

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Zakład Radiospektroskopii



*„Badanie oddziaływań nowej generacji leków
przeciwnowotworowych z grupy alkilofosfocholin z
lipidami błonowymi w układach dwu- i
trójwymiarowych”*

Anita Natasza Wnętrzak

Praca na stopień doktora nauk biofizycznych
wykonana pod kierunkiem
Prof. dra hab. Kazimierza Łątki

Kraków 2013

Oświadczenie

Ja niżej podpisana Anita Wnętrzak (nr indeksu: 1036404) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego kierunku Biofizyka oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. *„Badanie oddziaływań nowej generacji leków przeciwnowotworowych z grupy alkilofosfocholin z lipidami błonowymi w układach dwu- i trójwymiarowych”* przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Łątki. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja praca dyplomowa została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie tytułu nabytego na podstawie tej pracy.

.....
Kraków, dnia

.....
podpis doktorantki

Kraków, 23.07.2013

Oświadczenie

Oświadczam, że przedłożone egzemplarze pracy doktorskiej pani magister Anity Wnętrzak pt. *„Badanie oddziaływań nowej generacji leków przeciwnowotworowych z grupy alkilofosfocholin z lipidami błonowymi w układach dwu- i trójwymiarowych”* stanowią wersję ostateczną.

.....
Prof. dr hab. Kazimierz Łątka

Niniejszym chciałabym podziękować
promotorowi pracy
Panu Prof. dr hab. Kazimierzowi Łątce
za poświęcony czas, cenne rady
związane z niniejszą pracą,
a także za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

Serdeczne podziękowania składam
Pani Prof. dr hab. Patrycji Dynarowicz-Łątce
za opiekę naukową, zaangażowanie, życzliwość
i służenie doświadczeniem przy wykonywaniu badań
oraz czas poświęcony przy redakcji pracy.

Dziękuję **Pracownikom** Zespołu Fizykochemii Zjawisk
Międzyfazowych Wydziału Chemii UJ za wielką pomoc
podczas przeprowadzania eksperymentów oraz przeprowadzenie
pomiarów GIXD

Dziękuję **Panu Prof. dr hab. Wojciechowi Kwiatkowi**
za umożliwienie realizacji części badań
w Zakładzie Spektroskopii Stosowanej IFJ PAN w Krakowie,
a także wszystkim **Pracownikom** ww. zakładu
za zaangażowanie oraz pomoc udzieloną
przy wykonaniu badań i opracowywaniu danych.

Dziękuję **Pani dr hab. Monice Marzec**
za wszelką pomoc w pomiarach właściwości ciekłokrystalicznych

Mojej **Mamie** za wszystko.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli:.....	1
Cel pracy	4
I. Część teoretyczna	6
I.1. Błony biologiczne	6
I.1.1. Rys historyczny	6
I.1.2. Lipidy błonowe.....	8
I.1.3. Tratwy (rafty) lipidowe	21
I.1.4. Asymetria lipidowa błon komórkowych.....	25
I.1.5. Różnice w składzie błon komórek zdrowych i nowotworowych.....	28
I.2. Syntetyczne lipidy antynowotworowe	32
I.3. Monowarstwy Langmuira w świetle literatury	40
I.3.1. Fizyczne podstawy techniki Langmuira.....	42
I.3.2. Klasyczny i współczesny opis monowarstw Langmuira	47
I.3.3. Mechanizm załamania monowarstwy	53
I.3.4. Układy dwu- i wieloskładnikowe.....	57
I.3.5. Współczesne metody analizy filmów Langmuira	63
I.3.6. Monowarstwy Langmuira jako laboratoryjny model błony biologicznej.....	70
II. Część doświadczalna.....	75
II. 1. Metodologia przeprowadzonych badań	75
II.1.1. Odczynniki i związki wykorzystane w badaniach	75
II.1.2. Układ pomiarowy	76
II.1.3. Wpływ warunków eksperymentalnych na przebieg izoterm.....	79
II.1.4. Procedura badawcza	82
II. 2. Właściwości fizykochemiczne badanych APCs	87
II.3. Indukcja apoptozy przez APCs - badania na materiale biologicznym	91
II.4. Badania monowarstw Langmuira	95
II.4.1. Charakterystyka monowarstw Langmuira utworzonych przez badane APCs	95
II.4.2. Szczegółowa charakterystyka monowarstw tworzonych przez ErPC.....	98
II.4.3. Mieszanki APCs z lipidami błonowymi.....	103
II. 4.4. Oddziaływania APCs z modelowymi raftami lipidowymi.....	134

II.4.5. Wpływ APCs na modelowe błony komórkowe - układy trójskładnikowe APCs/Chol/DPPC(POPC)	139
II.4.6. Powinowactwo APCs do błony komórkowej nowotworu prostaty	147
III. Dyskusja wyników	151
III.1. Właściwości APCs.....	151
III.1.1. Ciekłokrystaliczne właściwości badanych APCs	151
III.1.2. Mechaniczne i elektryczne właściwości monowarstw Langmuira utworzonych przez APCs	152
III.2. Zdolność APCs do indukcji procesu apoptozy	154
III. 3. Oddziaływania APCs z cholesterolem i fosfolipidami (DPPC i POPC)	156
III.3.1. Mieszalność cząsteczek w układzie ErPC/DPPC	159
III.4. Oddziaływania ze sfingolipidami	162
III.5. Zasada komplementarności.....	165
III.6. Wpływ APCs na modelowe rafty lipidowe	167
III.7. Wpływ APCs na modelowe błony biologiczne	169
III.8. Powinowactwo APCs do błony komórki nowotworu prostaty.....	171
IV. Wnioski.....	173
Bibliografia.....	177
Streszczenie.....	i
Summary	iv

Wykaz stosowanych skrótów i symboli:

PL – fosfolipidy
PC – fosfatydylocholina
PE – fosfatydyloetanolamina
PS – fosfatydyloseryna
PI – fosfatydoinozytol
PA – kwas fosfatydowy
DAG – diacyloglicerol
DMPA – 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosforan
DPPA – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosforan
DMPG – 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfoglicerol
DPPG – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoglicerol
DPPE – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPE – 1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DPPC – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
POPC – 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DPPS – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoseryna
DPPI – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoinozytol
Sph/SM – Sfingomielina jaja kurzego
C16SM – N-palmitoilo sfingomielina
Chol – cholesterol
GM, GD – gangliozydy
PGA, PKB – prostaglandyny
Cer – ceramid
GalCer – galaktozyloceramid
GlcCer – glukozylloceramidy
ATLs – syntetyczne lipidy antynowotworowe
ALP – alkilolizofosfolipid
APC – alkilofosfolipid
LPC – lizofosfatydylocholina
ET-18-OCH₃ – edelfozyna
HePC – heksadecylfosfocholina (miltefozyna)
OcPC – oktadecylfosfocholina
ErPC – erucylfosfocholina
ErPC3 – eryfuzyna
SMS – syntaza sfingomieliny
CoA – koenzym A
HMG-CoA – hydroksymetyloglutarylo-koenzym A
NADPH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy w formie zredukowanej
NAD⁺ – forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
FAD – forma utleniona dinukleotydy flawinoadeninowego
ATP – adenozynt trifosforan
CTP – cytydynot trifosforan
ADP – adenozyndifosforan
CTP – trifosforan cytydyny
CMP – cytydynomonofosforan
GDNF – czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego
IgE – immunoglobulina E

MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenem
PKA/ CAPK – kinaza białkowa A
PKB/Akt – kinaza białkowa B
PKC – kinaza białkowa C
PKD – kinaza białkowa D
PLC – fosfolipaza C
PLD – fosfolipaza D
PIP2- 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu
PIP3- 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu
PI3K - kinaza fosfoinozytydu
ACP – białkowy nośnik grup acylowych
mTOR – kinaza kontrolująca cykl komórkowy
Fas/CD95 – receptor śmierci komórkowej
FasL/CD95L – ligand receptora śmierci komórkowej
ROS – stres oksydacyjny
Ras/Raf/MAPK/ERK oraz **PI3K/PKB/Act** - – antyapoptyczne szlaki sygnalizacji
Ras i Ras – białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów
G_{aq/11}, podjednostka białka G aktywująca fosfolipazę C
DISC – kompleks sygnalizujący apoptozę
SAPK/JNK – kinazy białkowe aktywowane stresem
ER – retikulum endoplazmatyczne
DRM – błona odporna na detergenty
DIG – nierozpuszczalna w detergentach błona bogata w glikolipidy
DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy
CT – toksyna cholery
chol:PL – stosunek cholesterolu do fosfolipidów
l_o - faza cieczy uporządkowanej
l_d - faza cieczy nieuporządkowanej
D - współczynnik dyfuzji
EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny
KB – linia komórkowa raka naskórkowego
HepG2 – ludzka linia komórkowa raka wątroby
CHO – linia komórkowa jajnika chomika chińskiego
ω – praca
s – powierzchnia
F – energia swobodna
G – entalpia swobodna
U-energia wewnętrzna
T – temperatura
T_m – temperatura przejścia fazowego
V – objętość
γ – napięcie powierzchniowe
γ₀ – napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika
BAM – mikroskopia kąta Brewstera
π – ciśnienie powierzchniowe
π_{coll} – ciśnienie załamania monowarstwy
π₁₂ – ciśnienie powierzchniowe mieszanej monowarstwy
C_s – ściśliwość
C_s⁻¹ – moduł ściśliwości

$C_S^{-1}{}_{\max}$ – maksymalna wartość modułu ściśliwości
 p – ciśnienie zewnętrzne
 k – stała Boltzmanna
 G – stan gazowy monowarstwy
 L_1 – stan ciekły rozprężony monowarstwy
 L – stan ciekły monowarstwy
 L_2 – stan ciekły skondensowany monowarstwy
 I – stan przejściowy monowarstwy
 S – stan stały monowarstwy
 CS – stan stały skondensowany monowarstwy
 LS – stan nadciekły monowarstwy
 X_i – ułamek molowy
 A – powierzchnia przypadająca na cząsteczkę w monowarstwie
 A_0 – powierzchnia graniczna
 A_{12} – średnia powierzchnia przypadająca na cząsteczkę w mieszanej monowarstwie
 A_{coll} – powierzchnia przypadająca na cząsteczkę przy załamaniu monowarstwy
 A^{exc} – powierzchnia nadmiarowa
 ΔG^{exc} – zmiana nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania
 ΔG^{M} – zmiana całkowitej entalpii swobodnej mieszania
 ΔG^{id} – zmiana entalpii swobodnej układu idealnego
 N_A – liczba Avogadro
 R – stała gazowa
 NN – ponachylenie cząsteczek w kierunku najbliższego sąsiada
 NNN – ponachylenie cząsteczek w kierunku następnego najbliższego sąsiada
 d – odległości między liniami w dwuwymiarowej sieci krystalicznej
 $2\theta_{xy}$ – horyzontalna składowa kąta rozpraszania
 Q_{xy} – wektor rozpraszania w płaszczyźnie monowarstwy
 Q_z – wektor rozpraszania w kierunku z
 L_{xy} – długość koherentna w płaszczyźnie monowarstwy
 L_z – długość koherentna w kierunku z

Cel pracy

Pomimo, że pierwsze związki z grupy alkilofosfocholin (APCs) zostały zsyntezowane już w latach 80-tych XX wieku, do dnia dzisiejszego nie udało się poznać mechanizmu ich wysokiej selektywności. Związki te działają jedynie na komórki zmienione nowotworowo, indukując w nich proces zaprogramowanej śmierci (apoptozy), jednakże nie wywołują takiego efektu w stosunku do komórek zdrowych. Antyneoplastyczne działanie alkilofosfocholin wynika z ich powinowactwa do błony komórkowej. Mianowicie, wbudowując się w nią, zmieniają jej właściwości biofizyczne, w wyniku czego dochodzi do modulacji procesów życiowych komórki. Dotychczas w literaturze opisano możliwe sposoby działania tych leków bezpośrednio po ich przedostaniu się do wnętrza komórki, nadal jednak nie jest jasne, dlaczego leki te pozostawiają komórki zdrowe w stanie niezmienionym. Aby więc poznać dokładny sposób ich działania, konieczne jest zbadanie mechanizmów inkorporacji APCs do wnętrza komórki oraz określenie - na poziomie błony - miejsc wiążących te leki.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie termodynamicznej charakterystyki oddziaływań syntetycznych lipidów antynowotworowych z grupy APCs z głównymi lipidami błonowymi w układach modelowych. Modyfikacja oddziaływań w warstwie lipidowej na skutek działania APCs może bowiem dostarczyć istotnych informacji na temat powinowactwa tej grupy leków do konkretnych lipidowych składników błon poprzez zbadanie ich wzajemnych oddziaływań. Do badań oddziaływań APCs ze składnikami biomembran wybrano trzy alkilofosfocholiny posiadające tę samą grupę polarną, natomiast różniące się między sobą długością apolarnego łańcucha: HePC (C16), OcPC (C18), ErPC (C22 z jednym podwójnym wiązaniem pomiędzy 13 a 14 atomem węgla). Jako lipidy błonowe wybrano: cholesterol - będący podstawowym steroidem błon komórek ssaków, DPPC i POPC - będące przedstawicielami fosfolipidów błonowych (odpowiednio nasyconych i nienasyconych), a także dwa sfingolipidy: sfingomielinę oraz gangliozyd GM1. Sfingomielinę wybrano z uwagi na fakt, iż obok cholesterolu stanowi główny składnik tratw lipidowych, natomiast gangliozyd wybrano z powodu jego nadekspresji w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek zdrowych.

Podstawową metodą wybraną do zbadania oddziaływania pomiędzy wybranymi APCs a składnikami błon biologicznych jest technika monowarstw Langmuira, będąca doskonałym narzędziem umożliwiającym analizę interakcji pomiędzy związkami o charakterze amfifilowym.

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badania monowarstw jedno - i wieloskładnikowych: APCs/lipid błonowy, APCs/raft lipidowy, APCs/błona komórkowa w szerokim zakresie składu i ciśnień powierzchniowych. Oczekuje się, że dogłębna analiza termodynamiczna tych układów pozwoli określić rolę poszczególnych lipidów w procesie selektywnej inkorporacji leków do komórek nowotworowych. Wyniki eksperymentów objętych niniejszą rozprawą oprócz interesujących aspektów poznawczych mają także znaczenie praktyczne w związku z ich potencjalnym zastosowaniem w medycynie. Zakłada się, że opisanie różnic w aktywności biologicznej poszczególnych APCs może w przyszłości przyczynić się do zaprojektowania i zsyntezowania innych pochodnych o jeszcze wyższej skuteczności i obniżonym działaniu ubocznym.

I. Część teoretyczna

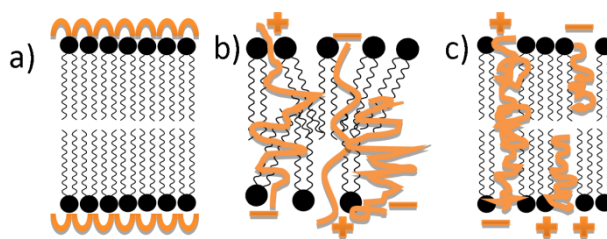
I.1. Błony biologiczne

Błony biologiczne są nie tylko fizycznymi granicami oddzielającymi komórki od środowiska zewnętrznego (Alberts i wsp., 2009), lecz te w pełni wyspecjalizowane lipidowo-białkowe struktury pełnią w organizmach wiele różnorodnych funkcji (Tekpli, 2013). Działają jak półprzepuszczalne selektywne sita umożliwiające transport wielu niezbędnych substancji oraz leków. Ich rolę potwierdzono również w procesie transdukcji sygnału (Simons i Ikonen, 1997; Shi i Massague, 2003; Suzuki, 2012). Funkcyjność błony ściśle zależy od typu komórki oraz rodzaju i wzajemnych proporcji budujących ją lipidów, białek i cukrów (Berg i wsp., 2011). Niniejszy rozdział poświęcony jest głównie lipidom błonowym i modulowaniu przez te składniki właściwości fizykochemicznych błon komórkowych. W dalszej części sekcji omówione zostaną zmiany strukturalne zachodzące w komórkach na skutek procesu nowotworzenia.

I.1.1. Rys historyczny

Teoria dotycząca struktury oraz składu błon biologicznych rozwijała się przez ponad wiek. Pierwszy istnienie błon komórkowych zapostulował w 1855 Nägeli obserwując wnikanie barwników do zdrowych i uszkodzonych komórek roślinnych (Ling, 2007). W 1897 roku Pfeffer sformułował wniosek, że każda komórka otoczona jest półprzepuszczalną błoną komórkową, która reguluje transport wody oraz substancji polarnych (Ling, 2007). Z kolei na lipidy jako główny składnik błon biologicznych wskazał Overton. Zauważył on, że komórki roślinne i zwierzęce są podobne do siebie w swoich właściwościach przepuszczalności. Wyniki przeprowadzonego przez niego eksperymentu pokazały, że związki o charakterze hydrofobowym łatwiej przenikają przez błonę, zatem jej składniki muszą wykazywać cechy swoiste dla tłuszczu (Overton, 1899; Edidin, 2003). W roku 1925 Gorter i Grendel wykorzystując technikę monowarstw Langmuira dowiedli, że utworzona na powierzchni wody lipidowa monowarstwa charakteryzuje się dwa razy większą powierzchnią od powierzchni krwinek czerwonych, z których lipidy te zostały wyekstrahowane. W oparciu o uzyskane wyniki

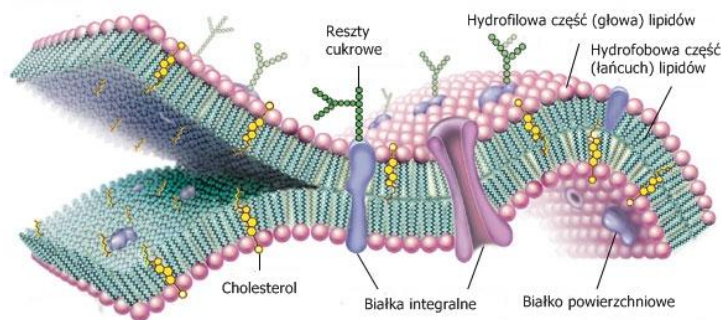
przedstawili oni pierwszy model błony biologicznej jako biwarstwy lipidowej (Gorter i Grendel, 1925). Kolejny pogląd na budowę błony biologicznej - znany jako model Davsona - Danielliego - Robertsona (DDR) - uwzględnia dodatkowo obecność białek. Według tego modelu lipidy uformowane są w dwuwarstwę otoczoną łańcuchami unieruchomionych białek (Davson i Danielli, 1952) - rys. 1 a. Pogląd ten uwiarygodniły zdjęcia wykonane przez Robertsona przy użyciu mikroskopu elektronowego (Robertson, 1964).



Rys. I.1. Konceptje dotyczące budowy błony biologicznej a) model Davsona – Danielliego – Robertsona (DDR) b) model Bensona c) wczesny model płynnej mozaiki; na pomarańczowo zaznaczono białka - na podstawie (Singer, 2004);

Mimo dużych ograniczeń (model ten nie rozstrzyga m.in. transportu przez błonę jonów i cząsteczek wody) koncepcja DDR przetrwała aż do roku 1966, kiedy to Benson przedstawił swój pomysł na budowę biomembrany. Według niego błonę biologiczną tworzą lipoproteinowe podjednostki, w których łańcuchy polipeptydowe splecione są z łańcuchami węglowodorowymi kwasów tłuszczowych i wypełniają wnętrze membrany, natomiast grupy polarne lipidów i jonowe reszty białek znajdują się w kontakcie z wodą na dwóch powierzchniach błony (Benson, 1966) - rys. I.1 b. W tym samym roku ukazał się artykuł prezentujący wczesny pogląd na mozaikową strukturę błony, w którym białka i lipidy rozmieszczone są w znacznym stopniu niezależnie od siebie - rys. I.1 c (Lenard i Singer, 1966). Brak było jednak dowodów potwierdzających słusność tego modelu, głównie dlatego, iż nie udało się wyizolować żadnych białek błonowych (Singer, 2004). Dopiero badania przeprowadzone przez da Silva i Brantona metodą kriorytnictwa z użyciem mikroskopii elektronowej potwierdziły obecność głęboko osadzonych w błonie białek (tzw. białek integralnych) rozmieszczonych mozaikowo w podwójnej warstwie lipidowej (da Silva i Branton, 1970). Rok później Bretscher posługując się techniką znakowania chemicznego potwierdził istnienie białek powierzchniowych w błonach erytrocytów (Bretscher, 1971). Wszystkie powyższe

wyniki zostały zebrane i opracowane przez Singera, a potwierdzona eksperymentalnie obecność białek integralnych odróżnia model płynnej mozaiki od innych prezentowanych wcześniej poglądów na temat struktury błon biologicznych (rys. I.2). Zgodnie z tym modelem błona komórkowa jest strukturą płynną, dynamiczną oraz jednorodną (Singer i Nicolson, 1972).



Rys. I.2. Model płynnej mozaiki wg Singera i Nicolsona

Późniejsze badania pokazały jednak, że struktura błon nie jest całkowicie homogeniczna. Wyniki eksperymentów wskazały na istnienie niejednorodności, zarówno w płaszczyźnie błony (tzw. tratw lipidowych) (Simons i Ikonen, 1997), jak i w kierunku do niej prostopadłym (wykazano bowiem związaną z odmiennym składem lipidowym poszczególnych warstw błony asymetryczność jej budowy (van Meer i wsp., 2008)). Zagadnienia te omówione są bardziej szczegółowo w dalszej części pracy (podrozdziały I.1.3 i I.1.4.)

I.1.2. Lipidy błonowe

Lipidy są grupą związków o zróżnicowanej budowie, których wspólną cechą jest słaba rozpuszczalność lub całkowita nierozpuszczalność w wodzie, natomiast bardzo dobra rozpuszczalność w substancjach niepolarnych, takich jak chloroform, benzen i etanol (Callegarin i wsp., 1997). Według Bloor'a wszystkie lipidy można podzielić na trzy grupy: lipidy proste, lipidy złożone oraz pochodne lipidów (Bloor, 1920). Szczegółowy podział tych związków zaprezentowany jest w tab. I.1.

Grupa				Przykład
Lipidy proste	Trójglicerydy	Oleje	Oleje roślin	Olej z awokado, olej sojowy
			Oleje zwierzęce	Olej z kolenia czarnego, olej z wątroby rekina
		Tłuszcze	Z kakaowca, masło shea	
	Woski	Wosk pszczeli		
Lipidy złożone	Fosfolipidy	kwasy fosfatydowe	DMPA, DPPA	
		Fosfatydyloglicerole	DMPG, DPPG	
		difosfatydyloglicerole		
		fosfatydyloetanolaminy	DOPE, DPPE	
		fosfatydylocholiny	DPPC, POPC	
		fosfatydyloseryny	DPPS	
		fosfatydyloinozytole	DPPI	
		Fosfanowe analogi		
	Sfingolipidy	sfingofosfolipidy	sfingomieliny	Sph , C16SM
		sfingoglikolipidy	GM ₁ , GM ₂ , GM ₃ , GM ₄ , GD ₂	
	Glikolipidy			
	Sulfolipidy	sulfogalaktolipidy		
Pochodne lipidów	Steroidy	sterole i estry steroli	Chol, ergosterol	
		Sterylglikozydy i acylsterylglikozydy		
		siarczany steroli		
		kwasy żółciowe i ich koniugaty		
	Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach	A	Karetonoidy, retinol	
		D	Ergo kalcyferol	
		E	Karetonoidy, retinol	
		K	K ₁ , K ₂	
	Prostaglandyny		PGA, PGA ₂ , PGB	

Tab. I.1. Podział lipidów

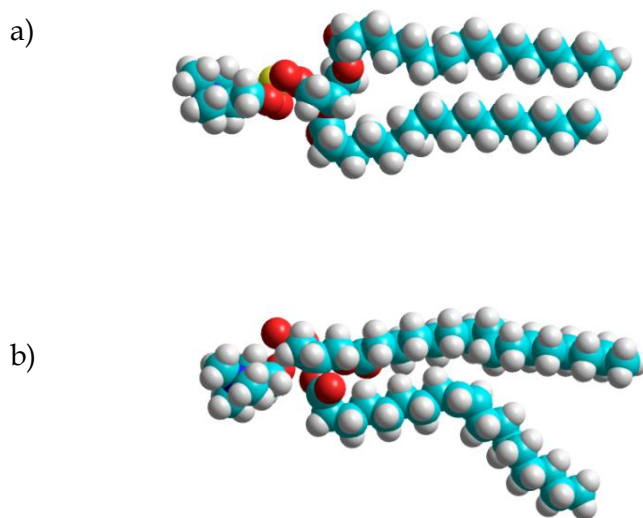
Lipidy wchodzące w skład błony biologicznej cechuje wynikająca z ich specyficznej budowy amfipatyczność: ich cząsteczki zawierają zarówno polarne głowy jak i hydrofobowe, przeważnie długie, węglowodorowe łańcuchy, pochodzące głównie

od kwasów tłuszczowych i alkoholi. Dzięki temu wykazują zdolność do formowania stabilnej termodynamicznie struktury dwuwarstwy, stanowiącej macierz dla protein błonowych (Dowhan i Bogdanov, 2002). Cząsteczki lipidów mogą różnić się od siebie zarówno liczbą łańcuchów węglowodorowych, ich długością, jak i stopniem nasycenia (Zhao i Feng, 2004). Powszechnie wiadomo, że im więcej łańcuchów posiadają lipidy i im są one dłuższe, tym mniej płynna jest błona. Wzrasta też temperatura przejścia fazowego, a zatem rośnie stabilność dwuwarstwy (Chapman i Urbina, 1974; Yokoyama i wsp., 2010). Obecność wiązań nienasyconych powoduje natomiast boczne skręcanie łańcuchów węglowodorowych, przez co zajmują one - w odniesieniu do łańcuchów prostych - względnie więcej miejsca i zmniejszają upakowanie błony (Yamamura i Saito, 2011). Błony biologiczne powinny w zakresie temperatur środowiska utrzymywać charakter płynny, dlatego też w lipidach błonowych jeden z łańcuchów posiada przeważnie co najmniej jedno wiązanie nienasycone (Murray i wsp., 2012).

Lipidy błonowe budujące błony ssaków można podzielić na 3 grupy: fosfolipidy (PL), sfingolipidy oraz sterole (Berg i wsp., 2011).

Fosfolipidy stanowią najliczniejszą grupę lipidów membranowych. W surfaktantach płucnych mogą stanowić nawet 90% składu (Veldhuizen i wsp., 1998; Yu i Possmayer, 2003). W organizmie poza funkcjami czysto strukturalnymi pełnią wiele innych, istotnych z biologicznego punktu widzenia zadań (Yeagle, 1989; Dowhan and Bogdanov, 2002) m.in. biorą udział w przemianach cholesterolu (Berg i wsp., 2011), uczestniczą w transporcie czynnym i biernym (Cullis i wsp., 1980, Prasad i Kumar, 2005) oraz stanowią istotne ogniwo w łańcuchu przekazu informacji (Zeisel, 1993). Szkielet tych związków stanowi glicerol, do którego wiązaniami estrowymi przyłączone są dwa nierozgałęzione łańcuchy kwasów tłuszczowych (zazwyczaj o parzystej liczbie atomów węgla w przedziale 16-18) oraz ortofosforan zestryfikowany w pozycji 3 z grupą -OH odpowiedniego alkoholu (Berg i wsp., 2011). W lipidach błonowych alkoholem może być etanoloamina (mówi się wtedy o fosfatydyloetanoloaminie), cholina (fosfatydylocholina), inozytol (fosfatydyloinozytol), seryna (fosfatydyloseryna), bądź glicerol (fosfatydyloglicerol) (Holthuis i Levine, 2005).

Przedstawicielami glicerofosfolipidów błon biologicznych są 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DPPC) oraz 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (POPC) - rys. I.3



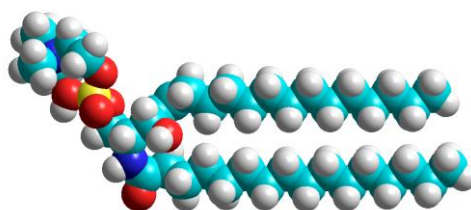
Rys. I.3. Struktura cząsteczek a) DPPC b) POPC

Cząsteczka DPPC zbudowana jest ze szkieletu glicerolowego, do którego przyłączone są dwa nasycone łańcuchy kwasu palmitynowego, ortofosforan i cholina. W cząsteczce POPC jeden z łańcuchów kwasu palmitynowego zastąpiony jest nienasyconym łańcuchem kwasu oleinowego w konformacji *cis*. Dwa estry karbonylowe w obszarze międzyfazowym tych fosfocholin decydują o tym, że cząsteczki te funkcjonują jako akceptory wodorów (Berenholtz i Thompson, 1999).

DPPC i POPC są związkami aktywnymi powierzchniowo. Fosfoglicerydy te stanowią podstawowy komponent surfaktantu płucnego (Tonks i wsp., 2001; Veldhuizen i wsp., 1998). Wykazano, że DPPC zmniejsza napięcie powierzchniowe między tkanką płucną a gazami, zapobiegając tym samym zlepianiu się pęcherzyków płucnych. Za regulację napięcia powierzchniowego w płucach odpowiadają najprawdopodobniej przejścia fazowe fosfolipidów (Duncan i Larson, 2008). Wyniki eksperymentów wskazują także na udział DPPC w odpowiedzi immunologicznej organizmu (Tonks i wsp., 2001).

Drugą klasę lipidów błonowych stanowią sfingolipidy. Związki te w miejscu glicerolu obecnego w fosfolipidach posiadają sfingozyne, której grupa hydroksylowa zestryfikowana jest przez alkohol. Reszta kwasu tłuszczowego (przeważnie lignocerynowego, stearynowego, palmitynowego, lub nerwonowego (O'Brien and

Rouser, 1964)) łączy się z grupą aminową sfingozyny wiązaniem amidowym, tworząc ceramid. 18-węglowy łańcuch węglowodorowy sfingozyny posiada w swojej strukturze pomiędzy 4 a 5 węglem podwójne wiązanie o konformacji *trans* nadające cząsteczce charakter nienasycony (Merrill i wsp., 1997). Znanych jest ok. 300 rodzajów sfingolipidów (Levade i wsp., 2001). W zależności od typu wiązania grupy hydrofobowej oraz jej charakteru sfingolipidy dzieli się na kilka podklas (Landha, 2000). Najpopularniejszą z nich są zawierające cholinę sfingomieliny (Sph) (rys. I.4). Posiadają one tę samą grupę polarną co fosfocholiny, różnią się jednak od nich znacznie właściwościami fizykochemicznymi. Różnica ta wynika z odmiennej budowy części hydrofobowej oraz międzyfazowej. Sfingomieliny w swojej części międzyfazowej posiadają bowiem wolną grupę hydroksylową (przy C₃) oraz amidową (pomiędzy łańcuchem acylowym a C₂ sfingozyny). Obecność tych grup funkcjonujących jako donory i akceptory wodoru, sprawia, że Sph jest zdolna do tworzenia wiązań wodorowych. Z kolei grupa karbonylowa służy jedynie jako akceptor wodoru (Berenholtz i Thompson, 1999).

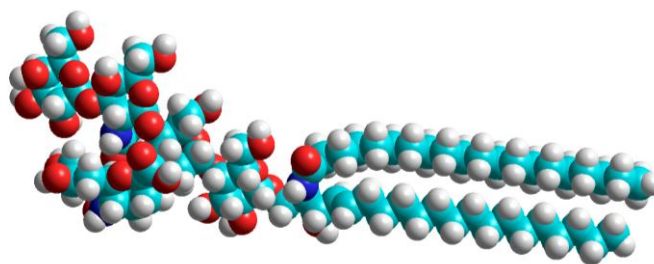


Rys. I.4. Struktura cząsteczki sfingomieliny (Sph) jaja kurzego

Sfingomieliny nazwę swą zawdzięczają tkance nerwowej, z której pierwotnie zostały wyizolowane. Pozostawia to błędne przeświadczenie o obecności tych lipidów tylko w obrębie tej tkanki. W rzeczywistości cząsteczki te występują we wszystkich tkankach ssaków, a ich zawartość w błonach komórkowych waha się w przedziale od 2% do 15 % i uwarunkowana jest typem komórki (Merrill i wsp., 1997; Slotte i Ramsted, 2007). Wyższe stężenia Sph stwierdzono w soczewkach ocznych (Deeley i wsp., 2010), erytrocytach oraz w tkance układu nerwowego, gdzie stanowią główny budulec osłonek mielinowych (Ramsted i Slotte, 2002). Obecność Sph zaobserwowano także w błonie jądrowej i mitochondrialnej. W środowisku jądrowym stanowią one główne źródło ceramidu, którego uwolnienie powoduje indukcję apoptycznych kaskad jądrowych oraz inicjuje procesy metaboliczne (Ledeen i Wu, 2006). Sph występujące w błonie

mitochondrialnej zaangażowane są w komunikację wewnątrzkomórkową wpływając tym samym na aktywację procesu zaprogramowanej śmierci komórki (Birbes i wsp., 2001).

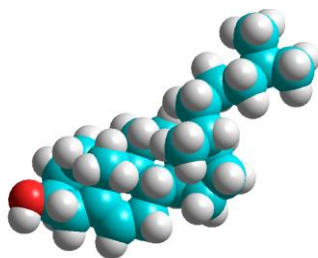
Kolejną podklasę sfingolipidów stanowią sfingoglikolipidy, których budowa również oparta jest na sfingozynie, ale zamiast ufosforylowanej grupy głowy zawierają składnik węglowodanowy w postaci jednej lub kilku reszt cukrowych. Wśród glikosfingolipidów wyróżnia się sfingoglikolipidy obojętne (galaktozyloceramidy (GalCer) - występujące w dużych ilościach w tkance nerwowej (głównie w mózgu) i glukozyloceramidy (GlcCer) - obecne w tkankach pozanerwowych), sfingoglikolipidy kwaśne zawierające sulfatydy oraz najbardziej złożone - gangliozydy (GM). Ostatnie charakteryzują się obecnością w swojej cząsteczce jednej lub kilku reszt kwasu sialowego (Murray i wsp., 2012). GM występują przeważnie w komórkach nerwowych (ok. 5-10% masy wszystkich występujących tam lipidów (Frey i wsp., 2008)). W pozostałych tkankach GM obecne są w ilościach śladowych w zewnętrznej warstwie błony komórkowej (Reed i Shipley, 1996). GM pełnią w organizmie wiele ważnych ról, m.in. uczestniczą w rozpoznaniu komórkowym, adhezji, interakcjach z białkami zewnątrzkomórkowymi. GM modulują wzrost komórkowy oraz stanowią receptory dla takich hormonów jak insulina czy integryna (Bremer i wsp., 1986; Singh i wsp.; 2000; Menke i wsp., 2002), które są markerami nowotworowymi (Battula i wsp., 2012). Gangliozyd GM₁ (rys. I.5.) - najpopularniejszy z tej grupy sfingoglikolipidów - znany jest jako receptor dla toksyn bakteryjnych, w tym toksyny cholery (Miller i wsp., 2004).



Rys. I.5 Struktura cząsteczki gangliozydu GM₁

Potwierdzono również wpływ sfingomielin i gangliozydów na uporządkowanie błony, w wyniku tworzenia wraz z cholesterolem charakterystycznych domen zwanych raftami lipidowymi, które omówione zostaną w dalszej części pracy (Simons i Ikonen, 1997).

Kolejną klasę lipidów błonowych stanowią sterole. Koronnym ich przedstawicielem w błonach biologicznych ssaków jest cholesterol (Chol). Związek ten cechuje determinująca sztywność molekuly budowa pierścieniowa. Cztery węglowodorowe pierścienie tworzą rdzeń cząsteczki, do którego z jednej strony przyłączona jest grupa hydroksylowa (stanowiąca część hydrofilową), zaś z drugiej - długolącuchowy kwas tłuszczowy (Berg i wsp., 2011; Murray i wsp., 2012) (rys. I.6).



Rys. I.1. Struktura cząsteczki cholesterolu

Cholesterol jest molekułą kluczową zarówno dla wzrostu, jak i rozwoju komórek eukariotycznych (Russel, 1992). Największa jego akumulacja występuje w zewnętrznych błonach komórkowych (Lange i wsp., 1989). Znikome ilości tego sterolu znajdują się również w błonach organelli komórkowych (m.in. ER oraz aparatu Golgi'ego (Bretscher i Munro, 1993), jak również w błonie otaczającej jądro (Albi i wsp., 1997)). Zawartość cholesterolu komórkowego w organizmie jest wynikiem równowagi pomiędzy swoistymi dla komórki mechanizmami metabolicznymi, a jego regulowaną dystrybucją. Wszelkie, nawet niewielkie odstępstwa mogą prowadzić do zmian chorobowych, w tym procesu nowotworzenia (Freeman i Solomon, 2004). Cholesterol jest prekursorem hormonów steroidowych, witaminy D i soli żółciowych (Russel, 1992). Sterol ten bierze udział w procesie adhezji (Norman i wsp., 2010). Znany jest również wpływ cholesterolu na szlaki transdukcji sygnału (Incardona i Eaton, 2000). Wyniki przedstawione w pracy Maccarone wskazują natomiast na rolę cholesterolu w procesie indukcji apoptozy w komórkach białaczki erytroblastycznej (Maccarone i wsp., 1998). Od dawna wiadomo, że cholesterol reguluje organizację i płynność błon biologicznych: wbudowując się w membranę równolegle do łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów ogranicza ich ruchy boczne i moduluje dyfuzję boczną (Mouritsen i Jørgensen, 1994; Pucadyil i Chattopadhyay, 2006). Poprzez porządkowanie organizacji biomembrany sterol ten

zmniejsza jej przepuszczalność bierną, co z kolei powoduje wzrost jej mechanicznej wytrzymałości (Carnescu i Luchian, 2005).

I.1.2.1. Metabolizm lipidów

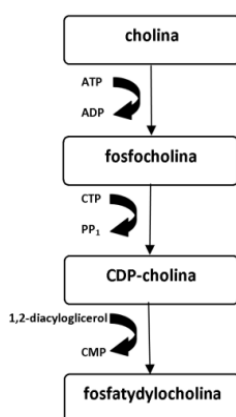
Wiele fizykochemicznych właściwości błon biologicznych uwarunkowanych jest przez skomplikowany metabolizm lipidów, na który składają się szlaki anaboliczne, prowadzące do biosyntezy tych związków, oraz szlaki kataboliczne, na drodze których lipidy są rozkładane (Sprecher 2005; van Meer i wsp., 2008). Mechanizm metaboliczny lipidów jest skompartymentyzowany - komórki posiadają pewne zdefiniowane obszary w których zachodzą poszczególne etapy syntezy i rozpadu: lipogeneza zachodzi w cytozolu i siateczce śródplazmatycznej, a proces utleniania w macierzy mitochondrialnej (Murray i wsp., 2012; van Meer i wsp., 2008).

Jednostki budujące cząsteczki fosfolipidów (kwasy tłuszczowe i glicerol) - mogą być dostarczone z zewnątrz wraz z pokarmem albo zsyntezowane w komórce (Berg i wsp., 2011). Kwasy tłuszczowe syntezowane są w cytozolu. Związek ten, będący produktem degradacji węglowodanów i białek, musi zostać przetransportowany z mitochondriów do cytozolu, gdzie obecne są specyficzne syntetazy niezbędne do procesu biosyntezy. Ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla acetylo-CoA, cząsteczka ta kondensuje ze szczawiooctanem tworząc cytrynian, który przenika do cytozolu, gdzie rozpada się na substraty podstawowe (Murray i wsp., 2012; Santos i Schulze, 2012). W komórkach ssaków wyższych, enzymy uczestniczące w syntezie zebrane są w kompleks białkowy, będący dimerem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek i zawierający ACP. Ten polipeptydowy kompleks, w skład którego wchodzi 7 aktywnych enzymów przeprowadza syntezę od początku do końca (Menendez i Lupu, 2004; Berg i wsp., 2011).

