4,5 | 34,8 | 2,3 | 0,9 | 176 | 325 |
| | 9,1 | 34,8 | 8,2 | 3,3 | 49 | 1805 |

Warto zwrócić uwagę, że dla czystych mieszanych liposomów DPPC/Chol powierzchnia przypadająca na jednostkę ładunku jest ponad trzykrotnie mniejsza niż wartość uzyskana dla czystych liposomów DPPC, co wynika z kondensacyjnego efektu cholesterolu [P2]. Ponadto, końcowe wyliczenia wskazują, że powierzchnia czystych liposomów DPPC/Chol jest naładowana w około 0,7% [P2], a po dodaniu najmniejszej ilości SDS i DTAB naładowanie powierzchni wynosi odpowiednio 2,9% i 0,3%.

8. Wnioski

Analiza wyników otrzymanych z przeprowadzonych eksperymentów pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

- Powszechnie stosowane związki powierzchniowo czynne wykazują zdolność do spontanicznego i trwałego wbudowywania się w strukturę modelowych błon biologicznych. Z tego powodu już ich niewielka ilość (znacznie poniżej CMC) jest wystarczająca, aby zmienić wiele właściwości zarówno modelu jednowarstwowego, jak i modelu dwuwarstwowego biomembran. Zakres obserwowanych zmian zależy od natury surfaktantu, struktury hydrofobowej surfaktantu, jego stężenia oraz składu chemicznego błon.
- Surfaktant niejonowy (Triton X-100), ulegając wbudowaniu w strukturę monowarstwy DPPC, obniża stopień uporządkowania łańcuchów acylowych cząsteczek lipidu i powoduje tym samym wzrost płynności membrany. Świadczą o tym zarówno zależności wartości współczynnika ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego, jak i mikroskopowe zdjęcia morfologii monowarstwy. Z kolei nastrzyk Tritonu X-100 do subfazy buforowej, gdy na jej powierzchni utworzona jest monowarstwa DPPC skompresowana do ciśnienia powierzchniowego równego 32 mN/m i charakteryzująca się upakowaniem cząsteczek, ściśliwością oraz stanem fazowym analogicznym do dwuwarstwy DPPC, powoduje tylko minimalny wzrost ciśnienia powierzchniowego. Jednak obserwowana dodatnia zmiana ciśnienia powierzchniowego wskazuje na spontaniczne i trwałe wbudowanie się cząsteczek Tritonu X-100 w monowarstwę lipidową imitującą dwuwarstwę. Mimo to, wbudowanie cząsteczek Tritonu X-100 w strukturę pęcherzyków lipidowych nie wpływa ani na rozmiar, ani na potencjał dzeta i ładunek powierzchniowy liposomów DPPC. Powoduje natomiast zwiększenie ich jednorodności.
- Surfaktanty jonowe, anionowy SDS i kationowy DTAB, o tej samej długości łańcucha hydrofobowego również wykazują upłynniający wpływ na monowarstwę DPPC oraz powodują dodatnią zmianę ciśnienia powierzchniowego po nastrzyku do wstępnie skompresowanej monowarstwy DPPC. Wykazują jednak znacznie efektywniejszą penetrację filmu DPPC niż analizowany wcześniej surfaktant niejonowy. Wynika to z większego przyrostu ciśnienia powierzchniowego w ich obecności widocznego podczas testu penetracji monowarstwy. Ponadto, surfaktanty jonowe w przeciwieństwie do surfaktantu niejonowego silnie wpływają na

właściwości liposomów DPPC. Dodatek SDS powoduje zmniejszenie ich średnicy hydrodynamicznej, podczas gdy dodatek DTAB przyczynia się do jej nieznacznego wzrostu. Powodem tego zjawiska są specyficzne oddziaływania pomiędzy najbardziej zewnętrzną, dodatnio naładowaną częścią głowy lipidowej DPPC a cząsteczkami surfaktantów. Surfaktant anionowy poprzez oddziaływania przyciągające powoduje zmniejszenie sił odpychających w dwuwarstwie, przez co rozmiar pęcherzyków jest mniejszy. Dodatek surfaktantu kationowego przyczynia się do indukcji sił odpychających w dwuwarstwie, powodując tym samym zwiększenie rozmiaru liposomów. Ponadto, naładowany ujemnie SDS zmienia wartość potencjału dzeta liposomów DPPC na bardziej ujemną, a naładowany dodatnio DTAB na bardziej dodatnią. Efekt jest silniejszy w przypadku surfaktantu anionowego, co wynika z tego, że surfaktant kationowy w pierwszej kolejności neutralizuje ujemny potencjał dzeta czystych liposomów DPPC.

✓ Wpływ SDS na modelowe biomembrany wzrasta, gdy w łańcuchu hydrofobowym cząsteczki lipidu obecne jest wiązanie nienasycone. W przypadku modelu jednowarstwowego obserwuje się coraz wyraźniejsze przesunięcia izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w filmie powierzchniowym w stronę większych powierzchni cząsteczkowych. Rozważając monowarstwy lipidowe charakteryzujące się upakowaniem cząsteczek, ściśliwością oraz stanem fazowym analogicznym do dwuwarstw lipidowych, tj. przy ciśnieniu filmu wynoszącym 32 mN/m, wyraźniejsze przesunięcia izoterm ciśnienia powierzchniowego obserwuje się w szeregu: lipid nasycony < lipid półnienasycony ≈ lipid nienasycony (Rysunek 58). Natomiast wpływ jego dodatnio naładowanego odpowiednika DTAB na monowarstwy Langmuira jest odwrotny i maleje wraz z obecnością wiązań nienasyconych w cząsteczce fosfolipidu, w szeregu: lipid nasycony > lipid półnienasycony.



Rysunek 58. Zmiany powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie Langmuira otrzymanej przy ciśnieniu powierzchniowym równym 32 mN/m z DPPC, POPC, DOPC oraz mieszaniny DPPC i cholesterolu w obecności SDS i DTAB. Początkowe stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM.

✓ Eksperymenty przeprowadzone z użyciem modelu dwuwarstwowego wskazują na analogiczny wpływ SDS na właściwości powierzchniowe liposomów. Efekt ten zobrazowano na przykładzie wyliczonego procentu naładowania powierzchni poszczególnych liposomów i przedstawiono na Rysunku 59. Wpływ DTAB jest znikomy, ponieważ surfaktant kationowy w pierwszej kolejności neutralizuje ujemny potencjał dzeta czystych liposomów.



Rysunek 59. Procent naładowania powierzchni liposomów utworzonych z DPPC, POPC, DOPC oraz mieszaniny DPPC i cholesterolu w obecności SDS i DTAB. Początkowe stężenie środka powierzchniowo czynnego wynosi 2,3 µM.

- ✓ Obecność cholesterolu (30 mol %) w warstwie lipidowej sprzyja wbudowywaniu się anionowego SDS i kationowego DTAB w modelowe biomembrany.
- Wpływ surfaktantów na modelowe biomembrany wzrasta wraz z długością łańcucha węglowego surfaktantu i wraz z jego stężeniem.
- ✓ Wpływ surfaktantów jonowych, SDS i DTAB, zbudowanych z 12-węglowego łańcucha hydrofobowego na potencjał elektrokinetyczny liposomów DPPC tylko w niewielkim stopniu zależy od metody otrzymania pęcherzyków lipidowych. Porównanie metody hydratacji cienkiego filmu lipidowego uzupełnionej o ekstruzję i metody elektroformacji prowadzi do analogicznych wniosków, przy czym przy zastosowaniu metody elektroformacji obserwowane bezwzględne zmiany potencjału elektrokinetycznego liposomów w obecności surfaktantów są nieco większe.
- Zmiany potencjału elektrokinetycznego liposomów DPPC w wyniku addycji SDS w pierwszym etapie otrzymywania liposomów są mniejsze niż te, gdy surfaktant dodano do gotowej zawiesiny pęcherzyków. Natomiast zmiany potencjału elektrokinetycznego liposomów DPPC pod wpływem DTAB są niezależne od momentu addycji surfaktantu.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że wszystkie rozważane surfaktanty charakteryzują się dobrą mieszalnością ze standardowymi lipidami błonowymi i bezpośrednio wpływają na właściwości modelowych błon biologicznych. Wbudowując się w błony, zmieniają ich organizację molekularną, zwiększają płynność i ładunek powierzchniowy, przez co mogą rzutować między innymi na translokację białek błonowych i funkcjonowanie błon komórkowych. Dodatek niewielkiej ilości surfaktantów o stężeniu nawet 100 razy niższym od ich CMC może zmieniać właściwości elektrokinetyczne membran lub zwiększać jej przepuszczalność również w przypadku surfaktantów niejonowych stosowanych powszechnie jako detergenty w laboratoriach. Należy zatem pamietać, jak ważna jest czystość układu pomiarowego zarówno w przypadku analizy monowarstw Langmuira, jak i liposomów, gdyż nawet niewielkie pozostałości detergentów mogą generować fałszywe i niemożliwe do odtworzenia wyniki. Z drugiej strony, dodatek surfaktantów do świeżo zsyntezowanych liposomów jest propozycją nowego podejścia użytkowego surfaktantów optymalizującego konwencjonalną procedurę modyfikacji powierzchni liposomów.

Uzyskane wyniki zachęcają do rozszerzenia przedmiotu badań o kolejne układy lipidów oraz kolejne techniki badawcze (np. technika Langmuir-Blodgett oraz dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego), które mogłyby być pomocne w ustaleniu rozmieszczenia cząsteczek związków powierzchniowo czynnych w warstwach lipidowych. Jest to zagadnienie istotne w kontekście interakcji tak zmodyfikowanych liposomów ze środowiskiem.

9. Streszczenie

W ostatnich latach liczba badań poświęconych modelowym błonom biologicznym wykazuje nieprzerwanie tendencję wzrostową. Co więcej, zarówno z modelu jednowarstwowego, jak i dwuwarstwowego błon korzystają obecnie Naukowcy z różnych dziedzin nauki, co podkreśla ich ogromną przydatność w poznawaniu świata. Ponieważ właściwości układów modelowych zmieniają się znacząco w obecności surfaktantów, zasadne jest poszerzenie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy na temat interakcji różnorodnych związków powierzchniowo czynnych z lipidami błonowymi. W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto zatem próbę analizy wpływu niewielkich ilości surfaktantów na wybrane właściwości monowarstw i dwuwarstw lipidowych. Badania przeprowadzono w sposób kompleksowy, stosując:

 monowarstwy lipidowe (monowarstwy Langmuira): poprzez analizę izoterm ciśnienia powierzchniowego, zmian współczynnika ściśliwości, zmian organizacji molekularnej, zmian morfologii i badanie penetracji monowarstw,

– dwuwarstwy lipidowe (liposomy typu SUV): poprzez określenie zmian właściwości elektrokinetycznych liposomów na podstawie pomiarów potencjału dzeta, jak również zmian średnicy hydrodynamicznej liposomów oraz współczynnika polidyspersyjności.

Dla pełnego opisu efektu związków powierzchniowo czynnych na biomembrany do badań wybrano surfaktanty zróżnicowane pod względem natury chemicznej (surfaktant niejonowy, anionowy i kationowy) i długości łańcucha węglowego (surfaktanty kationowe o 12-, 14- i 16-węglowym łańcuchu alifatycznym). Z kolei, w celu porównania efektu środka powierzchniowo czynnego na błony lipidowe o różnej strukturze części hydrofobowej w eksperymentach zastosowano układy modelowe utworzone z lipidów o zróżnicowanym stopniu nasycenia łańcuchów acylowych (lipid nasycony DPPC, półnienasycony POPC i nienasycony DOPC). Przeanalizowano również wpływ surfaktantów na mieszaną membranę utworzoną z całkowicie nasyconego lipidu i cholesterolu, który jest głównym sterolem występującym w błonach komórkowych ssaków, warunkującym ich prawidłowe funkcjonowanie.

