
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 polidispersyjności.

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 steroidem występującym w błonach komórkowych ssaków, warunkującym ich prawidłowe funkcjonowanie.

Rozprawa składa się z dwóch głównych części: części literaturowej i części doświadczalnej, które poprzedza krótkie wprowadzenie w tematykę rozprawy i naznaczenie celu pracy. Część literaturową 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 literaturową 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, półnasyconego, nienasyconego oraz z mieszaniny lipidu nasyconego i cholesterolu. Dla wszystkich układów jednowarstwowych zaprezentowano uzyskane izotermie 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 polidispersyjności 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.