Pierwszym etapem syntezy kwasów tłuszczowych jest wytworzenie melonylo-CoA z udziałem karboksylazy Co-A (Berg i wsp., 2011; Podkowiński i Dworak, 2011). Następnie zarówno melanylo-CoA jak i acetylo-CoA zostają przekształcone w swoje APC-pochodne i ulegają kondensacji. Czynnikiem redukującym jest wodór pochodzący z NADPH (Gibbons, 2003). W przypadku kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla cząsteczką wyjściową w syntezie w miejscu melanylo-ACP jest

prioponylo-ACP (Murray i wsp., 2012). W kolejnych etapach następuje wydłużanie łańcucha, podczas którego syntaza kwasu tłuszczowego katalizuje utworzenie palmitynianu. Dalsza elongacja zachodzi już w cytozolowej warstwie błon ER. W biosyntezie kwasów nienasyconych uczestniczą dodatkowo specjalistyczne układy enzymatyczne, tzw. desaturazy, odpowiedzialne za wprowadzanie do cząsteczek wiązań podwójnych (Uttaro, 2006). Komórki ssaków są w stanie syntezować tylko kwasy tłuszczowe z wiązaniem podwójnym znajdującym się nie dalej niż przy węglu C9, pozostałe kwasy muszą więc być dostarczane do organizmu egzogennie (z pokarmem) (Berg i wsp., 2011).

Glicerofosfolipidy tworzone są z 3-fosfoglicerolu. Przed rozpoczęciem procesu syntezy zarówno glicerol jak i kwasy tłuszczowe muszą zostać aktywowane przez ATP. Kwasy tłuszczowe aktywowane są do acylo-CoA przez syntetazy acylo-CoA, natomiast glicerol aktywowany jest przez kinazę glicerolową do sn-3-glicerofosforanu (Murray i wsp., 2012; Bonet i wsp., 2012). Dwie cząsteczki acylo-CoA wiążą się z glicero-3-fosforanem dając fosfatydan. Związek ten jest punktem wyjścia do syntezy PI. Fosfatydan pod wpływem fosfohydrolazy fosfatydanowej może zostać przekształcony do 1,2-diacyloglicerolu. Cząsteczka ta służy z kolei jako baza wyjściowa do syntezy PC i PE (Murray i wsp., 2012). Przed połączeniem pochodzących głównie z diety cholicy i etanoloaminy z 1,2-diacyloglicerolem, dochodzi do ich aktywacji. W pierwszej kolejności następuje fosforylacja cząsteczek alkoholi z ATP, a następnie połączenie z cytydynotrifosforanem (CTP). W formach CTP cząsteczki zostają przeniesione na 1,2-diacyloglicerol (Wong i wsp., 2000, Murray i wsp., 2012). Końcowy etap syntezy może zachodzić zarówno w ER jak i w aparacie Golgi'ego (van Meer i wsp., 2008). PS powstaje z kolei na drodze wymiany etanoloaminy z seryną w cząsteczce PE (Murray i wsp., 2012). Poszczególne szlaki syntezy PC przedstawia rys. I.7.



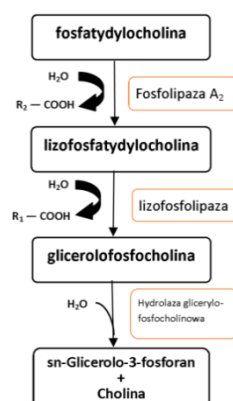
Rys. I.2. Synteza fosfatydylocholiny

Bazą dla sfingolipidów jest ceramid (Cer) tworzony w siateczce śródplazmatycznej na drodze syntezy CoA-pochodnych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ze sfingozyną (Gault i wsp., 2010). Sph powstaje w wyniku podstawienia końcowej grupy hydroksylowej Cer przez fosfocholinę, pochodzącą z PC. Proces ten zachodzi w aparacie Golgi'ego, skąd Sph transportowana jest do błony plazmatycznej (van Meer i wsp., 2008). W aparacie Golgi'ego zachodzi również proces syntezy gangliozydów. Powstają one przez dodawanie do ceramidu zaktywowanych reszt cukrowych oraz kwasu sialowego (N-acetylneuraminianu bądź N-glikolilomeuraminianu) (Gault i wsp., 2010, Murray i wsp., 2012).

Cholesterol może być przyjmowany z dietą, albo syntezowany w komórkach (głównie wątroby) (Russel, 1992). Sterol ten całościowo tworzony jest z acetylo-CoA (Murray i wsp., 2012). Pierwszym i kluczowym etapem biosyntezy cholesterolu jest synteza mewalonianu, który następnie przekształcany jest w pirofosforan izopentanylu. Ten z kolei kondensuje ze swoim izomerem tworząc pirofosforan geranylu. W wyniku kondensacji tej cząsteczki z cząsteczką pirofosforanu izopentanylu tworzy się piętnastowęglowy pirofosforan fernezyli. Związek ten łączy się z drugą identyczną cząsteczką dając skwalen, który ulega następnie procesowi cyklizacji z udziałem tlenu molekularnego, w wyniku czego powstaje lanosterol. Ostatni etap biosyntezy cholesterolu opiera się na modyfikacji zarówno pierścienia steroidowego jak i łańcucha bocznego cząsteczki lanosterolu, w konsekwencji czego tworzy się cząsteczka cholesterolu (Murray i wsp., 2012; Russel, 1992; Freeman i Solomon, 2004). Powyższa synteza zachodzi w ER i jest kontrolowana przez regulację reduktazy HMG-CoA, której

aktywność zależy od ilości cholesterolu dostarczonego z zewnątrz wraz z pokarmem (Murray i wsp., 2012).

Katabolizm lipidów nie jest procesem odwrotnym do ich syntezy (Berg i wsp., 2011). Każda podjednostka cząsteczek glicerofosfolipidów i sfingolipidów na skutek obecności różnych enzymów ulega degradacji z inną szybkością (Murray i wsp., 2012). Podstawowym produktem katabolizmu sfingolipidów jest pochodząca z rozkładu ceramidów sfingozyna (Morel i Braun, 1976). Rozkład gangliozydów zachodzi wewnątrz lizosomów na drodze systematycznego odcinania reszt cukrowych (Wilkening i wsp., 2000; Schultze i wsp., 2008). Z kolei cholesterol w wątrobie przekształcany jest w cholilo-CoA, który następnie reaguje z glicyną lub tauryną dając kwasy żółciowe. W tej postaci jest on wydalany z organizmu (Murray i wsp., 2001; Russel 1992). Rozkład fosfolipidów katalizowany jest przez enzymy z grupy hydrolaz – fosfolipazy. Ich zadaniem jest degradacja fosfolipidów do ich składników podstawowych tj. kwasów tłuszczowych i glicerolu. Na rys. I.8. przedstawiono rozpad PC. Wśród fosfolipaz - przy pomocy których PC ulegają enzymatycznej hydrolizie -rozdziela się acylohydrolazy (fosfolipazy) A_1 i A_2 , których zadaniem jest hydroliza wiązań estrowych (odpowiednio sn-1 i sn-2), fosfolipazę B katalizującą proces hydrolizy grup acylowych, fosfolipazę C rozkładającą wiązanie estrowe w pozycji 3 oraz fosfolipazę D odpowiadającą za uwolnienie PA i cholina. Działanie fosfolipazy A_2 powoduje wytworzenie wolnego kwasu tłuszczowego i lizofosfolipidu (He i Li, 2007; Murray i wsp., 2012).



Rys. I.3. Rozpad fosfatydylocholiny

Uwolniony w wyniku działania lipaz glicerol ulega procesowi fosforylacji i utlenienia do fosforanu dihydroksyacetonu i w dalszej kolejności na drodze izomeryzacji przekształcany jest w aldehyd 3-fosfoglicerynowy. W takiej postaci wchodzi na szlak przemian glikolizy i cyklu pentozowego (Murray i wsp., 2012).

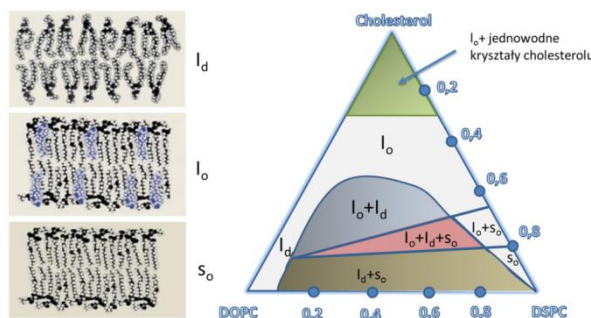
Przed rozpoczęciem właściwych mechanizmów katabolicznych wolne kwasy tłuszczowe muszą w obecności ATP ulec aktywacji (Berg i wsp., 2001). Proces ten zachodzi na zewnętrznej błonie mitochondrialnej (van Meer i wsp., 2008). Przemianę kwasu tłuszczowego do acylo-CoA katalizuje tiokinaza (syntetaza acylo-CoA). Zarówno acylo-CoA jak i kwasy tłuszczowe zawierające w swoich łańcuchach ponad 10 atomów węgla nie mogą przenikać przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Przekształcają się one w acylokarnitynę, która z udziałem nośników przenika do macierzy mitochondrialnej, gdzie uwalniana jest karnityna. Procesowi temu towarzyszy przeniesienie grupy acylowej z powrotem na Co-A. Proces β -oksydacji, zachodzący w obecności specjalistycznego układu enzymów β -oksydacji (w skład którego wchodzi 8 różnych enzymów) polega na porządkowym odczepianiu reszt dwuwęglowych w postaci acetylo-CoA od łańcuchów kwasów tłuszczowych, począwszy od końca karbonylowego. Każdy cykl odczepienia reszty dwuwęglowej przebiega w 4 etapach (utlenienie, uwodnienie, utlenienie, tioliza), dając w ostatnim cyklu dwie cząsteczki acetylo-CoA. W każdym etapie cyklu utleniania uczestniczy pochodna acylo-CoA, a każdy krok jest katalizowany przez inne enzymy wykorzystujące NAD^+ i FAD, efektem czego jest powstanie ATP (Eaton i wsp. 1996; Bartlett i Eaton, 2004; Berg i wsp., 2001, Murray i wsp., 2012). Całkowite utlenienie palmitynianu prowadzi do wytworzenia 108 cząsteczek ATP, z czego 2 cząsteczki zużywane są w procesie wspomnianej aktywacji kwasu tłuszczowego (Berg i wsp., 2001). W przypadku kwasów tłuszczowych posiadających nieparzystą liczbę atomów węgla produktem końcowym ostatniego cyklu β -oksydacji obok acetylo-CoA jest propionylo-CoA, który przekształcany jest w bursztynylo-CoA (Murray i wsp., 2012). Aby utlenić kwasy zawierające wiązania nienasycone dodatkowo wymagana jest obecność dwóch enzymów: izomerazy i reduktazy (Leyton i wsp., van Weeghel i wsp., 2012). W kolejnych etapach reszta acetylowa ulega dalszemu utlenieniu, natomiast koenzym - redukcji w cyklu kwasu cytrynowego, będącego końcowym szlakiem metabolizmu lipidów (Murray i wsp., 2012). Jeśli ilość cząsteczek acetylo-CoA przewyższa ilość cząsteczek potrzebnych w

cyklu kwasu cytrynowego - co ma miejsce w warunkach głodu lub cukrzycy - są one w procesie ketogenezy przekształcane w tzw. ciała ketonowe (acetoctan, aceton i D-3-hydroksymaślan) (Murray i wsp., 2012; Cotter i wsp., 2011).

Zaburzenie metabolizmu lipidów obserwowane jest przy wielu zmianach patologicznych. Nieprawidłowości w syntezie i utlenianiu kwasów tłuszczowych mogą prowadzić do niedocukrzenia, hipoketonemii, chorób związanych z niewydolnością układu oddechowego, jak również do stwardnienia rozsianego i chorób z grupy sfingolipidoz. Zbyt duże stężenie cholesterolu kojarzone jest z kolei z powstawaniem zmian miażdżycowych (Savage i wsp. 2008; Murray i wsp., 2012).

I.1.2.2. Wpływ lipidów na uporządkowanie błony

Właściwości fizykochemiczne błon biologicznych w dużej mierze zdeterminowane są przez właściwości budujących je lipidów. (Feigenson ,2007; Eeman i Deleu, 2010). Lipidy błonowe w temperaturze fizjologicznej mogą występować w jednym z kilku stanów fizycznych, opisanych zwyczajowo przez współczynnik uporządkowania łańcucha alkilowego (S), oraz przez współczynnik dyfuzji (D).



Rys. I.4. a) Główne fazy błony biologicznej b) Diagram fazowy otrzymany dla układu DOPC/Chol/DSPC

Liczne eksperymenty oraz modelowanie molekularne wskazują, że błony biologiczne najczęściej występują w stanie ciekłokrystalicznym l_d (charakteryzującym się niską wartością S oraz szybkim współczynnikiem dyfuzji rzędu $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$), stanie żelowym s_o (o wysokiej wartości S oraz niskiej wartości D (ok. $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$)) oraz stanie cieczy uporządkowanej l_o (wysoka wartość S oraz wysoka wartość D (ok. $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$)) (van Meer i wsp., 2008) (rys. I.9 a). Typ fazy zależy ściśle od struktury lipidów oraz ich wzajemnych proporcji. Udowodniono, że obecność steroli zwiększa uporządkowanie

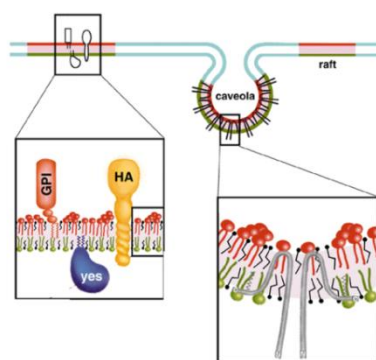
struktury (Eeman i Deleu, 2010). Rys. I. 9 b prezentuje wzorcowy diagram fazowy otrzymany dla mieszaniny trzech lipidów: cholesterolu, DOPC i DSPC.

Na zachowanie się lipidów w dwuwarstwie lipidowej wpływa również rodzaj polarnej głowy. Fosfolipidy o małych grupach polarnych (takie jak PA) tworzą fazy bardziej uporządkowane, natomiast fosfolipidy charakteryzujące się dużymi grupami polarnymi (np. PC), umożliwiającymi boczne ruchy i wyginanie łańcuchów węglowodorowych preferują tworzenie bardziej płynnych struktur. Przejścia fazowe pomiędzy kolejnymi stanami fizycznymi błony zachodzą przy pewnej określonej dla każdego typu lipidów temperaturze, zwanej temperaturą przejścia fazowego (T_m), którą można określić przy zastosowaniu metod kalorymetrii skaningowej. Charakter faz zależy również od siły jonowej i pH środowiska, w którym znajdują się lipidy (Murray i wsp., 2012, Eeman i Deleu, 2010).

I.1.3. Tratwy (rafty) lipidowe

Pierwotnie w modelu płynnej mozaiki zakładano, że błona biologiczna jest homogeniczną mieszaniną lipidów i białek, a jej składniki mogą się swobodnie przemieszczać w obrębie każdej z warstw (Singel i Nicolson, 1972). Badania przeprowadzone w oparciu o uporządkowanie konformacyjne lipidów oraz różnice w ich krótkozasięgowej translacji wykazały jednak, że w błonie biologicznej występują pewne zorganizowane pod względem strukturalnym i funkcjonalnym przestrzenie, które nazwano tratwami (raftami) lipidowymi (Simons i Ikonen, 1997; Simons i Gerl, 2010). Zbudowane są one z powiązanych bocznie sfingolipidów (głównie sfingomielin i glikosfingolipidów) o przewadze prostych łańcuchów węglowodorowych, a wszelkie wolne przestrzenie pomiędzy cząsteczkami wypełnia cholesterol (Simons i Ikonen, 1997; Simons i Toomre, 2000). Silne oddziaływania pomiędzy molekułami budującymi tratwy czynią je strukturami ściśle upakowanymi. Współcześnie przyjmuje się, że błony są strukturami heterogenicznymi, złożonymi z dwóch faz: tzw. „fazy cieczy uporządkowanej” (l_o), na którą składają się owe sfingolipidowo-cholesterolowe mikroregiony oraz z „fazy cieczy nieuporządkowanej” (l_d) utworzonej głównie przez glicerofosfolipidy posiadające zarówno nasycone, jak i nienasycone łańcuchy węglowodorowe (Brown and London, 1998).

Tratwy lipidowe są strukturami niezwykle dynamicznymi z czasem życia od 10^{-2} (Kusumi i wsp., 2004) do 10^3 sekundy (Pralle i wsp., 2000). Rozmiar pojedynczej domeny waha się w przedziale od 10 do 200 nm (Pike, 2006). Małe tratwy mogą łączyć się tworząc duże skupiska o średnicy przewyższającej setki nm (Schroeder i wsp., 2007). Tratwy lipidowe mogą wiązać wybrane białka, a mechanizmy i miejsce ich wiązania zależą przeważnie od rodzaju tych cząsteczek, np. GPI-zakotwiczone proteiny akumulują się do zewnętrznej warstwy biomembrany, natomiast podwójnie acylowane tyrazynowe kinazy z rodziny Src przyłączane są do cytoplazmatycznej warstwy błony (Simons i Ikonen, 1997). Obydwa procesy zachodzą na skutek modyfikacji lipidów błonowych. W tratwach lipidowych potwierdzono też obecność białek transmembranowych, dzielących domeny na podobszary. Białka te często wiążą się z tratwami na krótki okres, przez większość czasu pozostając poza ich obszarem (Simons i Toomre, 2000). Jedną z podgrup raft lipidowych stanowią kaweole, po raz pierwszy scharakteryzowane już w latach 50-tych XIX wieku. Powstają one bezpośrednio z raft lipidowych przez polimeryzację kaweoliny - integralnego białka wiążącego cholesterol. Kaweole charakteryzuje wklęsło-wypukły kształt. Ich występowanie zależy od rodzaju danej komórki (rys. I.10). Przykładowo, w błonie neuronów w ogólnie nie stwierdzono formowania się tych struktur (Brown and London, 1998; Razani i wsp. 2002).



Rys. I.5 Model organizacji tratw lipidowych i kaweoli w błonie biologicznej
(Simons i Ikonen, 1997)

Historycznie tratwy lipidowe zostały zidentyfikowane jako struktury o niskiej gęstości i nierozpuszczalności w niejonowym detergencie jakim jest 1% Tryton X-100 w temperaturze 4°C (Simons i Ikonen, 1997). Tradycyjny sposób uzyskiwania tych domen opiera się na scrappingu komórek do zimnego Trytonu X-100, a następnie homogenizacji lizatu. Ponieważ silne oddziaływania pomiędzy składnikami tratw utrudniają działanie

rozpuszczalnika, procedura ta pozwala na wyizolowanie ich z glicerofosfolipidowego otoczenia. Uzyskane w ten sposób frakcje błonowe zawierające poza sfingolipidami i cholesterolem również białka nazwane zostały błonami odpornymi na detergenty (DRMs - detergent-resistant membranes) bądź nierozpuszczalnymi w detergentach błonami bogatymi w glikolipidy (DIGs - ang. *detergent-insoluble, glycosphingolipids-enriched membranes*) (Pike, 2003). Najpoważniejszym problemem związanym z ekstrakcją Trytonem X-100 jest nieznana wewnątrzkomórkowa lokalizacja DRMs (Simons i Ikonen, 1997). Obecnie poza 1% Trytonem X-100 do izolacji raft z otoczenia stosuje się inne detergenty (np. NP-40, Lubrol), jak również preparatykę wolną od detergentów (m.in. liza całych komórek w buforze węglanu sodu lub izotonicznym buforze sacharozy) (Pike, 2003). Współcześnie istnieje jeszcze kilka innych metod pozwalających na identyfikację raft lipidowych, m.in. techniki wykorzystujące mikroskopię immunocytochemiczną (Harder i wsp., 1998, Janes i wsp. 1999).

Różne techniki pozyskiwania tratw prowadzą do uzyskiwania frakcji różniących się składem. Frakcje uzyskane bez użycia detergentów wykazują w porównaniu do DRMs większą zawartość glicerofosfolipidów. Badania przeprowadzone przez Pike pokazują, że niedetergentowe tratwy posiadają taki sam procent lipidów (40%) o wiązaniach nasyconych (lub jednym nienasyconym) jak lipidy z całej objętości błony, natomiast w przypadku DRMs ilość ta wynosi w przybliżeniu 60%. Co ciekawe, badania na tratwach lipidowych pozyskanych bezdetergentowo z komórek linii KB pokazały, że są one wzbogacone w fosfolipidy anionowe, PE oraz plazmalogeny etanoloaminy zawierające reszty kwasu arachidonowego. Związków tych, charakterystycznych dla cytoplazmatycznej strony błony nie obserwuje się natomiast w DRMs. Według Pike'a znalezienie w tratwach wyraźnej reprezentacji lipidów wewnętrznej warstwy membrany świadczyć może o biwarstwowym charakterze raft. Różnice w składzie poszczególnych frakcji sugerują bowiem, iż traktowanie błon biologicznych detergentem, może powodować selektywne wyodrębnianie warstwy zewnętrznej (Pike, 2003).

Tratwy lipidowe powstają w aparacie Golgi'ego, gdzie syntezowane są sfingolipidy i gdzie trafia syntezowany wcześniej w ER cholesterol. Stamtąd transportowane są do błony komórkowej, skąd mogą ulegać endocytozie (Simons i Toomre, 2000). Biofizyczne mechanizmy, dzięki którym komórki regulują rozmiar, trwałość i przestrzenną lokalizację tych domen są słabo poznane. Istnieje kilka modeli

opisujących te zjawiska. Według Yethireja i Weisshaara wielkość oraz przestrzenne usytuowanie tratw determinowane jest przez białka (Yethirej i Weisshaar, 2007). Inny model opiera się na założeniu, że dystrybucja i dynamika tratw kontrolowana jest przez przestrzenne zróżnicowanie cholesterolu i oddziaływania lipid - lipid (Gómez i wsp., 2008).

Tratwy lipidowe, stanowiące domeny sfingolipidowo-cholesterolowe uczestniczą w wielu ważnych procesach komórkowych. Potwierdzono ich udział w sortowaniu białek (Simons i Ikonen, 1997) oraz transporcie membranowym, m.in. białek zsyntezowanych w sieci trans aparatu Golgi'ego do błony biologicznej (Hanzal-Bayer i Hancock, 2007; Surma i wsp., 2012). Jedną z lepiej opisanych funkcji tratw lipidowych, związanych z obecnością w nich różnych typów białek jest udział w transdukcji sygnału. Według Simons'a i Toomre'a tratwy stanowią dla danych receptorów specyficzne platformy, a aktywacja następuje na drodze wiązania ligandu. Aby połączenie receptor/ligand miało miejsce niekiedy potrzebna jest oligomeryzacja receptorów. Aktywacja może nastąpić również w wyniku krzyżowego oddziaływania białek związanych z różnymi tratwami. Wiąże się to dodatkowo ze wzmocnieniem sygnału. Przykładami receptorów biorących udział w transdukcji sygnału i powiązanych z tratwami lipidowymi są receptory T-komórek, czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF) i białko $Fc\epsilon RI$. Ostatni z wymienionych receptorów powoduje redystrybucję składników tratw, głównie gangliozydów, a jego łączenie się z immunoglobuliną E (IgE) skorelowane jest z ilością cholesterolu błonowego i powoduje uaktywnienie procesów immunologicznej odpowiedzi komórki (Simons i Toomre, 2000).

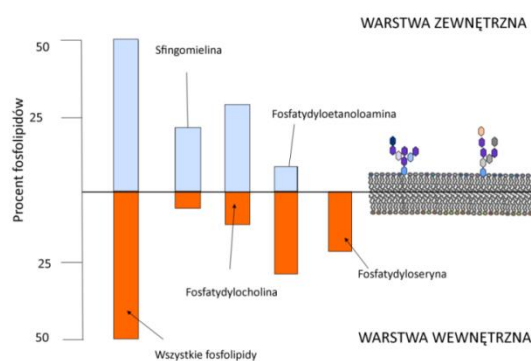
Według Pike'a tratwy odgrywają zarówno pozytywną jak i negatywną rolę w procesie przekazywania sygnałów. Łącząc się w większe skupiska, umożliwiają mieszanie komponentów poszczególnych tratw, zwiększając prawdopodobieństwo aktywacji szlaku transdukcji sygnału. Z drugiej jednak strony mają zdolność do przestrzennej segregacji oddziaływań składników i blokowania danych receptorów (Pike, 2003). Kolejną ważną funkcją tratw lipidowych jest udział w aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki przez zewnętrzny (receptorowy) szlak apoptyczny (Mollinedo i Gajate, 2006). Przekazanie sygnału następuje przez związanie się zakotwiczonego w raftach receptora śmierci Fas (którym może być białko CD95) z Fas ligandem (FasL). Ekspresja sfingomieliny obecnej w tratwach lipidowych sprzyja

tworzeniu się DISC, aktywacji kaspaz, wydajnemu łączeniu się Fas z trawami oraz ich wzajemnemu grupowaniu (Miyaji i wsp., 2005). Selektywna reorganizacja traw lipidowych, prowadząca do przemieszczania się wielu kluczowych w procesie apoptozy białek czyni z traw swoistych „kontrolerów śmierci”. Liczne badania wskazują na to, że ceramidy i sfingomielinazy wzmacniają sygnał na poziomie błony. Warunkiem niezbędnym okazuje się wzajemne połączenie Fas/FasL (Garcia i wsp., 2003; Mollinedo i Gajate, 2006).

Domeny lipidowe mogą też stanowić swego rodzaju komórkowe „wejścia” i „wyjścia” dla chorobotwórczych drobnoustrojów i toksyn, takich jak wirus grypy, odry czy toksyny cholery (CT) (Simons i Ehehalt, 2002). Wiele rodzajów patogenów rozwinęło zdolność angażowania traw lipidowych do przejęcia kontroli nad komórkami gospodarza i propagacji zmian chorobowych. Wirus HIV wchodzi do komórek nabłonkowych właśnie przez rafty lipidowe, na drodze endocytozy i transcytozy, natomiast możliwe wyjście wirusa następuje przez proces selektywnego pączkowania (Carter i wsp., 2009). CT wnika do komórek gospodarza przez związanie receptora zlokalizowanego w trawach, a proces ten do internalizacji wymaga obecności cholesterolu. Wykorzystanie filipin, wiążących cholesterol blokuje wejście wirusa (Orlandi i Fishman, 1998). Receptorem dla CT według Wolfa, może być związany w trawach gangliozyd GM₁ (Wolf i wsp., 2002). Rafty stanowią też ważne ogniowo na różnych etapach cyklu replikacji wirusów w komórkach gospodarza (Ono i Freed, 2005).

I.1.4. Asymetria lipidowa błon komórkowych

Cechą charakterystyczną błon biologicznych jest ich asymetria strukturalna i funkcjonalna. Zróznicowanie przestrzenne dotyczy zarówno lipidów, białek jak i węglowodanów (Berg i wsp., 2011). W błonie retikulum endoplazmatycznego fosfolipidy rozłożone są symetrycznie, podczas gdy dla pozostałych błon biologicznych (aparatu Golgiego, plazmatycznych i endosomalnych) typowa jest asymetryczna dystrybucja tych związków (van Meer i wsp., 2008). Najwyraźniej asymetria rysuje się w komórkach erytrocytów (Devaux i Zachowski, 1993). Rys. I.11. przedstawia schemat odpowiadający zewnętrznej i wewnętrznej dystrybucji lipidów w błonie komórkowej erytrocytów człowieka.



Rys. I.6. Asymetria fosfolipidów w błonie erytrocytów

W błonie plazmatycznej komórek eukariotycznych aminofosfolipidy - takie jak PS i PE - występują głównie po stronie cytozolowej dwuwarstwy, natomiast PC oraz Sph zlokalizowane są w warstwie zewnętrznej biomembrany. W synaptycznych błonach komórkowych nie stwierdzono w ogóle obecności Sph po ich wewnętrznej stronie (Wood i wsp., 2011). Mniejsze lipidy (PI oraz PA) tworzą przeważnie warstwę wewnętrzną, natomiast wszystkie lipidy z przyłączonymi resztami cukrowymi umiejscowione są zawsze po niecytozolowej stronie błony. Podział ten jest charakterystyczny dla wszystkich komórek eukariotycznych, zmieniają się tylko ich wzajemne proporcje (Devaux i Zachowski, 1993).

Asymetria fosfolipidów jest dla wielu rodzajów błon komórkowych jednoznacznie opisana, natomiast wyniki dotyczące rozmieszczenia cholesterolu są sprzeczne. Wczesne dane uzyskane dla erytrocytów wskazywały na większą zawartość cholesterolu w zewnętrznej warstwie błony (Fischer, 1976). Niektórzy autorzy postulują natomiast równomierne rozmieszczenie tego sterolu pomiędzy dwie warstwy błony komórkowej (Blau i Bittmann 1978; Müller i Herrmann 2002), inni sugerują jego przewagę (ok. 78%) po wewnętrznej stronie błony (Schroeder i wsp., 1991). Ostatnie dane otrzymane przy pomocy metod fluorescencyjnych dla komórek linii CHO potwierdzają, że 60-70% steroli zgromadzonych jest w warstwie cytozolowej (Mondal i wsp., 2009). Trudność z określeniem dystrybucji cholesterolu wynika z krótkiego czasu przeskoku cząsteczki sterolu pomiędzy warstwami błony (górna granica stałej czasowej dla tego ruchu wynosi w temperaturze 37°C około 1 sekundę (Steck i wsp., 2002)).

Asymetrię lipidów warunkują pierwotnie procesy zachodzące na szlaku ich biosyntezy, a za jej utrzymanie odpowiada wiele czynników, do których zalicza się

biofizyczne właściwości cząsteczek, determinujące ich zdolność do przekraczania dwuwarstwy w sposób spontaniczny, mechanizmy retencyjne odpowiadające za pułapkowanie lipidów w jednej z dwóch warstw oraz obecność licznych transporterów wspierających translokację lipidów tzw. flipaz i flopaz (van Meer i wsp., 2008). Flipazy są przekaźnikami przenoszącymi lipidy na warstwę wewnętrzną, flopazy - w kierunku przeciwnym (Daleke, 2007). Dla sfingomielin i glikosfingolipidów asymetria w błonie aparatu Golgi'ego jest uzyskiwana poprzez wprowadzenie lipidów tylko do jednej warstwy biomembrany i utrzymywanie ich stałego poziomu w obrębie tej warstwy (van Meer i wsp., 2008).

Asymetryczne rozmieszczenie lipidów ma ważne konsekwencje funkcjonalne. Jedną z nich jest różna płynność poszczególnych warstw biomembrany. Warstwy zawierające więcej steroli utrzymują większą sztywność. Duże ilości cholesterolu w cytozolowej warstwie, mogą również odpowiadać za powstawanie w jej obrębie uporządkowanych struktur składających się z cholesterolu i PC, odpowiadających cholesterolowo-sfingomielinowym domenom w zewnętrznej warstwie (Mondal i wsp., 2009). Transmembranowe rozmieszczenie lipidów przyczynia się również do różnicy wypadkowego ładunku obydwu warstw. PS oraz PI generują ujemny ładunek cytozolowej warstwy błon biologicznych, podczas gdy zewnętrzna strona biomembrany ma przeważnie charakter obojętny bądź zwitterjonowy. Separacja ładunku spowodowana asymetrią dystrybucji fosfolipidów została zastosowana do wytłumaczenia mechanizmu działania niektórych kationowych i anionowych leków posiadających mechanizm działania na poziomie błonowym (Scheetz i Singer, 1976; Sweet i wsp., 1987).

Utrzymanie asymetryczności błony jest bardzo istotne dla wielu procesów komórkowych (Ikeda i wsp., 2006). Najwyraźniejszym efektem załamania się asymetrii lipidów jest przemieszczenie PS na powierzchnię komórki. Wyeksponowanie PS na zewnątrz błony, prowadzi do zwiększenia przyczepności komórek, aktywacji procesów krzepnięcia i późniejszego tworzenia trombiny (Bever i Williamson, 2010). Eksternalizacja PS obserwowana jest w procesie zaprogramowanej śmierci komórki. Przemieszczenie się tego glicerofosfolipidu na powierzchnię komórki stanowi dla makrofagów sygnał do usunięcia apoptycznej komórki na drodze fagocytozy. Proces ten zachodzi często zanim uwidoczną się jakiekolwiek inne zmiany morfologiczne

związane ze śmiercią komórki (Schlegel i Williamson, 2001). Choć z jednej strony powyższe procesy są niezbędne do prawidłowego rozwoju komórki i zachodzić mogą także w warunkach normalnych, to nieregulowana utrata asymetrii PS przyczynia się do zmian w funkcjonowaniu komórek i obserwowana jest przy wielu zmianach patologicznych, takich jak choroby układu krążenia (np. zakrzepica), udar mózgu oraz cukrzyca (Daleke, 2003). Wymuszona zmiana położenia lipidów przekłada się także na zmiany w funkcjonowaniu wielu białek enzymatycznych związanych z lipidami, powodując zaburzenia m.in. w transdukcji sygnału (Verkleji i Post, 2000).

I.1.5. Różnice w składzie błon komórek zdrowych i nowotworowych

Szereg przeprowadzonych badań wskazuje na istnienie znaczącej korelacji pomiędzy płynnością błony a stopniem zmian nowotworowych komórki (Inbar, 1976; Kojima, 1993; Sok i wsp., 1999). Już w latach 70-tych XX wieku zależności te stały się przedmiotem uwagi szeregu grup badawczych. Pomiary mikroskopowej lepkości błon biologicznych komórek białaczki przeprowadzone przez Inbar'a i Shinitzky'ego pokazały, że lepkość zdrowych leukocytów jest dwa razy większa od lepkości błon komórek nowotworowych (Inbar i Shinitzky, 1974). Jako, że lepkość powiązana jest odwrotnie proporcjonalnie z płynnością, wysunięto wniosek, że błony komórek zmienionych nowotworowo są bardziej płynne niż ich zdrowe odpowiedniki. Po zestawieniu tych danych z analizą składu lipidowego błon biologicznych, mniejszą lepkość błon komórek patologicznych przypisano niższemu stosunkowi cholesterolu do fosfolipidów (Chol:PL), wynikającemu ze spadku zawartości sterolu w błonach komórek zmienionych nowotworowo. Przykładowo, dla błony biologicznej zdrowych leukocytów stosunek ten wynosi 0,6-0,7, podczas gdy w przypadku ostrej białaczki spada do wartości 0,25 (Tsuchiya i wsp., 2002). Kolejne badania pokazały, że zależność ta nie jest ograniczona tylko do komórek leukocytów, ale przekłada się na inne nowotwory (Sok i wsp., 1999; Nakazawa i wsp., 1989; Rybczyńska i wsp., 2001; Berra i wsp. 1994; Kojima 1993). Część autorów donosi jednak, że dla pojedynczych przypadków (m.in. dla niektórych nowotworów złośliwych mózgu) płynność błon komórek patologicznych jest wyższa niż dla zdrowych (Šentjurs i wsp., 1990). Wartość stosunku Chol:PL różni się w zależności od typu nowotworu i jest tym wyższa im większa jest złośliwość. Badania przeprowadzone przez Schroeder'a i wsp. pokazują, że błony komórkowe wyizolowane

z komórek przerzutowych mają dużo niższy stosunek cholesterolu do fosfolipidów niż błony pochodzące z komórek guza pierwotnego. Autor sugeruje, że zależność ta powiązana dodatkowo z obecnością białek transportujących cholesterol świadczy o niskiej zdolności przerzutowej komórek (Schroeder i wsp., 1991). Obniżony poziom cholesterolu może wynikać zarówno z wad genetycznych związanych z zaburzeniem biosyntezy tego sterolu, ze zwiększonej jego konsumpcji w trakcie podziałów komórkowych, jak również z zaburzeń transportu (Sok i wsp., 1999; Inbar i Shinitzky, 1974). Burstain i Fine dowiedli, że u pacjentów ze zdiagnozowaną białaczką spada o 50% poziom β -lipoprotein, które odpowiadają za większość procesów związanych z wymianą cholesterolu między surowicą a krwinkami (Burstain i Fine, 1959). Warto zaznaczyć, że niektóre linie komórkowe raka prostaty i piersi, wykazują zwiększoną zawartość cholesterolu w porównaniu do komórek niepatologicznych (Freeman i Solomon, 2004, Riedl i wsp., 2011).

Kolejnym lipidem modulującym płynność błony jest sfingomielina. Podobnie jak cholesterol powoduje wzrost lepkości błony. Wyniki zaprezentowane przez Gottfrieda dowodzą, że błony nowotworowe są ubogie w ten składnik (Gottfried, 1967). Analiza składu kwasów tłuszczowych pokazała, że nie tylko wartość współczynnika Chol:PL, ale również stopień nienasylenia łańcuchów acylowych wpływa na płynność błony (Szachowicz-Petelska i wsp., 2010, Tsuchiya i wsp., 2002). W swojej pracy Kojima sugeruje, że wzrost ilości fosfolipidów o nienasyconych łańcuchach węglowodorowych odpowiada za zwiększenie płynności błony, niezależnie od zawartości cholesterolu. Autor pokazuje, że w komórkach raka wątrobowokomórkowego obserwuje się wzrost zawartości kwasów tłuszczowych o nienasyconych wiązaniach oraz spadek ilości kwasów nasyconych. Stosunek molowy kwasów tłuszczowych 18:1 do 18:0 jest trzy razy wyższy w komórkach tego raka i dwa razy wyższy w komórkach guzków rozrostowych niż w komórkach zdrowej wątroby. Ponieważ podwyższone stosunki molowe 18:1 do 18:0 stwierdzono eksperymentalnie w innych komórkach nowotworowych, sugeruje się, że może to być jeden z komórkowych wskaźników transformacji nowotworowej (Kojima, 1993). Z kolei Tsuchiya pokazuje, że pojedyncze wiązanie *cis* wprowadzone do łańcucha nasyconego indukuje zwiększenie fluidyzacji błony, podczas gdy wprowadzenie kolejnych wiązań jest już mniej efektywne (Tsuchiya i wsp., 2002). Analiza chromatograficzna przeprowadzona dla komórek nowotworu wątroby pokazała

także wzrost ilości kwasów tłuszczowych o łańcuchach krótszych niż 18 węgli oraz spadek ilości kwasów długołańcuchowych (zawierających ponad 20 atomów węgla) w porównaniu do zdrowych komórek (Kojima, 1993). Postuluje się, że w proces utrzymania płynności błony na danym poziomie zaangażowane są specjalne enzymy estyfikujące kwasy tłuszczowe (Sok i wsp., 1999). Podczas procesu nowotworzenia zmiana ulega również stosunek lipidów cholinowych do aminowych. W większości przypadków obserwuje się wzrost ilości lipidów cholinowych i spadek zawartości lipidów etanoloaminowych (Slagel i wsp., 1967). Wynikać to może z opisanego w poprzednim podrozdziale zaburzenia asymetrii lipidów. Transformacja nowotworowa wiąże się również ze zmianą wzorca gangliozydów w błonach komórkowych. Duże części polarne tych związków wpływają stabilizująco na błony biologiczne i nawet w niewielkich ilościach obniżają znacząco płynność biomembrany (Sonnino i wsp., 2007). Zarówno w liniach komórkowych jak i tkankach nowotworowych zaobserwowano zależną od rodzaju nowotworu i stopnia jego progresji nadekspresję tych związków. Zmiany zależą od rodzaju gangliozydu, a akumulacja specyficznych glikolipidów może być dobrym markerem niektórych nowotworów (Kaucic i wsp., 2001). Przykładowo cząsteczki GD₂ oznaczono w komórkach nerwiaka, podczas gdy w zdrowych tkankach związek ten nie został odnotowany (Wu i wsp., 1986). W przypadku oponomięsaka – złośliwego guza mózgu stężenie ganglizydów GM₁ wzrasta aż 3,6 razy, a GD₃ – 1,6 razy w stosunku do odmiany łagodnej nowotworu (Berra i wsp., 1994). Zmienny skład gangliozydów, może w być również powiązany z aktywnością leków antynowotworowych (Hąc – Wydro Dynarowicz-Łątka, 2010). W przypadku analizy płynności błony biologicznej nie można pominąć wpływu otoczenia zmiany nowotworowej. O ile czynnik ten jest wyeliminowany w przypadku badań komórek pochodzących z hodowli, odgrywa duże znaczenie w analizie próbek pobranych bezpośrednio z tkanek. Wypadkowa płynność błony modulowana jest bowiem przez komórki otaczające miejsce guza oraz lokalną obecność komórek niezmiennych nowotworowo np. komórek zapalnych, komórek tkanki łącznej czy też komórek nekrotycznych. Badania tkanki pochodzącej od pacjentów z rakiem płuc wykonane przy pomocy spektroskopii EPR, wskazują że w określaniu płynności błony większe znaczenie ma jednak sama struktura błon biologicznych niż wzajemny stosunek poszczególnych typów komórek (Sok i wsp., 1999).