Rozprawa składa się z dwóch głównych części: części teoretycznej i części doświadczalnej, które poprzedza krótkie wprowadzenie w tematykę rozprawy i naznaczenie celu pracy. Część teoretyczną stanowi przegląd literatury podzielony na trzy rozdziały dotyczące kolejno: charakterystyki naturalnych błon biologicznych, przedstawienia modelowych błon biologicznych oraz opisu związków powierzchniowo czynnych jako

substancji zdolnych do modyfikacji właściwości modelowych błon biologicznych. W pierwszym kroku omówiono budowę i strukturę lipidową naturalnych biomembran. Następnie, odnosząc się do analogii strukturalnej, wskazano na istotne znaczenie monowarstw Langmuira i liposomów w naśladowaniu błon biologicznych. Omówiono ponadto ich otrzymywanie, zastosowanie i metody badania (ze szczególnym uwzględnieniem metod wykorzystywanych podczas przygotowywania niniejszej pracy). Część teoretyczną kończy rozdział przedstawiający definicję, klasyfikację, właściwości oraz przykłady zastosowania związków powierzchniowo czynnych. Ważnym punktem tej części rozprawy jest omówienie trójstopniowego modelu solubilizacji liposomów przez surfaktanty, które potwierdza, że w eksperymentach opisanych w części doświadczalnej proces ten na pewno nie zachodzi.

Na początku części eksperymentalnej scharakteryzowano stosowane odczynniki oraz rozważane układy pomiarowe, a także przedstawiono metodykę pomiarów. Następnie zaprezentowano wyniki otrzymane w toku zaplanowanych badań. Prezentację i dyskusję wyników podzielono na dwa rozdziały. Pierwszy z nich dotyczy wpływu niejonowego związku powierzchniowo czynnego na monowarstwy Langmuira i liposomy utworzone z lipidu całkowicie nasyconego, a drugi – wpływu surfaktantów jonowych na monowarstwy Langmuira i liposomy utworzone z lipidu całkowicie nasyconego, półnienasyconego, nienasyconego oraz z mieszaniny lipidu nasyconego i cholesterolu. Dla wszystkich układów jednowarstwowych zaprezentowano uzyskane izotermy ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej, wyliczone na ich podstawie zależności wartości współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego, zdjęcia morfologii powierzchni monowarstw wykonane przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera oraz testy penetracji wstępnie skompresowanej monowarstwy. Dla większości rozważanych układów jednowarstwowych określono również zmiany potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej. Z kolei dla układów dwuwarstwowych przedstawiono uzyskane w obecności surfaktantów: zmiany średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidyspersyjności i potencjału elektrokinetycznego. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono następnie potencjał powierzchniowy i ładunek powierzchniowy liposomów, powierzchnię przypadającą na jednostkę ładunku oraz liczbę ładunków elementarnych przypadającą na pojedynczy liposom. Finalnie pozwoliło to na określenie procentu naładowania powierzchni poszczególnych pęcherzyków lipidowych.

W kolejnej, ostatniej części pracy sformułowano wnioski z przeprowadzonych badań. Stwierdzono, że powszechnie stosowane związki powierzchniowo czynne wykazują
zdolność do spontanicznego i trwałego wbudowywania się w strukturę modelowych błon biologicznych. Z tego powodu już ich niewielka ilość jest wystarczająca, aby zmienić wiele właściwości zarówno modelu jednowarstwowego, jak i modelu dwuwarstwowego biomembran. Zakres obserwowanych zmian jest zależny od natury surfaktantu, struktury hydrofobowej surfaktantu, jego stężenia oraz składu chemicznego błon. Dodatek surfaktantu niejonowego Tritonu X-100 zwiększył stopień nieuporządkowania łańcuchów acylowych cząsteczek DPPC w monowarstwie lipidowej i spowodował tym samym wzrost płynności membrany. Jednak nie wpłynął ani na rozmiar, ani na potencjał dzeta i ładunek powierzchniowy liposomów DPPC. Spowodował natomiast zwiększenie ich jednorodności. Anionowy SDS i kationowy DTAB o tej samej długości łańcucha hydrofobowego również wykazały upłynniający wpływ na monowarstwę DPPC. Spowodowały ponadto znaczącą, dodatnią zmianę ciśnienia powierzchniowego po nastrzyku do wstępnie skompresowanej monowarstwy DPPC, co oznacza, że w porównaniu z surfaktantem niejonowym – penetrują film DPPC bardziej efektywnie. Włączenie SDS do pęcherzyków lipidowych DPPC doprowadziło do zmniejszenia ich średnicy hydrodynamicznej i nadało bardziej ujemny potencjał elektrokinetyczny. Przeciwnie, włączenie DTAB przyczyniło się do nieznacznego zwiększenia średnicy liposomów DPPC i nadało im bardziej dodatni potencjał dzeta. Dodatek kolejnych w szeregu homologicznym surfaktantów kationowych (TTAB i CTAB) w większości rozważanych właściwości spowodował jeszcze wyraźniejsze zmiany niż DTAB. Efekt surfaktantu był też najczęściej większy w miarę wzrostu stężenia surfaktantu i w obecności przynajmniej jednego wiązania nienasyconego w strukturze lipidu tworzącego membranę.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że poprzez wpływ na właściwości biomembran surfaktanty mogą rzutować między innymi na translokację białek błonowych i funkcjonowanie błon komórkowych. Należy zatem pamiętać, jak ważna jest czystość układu pomiarowego zarówno w przypadku analizy monowarstw Langmuira, jak i liposomów, gdyż pozostałości detergentów mogą generować fałszywe i niemożliwe do odtworzenia wyniki. Z drugiej strony, dodatek surfaktantów do świeżo zsyntezowanych liposomów jest propozycją nowego podejścia użytkowego surfaktantów optymalizującego konwencjonalną procedurę modyfikacji powierzchni liposomów.

10. Summary

In recent years, the number of studies devoted to model biological membranes shows a continually increasing trend. Moreover, both the monolayer and bilayer membrane models are currently used by scientists from various fields of science, which emphasizes their great usefulness in the exploring the world. As the properties of model systems change significantly in the presence of surfactants, it is reasonable to expand and systematize the general knowledge on the interaction of various surfactants with membrane lipids. Therefore, in this doctoral dissertation an attempt was made to analyze the influence of tiny amounts of surfactants on the selected properties of lipid monolayers and bilayers. The research was carried out comprehensively using:

- lipid monolayers (Langmuir monolayers): by analyzing the surface pressure isotherms, the changes in the compressibility modulus, the changes in the molecular organization, the changes in the morphology and the monolayer penetration studies,

- lipid bilayers (SUV liposomes): by determining the changes in the electrokinetic properties of liposomes based on the measurements of the zeta potential, as well as the changes in the hydrodynamic diameter of the liposomes and the polydispersity index.

To fully describe the effect of surfactants on the biomembranes, the surfactants differing in chemical nature (non-ionic, anionic and cationic surfactants) and carbon chain length (cationic surfactants with a 12-, 14- and 16-carbon aliphatic chain) were chosen for the study. In turn, in order to compare the effect of surfactant on lipid membranes with a various structure of the hydrophobic part, the model systems made of lipids with different degrees of saturation of acyl chains (saturated lipid DPPC, semi-unsaturated POPC and unsaturated DOPC) were included. The surfactants influence on a mixed membrane made of fully saturated lipid and cholesterol, which is the main sterol found in mammalian cell membranes determining their proper functioning, was also analyzed.

The dissertation consists of two main parts: the theoretical part and the experimental part, which are preceded by a brief introduction to the topic of the dissertation and setting the purpose of the work. The theoretical part is a literature review divided into three chapters concerning: the characteristics of natural biological membranes, the presentation of model biological membranes and the description of surfactants as substances capable of modifying the properties of model biological membranes. In the first step, the structure and lipid composition of natural biomembranes were described. Then, referring to the structural analogy, the importance of Langmuir monolayers and liposomes in mimicking biological

membranes was indicated. Moreover, their preparation, application and research methods (with particular emphasis on the methods used in this work) were discussed. The theoretical part ends with a chapter presenting the definition, classification, properties and examples of surfactant applications. An important point of this part of the dissertation is the discussion of the three-stage model of liposome solubilization by surfactants, which confirms that in the experiments described in the experimental part, this process certainly does not occur.

At the beginning of the experimental part, the applied reagents and the considered measuring systems were characterized, as well as the measurement methodology was presented. Then, the results obtained in the course of planned research were discussed. The presentation and discussion of the results were divided into two chapters. The first concerns the effect of nonionic surfactant on the Langmuir monolayers and liposomes composed of fully saturated lipid, and the second - the effect of ionic surfactants on the Langmuir monolayers and liposomes made of fully saturated, semi-unsaturated and unsaturated lipids, and a mixture of saturated lipid and cholesterol. For all monolayer systems, the obtained surface pressure-molecular area isotherms, the compressibility modulus-surface pressure dependences calculated on the basis of surface pressure isotherms, the images of the monolayers morphology recorded with the use of a Brewster angle microscope and the penetration tests of precompressed monolayers were presented. For most of the considered monolayer systems, the changes in surface potential as a function of the molecular area were also determined. On the other hand, for the bilayer systems, the changes in the mean hydrodynamic diameter, the polydispersity index and the electrokinetic potential obtained in the presence of surfactants were presented. On the basis of the obtained results, the surface potential and surface charge of the liposomes, the surface area per unit charge and the number of elementary charges per single liposome were then calculated. Finally, this allowed for the determination of the percentage of charged surface of individual lipid vesicles.

In the next, last part of the work, conclusions from the conducted research were formulated. It was found that commonly used surfactants indicate the ability to spontaneously and permanently integrate into the structure of model biological membranes. For this reason, even a tiny amount of surfactant is sufficient to change many properties of both the monolayer model and the bilayer model of biomembranes. The scope of the observed changes depends on the surfactants nature, the hydrophobic structure of the surfactant, its concentration and the chemical composition of the membranes. The addition of Triton X-100 nonionic surfactant increased the acyl chains disorder of the of DPPC molecules in the lipid monolayer and thus increased the fluidity of the membrane. However,

it did not affect the size, zeta potential, and surface charge of DPPC liposomes. On the other hand, Triton X-100 increased their homogeneity. The anionic SDS and cationic DTAB with the same hydrophobic chain length also showed a fluidizing effect on the DPPC monolayer. Moreover, they caused a significant, positive change in the surface pressure after injection into the precompressed DPPC monolayer, which means that they penetrate the DPPC film more effectively compared to the nonionic surfactant. The incorporation of SDS into DPPC lipid vesicles led to a reduction in their hydrodynamic diameter and induced a more negative electrokinetic potential. In contrast, the inclusion of DTAB slightly increased the diameter of DPPC liposomes and induced a more positive zeta potential. The addition of further cationic surfactants in the homologous series (TTAB and CTAB) in most of the considered properties caused even more pronounced changes than the DTAB. The surfactant effect was also generally greater as the surfactant concentration increased and in the presence of at least one unsaturated bond in the structure of the membrane-forming lipid.

The obtained results allow to conclude that by affecting the properties of biomembranes, surfactants may influence, among others, the translocation of membrane proteins and the functioning of cell membranes. Therefore, it should be remembered how important the cleanliness of the measurement system is in the case of the analysis of Langmuir monolayers and liposomes, as detergent residues may generate unreal and impossible to reproduce results. On the other hand, the addition of surfactants to freshly synthesized liposomes proposes a new utility approach to the use of surfactants, which optimizes the conventional procedure of liposome surface modification.

11. Literatura

- R. Sender, S. Fuchs, R. Milo, Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, PLOS Biol., 14 (2016) e1002533.
- [2] M. Eeman, M. Deleu, From biological membranes to biomimetic model membranes, Biotechnol. Agron. Société Environ., (2010).
- [3] P. Fagone, S. Jackowski, Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function, J. Lipid Res., 50 (2009) S311–S316.
- [4] T. Rivel, C. Ramseyer, S. Yesylevskyy, The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin, Sci. Rep., 9 (2019) 5627.
- [5] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, 175 (1972) 720–731.
- [6] A. Wiśniewska-Becker, W.I. Gruszecki, 2 Biomembrane models, in: R. Pignatello (Ed.), Drug-Biomembr. Interact. Stud., Woodhead Publishing, 2013: pp. 47–95.
- [7] L.A. Bagatolli, J.H. Ipsen, A.C. Simonsen, O.G. Mouritsen, An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes, Prog. Lipid Res., 49 (2010) 378–389.
- [8] G.L. Nicolson, The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, Biochim. Biophys. Acta, 1838 (2014) 1451–1466.
- [9] J.E. Escalante-Martinez, L.J. Morales-Mendoza, C. Calderon-Ramon, L.D. Romero Juarez, E. Santes Paredes, J.V. Garcia, J.R. Laguna-Camacho, S.N. Gonzalez-Rocha, E. Mejia-Sanchez, J. Garrido-Melendez, H. Lopez-Calderon, J. Martinez-Castillo, Fractional Derivatives modeling dielectric properties of biological tissue, in: 2018 IEEE XXV Int. Conf. Electron. Electr. Eng. Comput. INTERCON, 2018: pp. 1–3.
- [10] R.M. Epand, Introduction to Membrane Lipids, in: D.M. Owen (Ed.), Methods Membr. Lipids Second Ed., Humana Press Inc, Totowa, 2015: pp. 1–6.
- [11] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, A comprehensive classification system for lipids, J. Lipid Res., 46 (2005) 839–861.
- [12] A.A. Farooqui, L.A. Horrocks, T. Farooqui, Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders, Chem. Phys. Lipids, 106 (2000) 1–29.
- [13] A.C. Carreira, T.C. Santos, M.A. Lone, E. Zupančič, E. Lloyd-Evans, R.F.M. de Almeida, T. Hornemann, L.C. Silva, Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties, Prog. Lipid Res., 75 (2019) 100988.

- [14] T. Harayama, H. Riezman, Understanding the diversity of membrane lipid composition, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 19 (2018) 281–296.
- [15] E. Bernhart, S. Damm, A. Wintersperger, C. Nusshold, A.M. Brunner, I. Plastira, G. Rechberger, H. Reicher, C. Wadsack, A. Zimmer, E. Malle, W. Sattler, Interference with distinct steps of sphingolipid synthesis and signaling attenuates proliferation of U87MG glioma cells, Biochem. Pharmacol., 96 (2015) 119–130.
- [16] E. Bieberich, Ceramide in stem cell differentiation and embryo development: Novel functions of a topological cell-signaling lipid and the concept of ceramide compartments, J Lipids, 2011 (2011).
- [17] E.H. Ahn, J.J. Schroeder, Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C
 2-ceramide in human colon cancer cells, but not by C 2-dihydroceramide, Anticancer
 Res., 30 (2010) 2881–2884.
- [18] T.S. Tirodkar, C. Voelkel-Johnson, Sphingolipids in apoptosis, Exp. Oncol., 34 (2012) 231–242.
- [19] E.B. Harvald, A.S.B. Olsen, N.J. Færgeman, Autophagy in the light of sphingolipid metabolism, Apoptosis, 20 (2015) 658–670.
- [20] G.M. Strub, M. Maceyka, N.C. Hait, S. Milstien, S. Spiegel, Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate, Adv. Exp. Med. Biol., 688 (2010) 141–155.
- [21] M. MacEyka, S. Spiegel, Sphingolipid metabolites in inflammatory disease, Nature, 510 (2014) 58–67.
- [22] B. Cinque, L. Di Marzio, C. Centi, C. Di Rocco, C. Riccardi, M.G. Cifone, Sphingolipids and the immune system, Pharmacol. Res., 47 (2003) 421–437.
- [23] X. Han, Y. Zhou, 4 Application of lipidomics in nutrition research, in: J.-L. Sébédio, L. Brennan (Eds.), Metabolomics Tool Nutr. Res., Woodhead Publishing, 2015: pp. 63–84.
- [24] G. van Meer, A.I.P.M. de Kroon, Lipid map of the mammalian cell, J. Cell Sci., 124 (2011) 5–8.
- [25] A. Zampelas, E. Magriplis, New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy?, Nutrients, 11 (2019).
- [26] F.R. Maxfield, G. van Meer, Cholesterol, the central lipid of mammalian cells, Curr. Opin. Cell Biol., 22 (2010) 422–429.
- [27] L.X. Finegold, Cholesterol in Membrane Models, CRC Press, 1992.
- [28] J.A. Op den Kamp, Lipid asymmetry in membranes, Annu. Rev. Biochem., 48 (1979) 47–71.
- [29] P.F. Devaux, R. Morris, Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes, Traffic Cph. Den., 5 (2004) 241–246.

- [30] M. Mondal, B. Mesmin, S. Mukherjee, F.R. Maxfield, Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells, Mol. Biol. Cell, 20 (2009) 581–588.
- [31] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9 (2008) 112–124.
- [32] V.A. Frolov, A.V. Shnyrova, J. Zimmerberg, Lipid Polymorphisms and Membrane Shape, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 3 (2011).
- [33] R. Nagarajan, Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail, Langmuir, 18 (2002) 31–38.
- [34] M.C.A. Stuart, E.J. Boekema, Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipiddetergent systems, Biochim. Biophys. Acta, 1768 (2007) 2681–2689.
- [35] M. Edidin, Rotational and Lateral Diffusion of Membrane Proteins and Lipids: Phenomena and Function, in: F. Bronner, R.D. Klausner, C. Kempf, J. van Renswoude (Eds.), Curr. Top. Membr. Transp., Academic Press, 1987: pp. 91–127.
- [36] S. Cribier, G. Morrot, A. Zachowski, Dynamics of the membrane lipid phase, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 48 (1993) 27–32.
- [37] S. Gupta, J.U. De Mel, G.J. Schneider, Dynamics of liposomes in the fluid phase, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 42 (2019) 121–136.
- [38] J.V. Busto, A.B. García-Arribas, J. Sot, A. Torrecillas, J.C. Gómez-Fernández, F.M. Goñi, A. Alonso, Lamellar Gel (Lβ) Phases of Ternary Lipid Composition Containing Ceramide and Cholesterol, Biophys. J., 106 (2014) 621–630.
- [39] A.C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, S. Reis, Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1858 (2016) 2231–2244.
- [40] B. Vandermeer, Membrane Fluidity, More Than One Single Parameter, Acta Pharm. Jugosl., 41 (1991) 311–326.
- [41] C. Sebaaly, H. Greige-Gerges, C. Charcosset, Chapter 11 Lipid Membrane Models for Biomembrane Properties' Investigation, in: A. Basile, C. Charcosset (Eds.), Curr. Trends Future Dev. Bio- Membr., Elsevier, 2019: pp. 311–340.
- [42] R.M. Iost, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, I.L. Nantes, L. Caseli, F.N. Crespilho, Strategies of Nano-Manipulation for Application in Electrochemical Biosensors, Int J Electrochem Sci, 6 (2011) 33.
- [43] R. Fan, L. Gan, M. Liu, D. Zhu, L. Chen, Z. Xu, Z. Hao, L. Chen, An interaction of helicid with liposome biomembrane, Appl. Surf. Sci., 257 (2011) 2102–2106.
- [44] K.S. Birdi, Self-Assembly Monolayer Structures of Lipids and Macromolecules at Interfaces, Springer US, 2002.

- [45] D.S. Alvares, M.P. dos Santos Cabrera, J. Ruggiero Neto, Chapter Two Strategies for Exploring Electrostatic and Nonelectrostatic Contributions to the Interaction of Helical Antimicrobial Peptides with Model Membranes, in: A. Iglič, C.V. Kulkarni, M. Rappolt (Eds.), Adv. Biomembr. Lipid Self-Assem., Academic Press, 2016: pp. 43–73.
- [46] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Biomembr., 1286 (1996) 183–223.
- [47] B.S. Murray, P.V. Nelson, A Novel Langmuir Trough for Equilibrium and Dynamic Measurements on Air–Water and Oil–Water Monolayers, Langmuir, 12 (1996) 5973– 5976.
- [48] M.C. Larsen, Binary Phase Diagrams at the Air–Water Interface: An Experiment for Undergraduate Physical Chemistry Students, J. Chem. Educ., 91 (2014) 597–601.
- [49] J.J. Giner-Casares, G. Brezesinski, H. Moehwald, Langmuir monolayers as unique physical models, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 19 (2014) 176–182.
- [50] J. Goerke, J. Gonzales, Temperature dependence of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer stability, J. Appl. Physiol., 51 (1981) 1108–1114.
- [51] K. Gong, S.-S. Feng, M.L. Go, P.H. Soew, Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 207 (2002) 113–125.
- [52] Y. Wang, G. Wen, S. Pispas, S. Yang, K. You, Effects of subphase pH, temperature and ionic strength on the aggregation behavior of PnBA-b-PAA at the air/water interface, J. Colloid Interface Sci., 512 (2018) 862–870.
- [53] G. Brezesinski, H. Möhwald, Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces, Adv. Colloid Interface Sci., 100–102 (2003) 563–584.
- [54] M.D. Phan, K. Shin, A Langmuir Monolayer: Ideal Model Membrane to Study Cell, J. Chem. Biol. Interfaces, 2 (2014) 1–5.
- [55] B. Gzyl-Malcher, M. Paluch, Studies of lipid interactions in mixed Langmuir monolayers, Thin Solid Films, 516 (2008) 8865–8872.
- [56] M. Jurak, M. Golabek, L. Holysz, E. Chibowski, Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin, Adv. Colloid Interface Sci., 222 (2015) 385– 397.
- [57] M. Tomoaia-Cotişel, J. Zsakó, E. Chifu, P.J. Quinn, Intermolecular interactions in lipid/carotenoid monolayers, Biochem. J., 248 (1987) 877–882.
- [58] S.-S. Feng, K. Gong, J. Chew, Molecular Interactions between a Lipid and an Antineoplastic Drug Paclitaxel (Taxol) within the Lipid Monolayer at the Air/Water Interface, Langmuir, 18 (2002) 4061–4070.
- [59] A. Clausell, M.A. Busquets, M. Pujol, A. Alsina, Y. Cajal, Polymyxin B-lipid interactions in Langmuir-Blodgett monolayers of Escherichia coli lipids: a thermodynamic and atomic force microscopy study, Biopolymers, 75 (2004) 480–490.

- [60] M. Broniatowski, M. Flasiński, K. Hąc-Wydro, Antagonistic effects of α-tocopherol and ursolic acid on model bacterial membranes, Biochim. Biophys. Acta BBA -Biomembr., 1848 (2015) 2154–2162.
- [61] J. Hu, H. Liu, P. Xu, Y. Shang, H. Liu, Investigation of Drug for Pulmonary Administration–Model Pulmonary Surfactant Monolayer Interactions Using Langmuir–Blodgett Monolayer and Molecular Dynamics Simulation: A Case Study of Ketoprofen, Langmuir, 35 (2019) 13452–13460.
- [62] K. Hąc-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, Biomedical applications of the Langmuir monolayer technique, Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. AA – Chem., 63 (2008) 47–60.
- [63] R. Pignatello, T. Musumeci, L. Basile, C. Carbone, G. Puglisi, Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: Involvement in drug design and development, J. Pharm. Bioallied Sci., 3 (2011) 4–14.
- [64] D. Matyszewska, The influence of charge and lipophilicity of daunorubicin and idarubicin on their penetration of model biological membranes – Langmuir monolayer and electrochemical studies, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1862 (2020) 183104.
- [65] D. Matyszewska, E. Nazaruk, R.A. Campbell, Interactions of anticancer drugs doxorubicin and idarubicin with lipid monolayers: New insight into the composition, structure and morphology, J. Colloid Interface Sci., 581 (2021) 403–416.
- [66] C.P. Pascholati, E.P. Lopera, F.J. Pavinatto, L. Caseli, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, T. Viitala, C. D'Silva, O.N. Oliveira, The interaction of an antiparasitic peptide active against African sleeping sickness with cell membrane models, Colloids Surf. B Biointerfaces, 74 (2009) 504–510.
- [67] A. Arouri, A. Kerth, M. Dathe, A. Blume, The Binding of an Amphipathic Peptide to Lipid Monolayers at the Air/Water Interface Is Modulated by the Lipid Headgroup Structure, Langmuir, 27 (2011) 2811–2818.
- [68] C. da Rocha Junior, L. Caseli, Adsorption and enzyme activity of asparaginase at lipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films, Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., 73 (2017) 579–584.
- [69] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, DPPC–DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles: Phase behaviour, structure and rheology, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 413 (2012) 174–183.
- [70] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, Influence of silica nanoparticles on phase behavior and structural properties of DPPC—Palmitic acid Langmuir monolayers, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 413 (2012) 280–287.
- [71] A.A. Torrano, Â.S. Pereira, O.N. Oliveira, A. Barros-Timmons, Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models, Colloids Surf. B Biointerfaces, 108 (2013) 120–126.