Reasumując, oczywistym jest że znajomość parametrów fluidyzacji błony (współczynnika chol:PL, składu lipidowego oraz stopnia nienasycenia łańcuchów acylowych) ma istotne znaczenie w określeniu różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi. Wiedza ta wydaje się być niezbędna do opisu mechanizmów penetracji i modyfikacji błon przez niektóre chemioterapeutyki, co z kolei przełożyć się może na opracowanie efektywniejszej terapii.

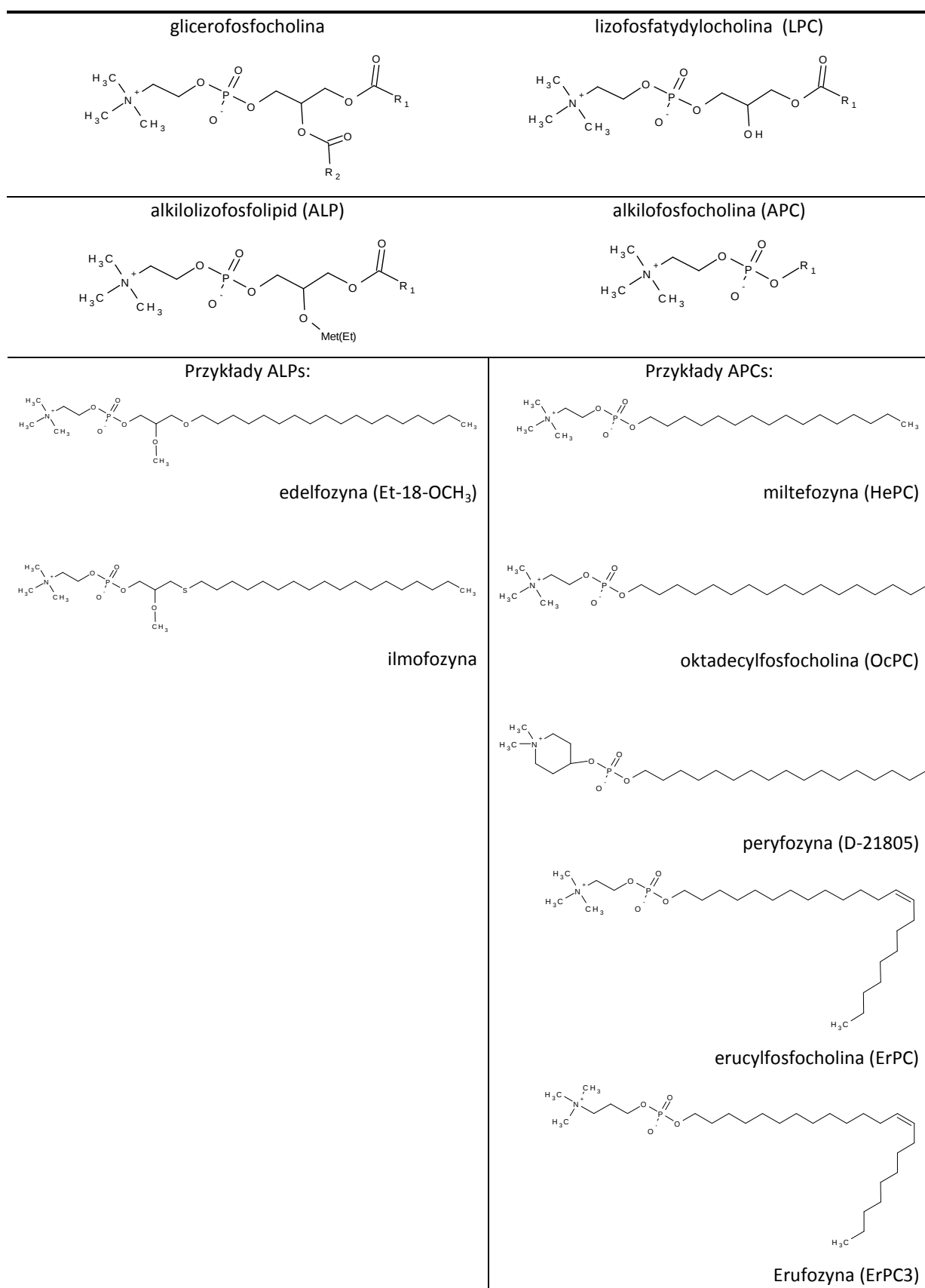
I.2. Syntetyczne lipidy antynowotworowe

Choroby nowotworowe, zaraz po chorobach układu krążenia, stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonu (ok. 21% wszystkich zgonów wywołanych przez choroby niezakaźne w 2010 r – dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO)-www.who.com) i pomimo rozwoju współczesnej medycyny ich liczba z każdym rokiem wzrasta. WHO szacuje, że ilość zgonów spowodowanych nowotworami wyniesie w roku 2030 13 milionów, podczas gdy w 2008 wynosiła ok. 7,6 milionów. Tak niezadowalające statystyki wynikają m.in. z niedokładnego poznania procesu karcynogenezy, co utrudnia opracowanie skutecznych i względnie bezpiecznych terapii przeciwnowotworowych. Mimo, że w ostatnich dziesięcioleciach osiągnięto duży postęp w zakresie walki z nowotworami, metody takie jak chirurgia, chemioterapia, radioterapia i terapia hormonalna są nieskuteczne w ponad 50% przypadków (Riedl i wsp., 2011). Stosowana obecnie chemioterapia w dużej mierze oparta jest na lekach cytotoksycznych, które działając bezpośrednio na DNA niosą ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek. Wiele grup badawczych na całym świecie postawiło sobie za cel znalezienie nowych i efektywnych związków o działaniu przeciwnowotworowym, których stosowanie nie wywołuje uciążliwych efektów ubocznych. Bez wątpienia do takich związków należą syntetyczne lipidy antynowotworowe (ATLs) (Gajate i Mollinedo, 2002; van Blliterswijk i Verheij, 2008).

Początki badań nad tą grupą związków pozwiązane są z badaniami nad występującą naturalnie w organizmach lizofosfatydylocholiną (LPC). Prace Bergenhema i Fahreasensa pokazały, iż związek ten, będący jednym z produktów pośrednich metabolizmu fosfolipidów charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną. Badania wykazały, że LPC wbudowują się w błonę komórkową, silnie zwiększając jej płynność (Bergenheim i Fahreasens, 1936). Przy wyższych stężeniach powoduje on lizę, jednak w ilościach sublitycznych stymuluje fagocytozę i może być traktowany jako ważny modyfikator biologiczny (Munder i wsp., 1979). Badania na liniach komórkowych inkubowanych z LPC pokazały zmniejszone oddychanie w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym wzroście konsumpcji tlenu w zawiesinie mikro- i makrofagów (Fischer, 1964). Niestety egzogenna LPC jest szybko metabolizowana w błonie komórkowej, przez co nie jest możliwe zastosowanie jej jako środka czynnego w terapii przeciwnowotworowej. Pod koniec lat 60-tych XX wieku Eibl, Arnold, Weltzien i

Westphal poszukując nowych modyfikatorów immunologicznych zsyntezowali pierwszy metabolicznie stabilny analog LPC - edelfozynę (1-O-oktadecylo-2-O-metylo-sn-glicero-3-fosfocholinę (ET-18-OCH₃)) (Eibl i wsp., 1967). Poprzez zastąpienie wiązania estrowego przy węglu C₁ wiązaniem eterowym oraz estryfikację grupy hydroksylowej przy węglu C₂ grupą metylową uzyskali oni związek odporny na działanie acetylotransferaz oraz lizofosfolipaz, który dodatkowo wykazał działanie antynowotworowe (Munder i Westphal, 1990). Kolejna modyfikacja struktury, polegająca na wprowadzeniu siarki do cząsteczki ET-18-OCH₃ zaowocowała uzyskaniem trioeterowej pochodnej edelfozyny - ilmofozyny (Herrmann i wsp., 1990). Cytotoksyczne działanie wyżej wymienionych związków, nazwanych łącznie alkilolizofosfolipidami (ALPs) (ang. *alkyllysophospholipids*) badano na wielu liniach komórek zarówno nowotworowych jak i normalnych, pokazując wysoki stopień selektywności tych związków wobec komórek zmienionych patologicznie (Munder i Westphal, 1990; Girgert i wsp., 1995). Niestety, silna aktywność antynowotworowa ALPs potwierdzona w badaniach *in vitro* i *in vivo* nie była już tak widoczna w badaniach klinicznych. Dodatkowo u pacjentów przyjmujących związki doustnie występowały - zależne od dawki - gastrologiczne skutki uboczne. Powiązano je z destrukcją błon biologicznych, wynikającą z silnej analogii ALPs do naturalnych lizofosfolipidów (Oberle i wsp., 2005). Kliniczne zastosowanie ET-18-OCH₃ ogranicza się obecnie do oczyszczania szpiku kostnego *ex vivo* przed przeszczepem (Vogler i wsp., 1996).

W celu zminimalizowania skutków ubocznych działania ALPs, przy jednoczesnym zachowaniu ich aktywności antynowotworowej Eibl i Unger w latach 80-tych XX wieku, dokonali kolejnej zmiany ich struktury, usuwając z cząsteczek szkielet glicerolu. Doprowadziło to do powstania nowej grupy substancji tzw. alkilofosfocholin (*alkylphosphocholines* - APCs) stanowiących drugą generację syntetycznych lipidów antynowotworowych (Eibl i Unger, 1990). Brak glicerolu czyni z APCs związki odporne na działanie wielu enzymów biorących udział w metabolizmie fosfolipidów, dzięki czemu mogą w znacznej ilości akumulować się w tkance (Jendrosseck i Handrick., 2003).



Rys. I.12. Wzory strukturalne glicerofosfocholiny, lizofosfatydylocholiny oraz wybranych ATLs

Pierwszą zsyntezowaną alkilofosfocholina była miltefozyna (HePC). Już pierwsze badania nad jej biologiczną aktywnością pokazały, że związek ten wykazuje silnie działania antyneoplastycznie *in vitro* i *in vivo*, indukuje różnicowanie komórek, aktywuje działalność cytotoksyczną makrofagów oraz hamuje rozrost komórek neoplastycznych w zdrowej tkance (Eibl i wsp., 1992). Stosunek części polarnej HePC do jej części apolarnej jest większy od jedności, dlatego cząsteczki tej aktywnej biomolekuły w środowisku wodnym tworzą micle, wywołując hemolizę. Z tego powodu HePC nie może być podawana przez injekcję. Badania kliniczne pokazały również podobne jak w przypadku ALPs gastrologiczne efekty uboczne. Obróbka liposomalna HePC eliminowała wprawdzie jej hemolityczne właściwości oraz obniżała gastrologiczną toksyczność, jednak w formie tej HePC była szybko usuwana z organizmu (Jendrossek i Handrick, 2003). Obecnie HePC dostępna jest komercyjnie pod nazwą *Miltex*®, a jej wykorzystanie ograniczone jest do stosowania miejscowego w leczeniu przerzutów u pacjentów chorych na raka piersi oraz ze skórny chłoniakiem złośliwym (Clive i wsp., 1999; Dummer i wsp., 1993). Dodatkowo w formie doustnej HePC stosowana jest w leczeniu laiszmaniozy, w przypadku której możliwe jest aplikowanie niższych dawek leku niż w terapii antynowotworowej (Berman, 2005).

Dalsze modyfikacje struktury polegające na elongacji łańcucha acylowego pozwoliły otrzymać kolejne pochodne APCs. Wyniki uzyskane przez Eibla i współpracowników wskazują, że oktadecylfosfocholina (OcPC) posiadająca 18-węglowy łańcuch, charakteryzuje się silniejszą aktywnością antynowotworową niż HePC (Eibl i wsp., 1992). Obiecujące efekty dało też zastąpienie cholinowego ugrupowania w cząsteczce OcPC heterocykliczną grupą piperydyny. Powstały w ten sposób związek – peryfozyna wykazuje powolną eliminację z organizmu, z czasem półtrwania ok. 140 h. Obecnie związek ten jest testowany klinicznie w leczeniu wielu nowotworów, m.in. zaawansowanej białaczki, chłoniaka, raka jelita grubego i szpiczaka mnogiego (Vink i wsp., 2005; Li i wsp., 2010; Crul i wsp., 2002; Gajate i Mollinedo, 2007).

Najbardziej obiecującymi alkilofosfocholinami wydają się być erucylfosfocholina (ErPC) oraz erufozyna (ErPC3) posiadające 22-węglowy łańcuch i podwójne wiązanie w konformacji *cis* pomiędzy 13 a 14 atomem węgla. Ta relatywnie niewielka modyfikacja struktury w stosunku do miltefozyny, zwiększyła charakter hydrofobowy tych związków. Tym samym tworzą one formy lamelarne, eliminując efekt hemolityczny, co

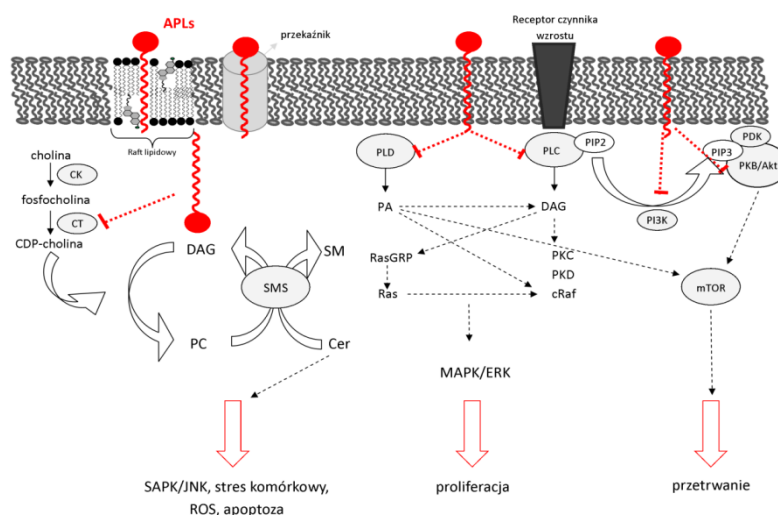
z kolei umożliwia ich dożylnie podawanie (Eibl i Kaufmann-Kolle, 1995; van der Luit i wsp., 2007). Ponadto związki te wykazały zdolność przenikania bariery krew-mózg, otwierając drogę do leczenia chorych ze słabo reagującymi pierwotnymi i przerzutowymi nowotworami mózgu (Rübel i wsp., 2006). Wyniki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych niezależnie od siebie przez zespoły badawcze Erdlenbruch'a oraz Schuettauf'a wskazują na brak poważnych skutków ubocznych przy stosowaniu ErPC w stężeniach wywołujących efekty cytotoksyczne (Erdlenbruch i wsp., 1999; Schuettauf i wsp., 2005).

Obiecujące efekty daje też wykorzystanie ATLs w terapii skojarzonej, zarówno w połączeniu z radioterapią, jak i innymi chemioterapeutykami (van Blliterswijk i Verheij, 2008). Zarówno edelfozyna jak i APCs wykazują radiouczulające właściwości, zwiększając szansę powodzenia terapii. Badania przeprowadzone na wielu liniach komórkowych pokazują, że związki te zdecydowanie wzmacniają apoptozę indukowaną promieniowaniem (Jendrossek i Handrick, 2003). W świetle wyników zaprezentowanych przez Rübel'a i współpracowników ErPC i ErPC3 w połączeniu z promieniowaniem jonizującym efektywnie indukują śmierć komórek w liniach wysoce odpornych na samo promieniowanie (takich jak glejak złośliwy) (Rübel i wsp., 2006). Również działanie peryfozyny w połączeniu z promieniowaniem wygląda obiecująco. Wyniki badań przeprowadzonych przez Vink'a przy jednoczesnym stosowaniu tych dwóch terapii pokazują całkowitą i trwałą reemisję w liniach komórkowych raka naskórkowego KB (Vink i wsp., 2006). Peryfozyna jest także szeroko stosowana jako uczulacz w chemioterapii (m.in. w połączeniu bortezomibem i deksametazonem) przy leczeniu chorych z opornym i nawrotowym szpiczakiem mnogim (Richardson i wsp., 2012).

Dokładny mechanizm działania tych modyfikatorów biologicznych, odpowiadający za ich selektywność nie jest jeszcze znany. Prowadzone w tym kierunku badania pokazują, że różni się on znacznie od sposobu działania klasycznych leków wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej, głównie dlatego, że molekularne cele ATLs usytuowane są w błonie komórkowej, a nie w DNA (Eibl i wsp., 1992). Ze względu na swoją strukturę chemiczną ATLs łatwo wnikają do podwójnej warstwy lipidowej, a następnie rozprzestrzeniają się po przedziałach komórkowych. Stosowane w niskiej, odpowiedniej z klinicznego punktu widzenia koncentracji ATLs wpływają na

rotację lipidów modyfikując biofizyczne właściwości błony biologicznej (Jendrossek i Handrick, 2003).

Proponowanych jest kilka mechanizmów działania tych leków (rys. I.13). Liczne badania potwierdzają, że ATLs oddziałują z wieloma kluczowymi enzymami, regulują powstawanie i zachowanie raft lipidowych, jak również wpływają na metabolizm lipidów, wynikiem czego jest deregulacja procesów pro- i antyapoptycznych, zakłócenie opartych na lipidach ścieżek transdukcji sygnału, indukcja stresu komórkowego, hamowanie wzrostu komórek oraz zatrzymanie ich cyklu komórkowego (Jendrossek i Handrick, 2003; van Blliterswijk i Verheij, 2008).



Rys. I.13. Proponowane mechanizmy działania ATLs (van Blliterswijk i Verheij, 2008)

Jeden z proponowanych w literaturze sposobów działania syntetycznych lipidów antynowotworowych opiera się na modulowaniu zawartości PC w błonie poprzez hamowanie zarówno jej syntezy jak i rozpadu. Inhibicja biosyntezy PC zachodzi na skutek blokowania cytydylotransferazy choliny (CTP) – enzymu katalizującego proces powstawania CTP-choliny oraz regulującego poziom PC w komórce i zależy od rodzaju stosowanych ATLs (van der Luit i wsp., 2007; Jendrossek i Handrick, 2003). Luit i współpracownicy pokazali, że edelfozyna powoduje zahamowanie syntezy PC w 65%, ErPC w 50% a peryfozyna w 30%. Dane te skorelowano z efektywnością tych związków do indukcji apoptozy (van der Luit i wsp., 2007). Niedobór PC w ER uniemożliwia syntezę sfingolipidów z PC i Cer, w wyniku czego cząsteczki Cer odkładają się w komórce. Ta akumulacja może wywołać stres komórkowy na drodze aktywacji kinaz

CAPK i MAPK bądź kaskady kinaz SAPK/JNK i tym samym zainicjować śmierć komórki (Gajate i wsp., 1998; van Blliterswijk i Verheij, 2008; Wider i wsp., 1998). Odrębną konsekwencją zahamowania syntezy PC jest wywołanie stresu oksydacyjnego (ROS) (Vrablic i wsp., 2001). ATLs mogą także wstrzymywać rozkład PA oraz DAG, zaburzając tym samym ścieżki przekazu sygnału zachodzące z udziałem tych cząsteczek (Lucas i wsp., 2001; van Blliterswijk i Verheij, 2008). Działanie ATLs przejawia się również w tłumieniu antyapoptycznych szlaków sygnalizacji, do których zalicza się proliferacyjną ścieżkę Ras/Raf/MAPK/ERK oraz ścieżkę przetrwania PI3K/PKB/Act (van Blliterswijk i Verheij, 2008). Badania przeprowadzone przez Strassheim'a i współpracowników na komórkach raka płuc pokazują, że edelfozyna zaburza asocjację PLC- β 1 z bezpośrednim aktywatorem $G_{aq/11}$, na drodze hamowania fosfolipaz C i D (PLC i PLD), co w konsekwencji osłabia powstawanie DAG oraz PA (Strassheim i wsp., 2000). Ruilter i współpracownicy dowiedli, że edelfozyna i HePC hamują aktywację kinazy proteinowej B (PKB) (Ruiter i wsp., 2001). Z kolei Jendrossek i Handrick opisali ten sam efekt dla ErPC w linii komórkowej gwiazdziak/glejak (Jendrossek i Handrick, 2003). Innym mechanizmem w wyniku którego ATLs mogą hamować szlak proliferacyjny sygnalizacji jest zaburzenie interakcji Ras z Raf wyniku zmniejszenia translokacji Raf w membranie (van Blliterswijk i Verheij, 2008). Fu i współpracownicy opisali inhibitujący efekt peryfozyny na ścieżkę przetrwania Act/mTor na skutek blokowania głównych składników tego szlaku m.in. kinazy białkowej Akt (Fu i wsp., 2009). ErPC również wykazuje właściwości blokujące Akt oraz PKB (van Blliterswijk i Verheij, 2008).

Ponadto, badania przeprowadzone przez Mollinedo na edelfozynie pokazują, że związek ten akumuluje się w tratwach lipidowych, wywołując redystrybucję białek Fas w wyniku indukcji procesu tworzenia DISC. Aktywacja receptora śmierci zachodzi niezależnie od naturalnej ligacji i nie wymaga obecności FasL. Wywołana w ten sposób apoptoza zachodzi przez wewnętrzny szlak mitochondrialny. Co więcej, badania pokazały, że edelfozyna wnika tylko do komórek nowotworowych, nie uszkodzając komórek zdrowych (Mollinedo i Gajate, 2006).

Carasco i Jimenez-Lopez zaproponowali kolejny mechanizm działania APCs związany z zaburzeniem homeostazy cholesterolu. Autorzy pokazali, że edelfozyna, HePC, peryfozyna oraz ErPC hamują wzrost komórek HepG2, a efekt ten zależy

zarówno od dawki leku jak i czasu inkubacji. Badane ATLs zmniejszają transport cholesterolu z błony do ER, wpływając tym samym na jego metabolizm. Związki te stymulują syntezę cholesterolu *de novo* oraz akumulację tego sterolu w komórce. Zaprezentowane przez autorów wyniki pokazują, że edelfozyna, ErPC i peryfozyna wywołują 80% spadek estryfikacji cholesterolu. Analiza składu raft lipidowych wyizolowanych z komórek inkubowanych z HePC wskazuje na podwyższoną zawartość cholesterolu w porównaniu do komórek kontrolnych (Carrasco i wsp., 2008; Carrasco i wsp., 2010; Jiménez-López i wsp., 2010)

Niezależnie od celu dla ATLs i wywołanego przez nich szlaku prowadzącego do apoptozy, związki te internalizowane są do wnętrza komórki. Wyróżnia się dwie drogi wnikania ATLs. Pierwszą z nich jest transport błonowy z zewnętrznej warstwy błony do jej warstwy cytozolowej zarówno przez spontaniczny przeskok (będący procesem wolnym ze względu na to, że jest niekorzystny energetycznie) albo za pomocą ATP-zależnych lipidowych translokatorów/flipaz. Drugim sugerowanym mechanizmem jest endocytoza. Nie jest jasne, który z procesów jest uprzywilejowany, ale badania wskazują, że zależy to głównie od rodzaju komórek. Przykładowo limfoidalne komórki wykorzystują tratwy lipidowe jako mediatory endocytozowego wychwytu, natomiast komórki nowotworowe zdają się w tym celu używać flipaz (van Blliterswijk i Verheij, 2008). Sugeruje się, że wnikanie tej grupy leków do wnętrza komórki może być związane z ich oddziaływaniami z poszczególnymi lipidami błonowymi.

Stopień indukcji apoptozy przez ATLs skorelowany jest ze wychwytem tych związków przez komórki, który z kolei powiązany jest ze stopniem proliferacyjnej aktywności i metabolizmem lipidów. Warto zaznaczyć, że nie tylko komórki nowotworowe, ale również normalne są wrażliwie na ATLs, warunkiem wychwytu jest jednak zaawansowany stopień proliferacji (Jendrosseck i Handrick, 2003; van Blliterswijk i Verheij, 2008).

Opisane ATLs stanowią obiecujące antynowotworowe związki, mogące modulować ścieżki transdukcji sygnału, prowadząc do śmierci komórkowej. Ponieważ w komórce istnieje wiele potencjalnych targetów dla tej grupy związków, ważne jest określenie które z nich są najistotniejsze dla pobudzenia mechanizmu apoptozy, a tym samym zabicia danego rodzaju nowotworu.

I.3. Monowarstwy Langmuira w świetle literatury

Monowarstwy Langmuira stanowią unikatowe narzędzie do badania struktur dwuwymiarowych. Ich nazwa pochodzi od nazwiska amerykańskiego fizykochemika Irvinga Langmuira, który w 1917 roku jako pierwszy przedstawił opis monomolekularnych warstw tworzonych przez amfifilowe substancje na swobodnej powierzchni roztworów wodnych, za co został kilkanaście lat później uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii (Rajvanshi, 2008). Jednak już wcześniej interesowano się właściwościami cienkich warstw na granicy faz woda/powietrze. Pierwszy udokumentowany eksperyment dotyczący efektów wywieranych przez cienkie warstewki na powierzchni wody został przeprowadzony przez Benjamina Franklina w 1772 (Wang i wsp., 2013). W swoim eksperymencie, Franklin wylał łyżeczkę oliwy z oliwek na wzburzoną powierzchnię stawu i zaobserwował natychmiastowe jej wygładzenie. Wyjaśnienie tego zjawiska przypisuje się Lordowi Rayleigh'owi, który w swoim laboratorium przeprowadził eksperyment, podczas którego zmierzył obniżenie napięcia powierzchniowego wody, wskutek rozlania na jej powierzchni oleju (Lord Rayleigh, 1988; Kaganer i wsp., 1999). Pierwsze izotermy ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie (π -A) zostały zmierzone w roku 1891 przez Pockels (Pockels, 1894; Kaganer i wsp., 1999), która swoje doświadczenia przeprowadziła w kuchni, używając jako zbiornika wody zwykłej miski. Zainspirowany jej badaniami Rayleigh, wykonał szereg własnych eksperymentów, na podstawie których wywnioskował, że otrzymane przez Pockels warstwy były jednocząsteczkowe. Rayleigh oszacował też grubość warstewki oliwy na ok 16 Å (Gains, 1966). Intensywne badania prowadzone na tym polu, pozwoliły Langmuir'owi przedstawić dowody na to, że uzyskane filmy faktycznie są monomolekularne. Określił on także charakter sił cząsteczkowych (Gains, 1966). Jako pierwszy w eksperymentach użył czystych chemicznie związków – wyższych kwasów tłuszczowych i alkoholi, co ułatwiło jednoznaczne określenie orientacji molekuł na granicy faz. Uznał on, że cząsteczki w pojedynczej warstwie preferują określone ułożenie: ich części polarne znajdują się w kontakcie z wodą, natomiast długie hydrofobowe łańcuchy skierowane są ku fazie gazowej (Langmuir, 1917; Gains, 1966). Opracowana przez Langmuira aparatura stosowana jest do dzisiaj i nosi nazwę wagi (wanny) Langmuira. W 1935 roku,

Katharine Blodgett zademonstrowała sekwencyjny transfer monowarstw Langmuira na podłoża stałe, umożliwiając tworzenie wielowarstwowych filmów, określanych obecnie jako filmy Langmuira-Blodgett (LB) (Blodgett, 1935; Peterson, 1990).

Przez kolejne lata monowarstwy Langmuira znajdowały się w płaszczyźnie zainteresowań zarówno fizyków, jak i chemików, umożliwiając m.in. opis uporządkowania dwuwymiarowych struktur. Zaletą techniki Langmuira jest niewątpliwie jej prostota. Sposób mechanicznej kompresji (będący bezpośrednim analogiem kompresji hydrostatycznej w trzech wymiarach) nie jest możliwy w żadnym innym układzie, a liczba parametrów uporządkowania jest wystarczająca, aby dać jasny obraz zmian faz w układzie. Początkowo monowarstwy Langmuira stosowano do rutynowych eksperymentów – od wyznaczania spadku napięcia powierzchniowego do kontroli właściwości zwilżających różnych materiałów, czy też w badaniach nad stabilizacją emulsji i pian (Safran, 1994). Z czasem jednak technika używana była coraz rzadziej. Jednakże z początkiem lat 90-tych ubiegłego wieku ponownie nastąpił wzrost zainteresowania filmami Langmuira. Z jednej strony przyczyn tego należy szukać w rozwoju technologii, dzięki której możliwa stała się analiza monowarstw nie tylko pod kątem standardowych izoterm π -A, ale również przy użyciu metod badawczych wykorzystujących m.in. rozpraszanie światła, dyfrakcję promieniowania X i fluorescencję (Kaganer i wsp., 1999; Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001). Z drugiej strony powrót do metody związany jest z nowymi możliwościami zastosowania filmów Langmuira, które wyniesione na powierzchnie stałe techniką LB umożliwiają tworzenie bezdefektowych warstw o kontrolowanej grubości, precyzyjnie zdefiniowanym składzie, określonej orientacji cząsteczkowej i zadanej architekturze. Znajduje to zastosowanie w analityce chemicznej (w produkcji sensorów chemicznych), optyce (w produkcji powłok antyrefleksyjnych) oraz w elektronice molekularnej, gdzie szczególnie istotna jest bezdefektowa struktura warstw (Delhaes i Yartsev, 1993; Ferreira i wsp. 2007; Geard i wsp., 2002). Warstewki zawierające w swej strukturze związki z układem azobenzenu znajdują zastosowanie jako pamięć optyczna oraz przy konstrukcji banków pamięci (Iwamoto i wsp., 1991). Z kolei monowarstwy utworzone z substancji o strukturze ciekłych kryształów mogą znaleźć zastosowanie przy produkcji wyświetlaczy ciekłokrystalicznych (Xue i wsp., 1999). Na przestrzeni ostatnich lat duże zainteresowanie budzą badania monowarstw utworzonych przez kompleksy DNA z

różnymi surfaktantami (Chen i wsp., 2012). Innymi dziedzinami, w których monowarstwy Langmuira znalazły zastosowanie, są nauki biomedyczne. Okazało się, że filmy Langmuira stanowią idealne modele błon biologicznych – biwarstwa lipidowa, stanowiąca podstawę błony biologicznej, jest bowiem złożeniem dwóch warstw monomolekularnych. Filmy Langmuira pozwalają na badanie oddziaływań pomiędzy składnikami w błonie oraz interakcji składnik błony-substancja fizjologicznie czynna (lek, hormon, enzym) (Hąc-Wydro i Dynarowicz – Łątka, 2008; Maget-Dana, 1999; Brockman, 1999). Dokładniejsze omówienie monowarstw Langmuira jako modelu błon biologicznych jest przedstawione poniżej.

Wzrost zainteresowania filmami Langmuira obserwowany w ostatnich latach związane jest również z odkryciem nowych substancji zdolnych do tworzenia monowarstw Langmuira. Powszechnie przyjmowano bowiem, że jedynie związki o amfipatycznej (amfifilowej) strukturze, posiadający w swojej budowie część polarną oraz apolarną, o odpowiednim balansie hydrofilowo-hydrofobowym, są zdolne do tworzenia filmów Langmuira. Przełom w tej klasycznej definicji substancji filmotwórczych datuje się od roku 1991, kiedy to Gaines zaprezentował izotermy zarejestrowane dla semifluorowanych alkanów, pokazując tym samym że również substancje o charakterze całkowicie polarnym, nie posiadające w swojej strukturze części hydrofilowej, mogą tworzyć nierozpuszczalne filmy Langmuira. (Gains, 1991). Inni autorzy wykazali, że zdolne do formowania termodynamicznie stabilnych warstw na granicy faz ciecz/gaz są także inne apolarne cząsteczki całkowicie pozbawione budowy blokowej, takie jak fulleren C_{60} lub perfluoroeikozan (Obeng i Bard, 1991; Li i wsp., 1994).

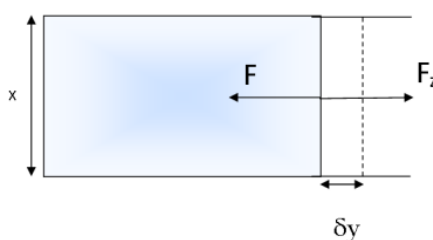
I.3.1. Fizyczne podstawy techniki Langmuira

I.3.1.1. Powierzchnia międzyfazowa i napięcie powierzchniowe

Na styku dwóch homogenicznych faz (nazywanych zazwyczaj fazą rozproszoną i fazą ciągłą) istnieje pewien region o skończonej grubości, charakteryzujący się odmiennymi właściwościami niż wewnątrz tych faz. Obszar ten nazwany jest obszarem międzyfazowym (powierzchnią międzyfazową) (Gains, 1966). W związku z tym, że istnieją trzy fazy objętościowe, powierzchnie międzyfazowe można podzielić na dwa główne typy: powierzchnie o charakterze ciekłym oraz o charakterze nieciekłym (bądź

stałym). Do pierwszego rodzaju zalicza się powierzchnie na granicy ciecz-gaz oraz ciecz-ciecz, natomiast do drugiego obszary na granicy gaz-ciało stałe, ciecz-ciało stałe oraz ciało stałe – ciało stałe (Barnes i Gentle, 2011).

Jednymi z podstawowych pojęć związanych z fizykochemią powierzchni jest pojęcie napięcia powierzchniowego. Rys. I.14 przedstawia ramkę o szerokości x wyposażoną w ruchomą poprzeczkę, na której rozpostarta jest błona cieczy.



Rysunek I.14 Schemat ramki z rozpostartą nań błoną

Jeżeli powierzchnię błony zwiększy się przez przesunięcie ruchomej poprzeczki na odległości δy , to obszar powierzchni (biorąc pod uwagę obie strony błony) wzrośnie o $\delta A = 2x\delta y$. Siła wywierana na błonę równa będzie: $F_z = \gamma 2x$, gdzie γ jest pewnym współczynnikiem proporcjonalności. Układ naturalnie będzie dążył do zmniejszania tej powierzchni działając na ramkę siłą F o tym samym kierunku co F_z lecz przeciwnym zwrocie (Barnes i Gentle, 2011; Atkins, 2007). Pracę wykonaną przez układ przeciw rozszerzeniu błony można więc zapisać:

$$\delta\omega = F\delta y = \gamma 2x\delta y = \gamma\delta A \quad (\text{I.1})$$

Wartość liczbowa wykonanej przez układ pracy będzie ujemna (jako, że $\delta A < 0$).

Podobne rozważania można zastosować do zachowania się cząsteczek cieczy na granicy faz woda/powietrze. Największa liczba cząsteczek znajduje się we wnętrzu fazy ciekłej, gdzie są one otoczone przez cząsteczki sąsiadów, a ich wzajemne oddziaływania mają charakter wysycony. Odmierna sytuacja ma miejsce na granicy faz. W pobliżu powierzchni siły działające na cząsteczkę nie są zrównoważone, a ich wypadkowa F jest skierowana do środka fazy i dąży do wciągnięcia cząsteczki w głąb cieczy. Powiększenie powierzchni swobodnej cieczy δA wymaga więc wykonania pewnej pracy o wartości $\delta\omega$ (Barnes i Gentle, 2011; Pigoń i Ruziewicz, 2005; Atkins, 2007). Przekształcając wzór (I.1) otrzymujemy wyrażenie definiujące napięcie powierzchniowe:

$$\gamma = \frac{\delta\omega}{\delta A} \quad (I.2)$$

Wymiarem napięcia powierzchniowego jest $\left[\frac{N}{m}\right]$

Napięcie powierzchniowe jest miarą oddziaływań międzycząsteczkowych i skierowane jest wzdłuż powierzchni. Zależy zarówno od gęstości jak i temperatury (Sobczyk i Kisza, 1981):

$$\gamma_t = \gamma_0 - at \quad (I.3)$$

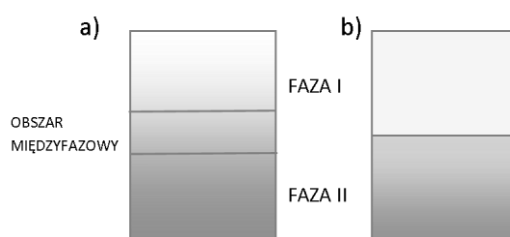
$$\gamma = c(\rho_l + \rho_p)^4 \quad (I.4)$$

gdzie, a, c – stałe zależne od natury substancji, t – temperatura, ρ_l i ρ_p – gęstość cieczy i pary.

Powyżej pewnej temperatury krytycznej napięcie powierzchniowe zanika całkowicie (Atkins, 2007).

I.3.1.1.1. Termodynamiczny opis układu zawierającego powierzchnię międzyfazową

W niniejszym podrozdziale rozważany jest układ składający się z fazy ciekłej (L) oraz fazy gazowej (G), pomiędzy którymi znajduje się obszar międzyfazowy (S) o płaskiej geometrii i ciekłym charakterze (rys. I.15 a).



Rys. I.15 a) Układ zawierający obszar międzyfazowy b) układ idealny (Gains, 1966)

Dla rzeczywistego układu w oparciu o proste zależności można zdefiniować jego termodynamiczne właściwości (Gains, 1966):

$$\begin{aligned}
V &= V^L + V^G \\
U &= U^L + U^G + U^S \\
S &= S^L + S^G + S^S \\
n_i &= n_i^L + n_i^G + n_i^S
\end{aligned} \tag{I.5}$$

gdzie V – objętość, U – energia wewnętrzna, S – entropia, n liczba moli. Indeks górny L odnosi się do fazy ciekłej, G – do gazowej, a wielkości z indeksem górnym S to tzw. „nadwyżki” powierzchniowe układu, zdefiniowane jako różnica pomiędzy daną wielkością w układzie idealnym, zawierającym nieskończenie cienką granicę pomiędzy fazami objętościowymi (rys 16b), a tą samą wielkością dla układu rzeczywistego.