- [72] R. Wang, Y. Guo, H. Liu, Y. Chen, Y. Shang, H. Liu, The effect of chitin nanoparticles on surface behavior of DPPC/DPPG Langmuir monolayers, J. Colloid Interface Sci., 519 (2018) 186–193.
- [73] R. Machatschek, B. Schulz, A. Lendlein, Langmuir Monolayers as Tools to Study Biodegradable Polymer Implant Materials, Macromol. Rapid Commun., 40 (2019) e1800611.
- [74] N.A. Tarazona, R. Machatschek, A. Lendlein, Relation between Surface Area and Surface Potential Change during (co)Polyesters Degradation as Langmuir Monolayer, Mrs Adv., 5 (2020) 667–677.
- [75] V. Kiessling, M.K. Domanska, D. Murray, C. Wan, L.K. Tamm, Supported Lipid Bilayers, in: Wiley Encycl. Chem. Biol., American Cancer Society, 2008: pp. 1–12.
- [76] J. Kurniawan, J.F. Ventrici de Souza, A.T. Dang, G. Liu, T.L. Kuhl, Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir–Blodgett Deposition: A Tutorial, Langmuir, 34 (2018) 15622–15639.
- [77] D. Marquardt, B. Geier, G. Pabst, Asymmetric Lipid Membranes: Towards More Realistic Model Systems, Membranes, 5 (2015) 180–196.
- [78] M. Broniatowski, I. Sandez Macho, Miñones J., P. Dynarowicz-Łątka, Langmuir Monolayers Characteristic of (Perfluorodecyl)-Alkanes, J. Phys. Chem. B, 108 (2004) 13403–13411.
- [79] A. Ladniak, M. Jurak, A.E. Wiacek, Langmuir monolayer study of phospholipid DPPC on the titanium dioxide-chitosan-hyaluronic acid subphases, Adsorpt.-J. Int. Adsorpt. Soc., 25 (2019) 469–476.
- [80] H. Mozaffary, On the sign and origin of the surface potential of phospholipid monolayers, Chem. Phys. Lipids, 59 (1991) 39–47.
- [81] C.B. Casper, D. Verreault, E.M. Adams, W. Hua, H.C. Allen, Surface Potential of DPPC Monolayers on Concentrated Aqueous Salt Solutions, J. Phys. Chem. B, 120 (2016) 2043–2052.
- [82] D. Vollhardt, V.B. Fainerman, Penetration of dissolved amphiphiles into twodimensional aggregating lipid monolayers, Adv. Colloid Interface Sci., 86 (2000) 103– 151.
- [83] W.I. Gruszecki, R. Luchowski, M. Gagoś, M. Arczewska, P. Sarkar, M. Hereć, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Strzałka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, Molecular organization of antifungal antibiotic amphotericin B in lipid monolayers studied by means of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Biophys. Chem., 143 (2009) 95–101.
- [84] I.C. Shieh, J.A. Zasadzinski, Visualizing monolayers with a water-soluble fluorophore to quantify adsorption, desorption, and the double layer, Proc. Natl. Acad. Sci., 112 (2015) E826–E835.
- [85] M. Jurak, J. Minones, Interactions of lauryl gallate with phospholipid components of biological membranes, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr., 1858 (2016) 1821–1832.

- [86] D.S. Dos Santos, F.J. Pavinatto, D.T. Balogh, L. Misoguti, O.N. Oliveira, C.R. Mendonça, In situ UV-vis absorbance measurements for Langmuir films of poly[4' [[2-(methacryloyloxy)-ethyl]ethylamino]-2-chloro-4-nitroazobenzene] (HPDR13) azopolymer, J. Colloid Interface Sci., 276 (2004) 138–142.
- [87] R.F. Vázquez, M.A. Daza Millone, F.J. Pavinatto, M.L. Fanani, O.N. Oliveira, M.E. Vela, S.M. Maté, Impact of sphingomyelin acyl chain (16:0 vs 24:1) on the interfacial properties of Langmuir monolayers: A PM-IRRAS study, Colloids Surf. B Biointerfaces, 173 (2019) 549–556.
- [88] M. Zaborowska, M. Broniatowski, P. Wydro, D. Matyszewska, R. Bilewicz, Structural modifications of lipid membranes exposed to statins – Langmuir monolayer and PM-IRRAS study, J. Mol. Liq., 313 (2020) 113570.
- [89] L. Velarde, H. Wang, Capturing inhomogeneous broadening of the -CN stretch vibration in a Langmuir monolayer with high-resolution spectra and ultrafast vibrational dynamics in sum-frequency generation vibrational spectroscopy (SFG-VS), J. Chem. Phys., 139 (2013) 084204.
- [90] R. Feng, L. Lin, Y. Li, M. Liu, Y. Guo, Z. Zhang, Effect of Ca2+ to Sphingomyelin Investigated by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy, Biophys. J., 112 (2017) 2173–2183.
- [91] C.A. Helm, Synchrotron X-Ray Studies on Lipid Monolayers, in: F.T. Hong (Ed.), Mol. Electron. Biosens. Biocomput., Springer US, Boston, MA, 1989: pp. 59–68.
- [92] A. Wójcik, P. Perczyk, P. Wydro, M. Broniatowski, Dichlorobiphenyls and chlorinated benzoic acids – Emergent soil pollutants in model bacterial membranes Langmuir monolayer and Grazing Incidence X-ray Diffraction studies, J. Mol. Liq., 307 (2020) 112997.
- [93] M. Zaborowska, D. Dziubak, P. Fontaine, D. Matyszewska, Influence of lipophilicity of anthracyclines on the interactions with cholesterol in the model cell membranes – Langmuir monolayer and SEIRAS studies, Colloids Surf. B Biointerfaces, 211 (2022) 112297.
- [94] G. Espinosa, I. López-Montero, F. Monroy, D. Langevin, Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity, Proc. Natl. Acad. Sci., 108 (2011) 6008–6013.
- [95] A.K. Sachan, S.Q. Choi, K.H. Kim, Q. Tang, L. Hwang, K.Y.C. Lee, T.M. Squires, J.A. Zasadzinski, Interfacial rheology of coexisting solid and fluid monolayers, Soft Matter, 13 (2017) 1481–1492.
- [96] 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 BBA Biomembr., 1462 (1999) 109–140.
- [97] P. Dynarowicz-Łątka, A. Dhanabalan, O.N. Oliveira, Modern physicochemical research on Langmuir monolayers, Adv. Colloid Interface Sci., 91 (2001) 221–293.

- [98] A.P. Girard-Egrot, L.J. Blum, Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes, in: D.K. Martin (Ed.), Nanobiotechnology Biomim. Membr., Springer US, Boston, MA, 2007: pp. 23–74.
- [99] A. Ponce-Torres, A method for measuring pressure-area isotherms of insoluble surfactant monolayers, Measurement, 110 (2017) 74–77.
- [100] R.K. Gupta, V. Manjuladevi, Molecular Interactions at Interfaces, IntechOpen, 2012.
- [101] K.Y.C. Lee, Collapse mechanisms of Langmuir monolayers, Annu. Rev. Phys. Chem., 59 (2008) 771–791.
- [102] J.T. Davies, E.K. Rideal, Interfacial phenomena, Academic Press, New York, 1963.
- [103] M. Aston, The Study of Surfactant Monolayers by Surface Pressure Area Measurement, Chem. Soc. Rev., 22 (1993) 67–71.
- [104] L. Gargallo, B. Miranda, A. Leiva, D. Radic, Poly(monomethyl itaconate) as subphase stabilizer of maleic anhydride-alt-stearyl methacrylate monolayers at the air-water interface The study on surface pressure-area isotherms, Polimery, 46 (2001) 828–834.
- [105] S.C. Mehta, P. Somasundaran, C. Maldarelli, R. Kulkarni, Effects of functional groups on surface pressure-area isotherms of hydrophilic silicone polymers, Langmuir, 22 (2006) 9566–9571.
- [106] M. Minones Conde, O. Conde, J.M. Trillo, J. Minones, Interactions in Monolayers: A Study of the Behavior of Poly(methyl methacrylate)-Lysozyme Mixed Films from Surface Pressure-Area and Ellipsometric Measurements, J. Phys. Chem. B, 115 (2011) 8667–8678.
- [107] Oliveira Osvaldo N., C. Bonardi, The Surface Potential of Langmuir Monolayers Revisited, Langmuir, 13 (1997) 5920–5924.
- [108] D.M. Taylor, G.F. Bayes, The surface potential of Langmuir monolayers, Mater. Sci. Eng. C, 8–9 (1999) 65–71.
- [109] O. Vilitis, M. Rutkis, J. Busenberg, D. Merkulov, Determination of Contact Potential Difference by the Kelvin Probe (Part I) I Basic Principles of Measurements, Latv. J. Phys. Tech. Sci., 53 (2016) 48–57.
- [110] A.W. Adamson, Chemia fizyczna powierzchni, PWN, Warszawa, 1963.
- [111] F. Bordi, C. Cametti, Biomembranes, in: F. Bassani, G.L. Liedl, P. Wyder (Eds.), Encycl. Condens. Matter Phys., Elsevier, Oxford, 2005: pp. 116–122.
- [112] D.M. Taylor, Developments in the theoretical modelling and experimental measurement of the surface potential of condensed monolayers, Adv. Colloid Interface Sci., 87 (2000) 183–203.
- [113] A. Chachaj-Brekiesz, J. Kobierski, A. Wnetrzak, P. Dynarowicz-Latka, Electrical Properties of Membrane Phospholipids in Langmuir Monolayers, Membranes, 11 (2021) 53.

- [114] W. Daear, M. Mahadeo, E.J. Prenner, Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr., 1859 (2017) 1749–1766.
- [115] B. Binks, D. Furlong, Modern Characterization Methods of Surfactant Systems: 83, New York, 1999.
- [116] C. Roldán-Carmona, J.J. Giner-Casares, M. Pérez-Morales, M.T. Martín-Romero, L. Camacho, Revisiting the Brewster Angle Microscopy: the relevance of the polar headgroup, Adv. Colloid Interface Sci., 173 (2012) 12–22.
- [117] D. Vollhardt, V.B. Fainerman, Characterisation of phase transition in adsorbed monolayers at the air/water interface, Adv. Colloid Interface Sci., 154 (2010) 1–19.
- [118] E. Prenner, G. Honsek, D. Hönig, D. Möbius, K. Lohner, Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers, Chem. Phys. Lipids, 145 (2007) 106–118.
- [119] M.D. Phan, J. Lee, K. Shin, Collapsed States of Langmuir Monolayers, J. Oleo Sci., 65 (2016) 385–397.
- [120] Y. Tagami, T. Narita, H. Ikigai, Y. Oishi, Penetration behavior of Vibrio cholerae hemolysin into (DMPC/cholesterol) mixed monolayer, Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp., 347 (2009) 225–229.
- [121] F.N. Zakanda, K. Nott, M. Paquot, G.M. Lelo, M. Deleu, Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers, Colloids Surf. B-Biointerfaces, 86 (2011) 176–180.
- [122] A. Botet-Carreras, M.T. Montero, J. Sot, O. Domènech, J.H. Borrell, Characterization of monolayers and liposomes that mimic lipid composition of HeLa cells, Colloids Surf. B Biointerfaces, 196 (2020) 111288.
- [123] S. Sundaram, K.J. Stebe, Dynamic Penetration of an Insoluble Monolayer by a Soluble Surfactant: Theory and Experiment, Langmuir, 13 (1997) 1729–1736.
- [124] M. Eeman, A. Berquand, Y.F. Dufrêne, M. Paquot, S. Dufour, M. Deleu, Penetration of Surfactin into Phospholipid Monolayers: Nanoscale Interfacial Organization, Langmuir, 22 (2006) 11337–11345.
- [125] A. Lucero Caro, M.R. Rodriguez Nino, J.M. Rodriguez Patino, Dynamics of penetration of dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) monolayers by beta-casein, Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp., 341 (2009) 134–141.
- [126] A. Blume, A. Kerth, Peptide and protein binding to lipid monolayers studied by FT-IRRA spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1828 (2013) 2294– 2305.
- [127] K. Wojciechowski, M. Orczyk, T. Gutberlet, M. Trapp, K. Marcinkowski, T. Kobiela, T. Geue, Unusual penetration of phospholipid mono- and bilayers by Quillaja bark saponin biosurfactant, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1838 (2014) 1931–1940.

- [128] A. Wojcik, P. Perczyk, P. Wydro, M. Broniatowski, Incorporation of cyclodiene pesticides and their polar metabolites to model membranes of soil bacteria, J. Mol. Liq., 298 (2020) 112019.
- [129] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, Nanoscale Res. Lett., 8 (2013) 102.
- [130] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol., 13 (1965) 238-IN27.
- [131] D.D. Lasic, Novel applications of liposomes, Trends Biotechnol., 16 (1998) 307– 321.
- [132] M.R. Mozafari, Liposomes: an overview of manufacturing techniques, Cell. Mol. Biol. Lett., 10 (2005) 711–719.
- [133] A. Jesorka, O. Orwar, Liposomes: technologies and analytical applications, Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif, 1 (2008) 801–832.
- [134] P.N. Shek, B.Y. Yung, N.Z. Stanacev, Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation, Immunology, 49 (1983) 37– 44.
- [135] P. Liu, G. Chen, J. Zhang, A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, Mol. Basel Switz., 27 (2022) 1372.
- [136] L. Maja, K. Željko, P. Mateja, Sustainable technologies for liposome preparation, J. Supercrit. Fluids, 165 (2020) 104984.
- [137] S. Ghanbarzadeh, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, Application of Response Surface Methodology in Development of Sirolimus Liposomes Prepared by Thin Film Hydration Technique, BioImpacts BI, 3 (2013) 75–81.
- [138] L. Llu, T. Yonetani, Preparation and Characterization of Liposome-Encapsulated Haemoglobin by a Freeze-Thaw Method, J. Microencapsul., 11 (1994) 409–421.
- [139] C. Pidgeon, S. McNeely, T. Schmidt, J.E. Johnson, Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment, Biochemistry, 26 (1987) 17–29.
- [140] W. Jiskoot, T. Teerlink, E.C. Beuvery, D.J. Crommelin, Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics, Pharm. Weekbl. Sci., 8 (1986) 259–265.
- [141] C. Charcosset, A. Juban, J.-P. Valour, S. Urbaniak, H. Fessi, Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices, Chem. Eng. Res. Des., 94 (2015) 508–515.

- [142] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, Faraday Discuss. Chem. Soc., 81 (1986) 303–311.
- [143] V. Pereno, D. Carugo, L. Bau, E. Sezgin, J. Bernardino de la Serna, C. Eggeling, E. Stride, Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles on Stainless Steel Electrodes, ACS Omega, 2 (2017) 994–1002.
- [144] S. Emami, S. Azadmard-Damirchi, S.H. Peighambardoust, H. Valizadeh, J. Hesari, Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector, J. Exp. Nanosci., 11 (2016) 737–759.
- [145] D.A. Kuznetsova, D.R. Gabdrakhmanov, G.A. Gaynanova, L.A. Vasileva, D.M. Kuznetsov, S.S. Lukashenko, A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, I.R. Nizameev, G.V. Sibgatullina, D.V. Samigullin, M.K. Kadirov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, Novel biocompatible liposomal formulations for encapsulation of hydrophilic drugs Chloramphenicol and cisplatin, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 610 (2021) 125673.
- [146] S. Mallick, J.S. Choi, Liposomes: Versatile and Biocompatible Nanovesicles for Efficient Biomolecules Delivery, J. Nanosci. Nanotechnol., 14 (2014) 755–765.
- [147] W. Alkhalaf, J.-C. Piard, M.E. Soda, J.-C. Gripon, M. Desmazeaud, L. Vassal, Liposomes as Proteinase Carriers for the Accelerated Ripening of Saint-Paulin Type Cheese, J. Food Sci., 53 (1988) 1674–1679.
- [148] B.A. Law, J.S. King, Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese, J. Dairy Res., 52 (1985) 183–188.
- [149] M. Marsanasco, A.L. Márquez, J.R. Wagner, S. del V. Alonso, N.S. Chiaramoni, Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment, Food Res. Int., 44 (2011) 3039– 3046.
- [150] S. Peng, L. Zou, W. Liu, C. Liu, D.J. McClements, Fabrication and Characterization of Curcumin-Loaded Liposomes Formed from Sunflower Lecithin: Impact of Composition and Environmental Stress, J. Agric. Food Chem., 66 (2018) 12421– 12430.
- [151] H.R. Ahmadi Ashtiani, P. Bishe, N.-A. Lashgari, M.A. Nilforoushzadeh, S. Zare, Liposomes in Cosmetics, J. Skin Stem Cell, (2016).
- [152] D.D. Lasic, Applications of Liposomes, in: Handb. Biol. Phys., Elsevier, 1995: pp. 491–519.
- [153] W.-C. Lee, T.-H. Tsai, Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application, Int. J. Pharm., 395 (2010) 78–83.
- [154] V. Campani, D. Marchese, M.T. Pitaro, M. Pitaro, P. Grieco, G. De Rosa, Development of a liposome-based formulation for vitamin K1 nebulization on the skin, Int. J. Nanomedicine, 9 (2014) 1823–1832.

- [155] J.C. Schwarz, N. Baisaeng, M. Hoppel, M. Löw, C.M. Keck, C. Valenta, Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenyzme Q10, Int. J. Pharm., 447 (2013) 213– 217.
- [156] W.T. Al-Jamal, K. Kostarelos, Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic applications, Nanomed., 2 (2007) 85–98.
- [157] F. Farooque, M. Wasi, M.M. Mughees, Liposomes as Drug Delivery System: An Updated Review, J. Drug Deliv. Ther., 11 (2021) 149–158.
- [158] B. Geusens, T. Strobbe, S. Bracke, P. Dynoodt, N. Sanders, M. Van Gele, J. Lambert, Lipid-mediated gene delivery to the skin, Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci., 43 (2011) 199–211.
- [159] V.P. Torchilin, CHAPTER 66 Liposomes as carriers of contrast agents for in vivo diagnostics, in: D.D. Lasic, D. Papahadjopoulos (Eds.), Med. Appl. Liposomes, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1998: pp. 515–543.
- [160] M. Çağdaş, A.D. Sezer, S. Bucak, Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery, in: Appl. Nanotechnol. Drug Deliv., IntechOpen, 2014.
- [161] U. Massing, S. Fuxius, Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness, Drug Resist. Updat., 3 (2000) 171–177.
- [162] M. Petaccia, M. Condello, L. Giansanti, A.L. Bella, F. Leonelli, S. Meschini, D.G. Villalva, E. Pellegrini, F. Ceccacci, L. Galantini, G. Mancini, Inclusion of new 5-fluorouracil amphiphilic derivatives in liposome formulation for cancer treatment, MedChemComm, 6 (2015) 1639–1642.
- [163] Q. Chen, A. Krol, A. Wright, D. Needham, M.W. Dewhirst, F. Yuan, Tumor microvascular permeability is a key determinant for antivascular effects of doxorubicin encapsulated in a temperature sensitive liposome, Int. J. Hyperthermia, 24 (2008) 475–482.
- [164] X. Wang, Z. Guo, Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs, Chem. Soc. Rev., 42 (2013) 202–224.
- [165] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, Nat. Rev. Drug Discov., 4 (2005) 145–160.
- [166] G. Urbinati, V. Marsaud, J.-M. Renoir, Anticancer Drugs in Liposomal Nanodevices: A Target Delivery for a Targeted Therapy, Curr. Top. Med. Chem., 12 (2012) 1693– 1712.
- [167] T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki, T. Kimura, Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers, Int. J. Pharm., 359 (2008) 272–279.
- [168] M. Estanqueiro, M.H. Amaral, J. Conceição, J.M. Sousa Lobo, Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art, Colloids Surf. B Biointerfaces, 126 (2015) 631–648.

- [169] I. Ahmad, M. Longenecker, J. Samuel, T.M. Allen, Antibody-targeted Delivery of Doxorubicin Entrapped in Sterically Stabilized Liposomes Can Eradicate Lung Cancer in Mice1, Cancer Res., 53 (1993) 1484–1488.
- [170] T.A. ElBayoumi, V.P. Torchilin, Tumor-Specific Anti-Nucleosome Antibody Improves Therapeutic Efficacy of Doxorubicin-Loaded Long-Circulating Liposomes against Primary and Metastatic Tumor in Mice, Mol. Pharm., 6 (2009) 246–254.
- [171] S. Chopra, N. Venkatesan, G.V. Betageri, Liposomes as nanocarriers for anti-HIV therapy, Drug Deliv. Transl. Res., 3 (2013) 471–478.
- [172] N.C. Phillips, E. Skamene, C. Tsoukas, Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immunosuppression, J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 4 (1991) 959–966.
- [173] E. Saadat, R. Dinarvand, P. Ebrahimnejad, Encapsulation of nystatin in nanoliposomal formulation: characterization, stability study and antifungal activity against Candida albicans, Pharm. Biomed. Res., 2 (2016) 44–54.
- [174] D.F.M.C. Veloso, N.I.G.M. Benedetti, R.I. Ávila, T.S.A. Bastos, T.C. Silva, M.R.R. Silva, A.C. Batista, M.C. Valadares, E.M. Lima, Intravenous delivery of a liposomal formulation of voriconazole improves drug pharmacokinetics, tissue distribution, and enhances antifungal activity, Drug Deliv., 25 (2018) 1585–1594.
- [175] A.A. Khan, A.M. Alanazi, N. Alsaif, N. Algrain, T.A. Wani, M.A. Bhat, Enhanced Efficacy of Thiosemicarbazone Derivative-Encapsulated Fibrin Liposomes against Candidiasis in Murine Model, Pharmaceutics, 13 (2021) 333.
- [176] G. Lopez-Berestein, G.P. Bodey, V. Fainstein, M. Keating, L.S. Frankel, B. Zeluff, L. Gentry, K. Mehta, Treatment of Systemic Fungal Infections With Liposomal Amphotericin B, Arch. Intern. Med., 149 (1989) 2533–2536.
- [177] O. Ringdén, F. Meunier, J. Tollemar, P. Ricci, S. Tura, E. Kuse, M.A. Viviani, N.C. Gorin, J. Klastersky, P. Fenaux, H.G. Prentice, G. Ksionski, Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients, J. Antimicrob. Chemother., 28 (1991) 73–82.
- [178] R. Herbrecht, S. Natarajan-Amé, Y. Nivoix, V. Letscher-Bru, The lipid formulations of amphotericin B, Expert Opin. Pharmacother., 4 (2003) 1277–1287.
- [179] T.J. Walsh, R.E. Lewis, J. Adler-Moore, Pharmacology of Liposomal Amphotericin B: An Introduction to Preclinical and Clinical Advances for Treatment of Lifethreatening Invasive Fungal Infections, Clin. Infect. Dis., 68 (2019) S241–S243.
- [180] I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci, Int. J. Antimicrob. Agents, 19 (2002) 299–311.