Jak wspomniano wcześniej, aby przeciwstawić się siłom wciągającym cząsteczki w głąb fazy wodnej, musi zostać wykonana praca, która wytwarza wzrost energii wewnętrznej układu. W oparciu o pierwszą zasadę termodynamiki $dU = \delta q + \delta \omega$ można więc zapisać (Pigoń i Ruziewicz, 2005; Atkins, 2007; Barnes i Gentle, 2011):

$$dU = TdS - p^L dV^L - p^G dV^G + \gamma dA + \sum_i \mu_i dn_i \tag{I.6}$$

W podobny sposób wyraża się zmianę entalpii dla tego układu (entalpia wyrażana jest przez: $H = U + p^L V^L + p^G V^G$):

$$dH = TdS - V^L dp^L - V^G dp^G + \gamma dA + \sum_i \mu_i dn_i \tag{I.7}$$

Zmiana energii swobodnej Helmholtza oraz potencjału Gibbsa opisane są następująco:

$$dF = -SdT - p^L dV^L - p^G dV^G + \gamma dA + \sum_i \mu_i dn_i \tag{I.8}$$

$$dG = -SdT - V^L dp^L - V^G dp^G + \gamma dA + \sum_i \mu_i dn_i \tag{I.9}$$

Korzystając z powyższych zależności można na nowo zdefiniować napięcie powierzchniowe. Jeśli na układ nałożone zostaną warunki izotermiczno-izobaryczne napięcie powierzchniowe wyrazić można jako zmianę energii swobodnej układu ∂F towarzyszącej utworzeniu jednostkowej powierzchni ∂A (Atkins, 2007; Barnes i Gentle, 2011):

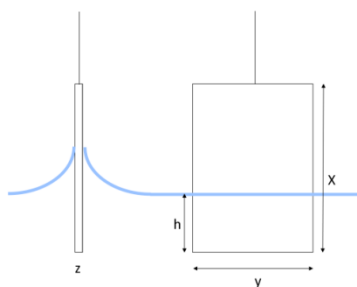
$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T, V^L, V^G, n_i} \quad (\text{I.10})$$

Jeżeli proces zachodzi w warunkach izotermiczno-izobarycznych napięcie powierzchniowe związane jest ze zmianą entalpii swobodnej:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, p^L, p^G, n_i} \quad (\text{I.11})$$

3.1.1.2. Pomiar napięcia powierzchniowego metodą Wilhelmy'ego

Znanych jest wiele sposobów pomiaru napięcia powierzchniowego. Najprostszą drogą zademonstrowania sił wynikających z istnienia napięcia powierzchniowego jest metoda opracowana przez Wilhelmy'ego (Barnes i Gentle, 2011). W metodzie tej, płytkę wykonaną z całkowicie zwilżanego materiału zanurza się w fazie wodnej. Podczas zanurzania płytki w cieczy, tworzy się menisk wklęsły (rys. I.16).



Rys. I.16 Płytką Wilhelmy'ego zanurzona w fazie wodnej

Skierowana w dół siła wypadkowa działająca na płytkę jest sumą siły oddziaływania grawitacyjnego i sił związanych z efektem napięcia powierzchniowego, zrównoważonych częściowo przez siłę wyporu. Dla sytuacji przedstawionej na rys. I.16 można więc zapisać (Gains, 1966):

$$F = \rho_p g z x y + 2 \gamma (x + y) \cos \theta - \rho_l g x y h \quad (\text{I.12})$$

gdzie: γ - napięcie powierzchniowe, θ - kąt zwilżania (dla materiałów całkowicie zwilżanych wynosi on 0°), g - stała grawitacji, ρ_p - gęstość materiału, z którego wykonano płytkę, ρ_l - gęstość cieczy. Standardowy pomiar może być przeprowadzony

na dwa sposoby: albo przez utrzymanie stałej pozycji płytki względem powierzchni i pomiar zmian siły, albo przez pomiar zmiennego zanurzenia płytki przy stałej sile (Barnes i Gentle, 2011).

I.3.2. Klasyczny i współczesny opis monowarstw Langmuira

Wynikiem pomiaru w klasycznym eksperymencie Langmuira są izotermy przedstawiające zależność ciśnienia powierzchniowego π od powierzchni A przypadającej na cząsteczkę w badanej monowarstwie (Gains, 1966). Pojęcia ciśnienia powierzchniowego używa się zazwyczaj w sytuacjach, w których w wyniku utworzenia nierozpuszczalnej monowarstwy na powierzchni subfazy (bądź zjawiska adsorpcji, w przypadku gdy badane substancje są w niej rozpuszczalne) dochodzi do zmiany napięcia powierzchniowego. Ciśnienie powierzchniowe definiuje się jako różnicę pomiędzy napięciem powierzchniowym subfazy przed naniesieniem na nią badanej substancji γ_0 , a napięciem powierzchniowym zmierzonym po utworzeniu filmu γ (Barnes i Gentle, 2011):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{I.13})$$

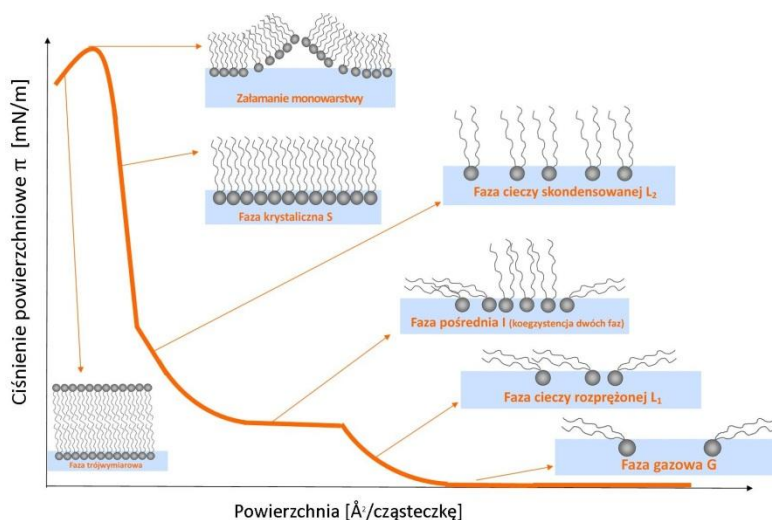
Związki które wykazują zdolność do gromadzenia się na granicy faz ciecz/gaz i obniżania napięcia powierzchniowego cieczy nazywa się surfaktantami. Posiadają one najczęściej budowę blokową: w obrębie ich cząsteczki można wyróżnić część liofilową i liofobową (bądź jeśli rozpatrywaną cieczą jest woda - hydrofilową i hydrofobową) (Hiemenz, 1986; Atkins, 2007). Mogą one rozpuszczać się w fazie ciekłej tworząc adsorpcyjne monowarstwy Gibbsa (surfaktanty jonowe lub niejonowe krótkołańcuchowe) albo tworzyć nierozpuszczalne monowarstwy Langmuira (niejonowe surfaktanty długołańcuchowe). Sposób tworzenia monowarstw zależy nie tylko od natury związków, ale również od metodyki przeprowadzanego eksperymentu (Dynarowicz-Łątka i Kita, 1999).

Wyniki badań wskazują, że nierozpuszczalne monowarstwy Langmuira tworzone są zazwyczaj przez związki zawierające w swoim łańcuchu węglowodorowym ponad 12 atomów węgla. Najczęstszym sposobem otrzymywania filmów Langmuira jest nanoszenie ich na granicę faz w lotnym roztworze rozpuszczalnika (najczęściej lotnego, organicznego, np. chloroformu) za pomocą mikrostrzykawki bądź mikropipety (Gains,

1966). W przypadku tworzenia monowarstw z substancji o bardzo ograniczonej rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych, stosuje się niewielki (zazwyczaj 1-2 %) dodatek rozpuszczalnika polarnego (np. niskocząsteczkowego alkoholu lub acetonu) (Flasiński i wsp., 2008). W celu utworzenia monowarstw substancji całkowicie nierozpuszczalnych w rozpuszczalnikach apolarnych, substancje takie rozpuszcza się w polarnych cieczach, np. DMSO, DMF (Seoane i wsp., 1997). W takich jednak przypadkach istnieje niebezpieczeństwo desorpcji materiału monowarstwy z powierzchni do wnętrza fazy wodnej ze względu na mieszalność obu cieczy.

I.3.2.1. Przebieg izotermy Langmuira

Po odparowaniu rozpuszczalnika na powierzchni subfazy powstaje nierozpuszczalna monowarstwa, którą poddaje się kompresji przy użyciu ruchomej barierki, rejestrując jednocześnie zmiany ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na molekułę (Gains, 1966). Pomiar odbywa się przy stałej temperaturze oraz stałym ciśnieniu zewnętrznym, stąd nazwa otrzymanej krzywej – izoterma. Przebieg przykładowej krzywej π -A prezentuje rys. I.17.



Rys. I.17. Przebieg przykładowej izotermy π -A

Na podstawie kształtu otrzymanych izoterm π -A możliwe jest określenie podstawowych faz, w których podczas sprężania znajduje się monowarstwa: fazy gazowej (G), ciekłej rozprężonej (L_1), ciekłej skondensowanej (L_2), fazy pośredniej (I) podczas której występuje koegzystencja dwóch faz oraz fazy stałej (S). Każda z nich

odpowiada innemu odcinkowi krzywej, z charakterystycznym dla siebie współczynnikiem nachylenia (Barnes i Gentle, 2011). Pierwszej klasyfikacji, w oparciu o kształt izotermy π - A dokonał w roku 1922 Adam (Adam, 1922; Kaganer i wsp., 1999). Nie dla wszystkich substancji tworzących filmy Langmuira udaje się jednak zaobserwować wszystkie możliwe stany fizyczne (Gaines, 1966).

W klasycznym pomiarze izotermy faza gazowa (G) jest praktycznie niemożliwa do zaobserwowania. Fazę tę charakteryzują bowiem bardzo duże odległości między cząsteczkami oraz niskie (poniżej 0,1 mN/m) wartości ciśnienia powierzchniowego, poniżej czułości tensjometru. Cząsteczki poruszają się niezależnie od siebie, analogicznie do cząsteczek dwuwymiarowego gazu (Gaines, 1966). Do jego opisu może posłużyć dwuwymiarowy odpowiednik równania stanu gazu doskonałego:

$$\pi A = NkT \quad (I.14)$$

jednak częściej w tym celu stosuje się jego modyfikację opisującą gaz rzeczywisty:

$$\pi(A - A_0) = NkT \quad (I.15)$$

gdzie A_0 jest rzeczywistą powierzchnią przypadającą na cząsteczkę w filmie (Barnes i Gentle, 2011).

Kompresja monowarstwy powoduje zmniejszenie odległości między molekułami i pojawienie się pomiędzy ich łańcuchami słabych oddziaływań. Leżące do tej pory równolegle do powierzchni subfazy łańcuchy zaczynają się podnosić i kierować w stronę fazy gazowej. Izoterma zaczyna „rosnąć” - obserwuje się wzrost wartości ciśnienia powierzchniowego powyżej wartości zero (tzw punkt „*lift off*”) (Gaines, 1966). Cząsteczki zachowują się analogicznie do cząsteczek w cieczy dwuwymiarowej, a stan ten z dobrym przybliżeniem opisuje równanie zaproponowane przez Langmuir'a (Langmuir, 1933):

$$(\pi - \pi_0)(A - A_0) = NkT \quad (I.16)$$

gdzie π_0 jest ciśnieniem związanym z odpychaniem naładowanych fragmentów cząsteczek. Langmuir pokazał, że parametry te mogą być rozpatrywane jako liniowe funkcje temperatury.

Bardziej skomplikowany opis tego stanu, pozwalający oszacować siłę oddziaływań Van der Waalsa został proponowany jest przez Smitha:

$$\left(\pi + \frac{n_c \varepsilon A_0}{2 A^2} \right) \left[A \left(1 - \frac{A_0}{2 A} \right)^2 \right] = kT \quad (\text{I.17})$$

gdzie n_c - ilość grup CH_3 (lub CH_2), ε - minimalna energia potencjalna Lennarda-Jonesa (Smith, 1967).

Dalsze zmniejszanie odległości między cząsteczkami prowadzi do przejścia fazowego ciecz rozprężona – ciecz skondensowana, które w przebiegu izotermy przejawia się jako odcinek o niemalże horyzontalnym przebiegu krzywej π - A (tzw. obszar *plateau*) (Gaines, 1966).

Stan cieczy skondensowanej opisuje liniowe równanie zaproponowane przez Harkinsa:

$$\pi = b - aA \quad (\text{I.18})$$

gdzie a, b - stałe (Harkins, 1954; Gaines, 1966).

Przy dalszym sprężaniu dochodzi do przejścia fazowego ze stanu cieczy skondensowanej L_2 do stanu stałego S . Adam zaobserwował, że na chwilę przed tym przejściem w przebiegu izoterm widoczne jest charakterystyczne przegięcie ("*kink*") (Adam, 1922). Cząsteczki w fazie stałej znajdują się blisko siebie prostopadle względem powierzchni subfazy i oddziałują silnie zarówno za pośrednictwem hydrofilowych głów jak i hydrofobowych łańcuchów (Gaines, 1966). Ostatecznie w wyniku dalszej kompresji dochodzi do przejścia struktury 2D w strukturę 3D. Przejście to, nazwane załamaniem (kolapsem) monowarstwy zachodzi przy pewnym ciśnieniu zwanym ciśnieniem kolapsu, π_{coll} (Gaines, 1966; Lee, 2008). Proponowane mechanizmy tego procesu zostaną szczegółowo omówione w dalszej części pracy.

Gibbs zauważył, że zmiany napięcia powierzchniowego zachodzące ze zmianą powierzchni przypadającej na cząsteczkę, powiązane są ze zmianami płynności monowarstwy, co z kolei można przypisać różnej elastyczności międzyfazowej filmu. Fazom dwuwymiarowym (analogicznie do faz objętościowych) można przypisać ściśliwość zdefiniowaną jako:

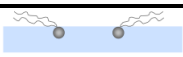
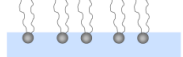
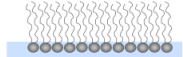
$$C_s = - \frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)_T \quad (\text{I.19})$$

Dla powierzchni nie pokrytej monowarstwą, ściśliwość oczywiście przyjmuje wartości nieskończone, gdyż wraz ze zmianą powierzchni nie następują zmiany ciśnienia (Vollhardt i Fainerman, 2006).

W celu określenia właściwości elastycznych monowarstwy częściej używaną wielkością jest odwrotność ściśliwości, zwana modulem ściśliwości:

$$C_s^{-1} = - A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (\text{I.20})$$

Wartości C_s^{-1} dla poszczególnych faz przedstawione są tabeli I.2 (Dervichian, 1939; Kumar i wsp., 2009):

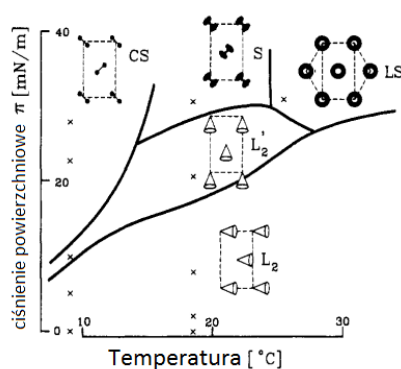
Stan monowarstwy	C_s^{-1} [mN/m]	Schemat
Gazowy	< 12,5	
Ciecz rozprężona	12,5 - 50	
Ciecz skondensowana	50-250	
Ciało stałe	> 250	

Tab. I.2. Wartości C_s^{-1} dla poszczególnych faz monowarstw Langmuira

I.3.2.2. Polimorfizm fazowy

O ile fakt, iż w wysokich temperaturach związki amfifilowe przypominają strukturą dwuwymiarowe ciecze, natomiast w niskich - dwuwymiarowe ciała stałe nie budził nigdy zastrzeżeń, to jednak interpretacja faz w temperaturach pośrednich pozostawała dyskusyjna. Badania przeprowadzone w tym zakresie, pozwoliły stwierdzić, że fazy określane wcześniej jako faza cieczy skondensowanej i faza stała wykazują podobny stopień uporządkowania, a jedyna różnica dotyczy orientacji łańcucha węglowodorowego cząsteczek (Kaganer i Loginov, 1993). Zastosowanie dodatkowych metod pomiarowych wykorzystujących dyfrakcję promieniowania X oraz

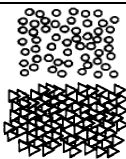
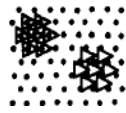
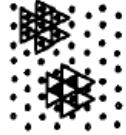
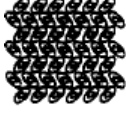
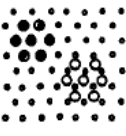
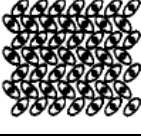
metod mikroskopowych (mikroskopia BAM i fluorescencyjna) pozwoliło zaobserwować bogaty polimorfizm monowarstw w obrębie faz skondensowanych (Barnes i Gentle, 2011). Diagramy fazowe przedstawiające zależność ciśnienia powierzchniowego od temperatury otrzymane dla związków amfifilowych o różnym profilu okazały się być bardzo do siebie zbliżone. Przykładowy diagram fazowy dla kwasu behenowego prezentuje rys. I.18 (Kenn i wsp., 1991)



Rys. I.18. Diagram fazowy otrzymany na podstawie izoterm dla kwasu behenowego (Kenn i wsp., 1991)

Głównym kryterium przydziału są parametry porządkowe, określające kąt nachylenia cząsteczek tworzących film Langmuira względem osi prostopadłej do granicy faz. I tak, długa oś cząsteczki może być nachylona albo w kierunku najbliższego sąsiada (NN), albo w kierunku następnego najbliższego sąsiada (NNN) lub też wykazywać nachylenie pośrednie (I). Fazę w której cząsteczki wykazują nachylenie NN oznacza się zwykle jako L_2 , natomiast fazę o nachyleniu NNN – L_2' (Binks, 1999; Barnes i Gentle, 2011). Kolejną fazą, której nie udało się zidentyfikować podczas klasycznych eksperymentów Langmuira jest faza supercieczy (LS - *Super Liquid*). Może ona być rozważana jako rozszerzenie fazy stałej z możliwością obrotu łańcucha względem długiej osi oraz zmianą upakowania z układu prostokątnego do heksagonalnego (Barnes i Gentle, 2011). Inną wyróżnioną fazą jest faza L_2'' o krystalicznym charakterze. Występuje ona przy niskich ciśnieniach i temperaturach, a cząsteczki wykazują nachylenie w stronę najbliższego sąsiada (Kaganer i Loginov, 1993). Polimorfizm monowarstw został szczegółowo opisany pod koniec lat 90-tych XX wieku przez zespół badawczy Kaganera. Autorzy celem wyjaśnienia zjawisk związanych z przejściami fazowymi posługują się skomplikowanym formalizmem matematycznym Landaua. (Kaganer i wsp., 1999). Na uwagę zasługuje również praca Bibo i współpracowników.

Wskazali oni bowiem na podobieństwo pomiędzy poszczególnymi fazami zaobserwowanymi dla monowarstw Langmuira a fazami ciekłych kryształów (Bibo i wsp., 1991). Dane zebrane są w tabeli I.3.

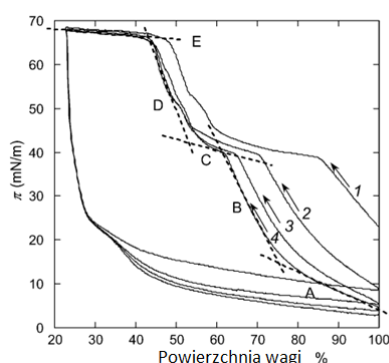
Faza	Struktura	Kategoria smektyka	Schemat ciekłego kryształu (widok z góry)
Gazowa	-	-	-
Ciekła rozprężona L_1	Przypadkowa, wertykalna lub ukośna	A lub C	
Ciekła skondensowana L_2	Prostokątna, NN	I	
Ciekła skondensowana $L_{2'}$	Prostokątna, NNN	F	
Ciekła skondensowana $L_{2''}$	Prostokątna, NN	K	
Super-ciecz SL	Heksagonalna (heksatyczna) U	BH	
Ciało stałe L	Prostokątna, U	E	
Dwuwymiarowy kryształ CS	Prostokątna, U	tal	-

Tab. I. 1. Porównanie faz zaobserwowanych dla monowarstw Langmuira z ciekłymi kryształami

I.3.3. Mechanizm załamania monowarstwy

Przejścia fazowe 2D zostały w literaturze obszernie opisane, natomiast mechanizmy i siły rządzące transformacją struktury z 2D do 3D nie są dobrze znane. Z biologicznego punktu widzenia zbadanie właśnie tego przejścia wydaje się mieć największe znaczenie. Osiągnięcie niskiej wartości napięcia powierzchniowego załamania (kolapsu) jest kluczowe m.in. do zmniejszenia pracy oddychania. Z kolei zdolność skolapsowanego materiału do ponownego wbudowania się w monowarstwę odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu płuc (Lee, 2008).

Początkowo uważano, że kolaps jest procesem nieodwracalnym i zachodzi na drodze pęknięć w strukturze monowarstwy, w wyniku których materiał badawczy wyrzucany jest albo do środka ciekłej fazy objętościowej, albo w stronę fazy gazowej, gdzie niejako nadbudowuje monowarstwę tworząc strukturę wielowarstwową (McFate i wsp., 1993; Ybert i wsp., 2002; Lee, 2008). Rejestracja tzw. pętli histerezy (czyli cykli kompresji i ekspansji monowarstwy) zdawała się potwierdzać ten pogląd. Rys. I.19 przedstawia przykładowe histerezy zarejestrowane dla surfaktantu płucnego. Przy kolejnych cyklach obserwuje się przesuwanie izoterm w stronę mniejszych powierzchni, co sugeruje ubytek materiału w monowarstwie (Alonso i wsp., 2004).



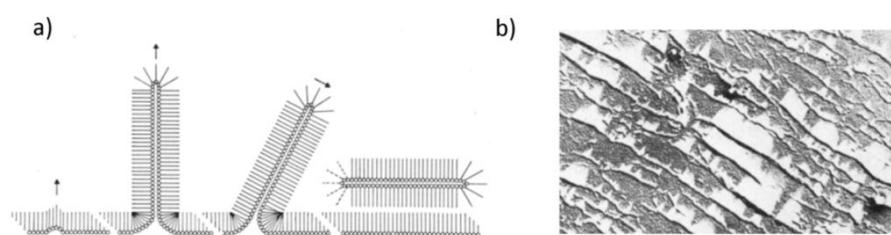
Rys. I.19 Pętle histerezy zarejestrowane dla lipidów wchodzących w skład surfaktantu płucnego (Alonso i wsp., 2004)

Smith i Berg opisali z kolei mechanizm tzw. "powolnego kolapsu". W swoim doświadczeniu utrzymywali filmy Langmuira w stałym ciśnieniu, obserwując spadek powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie, następujący w wyniku nukleacji fazy i wzrostu domen. Autorzy opisali relację zachodzącą pomiędzy powierzchnią A , a czasem t w którym zjawisko zachodzi:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -\alpha t - \beta t^2 \quad (\text{I.21})$$

Gdzie A_0 jest powierzchnią w chwili czasu $t=0$, α, β - są pewnymi stałymi, charakterystycznymi dla nukleacji (α) i wzrostu (β) (Smith i Berg, 1980). Wzrost ilości utworzonych w procesie enukleacji domen w przypadku kwasów tłuszczowych i alkoholi zależy ponadto od długości łańcucha węglowodorowego i jest wolniejszy dla związków długołańcuchowych (Ybert i wsp., 2002).

Badania przeprowadzane na szerszej grupie związków pokazały, że nie zawsze izotermie rejestrowane w kolejnych cyklach kompresji i ekspansji są względem siebie przesunięte, zatem w wyniku kolapsu niekoniecznie musi dochodzić do wyrzucania materiału z warstwy. Mechanizm załamania, powszechnie zwany "rollover", który po części może tłumaczyć odwracalność kolapsu dla niektórych monowarstw opisany został przez Reisa i Swifta (rys. I.20) (Ries i Swift, 1987).

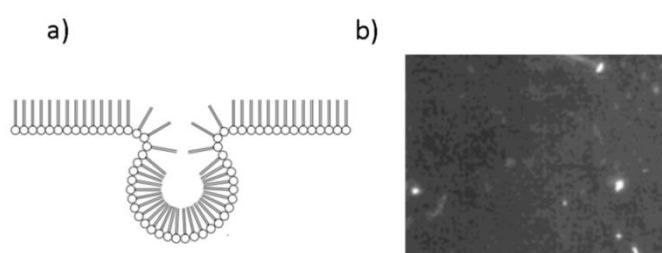


Rys. I.20. a) Mechanizm kolapsu zaproponowany przez Ries'a b) zdjęcie z mikroskopu elektronowego przedstawiające kolapsujący film dla kwasu cerebronowego (Ries i Swift 1987)

Według w/w autorów, do kolapsu może dojść na drodze fałdowania monowarstwy, kiedy jej fragment zostaje wypychany z powierzchni, tworząc grzbiety grubości dwóch warstw cząsteczek, które następnie nakładają się na istniejącą, pierwotną monowarstwę, tworząc strukturę trójwarstwową. W wyniku rozprężania może dojść do rozwijania utworzonych struktur bez straty materiału (odwracalność procesu zależy tutaj głównie od właściwości fizykochemicznych substancji oraz parametrów pomiaru). Milner wskazuje na to, że niestabilność monowarstwy w odniesieniu do fałdowania i późniejszego uginania nastąpić może tylko przy ciśnieniu powierzchniowym większym lub równym 72 mN/m (Milner i wsp., 1989). Liczne pomiary pokazują jednak, że kolaps następuje długo przed tą granicą (Lee, 2008). Nikomarov, pokazał natomiast, że

zaproponowany przez Reis'a mechanizm w przypadku monowarstw pozbawionych defektów jest niekorzystny energetycznie (bariera energetyczna procesu fałdowania w odniesieniu do energii termicznej $k_B T$ jest zbyt wysoka) (Nikomarov, 1990). Diamant wraz ze współpracownikami zaproponowali, że fałdy powstające pomiędzy fazami w danej monowarstwie powiązane są z różnicami wysokości między tymi fazami (Diamant i wsp., 2000, Diamant i wsp., 2001). Przeczą temu jednak badania przeprowadzone przez zespół naukowy Yberta, które wskazują na to, że fałdowanie zachodzi nawet w przypadku jednorodności monowarstwy (Ybert i wsp., 2002)..

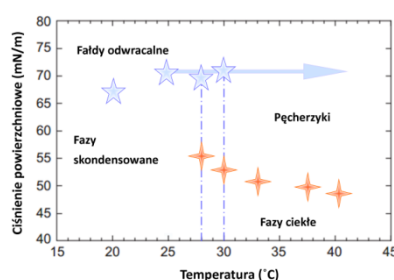
Zupełnie inny mechanizm zaproponowano w odniesieniu do fosfolipidów. Okazuje się, że związki te kolapsują przy niższych ciśnieniach powierzchniowych na skutek tworzenia pewnych określonych struktur, uwalnianych do wnętrza fazy ciekłej. Zakłada się, że początkowo tworzone są dwuwarstwowe fałdy skierowane w kierunku wnętrza fazy ciekłej, które następnie mogą przekształcić się w pęcherzyki i oderwać od filmu (proces ten może mieć charakter odwracalny bądź nieodwracalny) (rys. I.21). Tworzenie pęcherzyków prowadzi do zmniejszania energii powierzchniowej łańcuchów hydrofobowych eksponowanych w stronę fazy gazowej. Zarówno symulacje komputerowe (Baoukina i wsp., 2008) jak i liczne eksperymenty (Gopal i Lee, 2001) przeprowadzone dla wielu różnych fosfolipidów potwierdziły słuszność tego mechanizmu.



Rys. I.21 a) Mechanizm kolapsu fosfolipidów b) zdjęcie z mikroskopu BAM kolapsującego surfaktantu (Yang 2007; Gopal i Lee, 2001)

Załamanie monowarstwy jest funkcją zarówno parametrów makroskopowych takich jak temperatura i szybkość kompresji, jak i parametrów mikroskopowych, do których zalicza się oddziaływania międzycząsteczkowe, nukleację, czas wzrostu domen, asymetrię budowy molekuł, oraz grubość utworzonego filmu (Gopal i Lee, 2001; Lee,

2008). W swojej pracy Lee sugeruje, że sposób w jaki film kolapsuje zdeterminowany jest przez jego właściwości mechaniczne: monowarstwy charakteryzujące się stanem ciekłym załamują się w wyniku tworzenia pęcherzyków i wyrzucania cząsteczek do subfazy, natomiast monowarstwy sztywniejsze o większym uporządkowaniu kolapsują zazwyczaj przez pękanie bądź fałdowanie z jednoczesnym tworzeniem wielowarstwowych agregatów po stronie fazy gazowej. Autorka postuluje, że drogę, na której dochodzi do kolapsu można łatwo zmienić przez modulację właściwości mechanicznych monowarstwy np. poprzez zmianę temperatury (Lee, 2008). Lee poddała analizie surfaktant płucny - mieszaninę DPPC i POPG w proporcji 7:3. Wyniki przeprowadzonych przez nią badań jednoznacznie wskazują na zróżnicowanie mechanizmu kolapsu w funkcji temperatury (w zakresie od 20°C do 40°C). Rys. I.22 prezentuje zaproponowany przez Lee diagram fazowy obrazujący zależność ciśnienia powierzchniowego od temperatury (Gopal i Lee, 2001; Lee, 2008).

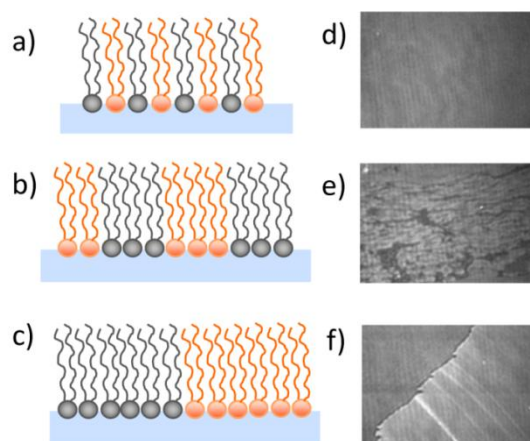


Rys. I.22 Diagram fazowy kolapsu otrzymany dla mieszaniny DPPC-POPG (Lee, 2008)

Jak widać z powyższego diagramu, rodzaj kolapsu ściśle zależy od temperatury subfazy. Poniżej pewnej temperatury - w tym przypadku 28°C - monowarstwy znajdują się w fazie skondensowanej i bardziej prawdopodobny jest kolaps na drodze pękania i fałdowania. W przedziale temperatur 28°C - 30°C monowarstwy mogą załamać się albo na skutek fałdowania albo poprzez tworzenie pęcherzyków, natomiast dalszy wzrost temperatury powoduje większe prawdopodobieństwo kolapsu na drodze tworzenia pęcherzyków.

I.3.4. Układy dwu- i wieloskładnikowe

Dotychczas w niniejszej pracy skupiono się głównie na właściwościach monowarstw jednoskładnikowych. Wykorzystanie monowarstw Langmuira w naukach biologicznych i medycznych wiąże się jednak z badaniem układów bardziej złożonych, zawierających niekiedy kilka oddziałujących ze sobą składników. Opis wzajemnej mieszalności w układach dwuwymiarowych, będący odbiciem oddziaływań międzymolekularnych jest analogiczny do opisu mieszalności w układach objętościowych: dwa składniki mogą się mieszać całkowicie, częściowo lub nie mieszać zupełnie. Modelową dystrybucję składników dla każdego z przypadków ilustruje rys. 23 a-c (Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999).



Rys. I.23 Modelowa dystrybucja faz dla układów dwuskładnikowych (a-c) i odpowiadające im zdjęcia BAM (d-f) otrzymane dla mieszanin HSA/DPPC (Dynarowicz-Łątka, 1999; Toimil i wsp., 2012)

Wzajemna mieszalność (bądź separacja faz) odgrywa w układach biologicznych bardzo istotną rolę. Występowanie rozdziału faz może prowadzić do metastabilnych defektów procesów transportu (egzocytozy i endocytozy) oraz procesów fuzji. Separacja faz powoduje także powstawanie w obrębie układów biologicznych specyficznych domen, które warunkują ich właściwości (Estrela-Lopis i wsp., 2004).

Podobnie jak w przypadku filmów jednoskładnikowych, oddziaływania między cząsteczkami w systemach wieloskładnikowych są wypadkową oddziaływań pomiędzy hydrofobowymi ogonami cząsteczek oraz oddziaływań ich hydrofilowych grup i zależą zarówno od ładunku elektrycznego związków tworzących film jak i od ich struktury

(budowy grupy hydrofilowej, długości łańcucha węglowodorowego oraz obecności w nim wiązań nienasyconych) (Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999; Israelachvili, 2011).

Interpretacja wzajemnych oddziaływań w układach mieszanych opiera się na dwóch podejściach. Pierwsze związane jest z prostymi regułami addytywności, drugie wiąże się z analizą termodynamiczną i wymaga wyznaczenia tzw. nadmiarowych funkcji mieszania (Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999).

I.3.4.1. Zasady addytywności

Według Costina i Barnesa monowarstwy mieszane wykazują nieidealne zachowanie, powodowane znaczącymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, wtedy gdy pewne opisujące ich własności lub proste funkcje f nie zależą liniowo od składu filmu X , a w przebiegu $f(X)$ obserwuje się dodatnie lub ujemne odchylenia od idealności (Costin i Barnes, 1975).

W analizie oddziaływań opartej o reguły addytywności wykorzystuje się dwa równania:

$$A_{1...N}^{id} = \sum_{i=1}^N A_i X_i \quad (I.22)$$

$$\pi_{coll}^{id}{}_{1...N} = \sum_{i=1}^N \pi_{coll\ i} X_i \quad (I.23)$$

Liniowy przebieg powyższych funkcji wskazuje na idealną mieszalność składników wynikającą z braku oddziaływań pomiędzy molekułami bądź na całkowitą ich niemieszalność, natomiast odstępstwa od idealności świadczą o istnieniu oddziaływań w tych układach (Gains, 1966, Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999, Gong i wsp., 2002).

Pierwsze równanie opisuje powierzchnię przypadającą na cząsteczkę w mieszanej monowarstwie jako funkcję jej składu (przy danym ciśnieniu). Dodatnie odchylenia przebiegu funkcji $A_{1...N}=f(x)$ wskazują na istnienie odpychających oddziaływań między składnikami, podczas gdy ujemne są rezultatem wzajemnego przyciągania. Dla niektórych mieszanin w przebiegu krzywych $f(X)$ można zaobserwować odcinki liniowe, dowodzące częściowej mieszalności składników układu (Gains, 1966, Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999; Barnes i Gentle, 2011).

Równanie I.23 jest dwuwymiarowym analogiem prawa Raoulota (Dynarowicz - Łątka i Kita, 1999). Wstępne informacje dotyczące wzajemnej mieszalności w oparciu o wartości ciśnienia kolapsu można uzyskać z kształtu samych izoterm: jeśli w przebiegu krzywej π - A występują dwa kolapsy, z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że składniki układu nie mieszają się ze sobą, tworząc dwie rozseparowane fazy. Kiedy w przebiegu izoterm dla układów mieszanych widoczny jest tylko jeden kolaps, a wartości ciśnień przy których występuje załamanie leżą pomiędzy wartościami zarejestrowanymi dla czystych komponentów - można wnioskować o ich wzajemnej mieszalności, zależnej od składu monowarstwy (Gains, 1966).

Powyższe rozważania można łatwo wyjaśnić w oparciu o regułę fazową:

$$L = (C_v - C_s) - (F_v - F_s) + 3 \quad (\text{I.24})$$

gdzie L - liczba stopni swobody układu, C_v, C_s - liczba składników, odpowiednio, w fazie objętościowej i powierzchniowej, F_v, F_s - liczba faz objętościowych (v) i powierzchniowych (s) pozostających w równowadze.

Przykładowo, dla monowarstwy dwuskładnikowej uformowanej przez składniki wspomnianego wcześniej surfaktantu płucnego (DPPC i POPG 7:3) na subfazie wodnej można zapisać: $C_v = 2$ (woda i powietrze), $C_s = 2$ (DPPC i POPG) oraz $F_v = 2$ (woda i powietrze). Zatem, liczba stopni swobody wynosi $L = (2 + 2) - (2 + F_s) + 3 = 5 - F_s$.

Badania pokazały, że DPPC i POPG w proporcji 7:3 nie mieszają się ze sobą. Kiedy więc taka monowarstwa utworzona przez niemieszające się składniki jest kompresowana aż do momentu załamania, obserwuje się pojawienie po kolapsie dwóch dodatkowych faz powierzchniowych. Liczba stopni swobody w takim przypadku wynosi $L=4-F_s=2$. Przy stałości temperatury i ciśnienia zewnętrznego ciśnienie kolapsu przyjmuje taką samą wartość, niezależnie od wzajemnej proporcji składników w mieszaninie.

Gdyby składniki surfaktantu mieszały się ze sobą, występowałaby jedna homogeniczna faza powierzchniowa i liczba stopni swobody wynosiłaby 4 (temperatura, ciśnienie zewnętrzne, ciśnienie powierzchniowe oraz skład). Zakładając stałość temperatury i ciśnienia zewnętrznego liczba stopni swobody zostaje zredukowana do 2. Kiedy taką mieszaną monowarstwę kompresuje się aż do momentu załamania, obserwuje się

pojawienie dodatkowej fazy - skolapsowanej monowarstwy, a $F_v = 3$. Przy założeniu, że po kolapsie istnieje tylko jedna faza powierzchniowa liczba stopni swobody szacowana jest na 3. Przy stałości temperatury i ciśnienia zewnętrznego wartość ciśnienia kolapsu jest więc jedyną zmienną w takim układzie i zależy od kompozycji filmu (Dynarowicz-Łątka i Kita, 1999). Analiza ciśnienia kolapsu w układach wieloskładnikowych pozwoliła na stworzenie diagramów fazowych, dających wgląd do wzajemnej mieszalności komponentów. Szczegółowe opracowanie tego zagadnienia znajduje się w pracach Tomoaia-Cotisel i E. Chifu, 1983; Zsako i wsp., 1984 oraz Tomoaia-Cotisel i wsp., 1985.

I.3.4.2. Termodynamika oddziaływań międzycząsteczkowych

Oddziaływania pomiędzy składnikami w mieszaninach można analizować w sposób ilościowy w oparciu o zagadnienia termodynamiki (Dynarowicz-Łątka i Kita, 1999). W przypadku układów dwuwymiarowych, podobnie jak dla układów objętościowych można zdefiniować termodynamiczne "nadwyżki" zarówno pewnych określonych właściwości układu (takich jak powierzchnia) jak i konkretnych funkcji termodynamicznych mieszania (m.in. entalpii, entropii). Przez termodynamiczną funkcję mieszania rozumie się różnicę pomiędzy wartościami danej funkcji dla mieszaniny oraz dla czystych składników. Nadmiarem funkcji termodynamicznej nazywa się z kolei różnicę wartości funkcji termodynamicznej dla mieszaniny rzeczywistej, w której występują oddziaływania międzycząsteczkowe oraz mieszaniny idealnej, opisanej zależnością liniową (Sobczyk i Kisza, 1981). Do termodynamicznej charakterystyki właściwości filmów wieloskładnikowych utworzonych na granicy faz woda/powietrze wykorzystuje się najczęściej nadwyżkę powierzchni w mieszanej monowarstwie (tzw. nadmiarową powierzchnię mieszania) oraz nadmiarową entalpię swobodną mieszania. Nadwyżki tych funkcji w zależności od składu mieszaniny umożliwiają podanie precyzyjnego opisu zmian towarzyszących procesowi mieszania, a tym samym dają wgląd w oddziaływania pomiędzy molekułami (Gains, 1966; Pagano i Gershweld, 1972).

Nadmiarowa powierzchnia mieszania dla układu wieloskładnikowego dana jest równaniem:

$$A^{exc} = A_{1...N} - A_{1...N}^{id} \quad (I.25)$$

gdzie $A_{1...N}$ jest średnią powierzchnią zajmowaną przez cząsteczkę w mieszanej monowarstwie, a $A_{1...N}^{id}$ jest powierzchnią zajmowaną przez cząsteczkę w mieszaninie idealnej, opisanej równaniem I.23.

Dla mieszanin idealnych wartość A^{exc} wynosi 0. Mieszaniny rzeczywiste, w których cząsteczki oddziałują ze sobą przebieg funkcji $A^{exc} = f(X)$ wykazuje odstępstwa od liniowości: w przypadku kondensacji wartości $A^{exc} < 0$, ekspansja prowadzi natomiast do $A^{exc} > 0$ (Dynarowicz-Łątka i Kita, 1999).

Oddziaływania i stabilność układu można również określić posługując się zmianami nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania ΔG^{exc} . Wartość ΔG^{exc} otrzymuje się poprzez całkowanie nadmiarowej powierzchni mieszania po ciśnieniu:

$$\Delta G^{exc} = N_A \int_0^{\pi} A^{exc} d\pi \quad (I.26)$$

Ujemne wartości ΔG^{exc} rozważane są jako kryterium stabilności monowarstwy i świadczą o przyciągających (lub mniej odpychających) oddziaływaniach między cząsteczkami w filmie mieszanym w odniesieniu do oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w monowarstwach jednoskładnikowych. Dodatnie wartości ΔG^{exc} wynikają z istnienia oddziaływań bardziej odpychających (lub słabiej przyciągających) w analizowanej mieszanej monowarstwie w porównaniu do odpowiednich filmach monoskładnikowych (Gains, 1966, Pagano i Gersheweld, 1972).

Dodatkowo, do określenia stabilności badanych mieszanin można posłużyć się zmianami tzw. całkowitej entalpii swobodnej mieszania ΔG^M , która wyraża się jako suma zmian nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania ΔG^{exc} oraz entalpii swobodnej w przypadku układu idealnego ΔG^{id} :

$$\Delta G^M = \Delta G^{exc} + \Delta G^{id} \quad (I.27)$$

gdzie $\Delta G^{id} = RT \sum_{i=1}^N X_i \ln X_i + \dots + X_N \ln X_N$

Ujemne wartości ΔG^M dowodzą większej stabilności układu w porównaniu do stanu niezmieszanego (Dynarowicz-Łątka i Kita 1999; Gong i wsp., 2002).

Bazując na izotermach π - A można również dla danych wartości ciśnienia powierzchniowego oszacować tzw. parametr oddziaływania (α) oraz energię oddziaływania Δh . W przypadku układów dwuskładnikowych ich wartości można policzyć przy użyciu następujących równań (Mestres i wsp., 1992; Dynarowicz-Łątka i Kita 1999):

$$\alpha = \frac{\Delta G^{exc}}{RT (X_1 X_2^2 + X_2 X_1^2)} \quad (I.28)$$

$$\Delta h = \frac{RT \alpha}{Z} \quad (I.29)$$

Z występująca w równaniu I.29 jest liczbą koordynacyjną, i zgodnie z modelem Quikendema i Tana wynosi 6 (Quickendem i Tan, 1974).

I.3.5. Współczesne metody analizy filmów Langmuira

Dokładne zbadanie zależności pomiędzy składnikami w monowarstwach Langmuira wymaga niekiedy wykorzystania kilku komplementarnych technik badawczych, opartych o różnorakie zjawiska fizyczne. Przegląd stosowanych obecnie metod zawiera tabela I.4.

Technika	Uzyskana informacja	Referencja
Pomiar izoterm π - A	• zdolność substancji badanej do tworzenia filmów nierozpuszczalnych, • powierzchnia przypadająca na cząsteczkę w tak utworzonym filmie, fazy monowarstwy • rodzaj kolapsu • ściśliwość i stabilność filmów • interakcje pomiędzy składnikami monowarstwy a substancjami znajdującymi się w fazie wodnej • wzajemna mieszalność składników i oddziaływania pomiędzy nimi • przebieg reakcji chemicznych (fotochemicznych)	Gains, 1966; Barnes, 2011
Pomiar izoterm ΔV - A	• orientacja dipoli cząsteczkowych, • agregacja • przebieg reakcji chemicznych (fotochemicznych)	Demchak i Ford, 1974

	• interakcje pomiędzy składnikami monowarstwy a substancjami znajdującymi się w fazie wodnej	
Pomiar przewodności	• międzycząsteczkowe oddziaływania grup hydrofilowych • wiązania wodorowe • przeskoki protonów	Teissie i wsp., 1985 Teissie i wsp. 1992
Pomiar prądu przesunięcia Maxwella	• agregacja • przebieg reakcji chemicznych (fotochemicznych)	Iwamoto i wsp., 1991; Iwamoto i wsp., 1996
Mikroskopia kąta Brewstera	• charakterystyka morfologiczna • agregacja i formowanie się domen • fazy i ich współistnienie • mechanizm kolapsu	Hönig i Möbius, 1991
Mikroskopia fluorescencyjna	• charakterystyka morfologiczna • agregacja i formowanie się domen • fazy i ich współistnienie	Lösche i H. Möhwald, 1984
Spektroskopia UV-VIS	• obecność chromoforów (grup absorbujące promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie 180 - 800 nm) • agregacja • oddziaływania międzycząsteczkowe	Gallant i wsp., 1998
Spektroskopia podczerwieni	• obecność grup funkcyjnych • stopień jonizacji • orientacja części hydrofobowej i hydrofilowej molekuly • wiązania wodorowe	Dluhy i Cornell, 1985
Spektroskopia Ramana	• obecność grup funkcyjnych • konformacja łańcuchów alkilowych • uporządkowanie monowarstwy	Chamberlain, 1997
Dyfrakcja promieniowania X (grazing)	• charakterystyka struktury w płaszczyźnie powierzchni • fazy monowarstwy	Als-Nielsen i wsp., 1994
Odbicie promieniowania X i neutronów	• rozkład gęstości elektronowej wzdłuż normalnej do granicy międzyfazowej • molekularny skład badanej warstwy i jej grubość • przebieg reakcji chemicznych • oddziaływania monowarstwa – przeciwjon	Zhou i Chenc, 1995
Generacja drugiej harmonicznej	• gęstość powierzchniowa monowarstwy • pK_a • Stopień jonizacji grupy głowy • organizacja molekuł wewnątrz monowarstwy	Heinz i wsp., 1983
Generacja częstotliwości	• zmiany konformacyjne i orientacyjne • struktura powierzchni międzyfazowej	Guyot-Sionnest i wsp., 1987

sumacyjnych	• przejścia fazowe • gęstość powierzchniowa utworzonych warstwek	
Mikrowaga kwarcowa	• natura monomolekularna • wnikanie wody do monowarstwy	Ebara i wsp., 1996
Elipsometria	• grubość monowarstwy	Den Engelsen i de Koning, 1974
Pomiary reologiczne	• viskoelastyczne właściwości monowarstw • moduł ściśliwości • mikrostrukturalne przejścia fazowe	Brooks i wsp., 1999

Tab. I.4. Współczesne techniki analizy filmów Langmuira (Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001)

Każda z przedstawionych w tabeli metod posiada wiele zalet, ale i pewne ograniczenia. Klasyczna technika pomiaru polegająca na rejestrowaniu izoterm π -A dostarcza w sposób natychmiastowy podstawowych informacji o badanych filmach (m.in. o zdolności danej substancji do tworzenia filmów oraz powierzchniach zajmowanych przez cząsteczki w monowarstwach). Z kształtu izoterm wnioskować można o obecności i rodzaju przejść fazowych podczas kompresji oraz o stabilności monowarstw przy zadanych warunkach eksperymentalnych. Zarejestrowane izotermy pozwalają też wstępnie określić mechanizm kolapsu monowarstwy. Termodynamiczna analiza mieszanych filmów umożliwia identyfikację oddziaływań w systemach wieloskładnikowych, co jest szczególnie istotne przy opisie układów biologicznych. Niestety, izotermy nie dają wglądu w szczegółowy polimorfizm fazowy. Na ich podstawie nie można też określić orientacji molekuł oraz grubości utworzonej warstewki. Stosowanie mikroskopii kąta Brewstera i mikroskopii fluorescencyjnej wymaga z kolei niehomogeniczności faz tworzonych przez badaną substancję (bądź mieszaninę). W przypadku związków o wysokiej wzajemnej mieszalności obserwacja powierzchni przy pomocy tych metod nie dostarcza żadnych kluczowych informacji. W przypadku mikroskopii BAM współczynnik załamania monowarstwy musi różnić się znacznie od współczynnika załamania wody. Duża część lipidów błonowych i wszystkie syntetyczne lipidy antynowotworowe stosowane powszechnie w badaniach langmuirowskich dają jednorodne obrazy fluorescencyjne i BAM. Co więcej, cząsteczki barwnika kontrastującego - którego obecność jest niezbędna w obrazowaniu fluorescencyjnym - wpływają na przebieg izoterm (Sandez i wsp., 2002), a zatem w

przypadku badania mieszanych układów biologicznych mogą zaburzać oddziaływania pomiędzy molekułami.

Metody spektroskopowe najlepiej nadają się do wyznaczania kierunku przebiegu reakcji chemicznych dla układów zawierających białka. Spektroskopia UV-VIS wymaga dodatkowo obecności chromoforów. Z kolei spektroskopia w podczerwieni utrudniona jest przez absorpcję promieniowania przez subfazę wodną (Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001).

Popularne w ostatniej dekadzie metody dyfrakcyjne i odbiciowe wykorzystujące jako źródło promieniowania synchrotrony również posiadają poważne ograniczenia w kontekście ich zastosowania. Monowarstwy analizowane przy pomocy tych technik muszą bowiem charakteryzować się wysokim stopniem uporządkowania (stan skondensowany) oraz ze względu na stosunkowo długi czas pomiaru - dużą stabilnością (Binks, 1999).

Filmy Langmuira po wyniesieniu na podłoże stałe (szkło, krzem, mikę albo kwarc) mogą być analizowane przy użyciu metod mikroskopowych, wśród których najpopularniejsze są mikroskopia elektronowa i mikroskopia sił atomowych. Problem z zastosowaniem tych technik, wiąże się z różnicami, jakie mogą pojawić się w strukturze filmów po wyniesieniu ich na podłoże stałe, w szczególności w odniesieniu do układów wieloskładnikowych (Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001; Barnes i Gentle, 2011).

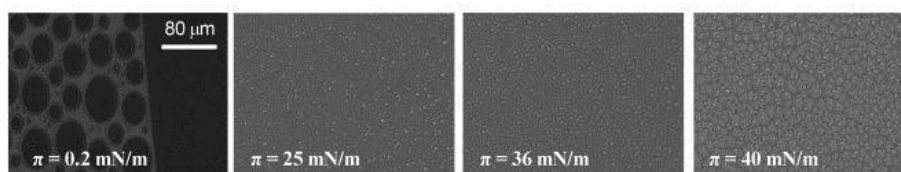
I.3.5.1. Mikroskopia kąta Brewstera w badaniu monowarstw

Analiza morfologiczna monowarstw Langmuira jest możliwa dzięki zróżnicowaniu ich gęstości powierzchniowej oraz istnieniu zjawiska anizotropii faz granicznych. W ośrodkach jednorodnych światło rozchodzi się po liniach prostych, a jego prędkość jest funkcją gęstości optycznej. Jeśli na drodze wiązki światła pojawi się ośrodek o innej gęstości optycznej, to część wiązki padającej zostanie na granicy faz odbita, natomiast część przejdzie do ośrodka drugiego. W przypadku gdy rozpatrywana granica faz ma charakter fresnelowski, tzn. współczynnik załamania światła zmienia się skokowo od n_1 do n_2 , a padające światło jest p spolaryzowane to dla pewnego kąta zwanego kątem Brewstera (β_B) natężenie wiązki odbitej będzie równe zero (Binks, 1999). Kąt ten zdefiniowany jest następująco:

$$\tan \beta_B = \frac{n_1}{n_2} \quad (\text{I.30})$$

i na granicy faz woda/powietrze wynosi ok 53° .

Monowarstwy Langmuira utworzone na granicy faz posiadają pewną skończoną grubość (zatem i pewien charakterystyczny współczynnik załamania n), a natężenie wiązki p -spolaryzowanej odbitej od nich nie zanika zupełnie, ale wykazuje minimum intensywności i może być rejestrowane przy pomocy czułego detektora (Binks, 1999). Podczas kompresji monowarstwy zmienia ulega grubość warstewek oraz ich współczynnik załamania, tym samym wiązka odbita od poszczególnych obszarów filmu charakteryzuje się różnym natężeniem. Na podstawie zmian tego natężenia uzyskuje się obraz powierzchni (Hönig i Möbius, 1991). Przykładowe obrazy uzyskane dla mieszaniny POPE/POPG podczas kompresji prezentuje rys. I.24.



Rys. I.24 Obrazy BAM zarejestrowane w czasie kompresji dla mieszanej monowarstwy (Wydro, 2013)

Mikroskopia BAM pozwala na obserwację stopnia uporządkowania filmu podczas kompresji, śledzenie przejść fazowych oraz powstawania domen (Kaganer i wsp., 1999; Miñones Jr i wsp., 2003). BAM jest też dobrym narzędziem do analizy mechanizmu kolapsu (Lee, 2008). Zestawienie obrazów BAM z zarejestrowaną izotermą π -A umożliwia podanie dokładnej charakterystyki badanych warstewek, a pomiary wykonane w funkcji temperatury pozwalają dodatkowo na stworzenie diagramów fazowych (Ramos i Castillo, 1999).

I.3.5.2 Pomiary dyfrakcyjne – GIXD

Na przestrzeni ostatnich dwóch dekad nastąpił znaczący rozwój technik dyfrakcyjnych w badaniach monowarstw Langmuira. Aby uzyskać dobry stosunek sygnału do szumu przy niewielkiej grubości tych warstewek (a zatem i małej ilości obiektów rozpraszających promieniowanie) konieczne jest stosowanie wiązek o dużej intensywności. Dopiero zastosowanie źródeł synchrotronowych dających dobrze

skolimowaną wiązkę promieniowania X pozwoliło w pełni wykorzystać metody dyfrakcyjne do badania struktury nierozpuszczalnych monowarstw na granicy faz ciecz/gaz (Kaganer i wsp., 1999, Barnes i Gentle, 2011, Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001). Wśród tych technik rozróżnia się dwie metody, z których jedna opiera się na zjawisku odbicia promieniowania X (*XR - X-ray reflectivity*) i dostarcza informacji na temat rozkładu gęstości elektronowej wzdłuż prostej prostopadłej do granicy faz (a zatem o orientacji polarnych głów znajdujących się wewnątrz subfazy), zaś druga metoda - GIXD - wykorzystuje zjawisko dyfrakcji promieniowania X i pozwala uzyskać informację na temat struktury filmów Langmuira w płaszczyźnie powierzchni (Möbius i Miller, 2001). W czasie eksperymentów wykonanych w ramach niniejszej pracy wykorzystano drugą z wymienionych wyżej technik i dlatego tylko ona zostanie tutaj opisana. Szczegółowo metody rozproszeniowe zostały opisane w literaturze (Binks, 1999; Als-Nielsen i wsp., 1994).

Podczas eksperymentu GIXD wiązka promieniowania X pada na monowarstwę pod pewnym bardzo małym kątem, a dyfrakcja jest możliwa tylko wtedy, gdy w monowarstwie występuje struktura zbliżona do struktury siatki dyfrakcyjnej (co czyni z niej dwuwymiarowy odpowiednik kryształu) oraz gdy linie tej "siatki" spełniają warunek Bragga:

$$d_{hk} = \frac{n\lambda}{2 \sin \alpha} \quad (I.31)$$

gdzie d_{hk} jest odległością pomiędzy liniami sieci dwuwymiarowej (h i k oznaczają wskaźniki Millera), λ jest długością fali promieniowania X, n jest liczbą całkowitą oznaczającą rząd ugięcia ($n = 1, 2, 3, \dots$), a α jest kątem między wiązką promieni padających, a płaszczyzną na której dochodzi do rozproszenia (Barnes i Gentle, 2011).

Intensywność promieniowania ugiętego na monowarstwie analizowana jest w odniesieniu do kąta α oraz kąta $2\theta_{xy}$ leżącego w płaszczyźnie monowarstwy pomiędzy kierunkiem promieniowania padającego a rozproszonego. Pomiar tych kątów umożliwia określenie odległości między liniami w badanej sieci dwuwymiarowej.

W rzeczywistości monowarstwy na granicy faz nie tworzą dwuwymiarowych kryształów, mogą natomiast być traktowane jako duży konglomerat zorganizowanych

dwuwymiarowych domen, analogicznie do próbki proszku (Möbius i Miller, 2001). Konsekwencją tego jest niemożność oddzielenia horyzontalnych składowych wektorów rozpraszania (Q_x i Q_y) i dlatego podczas eksperymentu mierzone są one jako wspólny wektor rozpraszania w płaszczyźnie monowarstwy:

$$Q_{xy} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{2\theta_{xy}}{2} \quad (I.32)$$

Maksimum intensywności promieniowania rozproszonego na otrzymanym widmie (Q_{xy}) nosi nazwę pików Bragga.

Składowa z wektora rozpraszania zdefiniowana jest następująco:

$$Q_z = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \alpha \quad (I.33)$$

Zakres zmian intensywności rozpraszania w kierunku z ograniczony jest do tzw. prętów Bragga, wzdłuż których intensywność zmienia się w funkcji czynnika struktury cząsteczek:

$$F(h, k, Q_z) = \int \rho(r) e^{i(Q_{hk} \cdot r + Q_z z)} d^3r \quad (I.34)$$

Piki Bragga przedstawiają zatem zależność intensywności rozpraszania od wektora Q_{xz} w płaszczyźnie monowarstwy, natomiast pręty Bragga - w kierunku składowej z (Kjaer, 1994).

Intensywność zmian można wykreślić w funkcji obydwu składowych, dzięki czemu możliwe jest stworzenie map konturu. Liczba pików i prętów Bragga uzyskanych dla danej powierzchni dostarcza informacji zarówno odnośnie faz obecnych na granicy ośrodków woda/gaz jak i o samej strukturze dwuwymiarowej siatki (Möbius i Miller, 2001, Binks, 1999).

Dodatkowych informacji o zakresie uporządkowania w płaszczyźnie xy oraz wzdłuż z dostarcza analiza szerokości połówkowej (ω) pików i prętów Bragga. Wielkość opisująca uśrednione rozmiary domen w płaszczyźnie xy (tzw. długość koherentna L_{xy}) wyraża się wzorem:

$$L_{xy} = 0,9 \frac{2\pi}{\omega(Q_{xy})} \quad (I.35)$$

Analogicznie do powyższego wzoru można zapisać równanie na długość koherentna L_z umożliwiającą obliczenie grubości warstewki:

$$L_z = 0,9 \frac{2\pi}{\omega(Q_z)} \quad (I.36)$$

Jeśli rozpatrywana dwuwymiarowa siatka jest heksagonalna to łańcuchy acylowe zorientowane będą prostopadle do powierzchni subfazy. W przypadku zaburzenia tej struktury, łańcuchy będą odchylone od normalnej do granicy faz. Kąt odchylenia można obliczyć korzystając ze zależności I.37:

$$\operatorname{tg} \tau = a \frac{Q_z}{2\pi} \quad (I.37)$$

gdzie a jest parametrem sieci, natomiast Q_z maksimum intensywności prętu Bragga (Möbius i Miller, 2001; Binks, 1999).

I.3.6. Monowarstwy Langmuira jako laboratoryjny model błony biologicznej

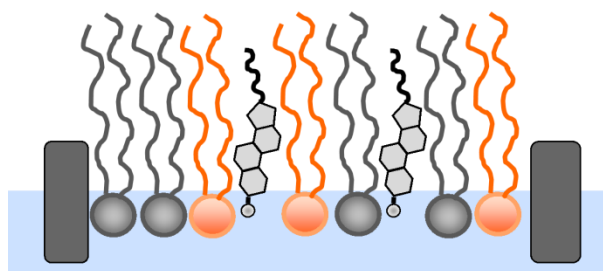
Badania wskazujące na występującą w błonach biologicznych separację faz oraz potwierdzona obecność w błonach specyficznych domen lipidowych stały się przyczyną do ponownego, dokładnego przyjrzenia się ich strukturze. Wykorzystanie błon wyizolowanych z żywych komórek dostarcza jednak wiele problemów. Preparatyka błon jest procesem złożonym, a otrzymane wyniki są trudne w interpretacji i często dają tylko ogólne spojrzenie na zagadnienie wzajemnych oddziaływań (Hąc- Wydro i Dynarowicz - Łątka, 2008). Dlatego też - w celu precyzyjnego opisanie interakcji zachodzących pomiędzy konkretnymi składnikami błon (np. lipid-białko, lipid-lipid) bądź pomiędzy składnikami błon i aktywnymi biomolekułami (np. antybiotyk - lipid) działającymi na poziomie membran biologicznych - stosuje się modele laboratoryjne (Maget-Dana, 1999). W literaturze można znaleźć wiele przykładów stosowanych powszechnie modeli błon. Do najbardziej popularnych zalicza się: liposomy (Kell, 1981), czarne błony lipidowe (Ottova i Tien, 1997), błony na podłożu stałym (Richter i wsp., 2006) oraz monowarstwy Langmuira (Peetla i wsp., 2009). Niestety, żaden z

wymienionych modeli nie jest w pełni uniwersalny. Użycie liposomów ograniczone jest ich promieniem krzywizny zdeterminowanym przez rozmiar głów polarnych oraz niską zdolnością modyfikacji stanu fizykochemicznego, czarne błony lipidowe charakteryzuje niska wytrzymałość, natomiast użycie modeli błon zdeponowanych na podłożu stałym ograniczone jest małą liczbą dostępnych powierzchni nie wpływających na wzajemne oddziaływania pomiędzy składnikami (Hąc- Wydro i Dynarowicz – Łątka, 2008).

Monowarstwy Langmuira utworzone w wyniku rozprzestrzenienia się nierozpuszczalnych, amfifilowych związków na powierzchni fazy ciekłej stanowią prosty model błon biologicznych, umożliwiając określenie oddziaływań pomiędzy składnikami jak również ocenę procesu inkorporacji aktywnych biologicznie cząsteczek do warstwy.

Niewątpliwie zaletą tych dwuwymiarowych systemów jest łatwość modyfikacji parametrów fizykochemicznych podczas eksperymentu, takich jak właściwości subfazy (siła jonowa, pH), temperatura oraz upakowanie cząsteczek. Jako, że parametry te można zmieniać w sposób kontrolowany i praktycznie bez ograniczeń, istnieje możliwość odwzorowania warunków najbardziej zbliżonych do fizjologicznych (Eeman i Deleu, 2010).

Wyniki badań przeprowadzonych przez Marsha wskazują na wysoką kompatybilność tego modelu (stanowiącego niejako „połowę” biwarstwy lipidowej) z modelami dwuwarstwowymi (rys. I.25).



Rys. I.25 Model monowarstwy Langmuira jako błony biologicznej

Autor pokazuje, że charakterystyki fizykochemiczne (m.in. ściśliwość, stan fizyczny, powierzchnia zajmowana przez cząsteczkę) monowarstw Langmuira utworzonych przez cząsteczki fosfolipidów i odpowiadających im dwuwarstw są do

siebie zbliżone, wtedy gdy monowarstwy skompresowane są do ciśnienia powierzchniowego o wartości z przedziału 30 - 35 mN/m. Marsh w swojej pracy sugeruje również, że stan cieczy rozprężonej w monowarstwie odpowiada fazie ciekłej dwuwarstwy (Marsh, 1996).

Zaletą stosowania techniki Langmuira jest także możliwość ścisłego kontrolowania składu modelowych błon. Wykorzystanie szerokiej gamy dostępnych lipidów, różniących się strukturą oraz dobranie odpowiednich proporcji składników umożliwia modelowanie wielu typów błon biologicznych, w tym błon komórek zmienionych patologicznie.

Na przestrzeni ostatnich lat monowarstwy Langmuira wykorzystywane są głównie do określania roli konkretnych składników błon biologicznych w mechanizmie działania leków o mechanizmie działania na poziomie błonowym (np. leków przeciwzapalnych, przeciwbólowych lub przeciwnowotworowych). W zależności od natury badanych substancji stosuje się jedno z dwóch podejść eksperymentalnych. Jeśli badane związki są rozpuszczalne w wodzie, wykorzystuje się zjawisko penetracji. W pierwszym kroku na powierzchni subfazy tworzy się monowarstwę lipidową, którą kompresuje się do określonego ciśnienia. Następnie, przy użyciu mikrostrzykawki badane biomolekuły aplikuje się bezpośrednio do subfazy, skąd ulegają adsorpcji do monowarstwy na powierzchni. Istnieje też możliwość naniesienia monowarstwy lipidowej na subfazę zawierającą już aktywne molekuły. Częsteczki bioaktywne penetrując monowarstwę, oddziałują z tworzącymi ją lipidami, co przejawia się zmianą ciśnienia powierzchniowego i umożliwia określenie wzajemnych interakcji. Metoda ta jest szeroko stosowana w badaniu oddziaływań hydrofilowych białek z lipidami błonowymi (Maget-Dana, 1999). Drugie podejście dotyczy substancji nierozpuszczalnych w wodzie. Procedura eksperymentalna obejmuje wówczas tworzenie mieszanin o ściśle określonej proporcji substancji badanej do lipidów, nanoszenie tak przygotowanych roztworów na powierzchnię subfazy i rejestrację izoterm π -A (Hąc- Wydro i Dynarowicz – Łątka, 2008, Eeman i Deleu, 2010).

Przykładem leku, którego mechanizm działania po części wyjaśniono dzięki zastosowaniu techniki Langmuira jest amfoterycyna B, (AmB) - przeciwgrzybiczy makrolidowy antybiotyk jonoforowy działający na poziomie błony. Powinowactwo leku

do steroli błonowych badane w mieszaninach AmB/cholesterol i AmB/ergosterol nie wyjaśniło początkowo selektywności tego antybiotyku względem komórek grzyba. Dopiero porównanie oddziaływań pomiędzy składnikami w tych układach z oddziaływaniami w układach DPPC/cholesterol i DPPC/ergosterol pozwoliło wyjaśnić większe powinowactwo leku względem komórek grzyba (cząsteczki DPPC i cholesterolu tworzą bowiem silne kompleksy, które nie są naruszane przez cząsteczki leku). Co więcej, okazało się, że oddziaływania w układach antybiotyk/fosfolipid wpływają na poziom toksyczności badanych leków (Hąc- Wydro i Dynarowicz – Łątka, 2008;).

Kolejną grupą związków analizowanych kompleksowo metodą Langmuira są syntetyczne lipidy antynowotworowe. Najczęściej badanym związkiem z tej rodziny leków jest edelfozyna. Badania przeprowadzone przez Hąc-Wydro wskazują m.in. na istnienie związku pomiędzy aktywnością edelfozyny a stężeniem gangliozydów w błonie (Hąc-Wydro i Dynarowicz - Łątka P., 2010). Wyniki innych badań sugerują dodatkowo korelację między wychwytem edelfozyny a ilością cholesterolu błonowego (Diomedea i wsp, 1990).

Podobne eksperymenty zostały wykonane dla innych związków charakteryzujących się aktywnością biologiczną m.in. karetonoidów oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych (Gruszecki i Strzałka, 2005; Milanowska i wsp., 2003; Shibata i wsp., 2001; Seoane i wsp., 2001). Monowarstwy Langmuira wykorzystuje się także do modelowania traft lipidowych. W tym celu najczęściej stosuje się mieszaniny sfingomieliny i cholesterolu w stosunku 2:1 (Jablin i wsp., 2010). Analiza izoterm π -A oraz obrazowanie domen przy pomocy mikroskopu BAM dostarczyła wielu informacji odnośnie uporządkowania tych struktur lipidowych jak również wzajemnych oddziaływań pomiędzy ich składnikami ((Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001).

W świetle opisanych przykładów monowarstwy Langmuira prezentują się jako doskonałe narzędzie służące do modelowania błon biologicznych. Możliwość precyzyjnej regulacji parametrów pomiaru i składu monowarstwy oraz prostota wykonania eksperymentu należą niewątpliwie do największych zalet tej metody. Znacząca ilość bioaktywnych molekuł zdolnych do tworzenia

nierozpuszczalnych warstw na granicy faz woda/powietrze otwiera drogę do badania mechanizmów ich działania właśnie przy zastosowaniu tej techniki.

II. Część doświadczalna

II. 1. Metodologia przeprowadzonych badań

II.1.1. Odczynniki i związki wykorzystane w badaniach

Do badań w ramach prezentowanej pracy wybrano trzy alkilofosfocholiny, będące przedstawicielami nowej generacji leków o działaniu antynowotworowym:

- heksadecylfosfochoinę (miltefosina, Miltex®, HePC) zakupioną w firmie Avanti Polar Lipids,
- oktadecylfosfochoinę (OcPC) zakupioną w firmie A.G. Scientific,
- erucylfosfochoinę (ErPC) dostarczoną bezpłatnie do badań przez Aeterna Zentaris GmbH,

oraz pięć lipidów błonowych:

- cholesterol (Chol), zakupiony w Sigma Aldrich,
- 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfochoinę (DPPC), zakupioną w Avanti Polar Lipids,
- 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfochoinę (POPC), zakupioną w Avanti Polar Lipids,
- N-heksadekanoilo-D-erytro-sfingozylofosforylocholine (sfingomielina, Sph) zakupioną w Avanti Polar Lipids,
- Gangliozyd (GM₁), zakupiony w Avanti Polar Lipids.

Wszystkie powyższe związki charakteryzowały się wysoką klasą czystości (>99%) i były używane bez dodatkowego oczyszczania. Powyższe lipidy były preparatami syntetycznymi, za wyjątkiem Sph (izolowanej z jaja kurzego) oraz GM₁ (wyizolowanego z tkanki mózgowej wołu). Struktury chemiczne badanych substancji zostały przedstawione w części literaturowej niniejszej pracy (rys. I.3-I.6).

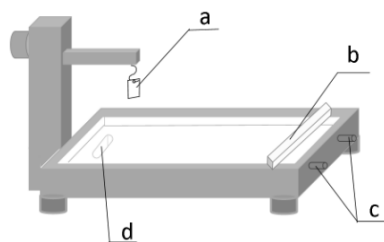
Jako rozpuszczalników do czyszczenia sprzętu użyto chloroformu oraz metanolu zakupionych w firmie POCh, o czystości $\geq 99\%$. Natomiast do sporządzania roztworów

zastosowano natomiast chloroform przeznaczony do HPLC stabilizowany metanolem o czystości $\geq 99.9\%$ (Sigma Aldrich).

W większości przeprowadzonych eksperymentów fazą nośną była woda destylowana, oczyszczona dodatkowo w systemie Millipore o oporności $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. W pojedynczych doświadczeniach jako subfazę zastosowano roztwór buforowy Theorella – Stenhagena (Teorell i Stenhagen, 1938). W celu sporządzania roztworu buforowego w 1 litrze wody podwójnie destylowanej rozpuszczono wodorotlenek sodu (27,44 g), kwas cytrynowy (14 g), kwas borowy (7,08 g) oraz stężony kwas fosforowy (6,78 cm³). Żądane pH roztworu buforowego otrzymywano przez dodanie do niego odpowiedniej ilości 2 M wodnego roztworu kwasu solnego.

II.1.2. Układ pomiarowy

Do utworzenia oraz badania monomolekularnych warstw na granicy faz gaz-ciecz służy przyrząd zwany wagą (wanną) Langmuira. Pomiary w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano na dwóch systemach: NIMA 611 (stanowiącym wyposażenie pracowni Zespołu Fizykochemii Zjawisk Międzyfazowych Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego) oraz KSV NIMA (stanowiącym wyposażenie Pracowni Badań Biofizycznych Wydziału Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego). Schemat wagi Langmuira NIMA 611 zastosowanej w pomiarach przedstawia rys. II.1.



Rys.II.1. Schemat wagi Langmuira stosowanej podczas badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, NIMA 611: a – Płytki Willhelmy'ego, b – ruchoma barierka, c- wyjście termostatu, d – studnia do wynoszenia warstw na stałe podłoże;

Waga NIMA 611 na której wykonano większość pomiarów składa się z płytkiej wanny o powierzchni 600 cm², wykonanej z jednolitego kawałka teflonu i wyposażonej w jedną ruchomą teflonową barierkę. Dodatkowo w wannie znajduje się specjalne wgłębienie, nazwane studnią, pozwalające na wynoszenie utworzonych na powierzchni wody monowarstw na podłoża stałe. Ruch barierki umożliwiający

kompresje monowarstwy z prędkością od 1 do 250 cm²/min zapewnia silnik krokowy. Waga KSV wyposażona jest natomiast w teflonową wanienkę o powierzchni 273 cm² oraz dwie symetryczne, ruchome barierki, mogące poruszać się z szybkością w zakresie od 0,075 do 202,5 cm²/min. Do pomiaru ciśnienia powierzchniowego metodą tensjometru Wilhelmy'ego stosowano wysokiej czystości bibułę chromatograficzną (Whatman Chr1) o wymiarach 1 cm na 2,5 cm. Waga Langmuira została umieszczona wewnątrz szklanej obudowy (zabezpieczającej przed niepożądanym wpływem czynników zewnętrznych) na stole antywibracyjnym. Tensjometr zintegrowany był z komputerem umożliwiającym precyzyjne sterowanie parametrami doświadczenia oraz elektroniczną rejestrację izoterm. Stałą temperaturę subfazy podczas przebiegu eksperymentu zapewniał w przypadku wagi firmy NIMA termostaat firmy Julabo, natomiast podczas pomiarów na wadze KSV – termostaat Lauda.

Do pomiaru zmian potencjału powierzchniowego monowarstwy wykorzystano dodatkowy moduł instalowany na wadze Langmuira - aparat KP2 firmy NFT (Göttingen, Niemcy). Zasadniczymi elementami głowicy pomiarowej jest wibrująca elektroda, zbudowana w oparciu o przetwornik piezoelektryczny oraz platynowa elektroda odniesienia.

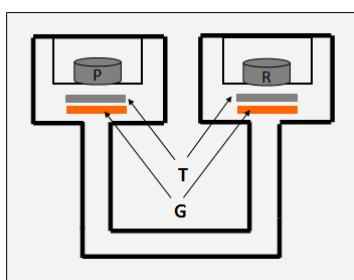
Strukturę filmów obserwowano przy użyciu mikroskopu ultraBAM (Accurion GmbH, Getynga, Niemcy), wyposażonego w laser o mocy 50mW emitujący światło o długości fali 658 nm, polaryzator, analizator oraz kamerę CCD. System detekcji obrazu w zastosowanym module pozwala na uzyskanie rozdzielczości przestrzennej 2 μm oraz 10-krotne powiększenie. Układ umożliwia także wizualizację monowarstw Langmuira w czasie rzeczywistym. Całość zamontowana jest na wadze Langmuira KSV 2000 (700 cm²) wyposażonej w symetryczne barierki (KSV, Helsinki, Finlandia).

Badania z wykorzystaniem rozpraszania promieniowania X (GIXD) przeprowadzone zostały w laboratorium HASYLAB DESY w Hamburgu na stanowisku BW1, gdzie wykorzystuje się promieniowanie synchrotronowe o długości fali $\lambda=1,303\text{\AA}$. Stanowisko to przystosowane jest do badania monowarstw Langmuira. Wykonana z teflonu waga Langmuira o powierzchni ok. 500 cm² wyposażona w pojedynczą barierkę (Riegler & Kirstein, Niemcy) umieszczona jest w szczelnej komorze usytuowanej na goniometrze dyfraktometru. Promieniowanie ugięte na monowarstwie po przejściu

przez kolimator Sollera trafia do jednowymiarowego detektora pozycyjnego (DSP) rejestrującego składową Q_z wektora rozproszenia w zakresie od 0 do $0,9 \text{ \AA}$. Sterowanie pomiarem odbywało się za pomocą programu TASCUM (Risø, Dania).

Zmiany tekstury APCs w funkcji temperatury obserwowano pod mikroskopem polaryzacyjnym Nikon Eclipse wyposażonym w ogrzewany stolik typu Linkam. Podstawowymi elementami mikroskopu są dwa polaryzatory liniowe skrzyżowane względem siebie pod kątem 90° , między którymi umieszcza się badaną substancję. Wszystkie elementy optyczne mikroskopu, wykorzystują optykę Nikon i są wykonane ze szkła odpęzanego, nie wykazującego dwójłomności własnej.

Przemiany fazowe zachodzące w wybranych APCs badano przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego Perkin Elmer Diamond 6000. Kalorymetr typu DSC składa się z dwóch identycznych mikropiecyków dokładnie od siebie odseparowanych, z których każdy wyposażony jest w grzejnik elektryczny oraz termoparę oparową (w celu zapewnienia równości temperatur). W każdym z mikropiecyków umieszczone jest naczynko aluminiowe o pojemności $30 \mu\text{l}$. Zastosowany kalorymetr którego schemat przedstawia rys. II.2. pozwala na badanie próbek w zakresie temperatur od -180°C do 730°C z dokładnością do $0,05^\circ\text{C}$. Kalorymetr zintegrowany jest z komputerem, przy pomocy którego, za pośrednictwem interfejsu, możliwe jest sterowanie pomiarem, oraz rejestracja wyniku eksperymentu.



Rys. II.2. Schemat kalorymetru typu DSC P – naczynko z badaną próbką, R – naczynko z próbką referencyjną, T – termopary, d – grzejniki;

Zarówno kalorymetr skaningowy Perkin Elmer Diamond 6000 jak i mikroskop polaryzacyjny Nikon Eclipse są własnością Pracowni Badań Przejść Fazowych w Ciekłych Kryształach w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Pomiary biologiczne z wykorzystaniem linii komórkowej nowotworu prostaty Du145 przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Spektroskopii Stosowanej IFJ PAN. Indukcję apoptozy przez APCs badano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego firmy Olympus BX51 wyposażonego w filtry U-MNB2 i U-MNG2. Użyty w eksperymencie mikroskop stanowi wyposażenie laboratorium Zakładu Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych IFJ PAN w Krakowie.

II.1.3. Wpływ warunków eksperymentalnych na przebieg izoterm.

Dla wielu związków zarówno stabilność otrzymywanych monowarstw, jaki i kształt rejestrowanych izoterm π -A silnie zależą od kilku czynników. Czynniki te można podzielić na trzy grupy. Do pierwszej zalicza się ogół parametrów fizykochemicznych pomiaru, takich jak temperatura subfazy i jej pH, natomiast druga grupa czynników obejmuje procedurę przygotowania roztworów i ich mieszanin oraz metodykę prowadzonych eksperymentów, trzecia zaś grupa czynników związana jest z czystością użytych odczynników i związków chemicznych, szkła i sprzętu laboratoryjnego oraz stosowanej podczas badań aparatury.