- [181] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, Biophys. Rev., 8 (2016) 409–427.
- [182] J. Zmpitas, J. Gross, Modified Stokes–Einstein Equation for Molecular Self-Diffusion Based on Entropy Scaling, Ind. Eng. Chem. Res., 60 (2021) 4453–4459.
- [183] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S.M. Ansar, A. Paredes, T. Ingle, Chapter 11 -Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges, in: A. López Rubio, M.J. Fabra Rovira, M. martínez Sanz, L.G. Gómez-Mascaraque (Eds.), Nanomater. Food Appl., Elsevier, 2019: pp. 313–353.
- [184] B. Lorber, F. Fischer, M. Bailly, H. Roy, D. Kern, Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students, Biochem. Mol. Biol. Educ., 40 (2012) 372–382.
- [185] N. Chayen, M. Dieckmann, K. Dierks, P. Fromme, Size and shape determination of proteins in solution by a noninvasive depolarized dynamic light scattering instrument, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1027 (2004) 20–27.
- [186] L.D. Mayer, L.C.L. Tai, D.S.C. Ko, D. Masin, R.S. Ginsberg, P.R. Cullis, M.B. Bally, Influence of Vesicle Size, Lipid Composition, and Drug-to-Lipid Ratio on the Biological Activity of Liposomal Doxorubicin in Mice, Cancer Res., 49 (1989) 5922–5930.
- [187] D. Liu, A. Mori, L. Huang, Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1104 (1992) 95–101.
- [188] Y. Zou, Y.-H. Ling, S. Reddy, W. Priebe, R. Perez-Soler, Effect of vesicle size and lipid composition on the in vivo tumor selectivity and toxicity of the non-crossresistant anthracycline annamycin incorporated in liposomes, Int. J. Cancer, 61 (1995) 666–671.
- [189] A. Nagayasu, K. Uchiyama, H. Kiwada, The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs, Adv. Drug Deliv. Rev., 40 (1999) 75–87.
- [190] M. Kaszuba, J. Corbett, F.M. Watson, A. Jones, High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques, Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci., 368 (2010) 4439–4451.
- [191] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential What they are and what they are not?, J. Controlled Release, 235 (2016) 337–351.
- [192] K. Pate, P. Safier, 12 Chemical metrology methods for CMP quality, in: S. Babu (Ed.), Adv. Chem. Mech. Planarization CMP, Woodhead Publishing, 2016: pp. 299– 325.
- [193] F. Varenne, J. Botton, C. Merlet, J.-J. Vachon, S. Geiger, I.C. Infante, M.M. Chehimi,C. Vauthier, Standardization and validation of a protocol of zeta potential

measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 486 (2015) 218–231.

- [194] A.V. Delgado, F. González-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division IUPAC Technical Report, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, J. Colloid Interface Sci., 309 (2007) 194–224.
- [195] A. Doroszkowski, 6 The physical chemistry of dispersion, in: R. Lambourne, T.A. Strivens (Eds.), Paint Surf. Coat. Second Ed., Woodhead Publishing, 1999: pp. 198– 242.
- [196] M.A. Morini, M.B. Sierra, V.I. Pedroni, L.M. Alarcon, G.A. Appignanesi, E.A. Disalvo, Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles, Colloids Surf. B Biointerfaces, 131 (2015) 54–58.
- [197] F. Otto, G. Brezesinski, P. van Hoogevest, R.H.H. Neubert, Physicochemical characterization of natural phospholipid excipients with varying PC content, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 558 (2018) 291–296.
- [198] A.A. Jovanovic, B.D. Balanc, A. Ota, P.A. Grabnar, V.B. Djordjevic, K.P. Savikin, B.M. Bugarski, V.A. Nedovic, N.P. Ulrih, Comparative Effects of Cholesterol and -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 120 (2018) 1800039.
- [199] A. Kafle, M. Akamatsu, A. Bhadani, K. Sakai, C. Kaise, T. Kaneko, H. Sakai, Effects of β-Sitosteryl Sulfate on the Properties of DPPC Liposomes, J. Oleo Sci., 67 (2018) 1511–1519.
- [200] C.L. Salcedo, M.A. Frías, A.C. Cutro, M.A. Nazareno, E.A. Disalvo, Antiradical activity of gallic acid included in lipid interphases, Biochim. Biophys. Acta, 1838 (2014) 2656–2661.
- [201] Y. Li, H. Liu, Q. Han, B. Kong, Q. Liu, Cooperative antioxidative effects of zein hydrolysates with sage (Salvia officinalis) extract in a liposome system, Food Chem., 222 (2017) 74–83.
- [202] E. Chibowski, A. Szcześ, Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme, Adsorption, 22 (2016) 755–765.
- [203] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Incorporated, New York, 2001.
- [204] K. Satoh, Determination of binding constants of Ca2+, Na+, and Cl- ions to liposomal membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at gel phase by particle electrophoresis, Biochim. Biophys. Acta, 1239 (1995) 239–248.
- [205] Light Scattering, in: Light Scatt. Size Exclusion Chromatogr. Asymmetric Flow Field Flow Fractionation, John Wiley & Sons, Ltd, 2011: pp. 37–98.

- [206] D.B. Temel, P. Landsman, M.L. Brader, Orthogonal Methods for Characterizing the Unfolding of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Chemical Denaturation, and Intrinsic Fluorescence with Concomitant Static Light Scattering, Methods Enzymol., 567 (2016) 359–389.
- [207] B. Setién, P. Albella, J.M. Saiz, F. González, F. Moreno, Spectral behavior of the linear polarization degree at right-angle scattering configuration for nanoparticle systems, New J. Phys., 12 (2010) 103031.
- [208] C.-Y. Lin, T.-H. Wang, S.-C. How, Z. Bednarikova, D. Fedunova, Z. Gazova, J.W. Wu, S.S.-S. Wang, Investigating the effect of sugar-terminated nanoparticles on amyloid fibrillogenesis of beta-lactoglobulin, Int. J. Biol. Macromol., 165 (2020) 291–307.
- [209] A. de la Maza, J.L. Parra, Vesicle-micelle structural transitions of phospholipid bilayers and sodium dodecyl sulfate, Langmuir, 11 (1995) 2435–2441.
- [210] M.R. Wenk, J. Seelig, Vesicle–Micelle Transformation of Phosphatidylcholine/Octyl-β-d-glucopyranoside Mixtures As Detected with Titration Calorimetry, J. Phys. Chem. B, 101 (1997) 5224–5231.
- [211] A.R. Mohammed, N. Weston, A.G.A. Coombes, M. Fitzgerald, Y. Perrie, Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability, Int. J. Pharm., 285 (2004) 23–34.
- [212] A.A. Ananyan, N.P. Milutina, I. Bernhardt, V.V. Vnukov, Effects of Guanidine Compounds on the Structural State of Membranes and Surface Charge of Lymphocytes, Biol. Membr., 33 (2016) 272–277.
- [213] N. Watanabe, K. Suga, H. Umakoshi, Comparison of Physicochemical Membrane Properties of Vesicles Modified with Guanidinium Derivatives, J. Phys. Chem. B, 121 (2017) 9213–9222.
- [214] A. Sujak, J. Gabrielska, W. Grudziński, R. Borc, P. Mazurek, W.I. Gruszecki, Lutein and Zeaxanthin as Protectors of Lipid Membranes against Oxidative Damage: The Structural Aspects, Arch. Biochem. Biophys., 371 (1999) 301–307.
- [215] W.I. Gruszecki, K. Strzałka, Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., 1740 (2005) 108–115.
- [216] S. Bandyopadhyay, J.C. Shelley, M.L. Klein, Molecular Dynamics Study of the Effect of Surfactant on a Biomembrane, J. Phys. Chem. B, 105 (2001) 5979–5986.
- [217] R. Bnyan, I. Khan, T. Ehtezazi, I. Saleem, S. Gordon, F. O'Neill, M. Roberts, Surfactant Effects on Lipid-Based Vesicles Properties, J. Pharm. Sci., 107 (2018) 1237–1246.
- [218] D.C. Cullum, Surfactant types; classification, identification, separation, in: D.C. Cullum (Ed.), Introd. Surfactant Anal., Springer Netherlands, Dordrecht, 1994: pp. 17–41.

- [219] A.D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd. edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [220] T. Tadros, ed., Encyclopedia of Colloid and Interface Science, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [221] R. Zieliński, Surfaktanty: budowa, właściwości, zastosowania, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, Poznań, 2013.
- [222] R. Zieliński, Surfaktanty towaroznawcze i ekologiczne aspekty ich stosowania, Akademia Ekonomiczna w Poznaniu, 2000.
- [223] S. Anastasiu, E. Jelescu, Środki powierzchniowo czynne, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1973.
- [224] J. Cross, Anionic Surfactants: Analytical Chemistry, Second Edition, CRC Press, 1998.
- [225] T. Cserhati, E. Forgacs, G. Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, Environ. Int., 28 (2002) 337–348.
- [226] J.-L. Salager, Surfactants types and uses, FIRP Bookl., 300 (2002).
- [227] J. Li, Y. He, S. Anankanbil, Z. Guo, Chapter 7 Phospholipid-Based Surfactants, in: D.G. Hayes, D.K.Y. Solaiman, R.D. Ashby (Eds.), Biobased Surfactants Second Ed., AOCS Press, 2019: pp. 243–286.
- [228] S. De, S. Malik, A. Ghosh, R. Saha, B. Saha, A review on natural surfactants, RSC Adv., 5 (2015) 65757–65767.
- [229] S. Akbari, N.H. Abdurahman, R.M. Yunus, F. Fayaz, O.R. Alara, Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review, Biotechnol. Res. Innov., 2 (2018) 81–90.
- [230] I.M. Banat, Q. Carboué, G. Saucedo-Castañeda, J. de Jesús Cázares-Marinero, Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology, Bioresour. Technol., 320 (2021) 124222.
- [231] C.B.B. Farias, F.C.G. Almeida, I.A. Silva, T.C. Souza, H.M. Meira, R. de C.F. Soares da Silva, J.M. Luna, V.A. Santos, A. Converti, I.M. Banat, L.A. Sarubbo, Production of green surfactants: Market prospects, Electron. J. Biotechnol., 51 (2021) 28–39.
- [232] Surfactants Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, in: Mark. Res. Rep., 2021.
- [233] Biosurfactants Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, in: Mark. Res. Rep., 2022.
- [234] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2002.

- [235] X. Lin, X. He, C. Hu, Y. Chen, Y. Mai, S. Lin, Disk-like micelles with cylindrical pores from amphiphilic polypeptide block copolymers, Polym. Chem., 7 (2016) 2815–2820.
- [236] G. Mohan, D.I. Kopelevich, A multiscale model for kinetics of formation and disintegration of spherical micelles, J. Chem. Phys., 128 (2008) 044905.
- [237] Y.S. Sun, J. Luo, K. Lam, X.D. Zhu, Detection of formation and disintegration of micelles by oblique-incidence reflectivity difference microscopy, Instrum. Sci. Technol., 41 (2013) 545–555.
- [238] M.J. Rosen, J.T. Kunjappu, Solubilization by Solutions of Surfactants: Micellar Catalysis, in: Surfactants Interfacial Phenom., John Wiley & Sons, Ltd, 2012: pp. 202–234.
- [239] S. Keller, A. Tsamaloukas, H. Heerklotz, A Quantitative Model Describing the Selective Solubilization of Membrane Domains, J. Am. Chem. Soc., 127 (2005) 11469–11476.
- [240] D. Lichtenberg, Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, Biochim. Biophys. Acta, 821 (1985) 470–478.
- [241] H. Heerklotz, Interactions of surfactants with lipid membranes, Q. Rev. Biophys., 41 (2008) 205–264.
- [242] D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F.M. Goñi, The Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers, Biophys. J., 105 (2013) 289–299.
- [243] A. Pizzirusso, A.D. Nicola, G.J. Agur Sevink, A. Correa, M. Cascella, T. Kawakatsu, M. Rocco, Y. Zhao, M. Celino, G. Milano, Biomembrane solubilization mechanism by Triton X-100: a computational study of the three stage model, Phys. Chem. Chem. Phys., 19 (2017) 29780–29794.
- [244] K.D. Pennell, L.M. Abriola, W.J. Weber, Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soil columns 1 Experimental investigation, Environ. Sci. Technol., 27 (1993) 2332–2340.
- [245] W. Zhou, L. Zhu, Solubilization of pyrene by anionic-nonionic mixed surfactants, J. Hazard. Mater., 109 (2004) 213–220.
- [246] T. Cserháti, E. Forgács, G. Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, Environ. Int., 28 (2002) 337–348.
- [247] N.A. Falk, Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity, J. Surfactants Deterg., 22 (2019) 1119–1127.
- [248] K. Koczó, G. Rácz, Foaming properties of surfactant solutions, Colloids Surf., 56 (1991) 59–82.
- [249] A.W. Cohen, M.J. Rosen, Wetting properties of nonionic surfactants of homogeneous structure C12H25(OC2H4)xOH, J. Am. Oil Chem. Soc., 58 (1981) 1062–1066.