Dosyć dobrze poznany jest wpływ pH subfazy na stabilność monowarstw i przebieg krzywych π -A. Wartość pH determinuje rozpuszczalność substancji filmotwórczej, a zatem zmieniając pH można zapobiegać (albo ułatwiać) rozpuszczaniu się badanych związków w fazie wodnej, powodując zmianę kształtu i położenia izoterm (Miñones i wsp., 2004). Również zależności temperaturowe izoterm π -A są szeroko opisane. Powszechnie przyjmuje się, że wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się powierzchnia przypadająca na cząsteczkę w monowarstwie, a utworzone filmy mają charakter bardziej rozprężony (Yun i wsp., 2003). Wynika to ze zwiększonej elastyczności łańcuchów węglowodorowych - wzrost temperatury powoduje bowiem zwiększenie energii wewnętrznej molekuł, co z kolei zwiększa oddziaływania o charakterze odpychającym pomiędzy hydrofobowymi łańcuchami. W literaturze przedmiotu można jednak znaleźć wiele prac opisujących odstępstwa od tej reguły, spośród których na uwagę zasługuje praca Nostro i Gabrielli (Nostro i Gabrielli, 1993). Autorzy prezentują eksperyment podczas którego na różnych subfazach (wodzie, wodnym roztworze uryny oraz wodnym roztworze sacharozy) rejestrowali w funkcji temperatury (w zakresie od 20°C do 35°C) izotermy dla trzech alkoholi różniących się

długością łańcucha hydrofobowego ($C_{16}OH$, $C_{18}OH$, $C_{20}OH$). W przypadku monowarstw utworzonych przez 16-węglowy alkohol na subfazie wodnej oraz roztworze sacharozy autorzy zaobserwowali postępujące wraz ze wzrostem temperatury zmniejszanie się powierzchni przypadającej na cząsteczkę w filmie. Izotermi zarejestrowane dla tego samego alkoholu na subfazie wodnego roztworu mocznika wykazywały z kolei normalne, zgodne z powszechnie przyjętą regułą zachowanie. Spadku wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę w filmie następującemu wraz ze wzrostem temperatury nie można zdaniem autorów przypisać jedynie parowaniu substancji filmotwórczej oraz jej zwiększonej rozpuszczalności. Nostro i Gabrielli sugerują, że na anomalne zachowanie z jednej strony wpływ mają oddziaływania międzycząsteczkowe (zarówno hydrofilowe, jak i hydrofobowe), zaś z drugiej - zmiana struktury monowarstw powodowana zmianą subfazy (Nostro i Gabrielli, 1993). W miarę wzrostu temperatury obserwuje się często spadek wartości ciśnienia, przy którym następuje załamanie filmu, co świadczy o mniejszej jego stabilności. Również dodanie elektrolitu do subfazy wpływa na zachowanie się monowarstw. Aston i Herrington wskazują na silne - prowadzące do rozprężenia monowarstw - interakcje pomiędzy polarnymi głowami badanych przez nich związków a elektrolitem (Aston i Herrington, 1989). Z kolei Lee postuluje, że zachowanie filmu uwarunkowane jest rodzajem obecnych w subfazie jonów. I tak, jony dwuwartościowe powodują kondensację, a zatem usztywnienie filmów, natomiast dodatek jonów jednowartościowych zwiększa ich fluidyzację (Lee, 2008). Na kształt rejestrowanych izoterm wpływa także sposób przygotowywania roztworów, a w szczególności rodzaj stosowanych rozpuszczalników. Zarówno Gaines jak i Barnes za najbardziej odpowiednie rozpuszczalniki uważają związki obojętne o temperaturze wrzenia z zakresu 40 - 80°C, niereagujące ani z rozpuszczoną w nich substancją ani z subfazą. Jeśli stosowany rozpuszczalnik paruje słabo, jego cząsteczki mogą podczas rejestracji izotermi π -A znajdować się w monowarstwie, modyfikując tym samym wewnętrzną strukturę filmu. Obecnie do najczęściej stosowanych rozpuszczalników zalicza się chloroform, benzen oraz heksan (Gains, 1966; Barnes i Gentle, 2011).

Sam sposób przygotowania filmów mieszanych również wpływa na właściwości otrzymanych filmów. Istnieją dwie podstawowe techniki otrzymania monowarstw wieloskładnikowych. Pierwsze podejście opiera się na oddzielnym naniesieniu na

subfazę substancji badanych, drugie - na naniesieniu już gotowych mieszanin. W przypadku, gdy jeden ze składników jest rozpuszczalny w wodzie często stosuje się trzeci sposób, polegający na wstrzykiwaniu tego składnika bezpośrednio do subfazy (de Silva i wsp., 1998). De Silva i wsp. porównali izotermy otrzymywane za pomocą każdej z wyżej wymienionych technik i wyciągnęli wniosek, że najbardziej powtarzalną metodą jest technika oparta na nanoszeniu gotowych mieszanin. Według tych samych autorów kształt izoterm może być również uwarunkowany czasem, jaki upływa pomiędzy nakropieniem badanej substancji na subfazę, a chwilą rozpoczęcia pomiaru (de Silva i wsp., 1998). Przebieg krzywych π -A może także zależeć od szybkości, z jaką sprężana jest monowarstwa. Powolna kompresja może powodować przechodzenie cząsteczek do subfazy i przejawiać się mniejszymi powierzchniami przypadającymi na cząsteczkę w monowarstwie (Gains, 1966). Według innych autorów na wynik wpłynąć może geometria wanienki i barierki oraz ustawienie względem nich płytki Wilhelmgiego. Często podczas pomiaru z użyciem jednej barierki zaobserwować można odchylenie płytki Wilhelmy'ego z pozycji wertykalnej (Constantino i wsp.) Kolejnym ważnym czynnikiem warunkującym kształt i położenie krzywych pomiarowych jest ilość cząsteczek naniesionych na powierzchnię fazy nośnej. Zdarza się, że zbyt duża ilość badanej substancji powoduje tworzenie się agregatów (Dynarowicz-Łątka i wsp., 1999). Należy pamiętać, że w przypadku gdy różna ilość cząsteczek naniesionych na subfazę zmienia kształt bądź położenie izoterm π -A niemożliwe staje się badanie oddziaływań w układach wieloskładnikowych.

Z kolei, aby wyeliminować trzecią grupę czynników wpływających na wyniki pomiarów wymagane jest przestrzeganie ściśle określonych zasad czystości. Bardzo ważne jest dokładne czyszczenie zarówno szkła laboratoryjnego jak i całej powierzchni wagi oraz barierki. Jednym z problemów związanych z czyszczeniem wagi przy pomocy chusteczek lub wacików jest obecność na ich powierzchni związków powierzchniowo czynnych, które mogą spowodować rejestrację tzw. "ghost-isotherms" (Schneider i wsp., 1995). Technika monowarstw Langmuira wymaga stosowania wysokiej klasy czystości odczynników i związków chemicznych. Wysoką czystość fazy nośnej uzyskuje się na drodze kilkukrotnego sprężania przy pomocy barierki powierzchni subfazy i usuwania zanieczyszczeń z jej powierzchni przy użyciu pompy ssącej. Powszechnie subfazę uznaje za czystą, wtedy gdy wartość ciśnienia

powierzchniowego π nie przekracza wartości 0,1 mN/m. Należy zadbać również o to, aby urządzenie pomiarowe znajdowało się wewnątrz osłony chroniącej przed zanieczyszczeniami z zewnątrz oraz ruchami mas powietrza.

II.1.4. Procedura badawcza

Badane związki przechowywane były w temperaturze -20°C. ErPC jako substancja silnie hydroskopijna, dodatkowo przechowywana była w eksyktorze, w którego dolnej części umieszczony był bezwodny chlorek wapnia. Roztwory przygotowywano w kolbkach pomiarowych o pojemności 10 cm³ (klasa A, ± 0.025 cm³, SIMAX). W celu przygotowania roztworów wyjściowych (jednoskładnikowych), odważano na wadze analitycznej (Mettler Toledo, Hiszpania) kilka miligramów substancji, a następnie rozpuszczano naważkę w mieszaninie metanolu i chloroformu w stosunku objętościowym 1:9. Każdorazowo badany związek rozpuszczany był najpierw w metanolu, a w następnym kroku dolewano chloroform. Stężenia otrzymanych roztworów mieściły się w zakresie 0,2-0,6 mg/ml. Mieszaniny badanych APCs z wybranymi lipidami błonowymi przygotowywano przez zmieszanie ich roztworów wyjściowych w odpowiednich frakcjach molowych. Do przechowywania mieszanin wykorzystano fiołki z ciemnego szkła o pojemności 1,5 ml (Vitrum, Czechy). Szkło używane podczas pomiarów myto w mieszaninie chromowej, kilkakrotnie płukano wodą destylowaną i pozostawiano do całkowitego wyschnięcia. Po przygotowaniu roztworu, kolbki oraz fiołki szczelnie zamykano, zabezpieczono parafilmem (ANCC, USA) i przechowywano w lodówce. Roztwory przygotowywano w dniu pomiaru.

Przed każdym pomiarem wagę dokładnie przemywano bawełnianym wacikiem nasączonym chloroformem, a po jego odparowaniu - metanolem. Następnie przepłukiwano ją trzy- lub czterokrotnie wodą świeżo redestylowaną (Rel 5, POLNA S.A.). Czystość wagi sprawdzano na podstawie wskazań tensjometru, podczas sprężania powierzchni subfazy. Wagę uznawano za czystą, gdy wartość ciśnienia podczas kompresji nie przekraczała 0.1 mN/m. W przypadku wyższej wartości ciśnienia powierzchniowego procedura czyszczenia była powtarzana.

Badane roztwory nanoszono na powierzchnię subfazy przy pomocy szklanej mikrostrzykawki (Hamilton). W zależności od rodzaju roztworu wykorzystywano strzykawki o objętościach 50 $\pm$ 1 μ l, 100 $\pm$ 2 μ l lub 250 $\pm$ 5 μ l. Ilość substancji dobierana była

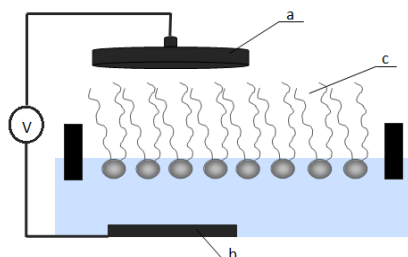
w zależności od masy molowej badanego związku, w ten sposób aby zarejestrowana izoterma obejmowała cały zakres przejść fazowych. Podczas rutynowych eksperymentów przed rozpoczęciem sprężania monowarstwy odczekiwano kilka minut, aby rozpuszczalniki organiczne, w których rozpuszczona była substancja filmotwórcza mogły całkowicie odparować.

Rejestrację izoterm, sterowanie szybkością kompresji monowarstwy oraz odczyt wyników pomiaru zapewniał interfejs będący częścią oprogramowania dostarczonego przez firmę NIMA (lub KSV). Większość eksperymentów przeprowadzono w warunkach standardowych: odczekując 5 min od naniesienia roztworu do rozpoczęcia kompresji, stosując szybkość kompresji $50 \text{ cm}^2/\text{min}$ i temperaturę 20°C , stosując jako subfazę wodę redestylowaną (pH 5,6). W celu szczegółowej charakterystyki filmów utworzonych przez ErPC, przeprowadzono dodatkowo pomiary w temperaturze 10°C i 30°C oraz pomiary dla pH = 3, pH = 6 i pH = 9. Dla tego związku rejestrowano również izotermy przy różnych szybkościach kompresji monowarstwy ($v = 20 \text{ cm}^2/\text{min}$, $v = 50 \text{ cm}^2/\text{min}$, $v = 100 \text{ cm}^2/\text{min}$), oraz dla różnych czasów jakie upłynęły od momentu naniesienia roztworu do chwili rozpoczęcia sprężania. Stabilność monowarstw utworzonych przez ErPC badano poprzez sprężanie monowarstw do określonego ciśnienia, a następnie rejestracji zmian powierzchni w funkcji czasu. Pomiary izoterm dla modelowej błony komórek nowotworu prostaty przeprowadzono w temperaturze 37°C . Bufory Theorella-Stengagena o różnym pH sporządzane były w szklanych kolbach o pojemności 2000 cm^3 i przechowywane w lodówce. Wartość pH roztworów buforowych mierzona była na pH-metrze Elmetron CX-731.

Pomiar ciśnienia powierzchniowego odbywał się z dokładnością do $0,01 \text{ mN/m}$. Bibułki filtracyjne były często wymieniane, w celu wyeliminowania błędów związanych z ich zanieczyszczeniem na drodze adsorpcji cząstek znajdujących się w subfazie bądź na jej powierzchni.

Do pomiaru potencjału powierzchniowego konieczne było zamontowanie na wadze dodatkowego modułu pomiarowego - aparatu KP2 firmy NFT. W tego typu pomiarach, przed rozpoczęciem standardowej procedury pomiarowej platynową elektrodę referencyjną czyści się chloroformem, metanolem i obmywa kilkakrotnie wodą destylowaną, a następnie umieszcza się na dnie wymytej wanny Langmuira. Po

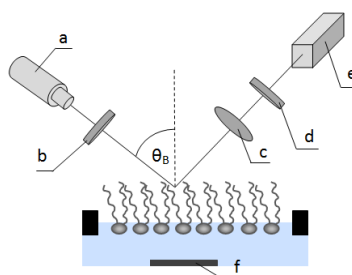
wypełnieniu wanny fazą nośną, w odległości ok. 2mm nad jej powierzchnią umieszcza się elektrodę drgającą. Po wyzerowaniu wartości potencjału dla swobodnej powierzchni wody, nanosi się roztwór badanej substancji. Schemat ideowy pomiaru potencjału powierzchniowego przedstawia rys. II.3.



Rys. II.3. Schemat modułu do pomiaru potencjału powierzchniowego *a* – elektroda wibrująca, *b* – elektroda odniesienia, *c* – monowarstwa

Dalsza część pomiaru odbywa się tak, jak opisano powyżej. Podczas pomiaru należy uważać aby nie zamoczyć elektrody drgającej. Zmiany potencjału powierzchniowego rejestrowane były z dokładnością do ± 10 mV.

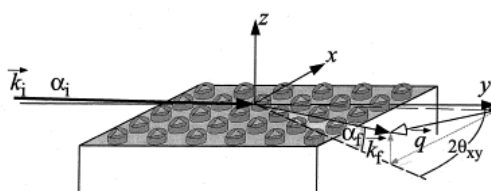
Strukturę monowarstw tworzonych przez APCs obserwowano przy pomocy mikroskopu ultraBAM (Accurion GmbH, Getynga, Germany). Przed rozpoczęciem pomiaru, na dnie wagi Langmuira (KSV) z którą zintegrowany był mikroskop, umieszczano czarną płytkę szklaną. Jej zadaniem było zapobieganie rozpraszaniu światła laserowego przez dno wagi Langmuira. Po wypełnieniu wanny subfazą, oraz naniesieniu roztworu substancji filmotwórczej na jej powierzchnię, każdorazowo przeprowadzano kalibrację mikroskopu. Kalibracji dokonywano poprzez ustawienie mikroskopu na takiej wysokości aby promień lasera padały na granicę faz pod kątem Brewstera, który dla granicy faz woda/powietrze wynosi on $53,1^\circ$.



Rys.II.4. Schemat ideowy mikroskopu BAM *a* – laser, *b* – polaryzator, *c* – obiektyw, *d* – analizator, *e* – kamera CCD, *f* – szklana płytka

Dodatkowo obracając nieznacznie analizatorem ustawiano optymalny kontrast obrazu, natomiast ustawienie ostrości odbywało się poprzez zmianę położenia obiektywu wzdłuż prostopadłej do powierzchni monowarstwy osi. Schemat zastosowanego systemu przedstawia rys. II.4.

Każdorazowo przed rozpoczęciem pomiaru GIDX wykonywano procedury opisane powyżej, związane z przygotowaniem roztworów (ErPC, DPPC i ich mieszanin o ułamkach molowych $X_{\text{ErPC}} = 0,1; 0,3; 0,5; 0,7$ i $0,9$) oraz kalibracją i czyszczeniem wagi Langmuira. Jako fazy nośnej używano wody redestylowanej. Aby zmniejszyć głębokość wody wypełniającej wannę - a tym samym zminimalizować amplitudę powstających na powierzchni subfazy fal - przed rozpoczęciem pomiaru na dnie wagi, umieszczano dokładnie oczyszczoną szklaną płytkę. Po naniesieniu roztworów na subfazę pokrywa komory była szczelnie dokręcana. Następnie w celu zmniejszenia tła i zminimalizowania ryzyka uszkodzenia monowarstwy podczas skanowania komorę wypełniano helem. Po 30 minutach, kiedy zawartość tlenu w komorze spadała do ok. 1% monowarstwa sprężana była do wartości ciśnienia powierzchniowego $\pi = 30$ mN/m (w pojedynczym pomiarze monowarstwę skompresowano do 50 mN/m), która utrzymywana była przez cały czas trwania pomiaru. Na tak przygotowaną monowarstwę kierowano pod stałym kątem padania $\alpha_i = 0,11^\circ$. Intensywność promieniowania ugiętego mierzona była w funkcji kąta $2\theta_{xy}$. Geometrię eksperymentu GIDX prezentuje rys. II.5.:



Rys. II.5. Geometria pomiaru GIDX (Verclas i wsp., 1999)

Badania kalorymetryczne przeprowadzano z użyciem aparatu Perkin Elmer Diamond 6000. Próbkę o masie ok. 7 mg umieszczano w jednym z dwóch aluminiowych naczynek (naczynko referencyjne pozostawało puste). Kalorymetr kalibrowany był względem temperatury topnienia indu i wody. Do stabilizacji temperaturowej podczas eksperymentu użyto ciekłego helu i azotu. Procedura przeprowadzanego eksperymentu była podobna do procedury stosowanej przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego: ogrzewanie od 25°C do 100°C , chłodzenie od 100°C do -50°C , ogrzewanie od -50°C do

temperatury poniżej punktu topnienia, chłodzenie do -100°C oraz dodatkowo ogrzewanie aż do rozpadu próbki. Szybkość chłodzenia i ogrzewania wynosiła $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Wynik pomiaru DSC w postaci krzywej DSC rejestrowany był na monitorze komputera.

Tekstury APCs obserwowano przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego Nikon Eclipse. Przed rozpoczęciem pomiaru kilka miligramów badanej substancji umieszczano pomiędzy dwiema cienkimi szklanymi płytkami, oczyszczonymi uprzednio metanolem. Tak przygotowaną próbkę mocowano w uchwycie mikroskopu. Zmiany tekstury obserwowano podczas procesów chłodzenia i ogrzewania próbki z szybkością $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Do stabilizacji temperatury podczas eksperymentu użyto ciekłego azotu. W pierwszej kolejności podgrzewano próbkę od 25°C do 100°C , a następnie ochładzano ją do temperatury -50°C , potem znów ogrzewano do temperatury niewiele niższej od temperatury topnienia badanego związku (ok. 235°C) i ostatecznie ochładzano do temperatury -100°C .

Komórki linii nowotworu prostaty Du145 hodowano w specjalnych butelkach o powierzchni denka 25 cm^2 . Komórki przesiewano co 7 dni, 3 lub 4 dni po przesiewaniu wymieniano medium. Inkubacja odbywała się w temperaturze 37°C , w atmosferze o 5% stężeniu CO_2 i wilgotności przekraczającej 98%. Stosowano medium RPMI 1640 z 10% dodatkiem cielęcej surowicy płodowej (FCS). Komórki wysiewano na szlaki Petri'ego (uzyskano gęstość na poziomie 50-60% zarośniętego dna w szalce Petri'ego o średnicy 35 mm). Tak przygotowane komórki inkubowano z badanymi lipidami antynowotworowymi w stężeniu $12,5\text{ }\mu\text{M}$, $25\text{ }\mu\text{M}$ oraz $50\text{ }\mu\text{M}$ oraz staurosporyną przez 24h i 48 h. Do detekcji apoptozy użyto testu *Annexin V-FITC Apoptotic Detection Kit*, w skład którego wchodzi dwa znaczniki: aneksyna V i jodek propidyny. Przed użyciem, wszystkie składniki kitu doprowadzano do temperatury pokojowej. Komórki apoptyczne oznaczane były przy pomocy aneksyny – barwnika wiążącego FS, natomiast nekrotyczne identyfikowane były jodkiem propidyny – barwnikiem oddziałującym z helisą DNA i wybarwiającym jądra komórkowe. Wpływ badanych leków na indukcję apoptozy sprawdzano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, pod którym obserwowano komórki oświetlane promieniowaniem niebieskim. Podczas obserwacji stosowano filtry: U-MNB2 - dla aneksyny (ekscytacja 470 - 490 nm) i U-MNG2 - dla jodku propidyny (ekscytacja 530-550 nm).

II. 2. Właściwości fizykochemiczne badanych APCs

W temperaturze pokojowej badane syntetyczne lipidy antynowotworowe są bezwonne i mają postać krystalicznego białego proszku. Charakteryzują się bardzo słabą rozpuszczalnością w wodzie, natomiast stosunkowo dobrą rozpuszczalnością w węglowodorach chlorowanych. Pozostałe informacje dotyczące tych związków zawarte są w poniższej tabeli:

	HePC	OcPC	ErPC
Wzór sumaryczny	$C_{21}H_{46}NO_4P$	$C_{23}H_{50}NO_4P$	$C_{27}H_{56}NO_4P$
Masa cząsteczkowa [g/mol]	407,57	435,6	489,71
Temperatura topnienia [°C]	232-234	Brak danych	248

Tab II.1. Właściwości fizykochemiczne badanych APCs

Rakotomanga i współpracownicy dla HePC oszacowali dodatkowo krytyczne stężenie micelizacji (*critical micelle concentration*, CMC). Według nich wartość CMC na subfazie zawierającej 150mM NaCl mieści się w przedziale od 2-2,5 μ M, natomiast na wodzie destylowanej - 2,5-3 μ M (Rakotomang i wsp., 2004).

Aby lepiej poznać strukturę badanych APCs, zbadać przejścia fazowe oraz sprawdzić czy wykazują ciekłokrystaliczny charakter przeprowadzono pomiary z użyciem mikroskopu polaryzacyjnego, a następnie różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC.

Tekstury badanych związków przedstawiono na rysunkach II.6-II.8.:

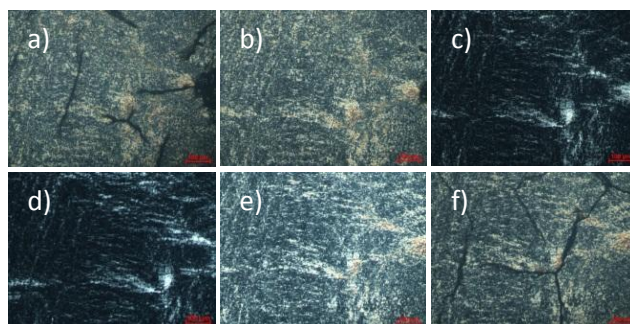


Fig. II.6. Tekstury HePC zaobserwowane podczas grzania (a-d) i chłodzenia (e-f): a) -50°C , Cr1; b) 90°C , Cr2; c) 105°C , N; d) 203°C , N; e) 65°C , Cr2; f) -10°C , Cr1;

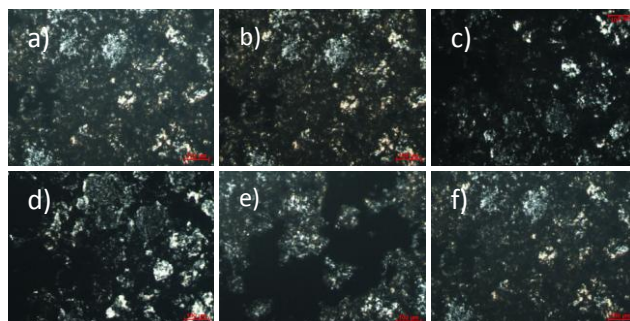


Fig. II.7. Tekstury OcPC zaobserwowane podczas grzania (a-d) i chłodzenia (e-f): a) -8°C , Cr1; b) 80°C , Cr2; c) 130°C , N; d) 215°C , N; e) 70°C , Cr2; f) -80°C , Cr1;

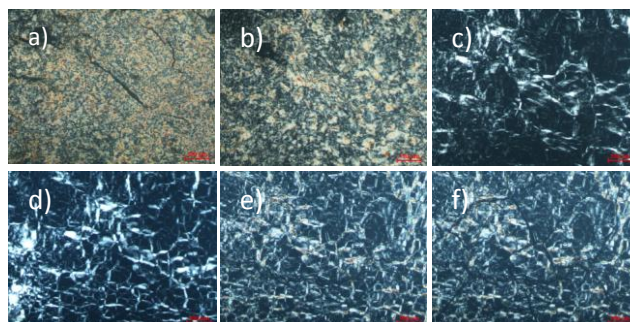


Fig. II.8. Tekstury ErPC zaobserwowane podczas grzania (a-d) i chłodzenia (e-f) w temperaturze: a) -50°C , Cr1; b) 60°C , Cr2; c) 70°C , N; d) 235°C , N; e) -30°C , Cr2; f) -66°C , Cr1;

W kolejnym etapie przeprowadzono pomiary DSC, które zanalizowano w oparciu o powyższe obrazy tekstur. Wyniki prezentuje rys. II.9.

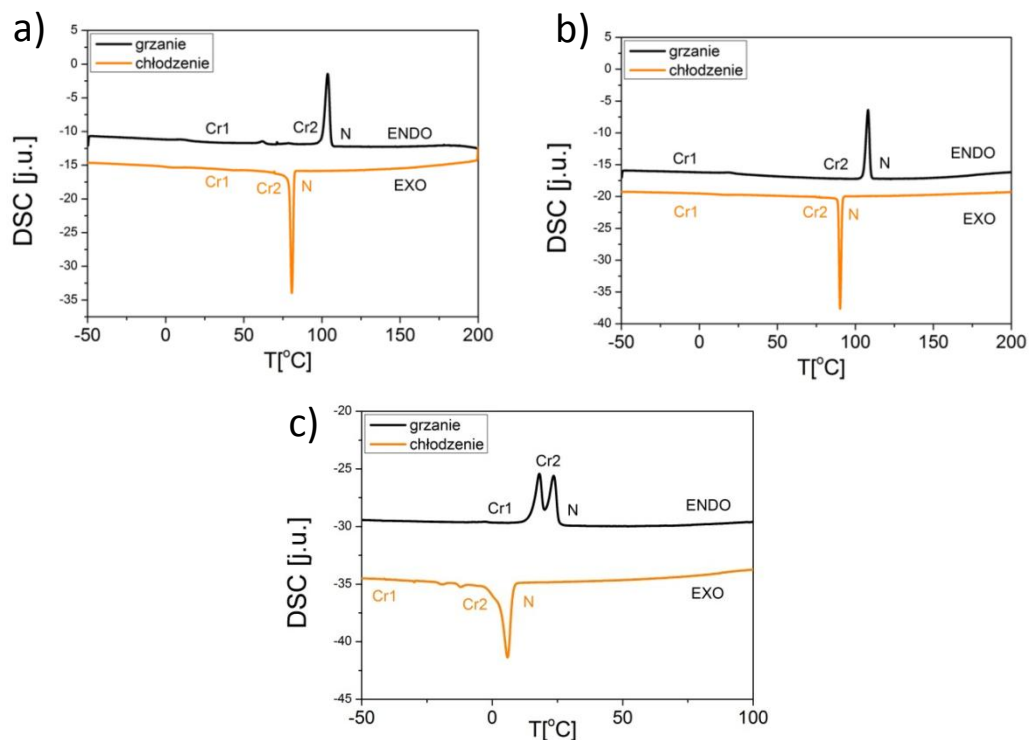


Fig.II.9. Krzywe DSC zarejestrowane z szybkością 10°C/min dla a) HePC; b) OcPC; c) ErPC;

Dla każdego z badanych APCs zarówno podczas grzania jak i chłodzenia widoczne są piki, związane z przejściami fazowymi. Dla dwóch pierwszych syntetycznych lipidów antynowotworowych HePC i OcPC podczas grzania pojawiają się wyraźne, pojedyncze piki w temperaturach 102°C i 108°C (odpowiednio dla HePC i OcPC). Piki te związane są z przejściem fazowym pomiędzy fazą krystaliczną (Cr2), a fazą nematyczną (N). Dla ErPC podczas grzania obserwuje się natomiast pik podwójny (temp. 12°C (Cr1-Cr2) i 23,5 °C (Cr2-N)). Podczas chłodzenia dla wszystkich trzech badanych próbek obserwowane piki są pojedyncze. Temperatuty przejść określone w oparciu o przebieg powyższych krzywych oraz zmiany entalpii wyliczone na podstawie zależności opisanej równaniem:

$$\Delta H = \int_{T_A}^{T_B} \frac{\Delta Q}{\Delta t} \frac{\Delta t}{\Delta T} \Delta T \quad (\text{II.1})$$

gdzie $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ jest różnicą mocy cieplnej dostarczanej do próbki i odnośnika, a $\frac{\Delta t}{\Delta T}$ jest stałą, zadaną szybkością zmian temperatury (Wróbel i Marzec, 2006) prezentuje poniższa tabela.

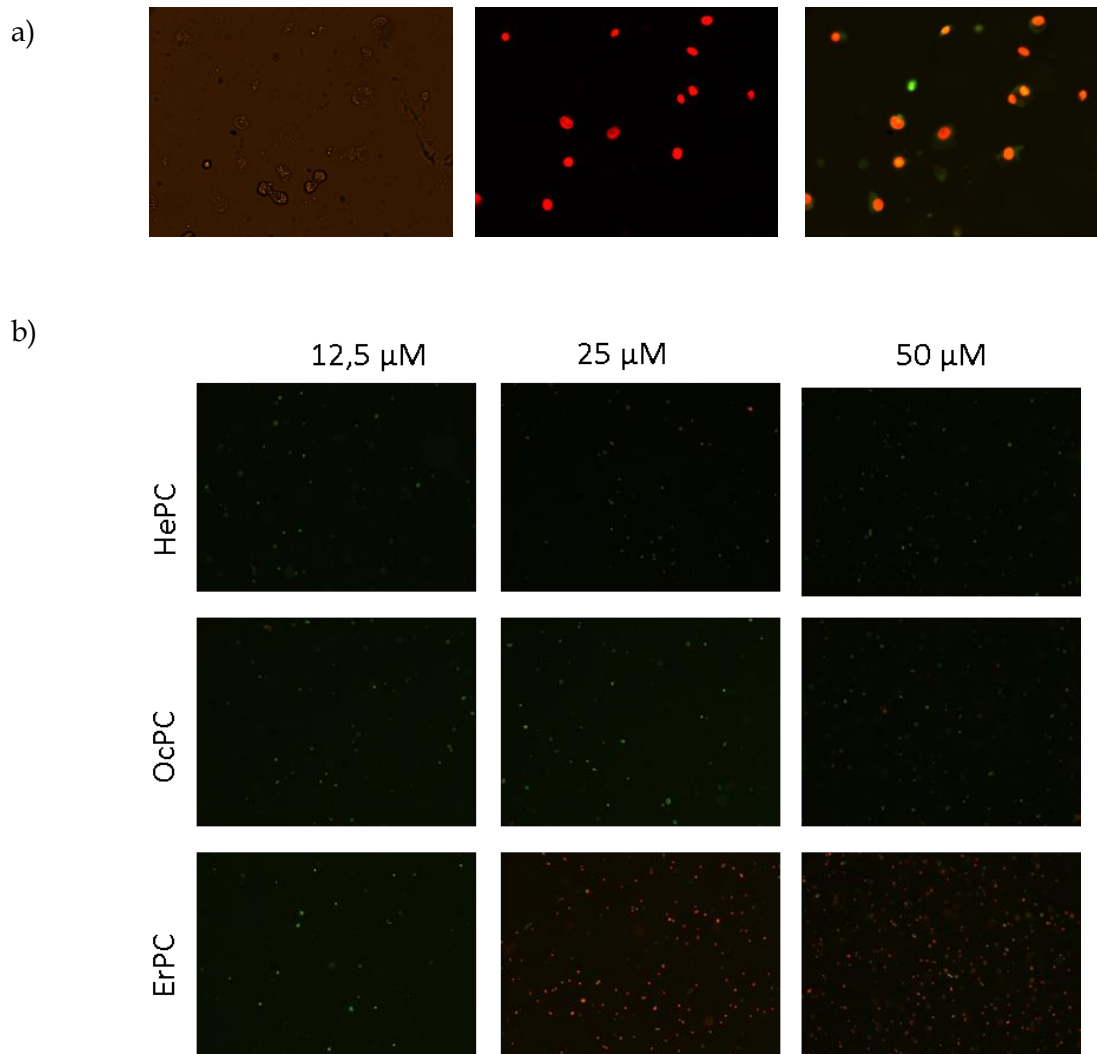
			Temperatura przejścia [°C]			Zmiana entalpii ΔH [kJ/mol]
No.			początek	środek	koniec	
HePC	Grzanie	1	5,2	9,6	13,5	1,25
		2	58,9	61,7	64,2	1,28
		3	71,0	71,2	71,7	0,17
		4	100,4	103,6	105,8	32,70
	Chłodzenie	1	82,1	80,7	79,1	36,94
		2	48,7	43,5	42,3	0,64
		3	3,0	3,3	-0,6	0,67
			Temperatura przejścia [°C]			Zmiana entalpii ΔH [kJ/mol]
No.			początek	środek	koniec	
OcPC	Grzanie	1	9,1	18,7	27,1	3,13
		2	105,3	108,1	109,8	61,95
	Chłodzenie	1	91,5	90,2	89,0	60,96
		2	28,5	15,7	10,5	2,52
			Temperatura przejścia [°C]			Zmiana entalpii ΔH [kJ/mol]
No.			początek	środek	koniec	
ErPC	Grzanie	1	-3,7	-2,9	-1,3	0,36
		2	15,5	18,0	19,5	32,12
		3	21,1	23,6	25,2	
	Chłodzenie	1	7,9	5,9	2,7	28,28
		2	10,5	12,1	13,4	0,68
		3	-19,3	-20,0	-20,7	0,49

Tab. II.2. Temperatury przejść fazowych i zmiany entalpii dla badanych APCs

Jak widać z powyższych obliczeń temperatury przejścia podczas chłodzenia są przesunięte w kierunku niższych temperatur. Zachowanie takie jest typowe dla substancji wykazujących właściwości ciekłokrystaliczne.

II.3. Indukcja apoptozy przez APCs - badania na materiale biologicznym

W dalszym etapie pracy doświadczalnej sprawdzono zdolność APCs do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. W tym celu komórki linii raka prostaty Du145 inkubowano z lekami w stężeniu 12,5 μM , 25 μM oraz 50 μM przez 24 i 48 godzin. Do oceny skuteczności działania APCs zastosowano detekcję komórek apoptycznych i nekrotycznych za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. W tym celu komórki zostały wybarwione aneksyną V i jodkiem propidyny. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego prezentuje rysunek:



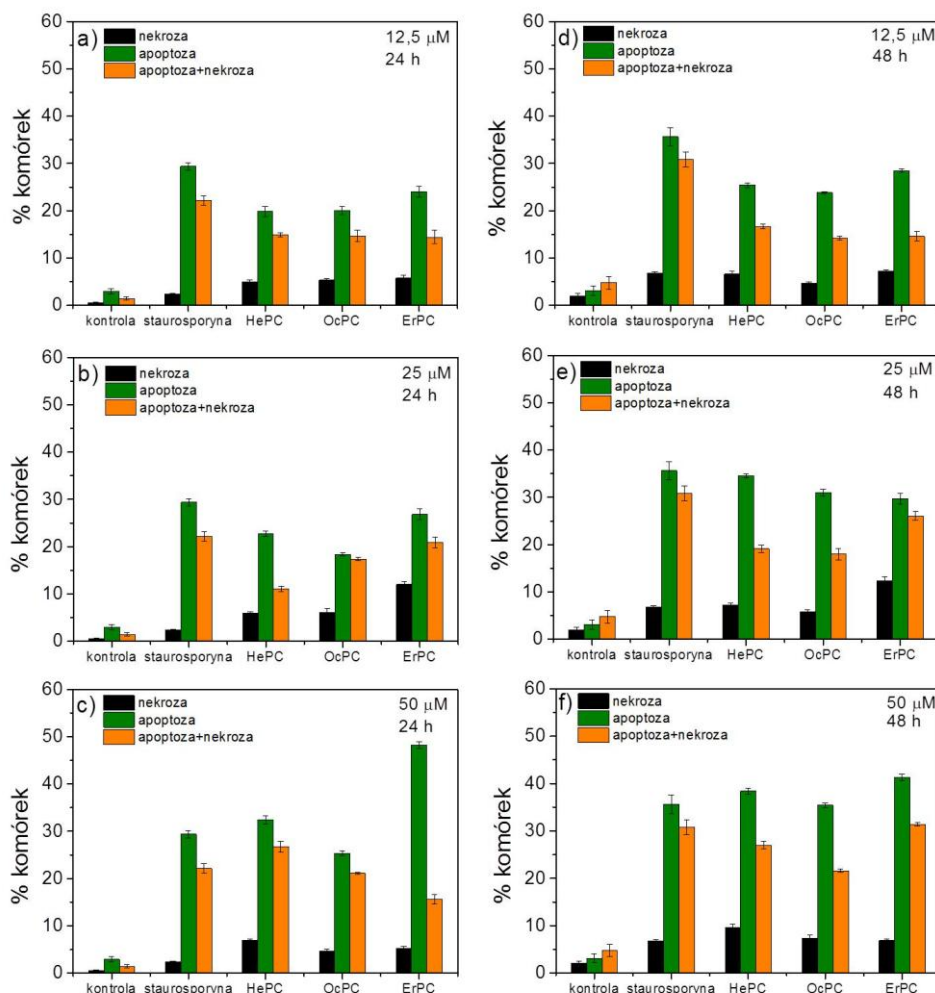
Rys. II.10. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego komórek linii raka prostaty Du145; a) od lewej: komórki w świetle przechodzącym; jądra komórek wybarwione jodkiem propidyny; komórki nekrotyczne i apoptyczne (na czerwono widać wybarwione jodkiem propidyny jądra, na zielono widoczna jest wybarwiona aneksyną V błona komórkowa) b) 48h inkubacja z lekami

Zastosowanie testu aneksyna V/jodek propidyny dało możliwość rozróżnienia 4 populacji komórek: komórek żywych, niebarwiących się żadnym z odczynników, komórek nekrotycznych barwiących się jedynie jodkiem propidyny (komórki wydzielające na czerwono), komórek we wczesnym stadium apoptozy (komórki wydzielające na zielono) oraz komórek w późnej fazie apoptozy (komórki wydzielające jednocześnie oboma znacznikami).

Z każdego obrazu zliczono ilość komórek apoptycznych oraz nekrotycznych i znormalizowano względem całkowitej liczby komórek. Wyniki w formie wykresów słupkowych w zależności od dawki i czasu inkubacji przedstawiono poniżej (rys. II.11). Jako kalibrator zastosowano hodowlę kontrolną (komórki nie traktowane żadnym lekiem) oraz tzw. kontrolę pozytywną (komórki inkubowane ze staurosporyną - antybiotykiem stosowanym powszechnie jako inicjator apoptozy). Wartości zmiennych pomiędzy grupami porównywano stosując test Manna-Whitney'a zastosowano test U Manna - Whitneya (Mann i Whitney, 1947). Test ten należy do grupy testów nieparametrycznych i stosowany jest zazwyczaj wtedy gdy zmienna zależna nie spełnia założeń związanych z normalnością rozkładu. Test U Manna - Whitneya weryfikuje hipotezę o nieistotności różnic pomiędzy medianami analizowanej zmiennej w dwóch populacjach, przy założeniu, że rozkłady zmiennej są sobie bliskie. Analizę statystyczną na poziomie istotności $p=0,05$ przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA wersja 8.0.

Jak widać na poniższych wykresach (rys. II.11 a, b, c) w próbce kontrolnej populacja komórek apoptycznych i nekrotycznych po 24 h jest niewielka (% liczby komórek < 5). Dodatek leku powoduje wyraźny wzrost liczby komórek apoptycznych, przy stosunkowo niedużym procencie komórek w stadium nekrozy. W przypadku najmniejszego stężenia leku 12,5 μM dla wszystkich trzech badanych alkilofosfocholin wyniki są porównywalne: nekroza na poziomie 5 %, wczesna apoptoza 20 - 25%, późna apoptoza ok. 14 %. Dwukrotne zwiększenie dawki OcPC i ErPC powoduje wzrost liczby komórek w późnym stadium apoptozy (apoptoza + nekroza), natomiast liczba komórek apoptycznych zmienia się nieznacznie. W przypadku ErPC wzrasta za to liczba komórek na szlaku nekrozy. Dla HePC obserwuje się wzrost liczby komórek apoptycznych oraz spadek liczby w późnym stadium apoptozy. W przypadku tych dwóch stężeń indukcja apoptozy jest niższa niż dla próbki inkubowanej ze staurosporyną. Inkubacja komórek

przez 24 godziny z najwyższym stężeniem leków – 50 μ M- powoduje z kolei wyraźny wzrost liczby komórek apoptycznych, widoczny w szczególności dla ErPC.



Rys. II. 11. Procentowa ilość nekrotycznych i apoptotycznych komórek linii Du145 inkubowanych z APCs przez 24 h (a, b, c) oraz 48 h (d, e, f) dla różnych stężeń leków; na wykresach umieszczono ponadto wyniki dla grupy kontrolnej, nie traktowanej lekami (kontrola) oraz komórek inkubowanych ze staurosporyną; otrzymane wyniki w stosunku do grupy kontrolnej uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0.05$

W przypadku dłuższego czasu inkubacji 48 h – (rys. II.11. d,e,f) dla grupy kontrolnej obserwuje się niewielki wzrost populacji komórek apoptycznych i nekrotycznych w odniesieniu do 24 h czasu inkubacji. Dla komórek traktowanych APCs widoczny jest duży wzrost ilości komórek, u których został aktywowany proces programowanej śmierci (zarówno tych we wczesnym jak i późnym stadium apoptozy). Dla dwóch wyższych stężeń leków ich liczba waha się w granicach: wczesna apoptoza - 30 % wszystkich komórek, późna faza apoptozy - 23% - 29 % dla stężenia 25 μ M, oraz 36-40 %

wczesna apoptoza i 25% - 30 % późna faza apoptozy dla stężenia 50 μ M. Wzrasta też ilość komórek nekrotycznych. Wszystkie wyniki otrzymane dla danych stężeń poszczególnych leków oraz przy różnych czasach inkubacji w stosunku do grupy kontrolnej są znamienne statystyczne na poziomie istotności $p=0,05$. Stwierdzono ponadto zależność umieralności komórek na drodze apoptozy w zależności od rodzaju leku oraz jego dawki. Dla najwyższych stężeń leku uzyskano istotnie statystycznie korelacje pomiędzy analizowanymi grupami dla dwóch różnych czasów (24h i 48h).

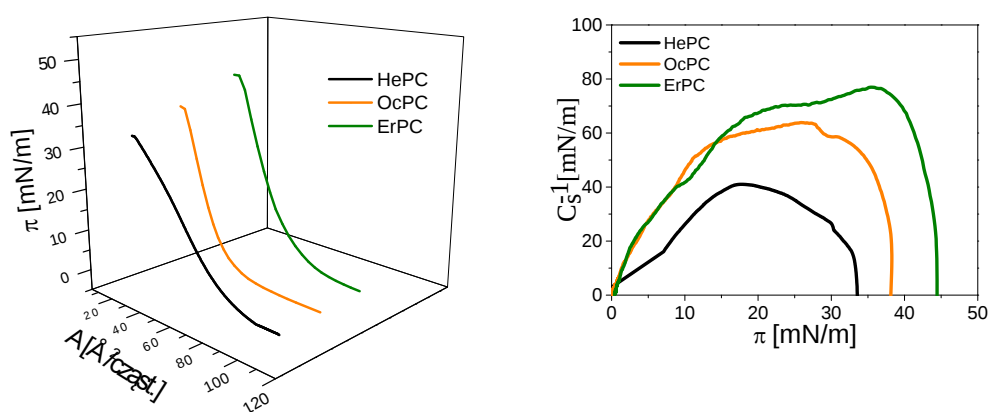
II.4. Badania monowarstw Langmuira

W rozdziale tym zostaną zaprezentowane wyniki badań przeprowadzonych z użyciem wagi Langmuira dla badanych APCs: HePC, OcPC oraz ErPC. Eksperymenty rozpoczęto od zarejestrowania dla każdego z wyżej wymienionych związków izoterm π -A oraz krzywych ΔV -A (obrazujących zmiany potencjału powierzchniowego), a następnie przeprowadzono szczegółową charakterystykę filmów tworzonych przez ErPC pod wpływem różnych czynników eksperymentalnych. Dla HePC podobne eksperymenty zostały przeprowadzone już wcześniej i dokładnie opisane w pracy Rey-Gomez-Serranillos (2004). W kolejnym etapie zarejestrowano izotermy dla badanych APCs w układach dwu- i trójskładnikowych.

II.4.1. Charakterystyka monowarstw Langmuira utworzonych przez badane APCs

II.4.1.1. Izotermy π -A

Przebieg izoterm π -A zarejestrowanych dla czystych APCs na swobodnej powierzchni wody (pH=5,6) w temperaturze 20°C oraz zależność C_s^{-1} (π) przedstawia rysunek II.12.



Rys.II.12. Izotermy monowarstw badanych alkilofosfocholin: HePC, OcPC i ErPC zarejestrowane w temperaturze 20°C na swobodnej powierzchni wody (pH=5,6) oraz obliczone na ich podstawie moduły ścisłości C_s^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Przebieg izoterm dla badanych związków jest podobny: obserwuje się systematyczny wzrost wartości ciśnienia powierzchniowego podczas kompresji monowarstw, aż do momentu ich załamania. Izotermy różnią się natomiast wartością powierzchni, przy której następuje wzrost ciśnienia powyżej wartości zero (punkt „*lift-off*”), wartością graniczną powierzchni A_0 oraz wartością ciśnienia kolapsu π_{coll} . Obliczone maksymalne moduły ściśliwości C_s^{-1} zgadzają się z wynikami otrzymanymi przez innych autorów (dla HePC: Rey-Gomez-Serranillos i wsp., 2004) i wskazują na ciekły stan monowarstw utworzonych przez cząsteczki OcPC ($C_s^{-1}_{max} = 63$ mN/m) i ErPC ($C_s^{-1}_{max} = 78$ mN/m), oraz stan ciekły rozprężony filmu utworzonego przez HePC ($C_s^{-1}_{max} = 41$ mN/m). Analizując przebieg izoterm π -A łatwo zauważyć, iż wraz ze wzrostem długości części hydrofobowej molekuly, monowarstwy wykazują większą stabilność, przejawiającą się we wzroście wartości π_{coll} . Wraz ze wzrostem długości hydrofobowego łańcucha rosną też wartości maksymalnych modułów ściśliwości, wskazując na większe upakowanie cząsteczek w monowarstwie. Efekt ten, nazywany efektem kondensacji, został opisany w pracy (Miñones i wsp., 1981). Parametry charakterystyczne dla izoterm π -A utworzonych z badanych APCs prezentuje tabela II.3.

	Parametr	A_0 [Å ² /cząst.]	π_{coll} [mN/m]	A_{coll} [Å ² /cząst.]	$C_s^{-1}_{max}$ [mN/m]	Stan
APCs	HePC	79	34	32	41	L ₁
	OcPC	68	38	28	63	L
	ErPC	78	44	40	78	L

Tab.II.3. Parametry izoterm badanych APCs

II.4.1.2. Krzywe ΔV -A

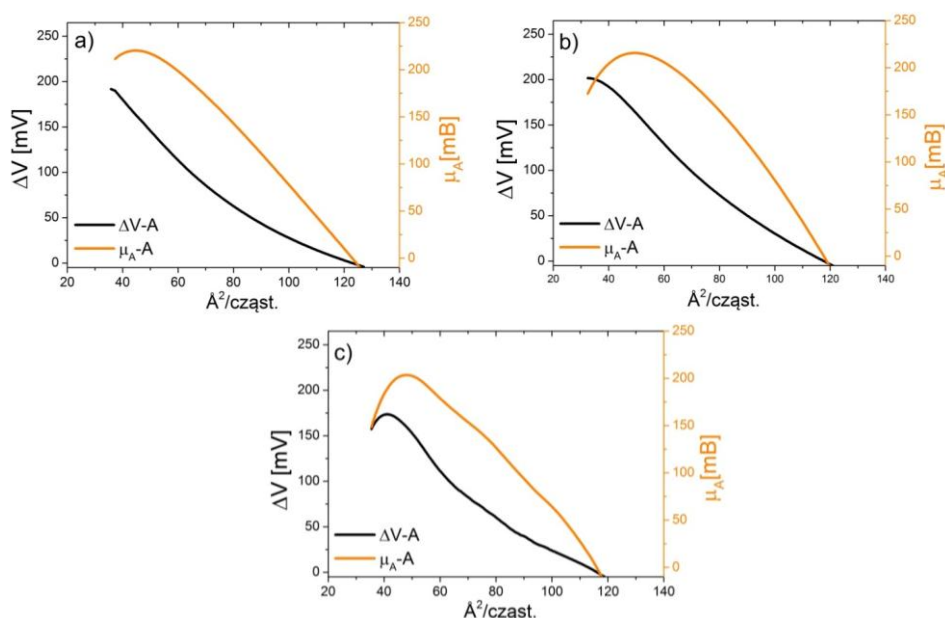
Na podstawie zarejestrowanych krzywych ΔV -A wyznaczono korzystając z modelu Helmholtza względny moment dipolowy cząsteczek (Dynarowicz-Łątka i wsp., 2001). W modelu tym zakłada się, że

$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{A \epsilon \epsilon_0} \quad (\text{II.2})$$

gdzie $\mu_{\perp}$ jest wertykalną składową wektora momentu dipolowego, ϵ , ϵ_0 przenikalnością dielektryczną odpowiednio monowarstwy i próżni. Jako, że występująca w równaniu przenikalność dielektryczna monowarstwy nie jest znana, a ponadto zmienia się podczas sprężania filmu, wprowadza się pojęcie względnego momentu dipolowego

$$\mu_A = \frac{\mu_{\perp}}{\epsilon} \quad (\text{II.3})$$

Krzywe ΔV -A oraz zależność względnego momentu dipolowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (μ_A -A) ilustruje poniższy rysunek:



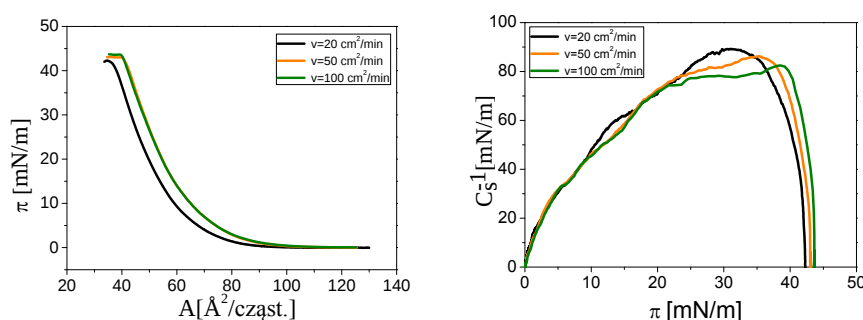
Rys.II.13. Krzywe ΔV -A i μ_A -A monowarstw badanych alkilofosfocholin: HePC, OcPC oraz ErPC zarejestrowane w temperaturze 20°C

Dla każdego z badanych związków potencjał powierzchniowy zaczyna rosnąć przy większych powierzchniach przypadających na cząsteczkę niż ciśnienie powierzchniowe (odczytane z izoterm π -A). Wzrost potencjału następuje systematycznie osiągając maksymalną wartość ok. 190 mV dla HePC, 200 mV dla OcPC oraz 180 mV dla ErPC dla odpowiednich wartości powierzchni: ok. 39 $\text{\AA}^2/\text{cząsteczkę}$, 37 $\text{\AA}^2/\text{cząsteczkę}$ i 42 $\text{\AA}^2/\text{cząsteczkę}$. Względny moment dipolowy cząsteczek APCs, podobnie jak ich potencjał powierzchniowy, rośnie stopniowo w miarę kompresji monowarstwy osiągając maksimum przy wartości ok. 220 mD dla HePC, 215 mD dla OcPC oraz 220 mD dla HePC, dla wartości powierzchni przy których dana monowarstwa ulega załamaniu.

II.4.2. Szczegółowa charakterystyka monowarstw tworzonych przez ErPC

W celu przeprowadzenia charakterystyki filmów tworzonych przez ErPC wykonano szereg doświadczeń, w których modyfikowano warunki eksperymentu, m.in. szybkość kompresji, temperaturę i pH subfazy, a także ilość cząsteczek naniesionych na powierzchnię fazy nośnej.

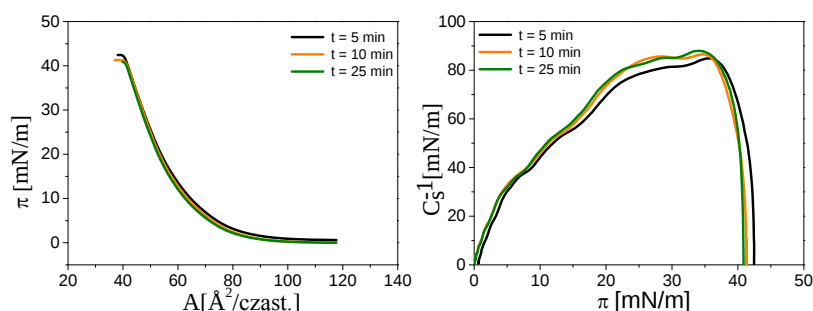
W pierwszej kolejności zbadano wpływ szybkości kompresji monowarstw tworzonych przez cząsteczki ErPC na kształt izoterm oraz na upakowanie filmu. Rys. II.14 przedstawia izotermy zarejestrowane na swobodnej powierzchni wody (pH 5,6) w temperaturze 20°C wraz z zależnością $C_s^{-1}(\pi)$ dla szybkości kompresji wynoszących kolejno 20 cm²/min, 50 cm²/min i 100 cm²/min.



Rys. II.14. Izotermy monowarstw ErPC zarejestrowane w temperaturze 20°C przy trzech szybkościach kompresji: 10 cm²/min, 50 cm²/min, 100 cm²/min oraz obliczone na ich podstawie moduły ścisłości C_s^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Przedstawione powyżej wyniki badań wskazują na brak znaczącego wpływu szybkości sprężania monowarstw na ich upakowanie oraz kształt izoterm. Tylko dla 20 cm²/min obserwuje się nieznaczne przesunięcie izoterm w stronę mniejszych powierzchni.

Dodatkowo przeprowadzono eksperyment, gdzie w każdym kolejnym pomiarze, wydłużano czas, jaki upłynął od chwili naniesienia na powierzchnię subfazy cząsteczek do chwili zainicjowania kompresji monowarstwy. Czasy te wynosiły odpowiednio 5 min, 10 min oraz 25 min. Wyniki przedstawia rys. II.15:

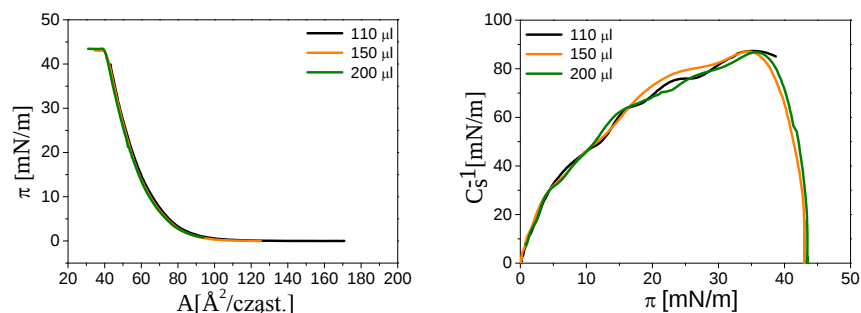


Rys.II.15. Izotermy monowarstw ErPC zarejestrowane w temperaturze 20°C przy różnych czasach jakie upłynęły od naniesienia roztworu na powierzchnię subfazy do chwili inicjacji sprężania : 5 minut, 10 minut, 25 minut oraz obliczone na ich podstawie moduły ściśliwości C_S^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Przedstawione na rys. II.15. wyniki dowodzą braku istotnego wpływu czasu, jaki upłynął od momentu naniesienia roztworu na powierzchnię swobodną a kompresją, na przebieg izotermy π -A. Przeprowadzone eksperymenty dowodzą stabilności monowarstw utworzonych z cząsteczek ErPC na swobodnej powierzchni wody.

Opierając się na powyższych wynikach, wykonując dalsze pomiary z udziałem ErPC, po naniesieniu roztworu na powierzchnię subfazy odczekiwano standardowo 10 minut przed rozpoczęciem sprężania monowarstwy, a monowarstwę kompresowano z szybkością 50 cm^2/min .

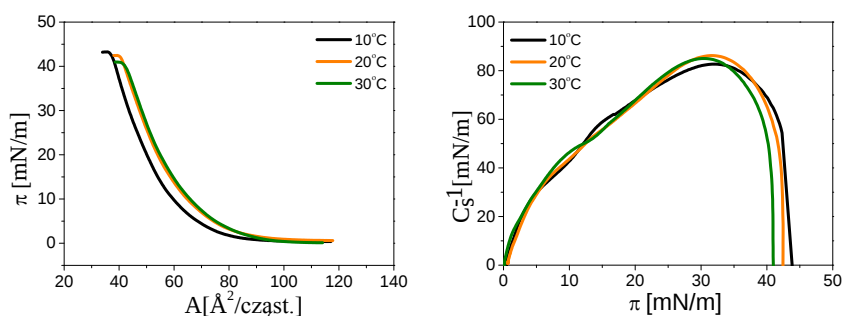
W następnym etapie zbadano, czy ilość roztworu badanego związku nanoszonego na powierzchnię fazy nośnej - a co za tym idzie gęstość powierzchniowa cząsteczek ErPC na powierzchni - ma wpływ na kształt i położenie izoterm, oraz upakowanie tworzonych przez nią monowarstw. Wyniki eksperymentu przedstawia rys. II.16.



Rys.II.16. Izotermy monowarstw ErPC zarejestrowane w temperaturze 20°C dla różnych ilości roztworu naniesionego na powierzchnię subfazy oraz obliczone na ich podstawie moduły ściśliwości C_S^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Z danych otrzymanych podczas badań jednoznacznie wynika, iż ilość cząstek nanoszonych na powierzchnię fazy nośnej nie wpływa na położenie i przebieg izoterm.

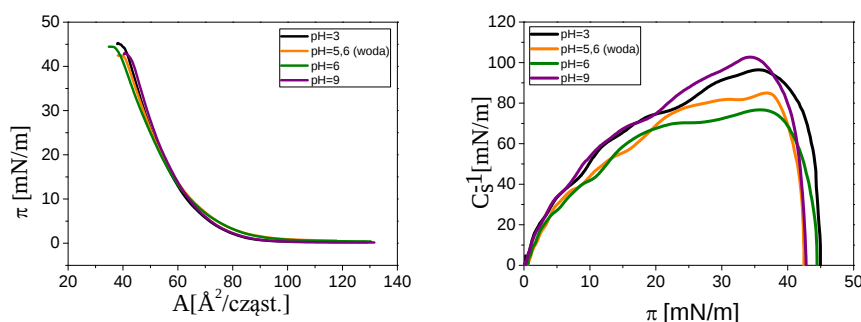
Następnie zbadano zależności temperaturowe dla monowarstw ErPC. Izoterm zarejestrowane na wodzie wraz z zależnością $C_s^{-1}(\pi)$ dla trzech różnych temperatur: 10°C, 20°C oraz 30°C przedstawia rys. II.17.:



Rys.II.17. Izoterm monowarstw ErPC zarejestrowane w temperaturach 10°C, 20°C i 30°C oraz obliczone na ich podstawie moduły ścisłości C_s^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Analiza powyższych wykresów wskazuje, że zmiana temperatury subfazy w zakresie od 10°C do 30°C praktycznie nie wpływa na przebieg izoterm. Wyłącznie dla temperatury 10°C widać nieznaczne przesunięcie izoterm w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w monowarstwie, chociaż przebieg izoterm pozostaje taki sam jak w przypadku wyższych temperatur fazy nośnej. Krzywe modułów ścisłości w funkcji ciśnienia powierzchniowego nie wykazują zmian w upakowaniu monowarstw pod wpływem temperatury. Parametrem, który zmienia się nieznacznie wraz z temperaturą jest ciśnienie kolapsu, które najwyższą wartość 44 mN/m osiąga dla temperatury subfazy 10°C, a wraz z jej podwyższaniem maleje osiągając przy 30°C wartość 41 mN/m. Spadek wartości π_{coll} świadczy o zmniejszeniu stabilności monowarstw tworzonych przez ErPC, pod wpływem wzrastającej temperatury fazy nośnej.

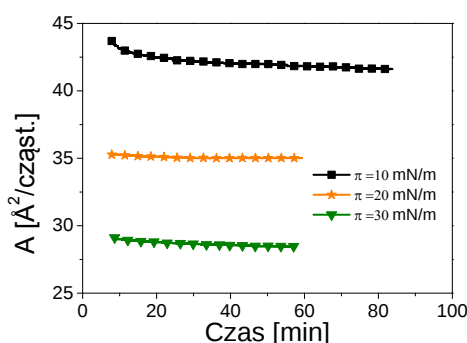
W kolejnym etapie rejestrowano izoterm w temperaturze 20°C na subfazach o pH z zakresu 3-9 (rys. II.18).



Rys. II.18. Izotermy monowarstw erucylfosfocholiny (ErPC) zarejestrowane w temperaturze 20°C dla różnych wartości pH fazy nośnej (pH3, pH5,6, pH6 i pH9) oraz obliczone na ich podstawie moduły ścisłościwości C_s^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego π .

Na podstawie powyższych wykresów można stwierdzić, iż pH subfazy w zakresie od 3 do 9 nie ma wpływu na kształt i przebieg izoterm. Oznacza to, że cząsteczki ErPC występują w formie amfijonów. Niewielkie różnice widać jedynie w upakowaniu monowarstw, o czym świadczą różne maksymalne wartości C_s^{-1} dla poszczególnych wartości pH, jednakże stan fizyczny monowarstw (ciekły) pozostaje bez zmian.

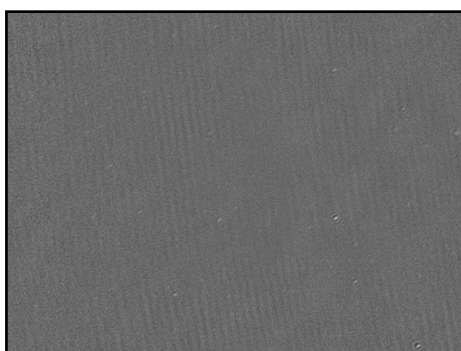
Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż ErPC tworzy stabilne monowarstwy na powierzchni faz woda/powietrze. Aby ostatecznie potwierdzić stabilność filmów tworzonych przez badany związek przeprowadzono kolejny eksperyment. Monowarstwy kompresowano do określonej wartości ciśnienia powierzchniowego (10 mN/m, 20 mN/m i 30 mN/m) i utrzymując je podczas pomiaru na stałym poziomie badano zmiany powierzchni przypadającej na cząsteczkę w funkcji czasu. Wyniki eksperymentu prezentuje rys. II.19.



Rys. II.19. Stabilność dla monowarstw ErPC zarejestrowanych w temperaturze 20°C dla ciśnień powierzchniowych wynoszących odpowiednio: 10 mN/m, 20 mN/m oraz 30 mN/m

Dla trzech wybranych ciśnień nie obserwuje się strat w powierzchni przypadającej na cząsteczkę, co jest kolejnym dowodem potwierdzającym dużą stabilność filmów tworzonych przez cząsteczki ErPC.

W celu wizualizacji powierzchni monowarstw Langmuira tworzonych przez ErPC użyto mikroskopu kąta Brewstera (BAM). Zdjęcia BAM wykonane podczas całego procesu kompresji filmu na wodzie (pH 5.6) w temperaturze 20°C pokazują całkowitą homogeniczność monowarstw. Przykładowy obraz z mikroskopu kąta Brewstera prezentuje rys. II.20.



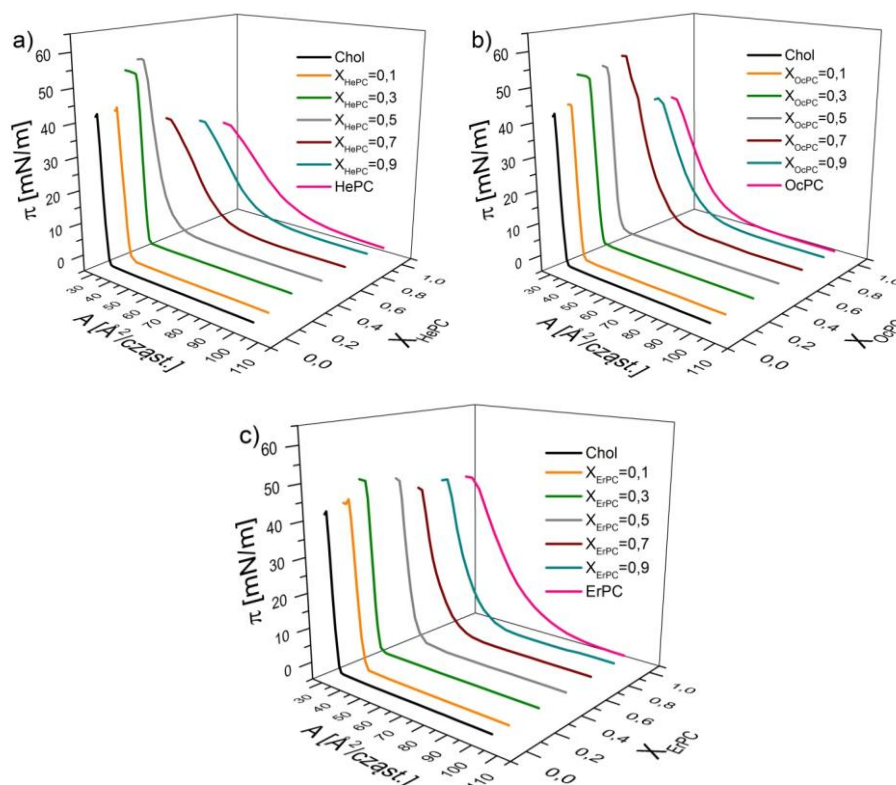
Rys. II.20. Obraz powierzchni warstwy ErPC uzyskany przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera.

II.4.3. Mieszaniny APCs z lipidami błonowymi

W kolejnych seriach eksperymentów zbadano monowarstwy utworzone przez cząsteczki badanych APCs w mieszaninach z wybranymi lipidami błonowymi: Chol, DPPC, POPC, Sph oraz GM₁. Badania miały na celu sprawdzenie wpływu, jaki na własności monowarstw oraz wzajemne oddziaływanie ich składników ma długość hydrofobowego łańcucha w cząsteczkach badanych lipidów antynowotworowych (C16, C18 oraz C22 odpowiednio dla HePC, OCPc oraz ErPC) oraz obecność podwójnego wiązania (ErPC). W tym celu, z roztworów wyjściowych APCs i wyżej wymienionych lipidów, sporządzono mieszaniny o ułamkach molowych APCs (X_{APCs}) wynoszących 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 oraz 0,9. Dla każdej z mieszanin zarejestrowano izotermy π -A w temperaturze $20 \pm 1^\circ\text{C}$, stosując jako fazę nośną wodę redestylowaną. Monowarstwy sprężano z szybkością $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. Na podstawie izoterm π -A korzystając z zależności określonej równaniem (I.20) wyliczono moduły ściśliwości. Mieszalność składników badano na podstawie zmian ciśnienia kolapsu. Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w monowarstwach analizowano w sposób jakościowy i ilościowy. Analizę jakościową przeprowadzono w oparciu o regułę addytywności. W tym celu z wykresów izoterm π -A odczytano średnią powierzchnię przypadającą na cząsteczkę w filmie A_{12} (A_{123}), a wyniki przedstawiono w funkcji ułamków molowych X_{APCs} . Linia przerywaną zaznaczono prostą opisaną równaniem (I.22). Prosta ta przedstawia sytuację, w której składniki mieszają się idealnie lub nie mieszają się w ogóle. Odstępstwa od liniowości wskazują na nieidealną mieszalność składników. Analizę ilościową oddziaływań pomiędzy badanymi lipidami antynowotworowymi a lipidami błonowymi dokonano opierając się na zmianach nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania, ΔG^{exc} , danej równaniem (I.26) w funkcji składu monowarstwy. Wartość zmian nadmiarowej swobodnej entalpii mieszania ΔG^{exc} świadczy o termodynamicznej stabilności układu. Średnią powierzchnię mieszania oraz zmiany nadmiarowej swobodnej entalpii mieszania ΔG^{exc} wyznaczono dla trzech wybranych wartości ciśnienia powierzchniowego (10 mN/m , 20 mN/m oraz 30 mN/m).

II.4.3.1. Monowarstwy mieszane APCs z cholesterolem

Wyniki badań w postaci izoterm π -A zarejestrowanych dla monowarstw mieszanych HePC, OcPC i ErPC z cholesterolem przedstawia rys. II.21.

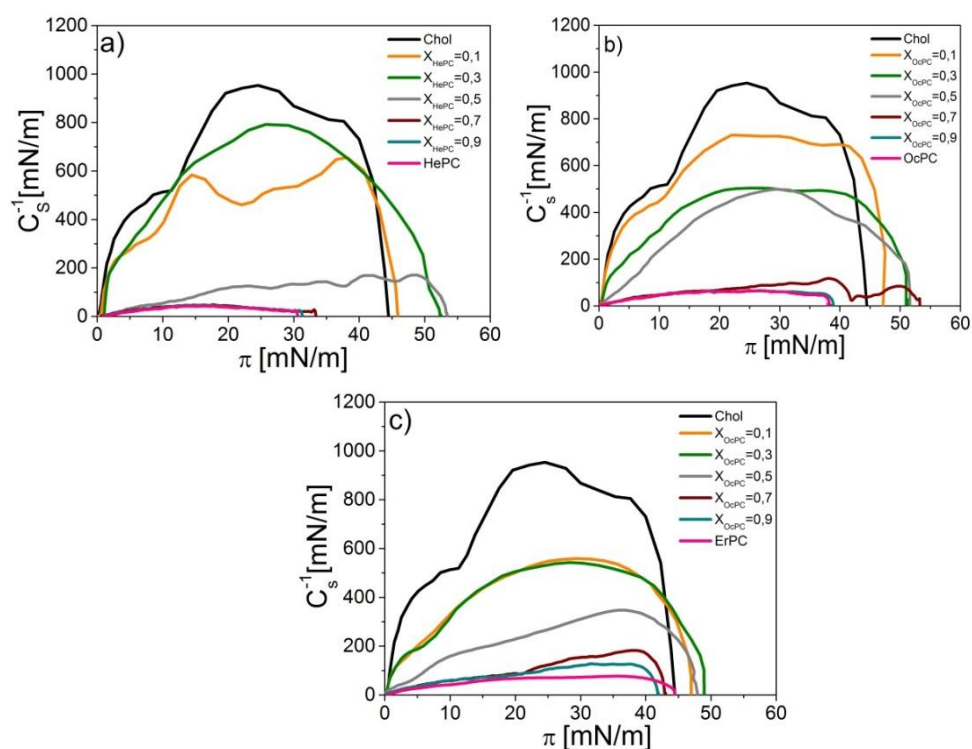


Rys. II.21. Izotermie monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z cholesterolem zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Analiza powyższych wykresów wskazuje na podobne zachowanie się cząsteczek w monowarstwach mieszanych utworzonych przez wszystkie trzy badane syntetyczne lipidy antynowotworowe i cholesterol. Izoterma dla frakcji molowej $X_{APCs} = 0,1$ w każdym z przypadków ma przebieg bardzo podobny do izoterm czystego cholesterolu, natomiast izoterm zarejestrowane dla ułamków molowych $X_{APCs} = 0,3$ i $X_{APCs} = 0,5$ charakteryzują się mniejszym nachyleniem oraz przesunięciem punktu „lift-off” w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w odniesieniu do izoterm czystego sterolu. Dla mieszanin o ułamku molowym $X_{APCs} > 0,5$ przebieg izoterm staje się podobny do izoterm zarejestrowanych dla czystych APCs. Dodatkowych informacji

dostarcza analiza wartości ciśnienia powierzchniowego, przy których monowarstwy ulegają załamaniu. Zarówno dla układów zawierających HePC, jak i OcPC wartość ciśnienia kolapsu rośnie w zakresie ułamków molowych APCs od 0,1 do 0,5, natomiast dla filmów bogatszych w syntetyczne lipidy antynowotworowe ($X_{\text{HePC}, \text{OcPC}} \geq 0,7$) wartość ciśnienia załamania monowarstw pozostaje stała, wskazując na brak mieszalności składników (Gains, 1966; Dynarowicz-Łątka i Kita, 1999). Dla ułamka molowego $X_{\text{OcPC}} = 0,7$ obserwuje się dwa kolapsy. Pierwszy z nich występuje dla ciśnienia powierzchniowego zbliżonego do wartości kolapsu dla czystej OcPC i może świadczyć o jej usuwaniu z mieszanej monowarstwy (jako składnika mniej stabilnego), drugi natomiast występuje przy ciśnieniu podwyższonym (ok. 53 mN/m) w stosunku do ciśnienia załamania czystego sterolu. Występowania dwóch kolapsów można spodziewać się także w przebiegu izoterm dla frakcji molowej $X_{\text{OcPC}} = 0,9$. Brak drugiego kolapsu w przebiegu izoterm zarejestrowanej dla tej mieszaniny wynika prawdopodobnie ze zbyt małej wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie, przy której następuje załamanie i jest konsekwencją niewystarczającego zasięgu barierki stosowanej wagi Langmuira. Obecność dwóch wartości ciśnienia załamania jest dodatkowym dowodem na brak mieszalności składników w monowarstwach bogatych w OcPC. Powyższa analiza pozwala stwierdzić, iż wzajemna mieszalność w układach HePC/Chol i OcPC/Chol ściśle zależy od składu monowarstwy: dla filmów bogatych w cholesterol obserwuje się mieszalność ich składników, natomiast dla filmów ubogich w ten sterol następuje separacja faz powyżej ciśnienia pierwszego załamania monowarstwy. W przypadku trzeciego z badanych układów - ErPC/Chol - trudno na podstawie wartości ciśnienia załamania jednoznacznie określić mieszalność składników w utworzonych filmach. Wynika to z bardzo zbliżonych wartości ciśnienia kolapsu monowarstw utworzonych zarówno przez pojedyncze składniki (ErPC, Chol), jak i ich mieszaniny. Przebieg i położenie izoterm wskazuje jednak na to, że składniki mieszają się w całym zakresie ułamków molowych, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga dodatkowej analizy termodynamicznej oddziaływań pomiędzy składnikami badanego układu.

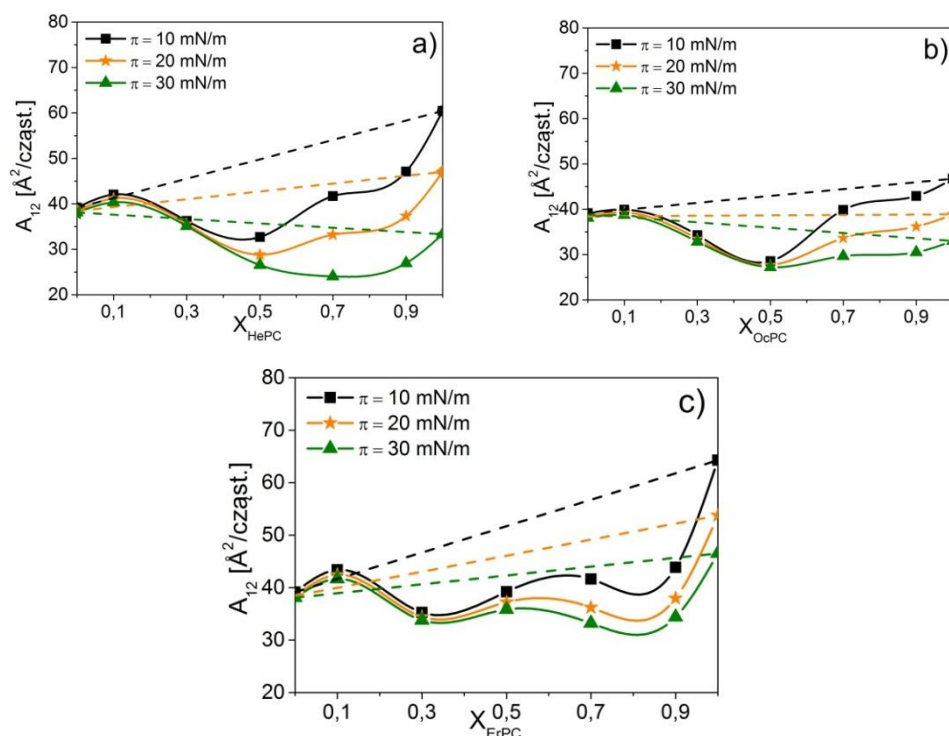
Wykresy modułów ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego przedstawiono na rys. II.22.:



Rys.II.22. Przebieg krzywych $C_s^{-1}(\pi)$ dla monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z cholesterolem zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Największe wartości modułów ściśliwości odpowiadające na wykresie maksimum funkcji $C_s^{-1}(\pi)$ charakteryzują monowarstwy czystego cholesterolu ($C_{s \max}^{-1} \approx 1000$ mN/m) oraz mieszanin o ułamkach molowych $X_{APCs} = 0,1 - 0,3$ ($C_{s \max}^{-1} \approx 500 - 700$ mN/m) i świadczą o tym, iż monowarstwy te znajdują się w fazie skondensowanej. Mieszaniny zawierające $X_{APC} \geq 0,7$ tworzą natomiast monowarstwy o charakterze ciekłym ($C_{s \max}^{-1} < 120$ mN/m).