- [250] K. Szymczyk, A. Zdziennicka, B. Jańczuk, Adsorption and wetting properties of cationic, anionic and nonionic surfactants in the glass-aqueous solution of surfactantair system, Mater. Chem. Phys., 162 (2015) 166–176.
- [251] K. Nakamura, Adsorption and Softening Mechanism of Surfactant-type Fabric Softener on Fabric Surfaces, Oleoscience, 13 (2013) 527–532.
- [252] L. Chen, X. Zhao, Z. Wang, J. Tang, B. Feng, M. Tang, Research on the Emulsifying Ability of Surfactants in Crude Oil, Tenside Surfactants Deterg., 50 (2013) 434–440.
- [253] L. Zhang, X. Zhang, P. Zhang, Z. Zhang, S. Liu, B. Han, Efficient emulsifying properties of glycerol-based surfactant, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 553 (2018) 225–229.
- [254] K.A. Wilk, R. Poźniak, A. Sokołowski, Antistatic and wetting properties of chemodegradable cationic surfactants containing 1,3-dioxolane moiety, J. Surfactants Deterg., 3 (2000) 207–211.
- [255] A. Zheng, X. Xu, H. Xiao, N. Li, Y. Guan, S. Li, Antistatic modification of polypropylene by incorporating Tween/modified Tween, Appl. Surf. Sci., 258 (2012) 8861–8866.
- [256] D.R. Karsa, Industrial Applications of Surfactants IV 1st Edition, Woodhead Publishing, 1999.
- [257] Y. Yu, J. Zhao, A.E. Bayly, Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations, Chin. J. Chem. Eng., 16 (2008) 517–527.
- [258] M. Corazza, M.M. Lauriola, M. Zappaterra, A. Bianchi, A. Virgili, Surfactants, skin cleansing protagonists, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 24 (2010) 1–6.
- [259] M.J.L. Castro, C. Ojeda, A.F. Cirelli, Surfactants in Agriculture, in: E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert (Eds.), Green Mater. Energy Prod. Depollution, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013: pp. 287–334.
- [260] T. Rasheed, S. Shafi, M. Bilal, T. Hussain, F. Sher, K. Rizwan, Surfactants-based remediation as an effective approach for removal of environmental pollutants—A review, J. Mol. Liq., 318 (2020) 113960.
- [261] D. Chen, C. Cen, z. Tang, P. Fang, Z. Chen, Treatment of exhaust gas loaded with chlorinated VOC by composite adsorbent, Adv. Mater. Res., 550–553 (2012) 2125– 2128.
- [262] B. Tanhaei, M. Pourafshari Chenar, N. Saghatoleslami, M. Hesampour, M. Kallioinen, M. Mänttäri, Assessment of the micellar-enhanced ultrafiltration process with a tight UF membrane for the removal of aniline from water, Desalination Water Treat., 52 (2014) 5748–5756.
- [263] D.Y. Pharr, Green analytical chemistry the use of surfactants as a replacement of organic solvents in spectroscopy, Phys. Sci. Rev., 2 (2017).

- [264] P.V. Shinde, A.H. Kategaonkar, B.B. Shingate, M.S. Shingare, Surfactant catalyzed convenient and greener synthesis of tetrahydrobenzo[a]xanthene-11-ones at ambient temperature, Beilstein J. Org. Chem., 7 (2011) 53–58.
- [265] T. Lorenzetto, G. Berton, F. Fabris, A. Scarso, Recent designer surfactants for catalysis in water, Catal. Sci. Technol., 10 (2020) 4492–4502.
- [266] Q. Liang, X. Liu, G. Zeng, Z. Liu, L. Tang, B. Shao, Z. Zeng, W. Zhang, Y. Liu, M. Cheng, W. Tang, S. Gong, Surfactant-assisted synthesis of photocatalysts: Mechanism, synthesis, recent advances and environmental application, Chem. Eng. J., 372 (2019) 429–451.
- [267] M. Goto, T. Ono, F. Nakashio, T.A. Hatton, Design of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelles, Biotechnol. Bioeng., 54 (1997) 26–32.
- [268] I. Anestopoulos, D.E. Kiousi, A. Klavaris, A. Galanis, K. Salek, S.R. Euston, A. Pappa, M.I. Panayiotidis, Surface Active Agents and Their Health-Promoting Properties: Molecules of Multifunctional Significance, Pharmaceutics, 12 (2020).
- [269] I.F. Uchegbu, S.P. Vyas, Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, Int. J. Pharm., 172 (1998) 33–70.
- [270] M. Gupta, B. Vaidya, N. Mishra, S.P. Vyas, Effect of Surfactants on the Characteristics of Fluconazole Niosomes for Enhanced Cutaneous Delivery, Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol., 39 (2011) 376–384.
- [271] T. Webster, S. Singh, H. Vardhan, N. Kotla, B. Maddiboyina, D. Sharma, The role of surfactants in the formulation of elastic liposomal gels containing a synthetic opioid analgesic, Int. J. Nanomedicine, (2016) 1475.
- [272] J.H. Crowe, L.M. Crowe, Factors affecting the stability of dry liposomes, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 939 (1988) 327–334.
- [273] A.H. AL Shuwaili, B.K.A. Rasool, A.A. Abdulrasool, Optimization of elastic transfersomes formulations for transdermal delivery of pentoxifylline, Eur. J. Pharm. Biopharm., 102 (2016) 101–114.
- [274] G. Cevc, A. Schätzlein, G. Blume, Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides, J. Controlled Release, 36 (1995) 3–16.
- [275] A. Kim, E.H. Lee, S.-H. Choi, C.-K. Kim, In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome, Biomaterials, 25 (2004) 305–313.
- [276] P. Yadava, D. Buethe, J.A. Hughes, Nonviral Gene Therapy with Surfactants, in: Polym. Drug Deliv. I, American Chemical Society, 2006: pp. 198–216.
- [277] D.R. Acosta-Martínez, E. Rodríguez-Velázquez, F. Araiza-Verduzco, P. Taboada, G. Prieto, I.A. Rivero, G. Pina-Luis, M. Alatorre-Meda, Bis-quaternary ammonium gemini surfactants for gene therapy: Effects of the spacer hydrophobicity on the DNA complexation and biological activity, Colloids Surf. B Biointerfaces, 189 (2020) 110817.

- [278] B.C.P. Sanches, C.A. Rocha, J.G. Martin Bedoya, V.L. da Silva, P.B. da Silva, A.M. Fusco-Almeida, M. Chorilli, J. Contiero, E. Crusca, R. Marchetto, Rhamnolipid-Based Liposomes as Promising Nano-Carriers for Enhancing the Antibacterial Activity of Peptides Derived from Bacterial Toxin-Antitoxin Systems, Int. J. Nanomedicine, 16 (2021) 925–939.
- [279] Q. Shu, J. Wu, Q. Chen, Synthesis, Characterization of Liposomes Modified with Biosurfactant MEL-A Loading Betulinic Acid and Its Anticancer Effect in HepG2 Cell, Molecules, 24 (2019) 3939.
- [280] C. Peetla, V. Labhasetwar, Effect of Molecular Structure of Cationic Surfactants on Biophysical Interactions of Surfactant-Modified Nanoparticles with a Model Membrane and Cellular Uptake, Langmuir, 25 (2009) 2369–2377.
- [281] N. Voigt, P. Henrich-Noack, S. Kockentiedt, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Surfactants, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles, Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV, 87 (2014) 19–29.
- [282] D. Koley, A.J. Bard, Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107 (2010) 16783–16787.
- [283] R.B. Brown, J. Audet, Current techniques for single-cell lysis, J. R. Soc. Interface, 5 Suppl 2 (2008) S131-138.
- [284] O. Regev, R. Zana, Aggregation Behavior of Tyloxapol, a Nonionic Surfactant Oligomer, in Aqueous Solution, J. Colloid Interface Sci., 210 (1999) 8–17.
- [285] N. Takeshita, M. Okuno, T. Ishibashi, Molecular conformation of DPPC phospholipid Langmuir and Langmuir–Blodgett monolayers studied by heterodynedetected vibrational sum frequency generation spectroscopy, Phys. Chem. Chem. Phys., 19 (2017) 2060–2066.
- [286] P. Nigam, Thermodynamic quantification of sodium dodecyl sulfate penetration in cholesterol and phospholipid monolayers, Chem. Phys. Lipids, 232 (2020) 104974.
- [287] M.I. Sández, A. Suárez, A. Gil, Surface Pressure–Area Isotherms and Fluorescent Behavior of Phospholipids Containing Labeled Pyrene, J. Colloid Interface Sci., 250 (2002) 128–133.
- [288] S.W. Nowotarska, K.J. Nowotarski, M. Friedman, C. Situ, Effect of Structure on the Interactions between Five Natural Antimicrobial Compounds and Phospholipids of Bacterial Cell Membrane on Model Monolayers, Molecules, 19 (2014) 7497–7515.
- [289] K. Hąc-Wydro, M. Mach, K. Węder, K. Pająk, P. Wydro, Effect of Cd2+ and Cd2+/auxin mixtures on lipid monolayers – Model membrane studies on the role of auxins in phytoremediation of metal ions from contaminated environment, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1859 (2017) 1164–1171.

- [290] K. Połeć, A. Wójcik, M. Flasiński, P. Wydro, M. Broniatowski, K. Hąc-Wydro, The influence of terpinen-4-ol and eucalyptol - The essential oil components - on fungi and plant sterol monolayers, Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1861 (2019) 1093– 1102.
- [291] A. Wojcik, P. Perczyk, P. Wydro, M. Broniatowski, Incorporation of cyclodiene pesticides and their polar metabolites to model membranes of soil bacteria, J. Mol. Liq., 298 (2020) 112019.
- [292] M. Genisel, O. Eren, Evaluation of physiological and biochemical aberration linked to effect of sodium dodecyl sulphate on barley seedlings, Sn Appl. Sci., 2 (2020) 514.
- [293] M.A. Bahri, M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, A. Seret, Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 290 (2006) 206–212.
- [294] E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems, Anal. Chim. Acta, 548 (2005) 95–100.
- [295] T. Tadros, Critical Micelle Concentration, in: T. Tadros (Ed.), Encycl. Colloid Interface Sci., Springer, Berlin, Heidelberg, 2013: pp. 209–210.
- [296] S.Z. Can, C.F. Chang, R.A. Walker, Spontaneous formation of DPPC monolayers at aqueous/vapor interfaces and the impact of charged surfactants, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1778 (2008) 2368–2377.
- [297] P. Nigam, Thermodynamic quantification of sodium dodecyl sulfate penetration in cholesterol and phospholipid monolayers, Chem. Phys. Lipids, 232 (2020) 104974.
- [298] B. Munteanu, F. Harb, J.P. Rieu, Y. Berthier, B. Tinland, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Charged particles interacting with a mixed supported lipid bilayer as a biomimetic pulmonary surfactant, Eur. Phys. J. E Soft Matter, 37 (2014) 28.
- [299] A. Manosroi, P. Khanrin, W. Lohcharoenkal, R.G. Werner, F. Götz, W. Manosroi, J. Manosroi, Transdermal absorption enhancement through rat skin of gallidermin loaded in niosomes, Int. J. Pharm., 392 (2010) 304–310.
- [300] S. Duangjit, P. Opanasopit, T. Rojanarata, Y. Obata, K. Takayama, T. Ngawhirunpat, B. Pamornpathomkul, Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes, Int. J. Nanomedicine, (2014) 2005.
- [301] R. Tanasescu, U. Mettal, A. Colom, A. Roux, A. Zumbuehl, Facile and Rapid Formation of Giant Vesicles from Glass Beads, Polymers, 10 (2018) 54.
- [302] E. Haba, A. Pinazo, R. Pons, L. Pérez, A. Manresa, Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1838 (2014) 776–783.

- [303] M. Jo, K.-M. Park, J.-Y. Park, H. Yu, S.J. Choi, P.-S. Chang, Microfluidic assembly of mono-dispersed liposome and its surface modification for enhancing the colloidal stability, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 586 (2020) 124202.
- [304] T.-B. J, R. R, Effect of lysozyme subphase and insertion on several lipid films, Adv. Mater. Sci., 4 (2019).
- [305] J.T. Davies, E.K. Rideal, Interfacial phenomena, Academic Press, New York, 1963.
 [306] A. Wnętrzak, K. Lątka, P. Dynarowicz-Łątka, Interactions of alkylphosphocholines with model membranes-the Langmuir monolayer study, J. Membr. Biol., 246 (2013) 453–466.
- [307] E. Piosik, M. Ziegler-Borowska, D. Chełminiak-Dudkiewicz, T. Martyński, Effect of Aminated Chitosan-Coated Fe3O4 Nanoparticles with Applicational Potential in Nanomedicine on DPPG, DSPC, and POPC Langmuir Monolayers as Cell Membrane Models, Int. J. Mol. Sci., 22 (2021) 2467.
- [308] S. Ballweg, E. Sezgin, M. Doktorova, R. Covino, J. Reinhard, D. Wunnicke, I. Hänelt, I. Levental, G. Hummer, R. Ernst, Regulation of lipid saturation without sensing membrane fluidity, Nat. Commun., 11 (2020) 756.
- [309] M. Jurak, Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers: Langmuir and Langmuir–Blodgett Monolayer Study, J. Phys. Chem. B, 117 (2013) 3496–3502.
- [310] W. Kulig, H. Korolainen, M. Zatorska, U. Kwolek, P. Wydro, M. Kepczynski, T. Róg, Complex Behavior of Phosphatidylcholine–Phosphatidic Acid Bilayers and Monolayers: Effect of Acyl Chain Unsaturation, Langmuir, 35 (2019) 5944–5956.
- [311] L. Qiao, A. Ge, Y. Liang, S. Ye, Oxidative Degradation of the Monolayer of 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC) in Low-Level Ozone, J. Phys. Chem. B, 119 (2015) 14188–14199.
- [312] J.M. Rodríguez Patino, A.L. Caro, M.R. Rodríguez Niño, A.R. Mackie, A.P. Gunning, V.J. Morris, Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers, Food Chem., 102 (2007) 532– 541.
- [313] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, G. Paboeuf, V. Vié, C. Lopez, Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 1848 (2015) 2308–2316.
- [314] H. Alobeedallah, B. Cornell, H. Coster, The Effect of Cholesterol on the Dielectric Structure of Lipid Bilayers, J. Membr. Biol., 251 (2018) 153–161.
- [315] W.K. Subczynski, M. Pasenkiewicz-Gierula, J. Widomska, L. Mainali, M. Raguz, High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review, Cell Biochem. Biophys., 75 (2017) 369–385.

- [316] X. Zhang, K.M. Barraza, J.L. Beauchamp, Cholesterol provides nonsacrificial protection of membrane lipids from chemical damage at air-water interface, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 115 (2018) 3255–3260.
- [317] R.A. Demel, L.L.M. Van Deenen, B.A. Pethica, Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., 135 (1967) 11–19.
- [318] S. Malcharek, A. Hinz, L. Hilterhaus, H.-J. Galla, Multilayer structures in lipid monolayer films containing surfactant protein C: effects of cholesterol and POPE, Biophys. J., 88 (2005) 2638–2649.
- [319] R. Derradi, M. Bolean, A.M.S. Simão, L. Caseli, J.L. Millán, M. Bottini, P. Ciancaglini, A.P. Ramos, Cholesterol Regulates the Incorporation and Catalytic Activity of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in DPPC Monolayers, Langmuir, 35 (2019) 15232–15241.
- [320] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, Mixed DPPC-cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles, Colloids Surf. B Biointerfaces, 105 (2013) 284–293.
- [321] D.-Z. Liu, W.-Y. Chen, L.-M. Tasi, S.-P. Yang, Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp., 172 (2000) 57–67.
- [322] A. Vangala, R. Morris, M. Bencsik, Y. Perrie, Preparation and Characterization of Gas-filled Liposomes: Can They Improve Oil Recovery?, J. Liposome Res., 17 (2007) 263–272.
- [323] S.-C. Lee, K.-E. Lee, J.-J. Kim, S.-H. Lim, The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated Retinol, J. Liposome Res., 15 (2005) 157– 166.
- [324] S. Shaker, A.R. Gardouh, M.M. Ghorab, Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method, Res. Pharm. Sci., 12 (2017) 346–352.

12. Wykaz dorobku naukowego

Publikacje dotyczące wyników zamieszczonych w pracy:

[P1] A. Sęk, P. Perczyk, P. Wydro, W.I. Gruszecki, A. Szcześ, Effect of trace amounts of *ionic surfactants on the zeta potential of DPPC liposomes*, Chem. Phys. Lipids. 235 (2021) 105059.

pkt. MNiSW = 100

[P2] A. Sęk, P. Perczyk, A. Szcześ, P. Wydro, The interactions of trace amounts of ionic surfactants with mixed 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)/Cholesterol membranes, J. Mol. Liq. 353 (2022) 118805. pkt. MNiSW = 100

[P3] A. Sęk, P. Perczyk, A. Szcześ, R. Machatschek, P. Wydro, Studies on the interactions of tiny amounts of common ionic surfactants with unsaturated phosphocholine lipid model membranes, Chem. Phys. Lipids. (w recenzji) pkt. MNiSW = 100IF₂₀₂₀ = 3,329*

Pozostałe publikacje:

I.S. Pieta, W.S. Epling, A. Kazmierczuk, P. Lisowski, R. Nowakowski, E.M. Serwicka, Waste into Fuel-Catalyst and Process Development for MSW Valorisation, Catalysts, 8 (2018) 113.

pkt. MNiSW = 100

A. Sek, R. Welc, M.M. Mendes-Pinto, E. Reszczynska, W. Grudzinski, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, Raman spectroscopy analysis of molecular configuration forms of the macular xanthophylls, J. Raman Spectrosc., 51 (2020) 635–641. pkt. MNiSW = 70 $IF_{2020} = 3,133$

R. Luchowski, W. Grudzinski, R. Welc, M.M.M. Pinto, A. Sek, J. Ostrowski, L. Nierzwicki, P. Chodnicki, M. Wieczor, K. Sowinski, R. Rejdak, A.G.M. Juenemann, G. Teresinski, J. Czub, W. Gruszecki, Light-Modulated Sunscreen Mechanism in the Retina of the Human *Eye*, J. Phys. Chem. B, 125 (2021) 6090–6102. IF₂₀₂₀ = 2.991* pkt. MNiSW = 140

IF₂₀₂₀ = 3,329*

 $IF_{2018} = 3.444$

IF₂₀₂₀ = 6,165*

I.S. Pieta, A. Michalik, E. Kraleva, D. Mrdenovic, A. Sek, E. Wahaczyk, A. Lewalska-Graczyk, M. Krysa, A. Sroka-Bartnicka, P. Pieta, R. Nowakowski, A. Lew, E.M. Serwicka, *Bio-dee synthesis and dehydrogenation coupling of bio-ethanol to bio-butanol over multicomponent mixed metal oxide catalysts*, Catalysts, 11 (2021). pkt. MNiSW = 100 IF₂₀₂₀ = 4,146*

* Najnowszy dostępny IF według Journal Citation Report (Web of Science)

Wystąpienia konferencyjne, na których wygłoszono komunikaty:

A. Sęk, *Analiza ramanowska barwników ksantofilowych,* IX Ogólnokrajowa Konferencja Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, Lublin, 05.04.2019.

Wystąpienia konferencyjne, na których zaprezentowano plakaty:

A. Kaźmierczuk, R. Welc, M.M. Mendes-Pinto, W. Grudziński, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, *Xanthophylls in the Retina of the Eye*, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Techniczna "Innowacje w praktyce", Lublin, 23–24.11.2017.

A. Kaźmierczuk, M.M. Mendes-Pinto, R. Welc, W. Grudziński, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, *Raman microscopic imaging of lutein-containing unilamellar liposomes*, I Międzynarodowa Konferencja "Chemistry for Beauty and Health", Toruń, 13–16.06.2018.

A. Sęk, M.M. Mendes-Pinto, R. Welc, W. Grudziński, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, *Orientation of macular pigments in a lipid bilayer defined by Raman microscopic imaging,* XLVI Winter School "The Light Side of the Force", Zakopane, 11–15.02.2019.

A. Sęk, M.M. Mendes-Pinto, R. Welc, W. Grudziński, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, *Xanthophylls in the Retina of the Eye*, 3rd Interdisciplinary FNP Conference, Warszawa, 11–12.04.2019.

A. Sęk, M.M. Mendes-Pinto, R. Welc, W. Grudziński, R. Luchowski, W.I. Gruszecki, *Resonance Raman spectroscopy study on localization and orientation of lutein in a lipid bilayer*, XVII Congress of the Polish Biophysical Society, Olsztyn, 24–27.06.2019.

A. Sęk, W.I. Gruszecki, A. Szcześ, *Potencjał elektrokinetyczny jako parametr stanowiący o właściwościach błon lipidowych*, 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Warszawa, 02–06.09.2019.

A. Sęk, P. Perczyk, P. Wydro, W.I. Gruszecki, A. Szcześ, *Effect of tiny amounts of ionic surfactants on the zeta potential of DPPC liposomes*, Geneva Colloids 2021, online, 08–09.04.2021.

A. Sęk, P. Perczyk, P. Wydro, A. Szcześ, *Effect of tiny amounts of surfactants on the zeta potential of phosphatidylcholine liposomes*, 35th Conference of the European Colloid and Interface Society, Ateny, Grecja, 05–10.09.2021.

Projekty naukowe:

01.10.17 – 31.12.2020 Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin – wykonawca projektu badawczego pt. "Xanthophylls in the Retina of the Eye" realizowanego w programie TEAM finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej.

Wyjazdy naukowe:

| 21.10 - 25.10.2019 | Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, U niwersytet Jagielloński , Kraków. |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18.11 – 29.11.2019 | Department of Physics and Astronomy, Texas Christian University , Fort Worth, Texas (USA) – wyjazd badawczy w ramach projektu pt. <i>"Xanthophylls in the Retina of the Eye"</i> finansowanego przez FNP i realizowanego w Katedrze Biofizyki Instytutu Fizyki UMCS w Lublinie. |
| 24.05 - 28.05.2021 | Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, U niwersytet Jagielloński, Kraków. |
| 14.06 – 18.06.2021 | Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, U niwersytet Jagielloński, Kraków. |
| 27.09 - 01.10.2021 | Zakład Chemii Środowiska, Wydział Chemii, U niwersytet Jagielloński, Kraków. |
| 08.11 – 28.11.2021 | Department of Materials in Life Sciences, Institute of Active Polymers, Helmholtz Hereon Center , Teltow (Germany) – wyjazd badawczy w ramach projektu " <i>PROM – Międzynarodowa wymiana</i> <i>stypendialna doktorantów i kadry akademickiej</i> " realizowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA). |