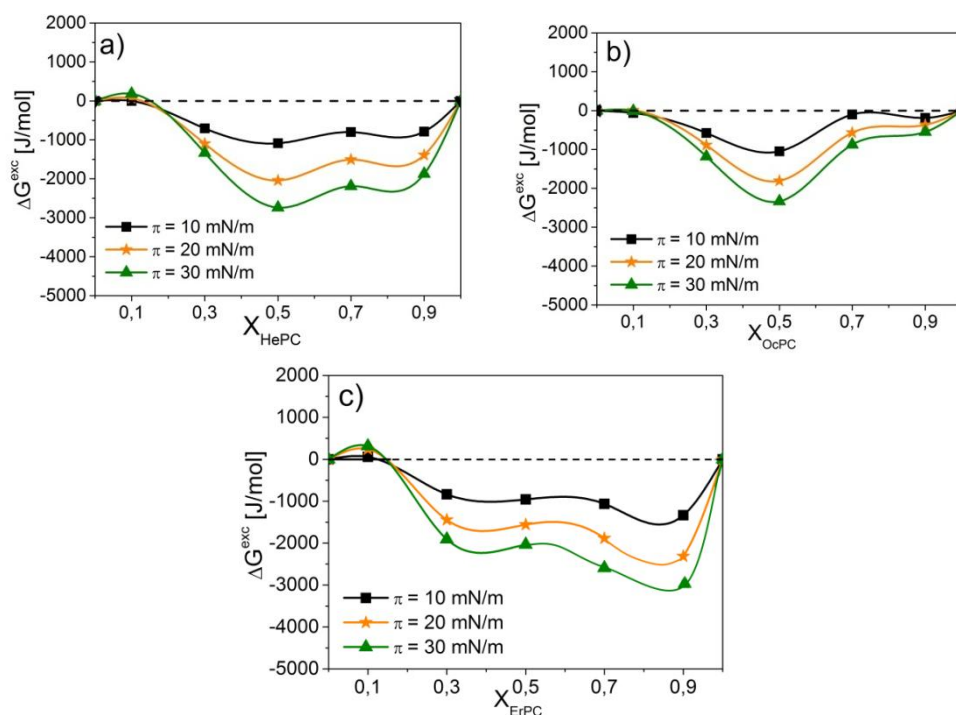
Średnie powierzchnie przypadające na cząsteczkę w mieszanych monowarstwach (A_{12}) w funkcji składu monowarstwy dla każdego z trzech badanych układów HePC/Chol, OcPC/Chol i ErPC/Chol przedstawiono na rys. II.23.



Rys. II.23. Wykresy zależności $A_{12}(X_{APCs})$ dla systemów a) HePC/Chol, b) OcPC/Chol oraz c) ErPC/Chol

Znaczne odstępstwa od liniowości widoczne są dla każdego z badanych układów niemal w całym zakresie badanych ułamków molowych. Dla frakcji molowych X_{APCs} od 0,3 do 0,9 wartości A_{12} uzyskane podczas eksperymentu leżą poniżej prostych przedstawiających stan idealny (linia przerywana), świadcząc o nieidealnym mieszaniu się składników i przyciągającym charakterze oddziaływań pomiędzy nimi w utworzonych filmach. Jedynie dla $X_{APCs} = 0,1$ obserwuje się nieznaczne odchylenia od liniowości w kierunku wyższych powierzchni w stosunku do stanu idealnego. Odstępstwo od liniowości jest jednak bardzo niewielkie i sugeruje występowanie bardzo słabych oddziaływań pomiędzy komponentami monowarstwy. Dla układów HePC/Chol i OcPC/Chol najsilniejsze oddziaływania występują dla monowarstw o ułamku molowym $X_{APCs} = 0,5$.

Ilościowej analizie oddziaływań pomiędzy składnikami w mieszanych filmach dokonano na podstawie obliczeń zmian nadmiarowej swobodnej entalpii mieszania ΔG^{exc} . Uzyskane wyniki ΔG^{exc} w funkcji ułamków molowych badanych syntetycznych lipidów nowotworowych przedstawiono na rys. II.24.



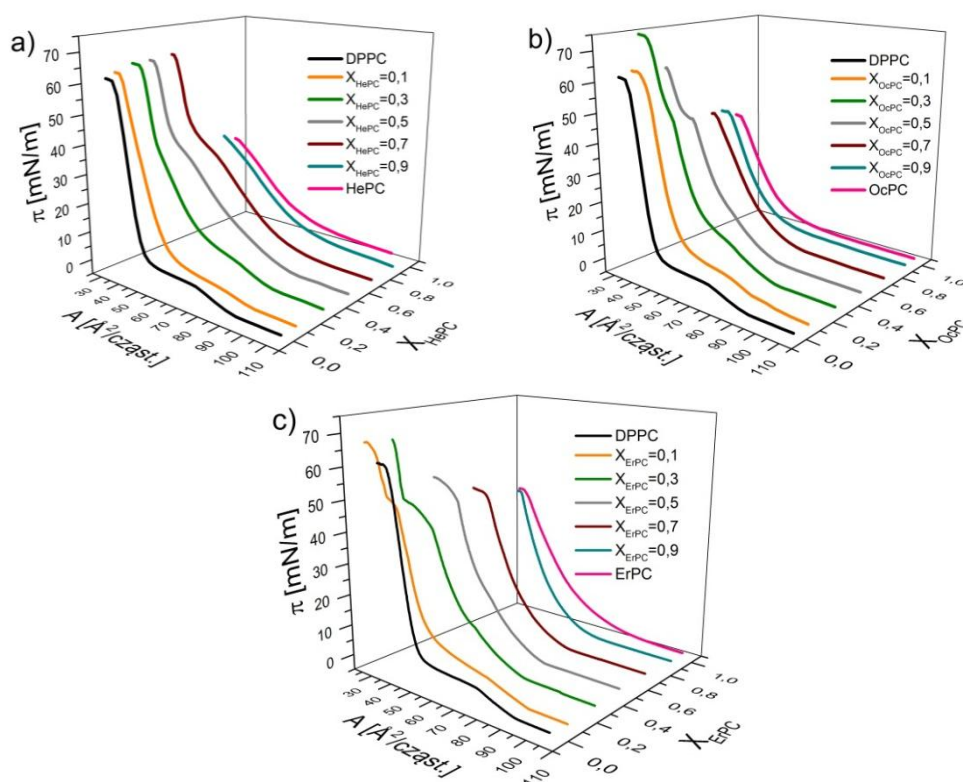
Rys.II.24. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla systemów a) HePC/Chol, b) OcPC/Chol oraz c) ErPC/Chol w temperaturze 20°C

Ujemne wartości funkcji $\Delta G^{exc}(X_{APCs})$ w zakresie badanych ciśnień powierzchniowych świadczą o istnieniu przyciągających oddziaływań pomiędzy cząsteczkami APCs a cholesterolem. Utworzone monowarstwy charakteryzują się dużą stabilnością. Jedynie dla frakcji molowej $X_{APC} = 0,1$, oddziaływania są stosunkowo słabe, a dla układu ErPC/Chol przyjmują wartości dodatnie (jednakże bliskie zeru). Wyniki te potwierdzają hipotezę o słabych oddziaływaniach między cząsteczkami w filmie o ułamku molowym $X_{APCs} = 0,1$ wysuniętą podczas analizy średniej powierzchni mieszania przypadającej na cząsteczkę w filmie (A_{12}). Stabilność monowarstw silnie zależy od ciśnienia powierzchniowego i rośnie wraz z jego wzrostem. Minima w przebiegu funkcji $\Delta G^{exc}(X_{APCs})$ obrazujące najsilniejsze oddziaływania pomiędzy składnikami w monowarstwach mogą świadczyć o tworzeniu się kompleksów powierzchniowych APCs-cholesterol. Tworzenie tego typu kompleksów przez składniki filmów mieszanych zostało zaproponowane przez innych autorów w celu

zinterpretowania pojawiających się w przebiegu zależności $\Delta G^{\text{exc}}(X_{\text{APCs}})$ minimów obserwowanych dla danego składu monowarstwy (Gong i wsp., 2002; Seoane i wsp., 1998). Dla układów HePC/Chol i OcPC/Chol minimalne wartości ΔG^{exc} osiągają mieszaniny o składzie 1:1, natomiast w przypadku układu ErPC/Chol nie obserwuje się wyraźnego minimum. Układ ten wydaje się być najbardziej stabilny termodynamicznie (najniższe wartości ΔG^{exc})

II.4.3.2. Monowarstwy mieszane APCs z DPPC

W kolejnym etapie zbadano oddziaływania pomiędzy cząsteczkami APCs, a cząsteczkami DPPC w monowarstwach utworzonych na wodzie w temperaturze 20°C. Izotermy zarejestrowane podczas eksperymentu prezentuje rys. II.25.:



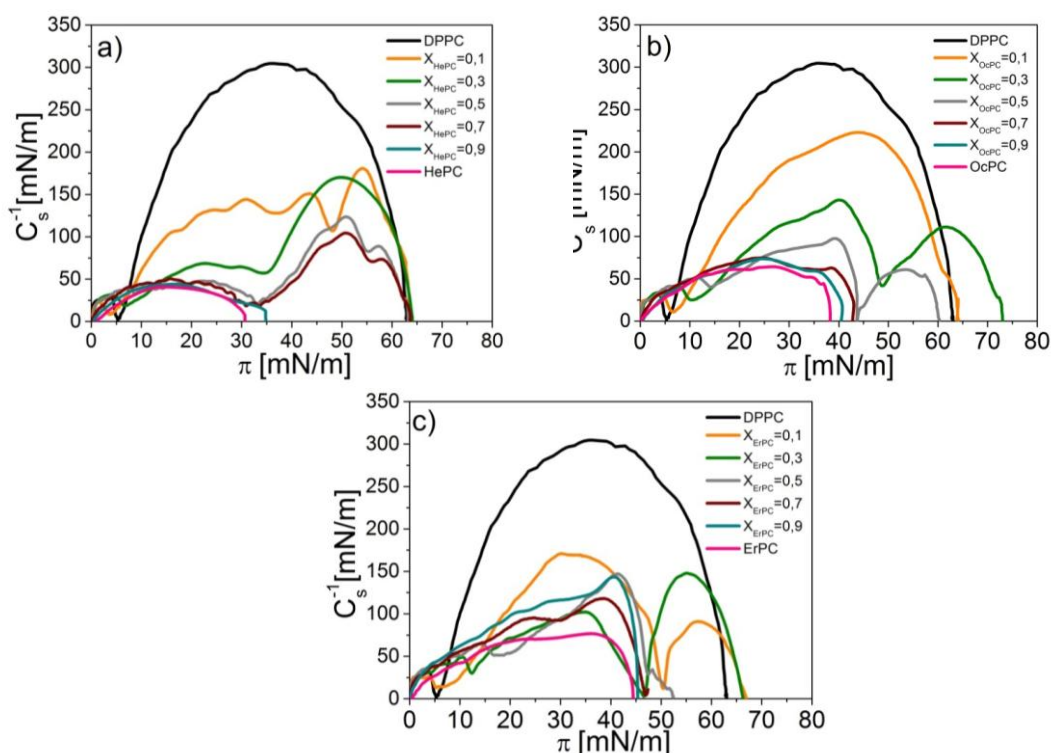
Rys. II.25. Izotermy monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z DPPC zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Na podstawie przebiegu izoterm π - A można zauważyć, że wraz ze zwiększeniem ilości APCs w filmach kształt rejestrowanych izoterm zmienia się systematycznie od kształtu charakterystycznego dla czystego DPPC do właściwego dla czystych APCs. Wraz ze

zwiększeniem frakcji molowej APCs w monowarstwach skróceniu ulega obszar plateau - typowy dla izoterm DPPC i związany z przejściem fazowym pomiędzy fazą ciekłą rozprężoną (L_1), a ciekłą skondensowaną (L_2). Obecność obszaru plateau można zaobserwować wyłącznie dla mieszanin o ułamkach molowych $X_{APCs} = 0,1-0,3$. Dla monowarstw bogatszych w syntetyczne lipidy antynowotworowe obszar ten zanika zupełnie. W przypadku układów OcPC/DPPC oraz ErPC/DPPC wraz z zawartością APCs w monowarstwie wzrasta wartość ciśnienia powierzchniowego, przy którym następuje wspomniane przejście fazowe. Kolejną cechą charakterystyczną dla filmów mieszanych $X_{HePC} = 0,3-0,7$; $X_{OcPC} = 0,3-0,5$ oraz $X_{ErPC} = 0,3$ jest obecność dwóch kolapsów. Dla każdej z mieszanin w badanych systemach dwuskładnikowych ciśnienia pierwszego kolapsu leżą blisko ciśnień, przy których załamaniu ulegają filmy utworzone przez czyste APCs, drugi kolaps odpowiada z kolei załamaniu monowarstwy czystego DPPC. Bazując na regule faz można wnioskować, że tego typu zachowanie wskazuje na niemieszalność składników układu, wydalenie składnika mniej stabilnego z filmu i utworzenie dwóch odeseparowanych faz.

Zależności $C_s^{-1}(\pi)$ obliczone na podstawie powyższych izoterm przedstawia rys.

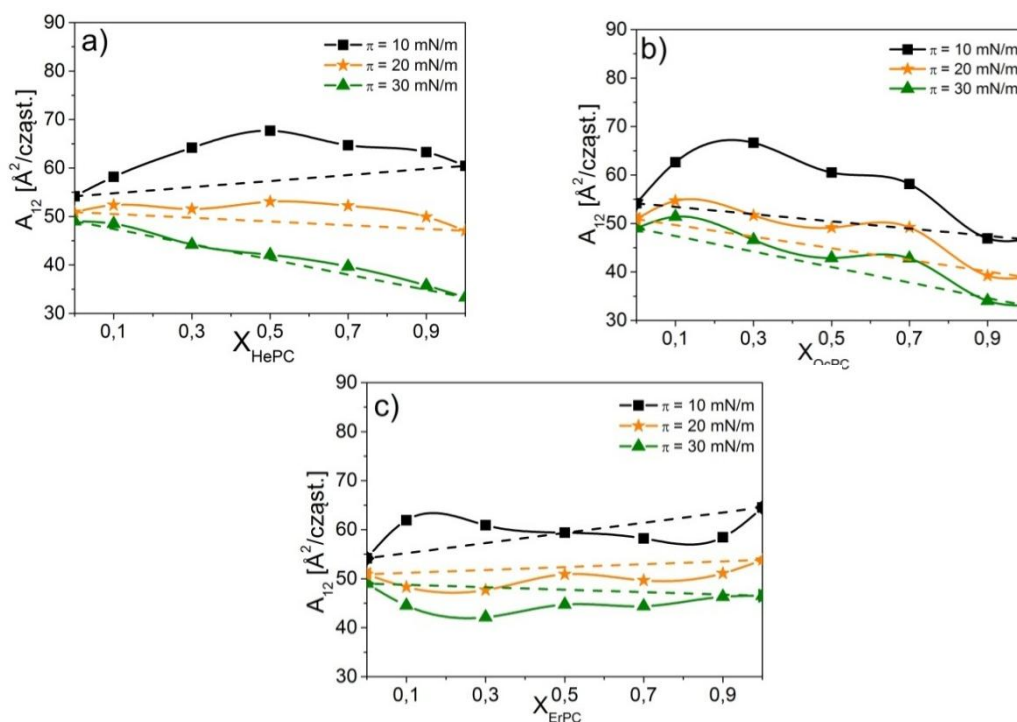
II.26.:



Rys.II.26. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ Izoterm monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z DPPC zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Ze zmian wartości maksymalnych modułów ściśliwości widać, że dodanie APCs powoduje spadek upakowania tworzonych filmów. Przykładowo, maksymalna wartość modułu ściśliwości dla DPPC wynosi ≈ 300 mN/m, a w przypadku mieszanin o ułamku molowym $X_{\text{APCs}} = 0,3$ wartość ta spada o połowę (≈ 150 mN/m). W przebiegu krzywych $C_s^{-1}(\pi)$ czystego fosfolipidu oraz frakcji molowych $X_{\text{APCs}} = 0,1-0,3$ obserwuje się obecność dwóch minimum. Pierwsze wynika z obecności obszaru plateau, drugie związane jest albo z usuwaniem cząsteczek APCs z mieszanych filmów albo z kolapsem APCs i występuje przy wartościach ciśnienia powierzchniowego, dla których w przebiegu izoterm π -A obserwuje się pierwszy kolaps.

Zależność średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę A_{12} w monowarstwie w funkcji ułamka molowego X_{APCs} ilustruje rys. II.27.:

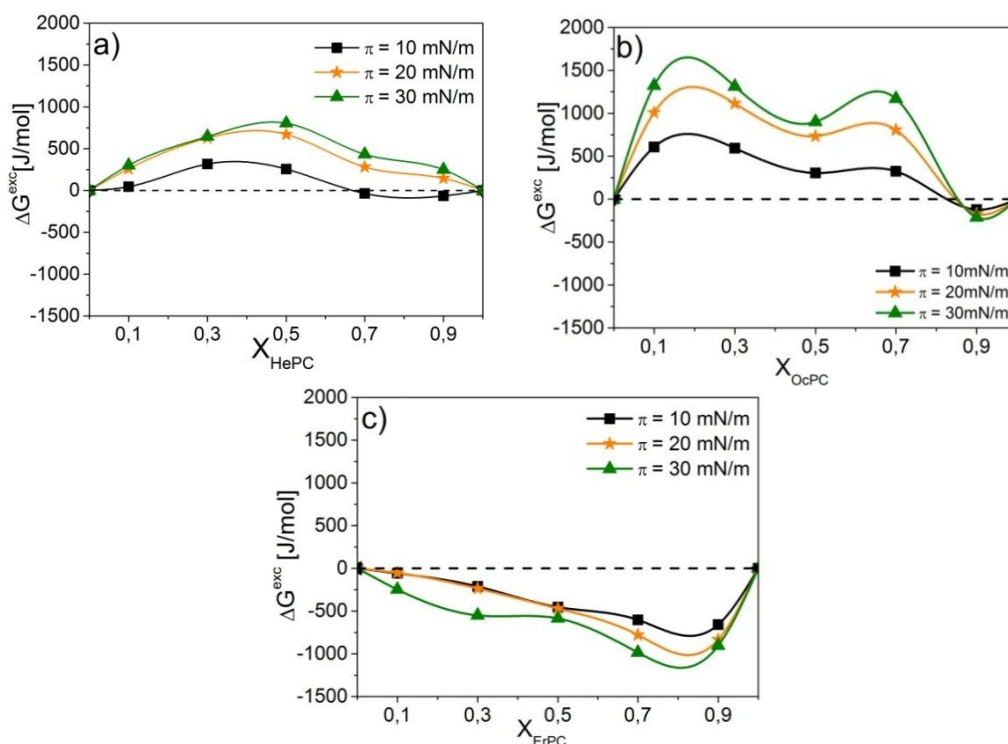


Rys. II.27. Wykresy zależności $A_{12}(X_{\text{APCs}})$ dla układów a) HePC/DPPC, b) OcPC/DPPC oraz c) ErPC/DPPC w temperaturze 20°C

Przebieg funkcji opisującej średnią powierzchnię przypadającą na cząsteczkę A_{12} wyznaczoną dla danych ciśnień w każdym z badanych układów odbiega nieznacznie od prostych określonych równaniem $A_{12} = A_1X_1 + A_2X_2$ (wykreślonych na powyższych wykresach liniami przerywanymi). Niewielkie odstępstwa od liniowości świadczą o małej sile oddziaływań między cząsteczkami DPPC, a cząsteczkami badanych lipidów

antynowotworowych. Dla układów HePC/DPPC oraz OcPC/DPPC średnie powierzchnie zajmowane przez cząsteczkę w mieszanej monowarstwie A_{12} są większe od powierzchni zajmowanych przez cząsteczkę w przypadku mieszanin idealnych bądź w przypadku zupełnego braku oddziaływań w całym zakresie badanych ułamków molowych. Można zauważyć, iż wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego przebieg krzywych $A_{12}(X)$ zmienia się, a odstępstwa od liniowości stają się coraz mniejsze. W monowarstwach utworzonych przez cząsteczki ErPC i DPPC średnia powierzchnia przypadająca na cząsteczkę A_{12} jest mniejsza niż w przypadku układu idealnego prawie w całym zakresie badanych ciśnień i ułamków molowych. Jedynie dla $X_{\text{ErPC}} = 0,1-0,3$ przy ciśnieniu powierzchniowym równym $\pi = 10 \text{ mN/m}$ cząsteczki zajmują powierzchnie większe niż te określone zależnością (I.22).

Aby móc lepiej przeanalizować oddziaływania między składnikami w poszczególnych monowarstwach oraz ich termodynamiczną stabilność - dla określonych ciśnień powierzchniowych - wyznaczono wartości ΔG^{exc} i przedstawiono w funkcji ułamków molowych APCs. Wyniki zaprezentowano na rys. II.28.:



Rys.II.28. Wykresy zależności $\Delta G^{\text{exc}} = f(X_{\text{APCs}})$ dla systemów a) HePC/DPPC, b) OcPC/DPPC oraz c) ErPC/DPPC w temperaturze 20°C

Dla dwóch pierwszych układów wartości ΔG^{exc} są dodatnie. Wyłącznie dla mieszanin bogatych w HePC i OcPC ($X_{\text{OcPC}} = 0,9$ dla każdego z rozpatrywanych ciśnień i $X_{\text{HePC}} = 0,7-$

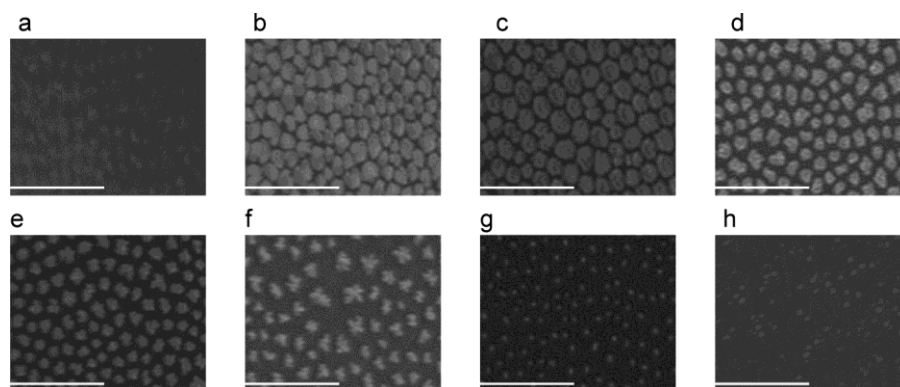
0,9 dla $\pi=10\text{mN/m}$) ΔG^{exc} przyjmuje wartości ujemne, jednak bliskie zeru. Świadczy to o słabej termodynamicznej stabilności mieszanin i wskazuje na separację faz w utworzonych mieszanych monowarstwach. W przypadku ErPC ΔG^{exc} przyjmują wartości ujemne w całym zakresie badanych ułamków molowych. Może to świadczyć o tym, że całkowity rozdział faz dla tego układu następuje dopiero powyżej wartości ciśnienia powierzchniowego pierwszego załamania. Określenie wzajemnej mieszalności pomiędzy molekułami ErPC i DPPC wymaga jednak zastosowania bardziej zaawansowanych metod badawczych (BAM i GIXD).

II. 4.3.3.1. Mieszalność w układzie DPPC/ErPC - analiza BAM i GIXD

W przebiegu izoterm zarejestrowanych dla monowarstw mieszanych ErPC/DPPC ubogich w ErPC ($X_{\text{ErPC}}=0,1$ i $X_{\text{ErPC}}=0,3$) w obszarze wysokich ciśnień (powyżej 45 mN/m) widoczne są obszary plateau. Na podstawie analizy przebiegu izoterm zasugerowano, że ich obecność może być wynikiem usuwania cząsteczek składnika mniej stabilnego (ErPC) z filmów i świadczyć o niemieszaniu się molekuł ErPC i DPPC w monowarstwie. Jednak analiza termodynamiczna ($\Delta G^{\text{exc}}(X_{\text{ErPC}})<0$ w przedziale ciśnienia powierzchniowego od 0 - 40 mN/m – rys. II.28 - dla 40 mN/m dane nie są pokazane) wskazuje na istnienie oddziaływań o charakterze bardziej przyciągającym (lub mniej odpychającym) w układzie mieszanym ErPC/DPPC w porównaniu do interakcji w układach jednoskładnikowych (ErPC/ErPC i DPPC/DPPC). Aby zatem jednoznacznie określić zachowanie się cząsteczek w mieszaninach ErPC/DPPC i uzyskać lepszy wgląd w strukturę badanych filmów w obszarze poprzedzającym pierwszy kolaps, a także zaraz po nim, przeprowadzono dodatkowe badania, wykorzystując w tym celu mikroskopię BAM oraz technikę rozproszeniową GIXD. W każdym z przypadków analizowano monowarstwy skompresowane do 30 mN/m (obszar poniżej wartości kolapsu ErPC) oraz do 50 mN/m (obszar po kolapsie ErPC).

W pierwszej kolejności zarejestrowano obrazy BAM dla monowarstwy DPPC oraz monowarstw mieszanych o ułamkach molowych X_{ErPC} : 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 przy wartości ciśnienia powierzchniowego $\pi = 30$ mN/m. Wyniki zaprezentowano na rys. II.29. (dla ErPC (rys. II.20) oraz monowarstw o dużym jej stężeniu ($X_{\text{ErPC}}=0,8$ i 0,9) uzyskane obrazy były całkowicie homogeniczne i nawet po

kolapsie nie zaobserwowano żadnych struktur, w związku z czym zostały tutaj pominięte):



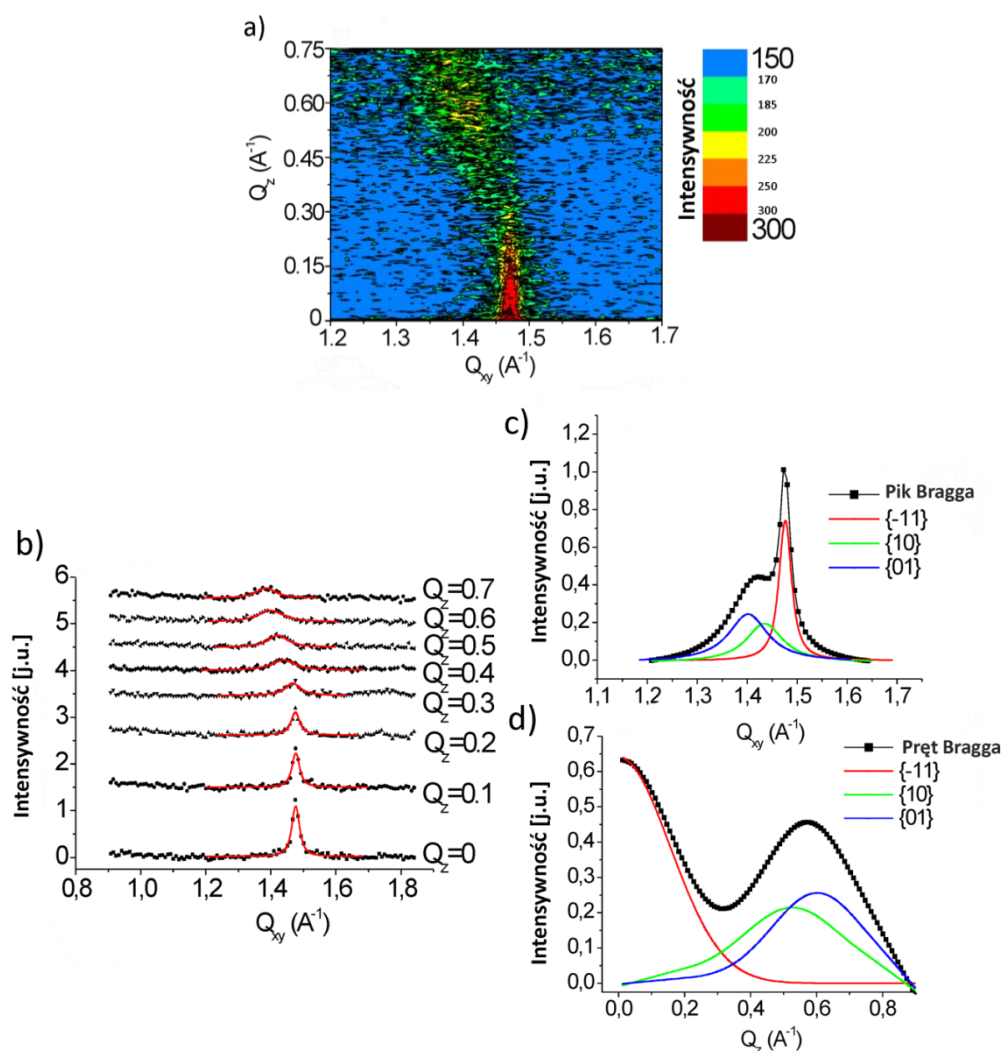
Rys. II.29. Obrazy BAM zarejestrowane przy wartości ciśnienia powierzchniowego $\pi = 30 \text{ mN/m}$: a) DPPC; b) $X_{\text{ErPC}} = 0,1$; c) $X_{\text{ErPC}} = 0,2$; d) $X_{\text{ErPC}} = 0,3$; e) $X_{\text{ErPC}} = 0,4$; f) $X_{\text{ErPC}} = 0,5$; g) $X_{\text{ErPC}} = 0,6$; h) $X_{\text{ErPC}} = 0,7$ (biały odcinek na zdjęciach odpowiada $100 \mu\text{m}$)

Struktura monowarstw utworzonych przez DPPC zwizualizowana przy pomocy BAM oraz mikroskopii fluorescencyjnej jest w literaturze szeroko opisana, a wyniki uzyskane przy pomocy tych dwóch technik są ze sobą zgodne (McConlogue i Vanderlik, 1997). Pierwsze domeny o charakterystycznym wydłużonym kształcie (tzw. "asymmetric bean") pojawiają się przy ciśnieniu ok. 6 mN/m , czyli w rejonie koegzystencji dwóch faz. Podczas dalszej kompresji ich rozmiar i liczba rośnie, domeny łączą się ze sobą, a przy 30 mN/m obraz jest praktycznie homogeniczny (II.29 a). Po dodaniu do monowarstwy DPPC frakcji molowych $X_{\text{ErPC}}=0,1-0,2$ na obrazach pojawiają się duże domeny. Dla obu tych ułamków domeny mają podobną wielkości, ale ich kształt różni się: dla $X_{\text{ErPC}}=0,1$ obserwuje się wyraźną nieregularność, natomiast dla $X_{\text{ErPC}}=0,2$ domeny mają kształt zbliżony do eliptycznego. Wraz ze zwiększaniem proporcji ErPC w monowarstwie odległości między domenami zwiększają się, co świadczy o tym, że coraz większa liczba cząsteczek zaangażowana jest w tworzenie fazy rozprężonej. Dla frakcji molowych ErPC od 0,2 do 0,5 obserwuje się stopniowe zmniejszanie napięcia liniowego i zmianę kształtu domen na charakterystyczny rozgałęziony (tzw. "snow-flake-like") (rys II. 29 f). Dla dwóch kolejnych frakcji molowych $X_{\text{ErPC}} = 0,6-0,7$ liczba domen na jednostkę powierzchni znacząco spada, a ich wielkość maleje.

W dalszym etapie badań przeprowadzono eksperyment dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego dla ErPC, DPPC oraz ich mieszanin skompresowanych do ciśnienia 30 mN/m . Z uwagi na ciekły stan monowarstwy ErPC

($C_s^{-1}_{\max} = 79 \text{ mN/m}$) oraz jej jednorodny obraz BAM wątpliwe było, aby rozpraszała ona promieniowanie synchrotronowe. Rzeczywiście, okazało się, że zarówno monowarstwa ErPC jak i mieszanina ErPC/DPPC o najwyższym stężeniu leku nie dały obrazu dyfrakcyjnego. Zaskakujące okazało się jednak to, że dla monowarstwy o najniższym stężeniu ErPC ($X_{\text{ErPC}} = 0,1$) również nie udało się zaobserwować piku, pomimo iż, jak pokazały obrazy BAM (rys II.29 b), większość molekuł w tym filmie zaangażowana jest w tworzenie domen skondensowanych.

Pozostałe wyniki w formie pików i prętów Bragga przedstawiono poniżej. Dla DPPC dodatkowo zaprezentowano mapę wektora rozpraszania.

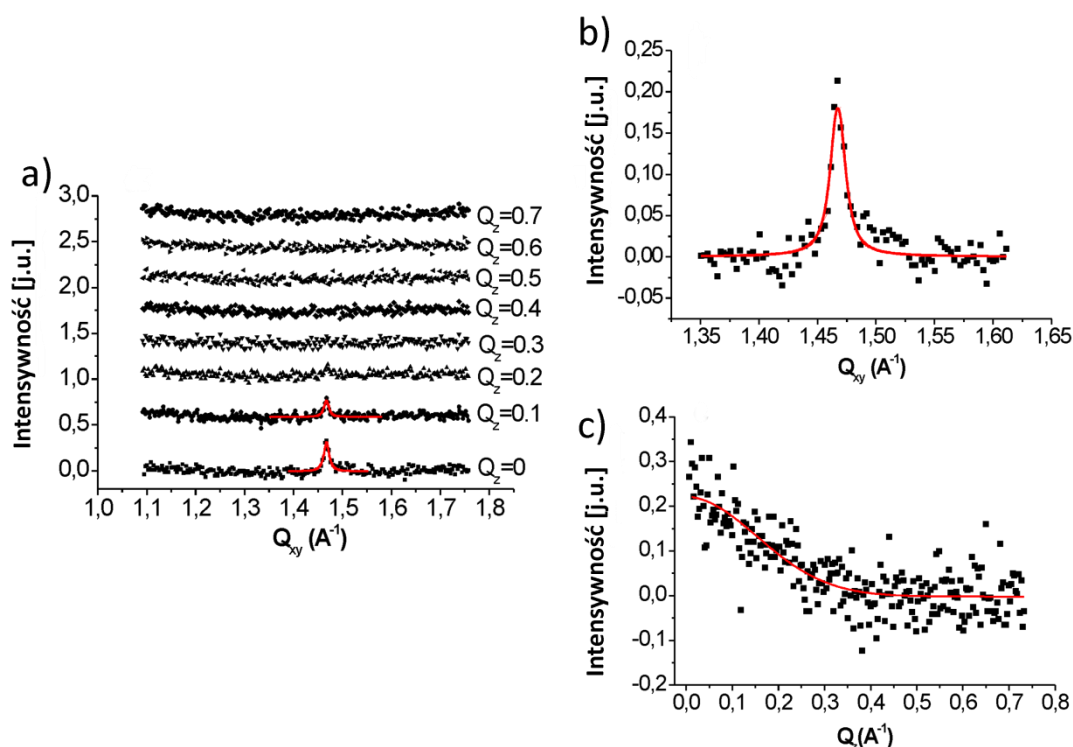


Rys.II.30. Dane GIXD zarejestrowane dla monowarstwy DPPC skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m na powierzchni wody: a) mapa wektora rozpraszania, $I(Q_{xy}, Q_z)$, b) Piki Bragga policzone przy różnych wartościach Q_z c) Całkowity pik Bragga d) całkowity pręt Bragga

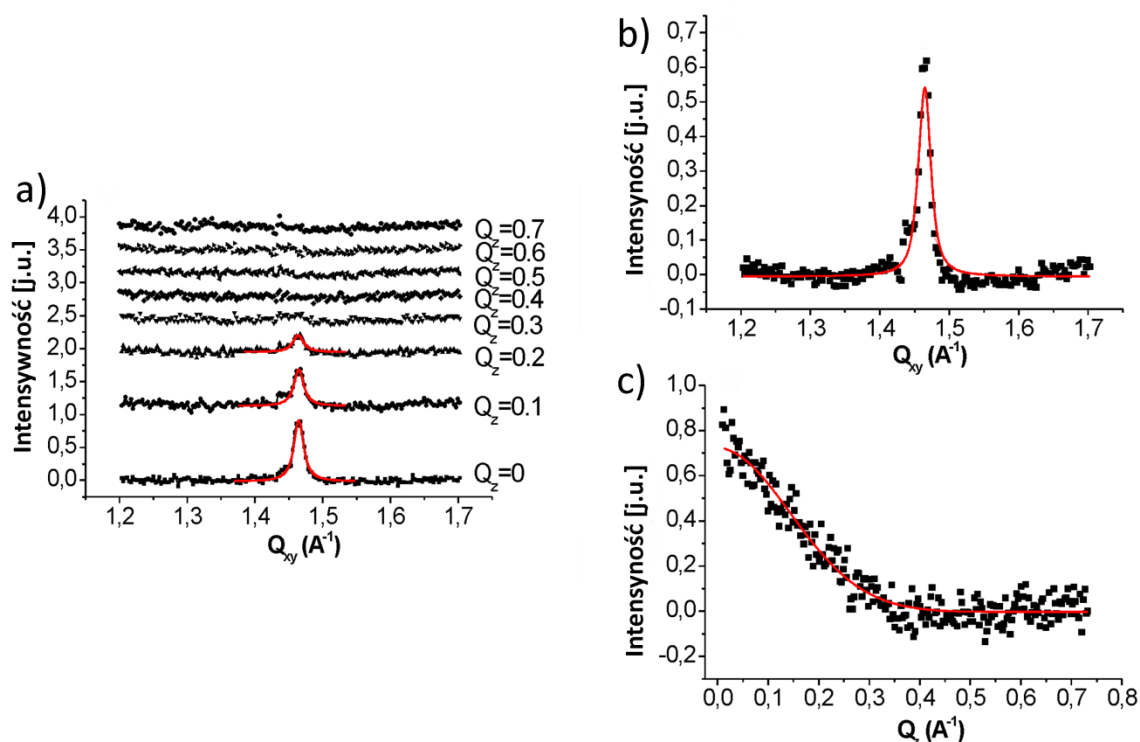
Dokładna interpretacja zależności $I(Q_{xy})$ policzonych przy różnych wartościach Q_z (rys. II.30 b) pozwoliła dostrzec 3 piki Bragga (rys. II.30 c) oznaczone zbiorami prostych $\{-11\}$, $\{10\}$, $\{01\}$ i charakteryzujące się maksimum na 1,476; 1,435 oraz 1,402 $\text{\AA}^{-1}$. Obecność trzech pików wskazuje na to, że dwuwymiarowa sieć krystaliczna DPPC przy ciśnieniu 30 mN/m może zostać jednoznacznie określona jako ukośna, co pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez Brezesinski'ego i wsp. (Brezesinski i wsp., 1995). W oparciu o znajomość położenia maksimum pików Bragga obliczono odległości d między liniami w analizowanej sieci ($d=2\pi/Q_{xy}$), a następnie na ich podstawie wyznaczono parametry komórki elementarnej ($a = 4,928 \text{ \AA}$, $b = 5,044 \text{ \AA}$, $\gamma = 117,3^\circ$). Ukośna komórka elementarna zawiera tylko jeden łańcuch DPPC, zatem obliczając jej pole powierzchni ($P=absin\gamma$), można określić powierzchnie odpowiadającą cząsteczce DPPC w monowarstwie przy ciśnieniu 30 mN/m. Wynosi ona 44,14 $\text{\AA}$. Dodatkowo dysponując wartościami szerokości połówkowych pików obliczono długości koherentne w płaszczyźnie monowarstwy L_{xy} . W kierunku krystalograficznym $\{-11\}$ (pik wąski) L_{xy} wynosi $(217 \pm 6) \text{ \AA}$. Wartość tą można traktować jako średnicę przeciętnej domeny powierzchniowej, co z kolei pozwala w przybliżeniu oszacować liczbę tworzących ją cząsteczek DPPC na ok. 840.

Na rys. II.30 d widoczne są trzy pręty Bragga, oznaczone podobnie jak piki Bragga zbiorami prostych $\{-11\}$, $\{10\}$ i $\{01\}$. Maksima intensywności przypadają na 0 $\text{\AA}^{-1}$; 0,526 $\text{\AA}^{-1}$ i 0,602 $\text{\AA}^{-1}$ (odpowiednio dla każdego pręta). Koherentna długość w kierunku z dla kierunku krystalograficznego $\{-11\}$ obliczona ze wzoru (I.36) wynosi $(18,2 \pm 0,3) \text{ \AA}$. Długość tą interpretuje się jako długość fragmentu molekuly rozpraszającego promieniowanie X. Otrzymana wartość odpowiada dokładnie długości łańcucha acylowego DPPC pomniejszonej o zbiorowe nachylenie cząsteczek tworzących monowarstwę. Dodatkowo, korzystając z zależności (I.37) obliczono kąt nachylenia cząsteczki DPPC (kąt pomiędzy normalną do płaszczyzny xy a szkieletem hydrofobowej części molekuly). Wynosi on $25,3^\circ$.

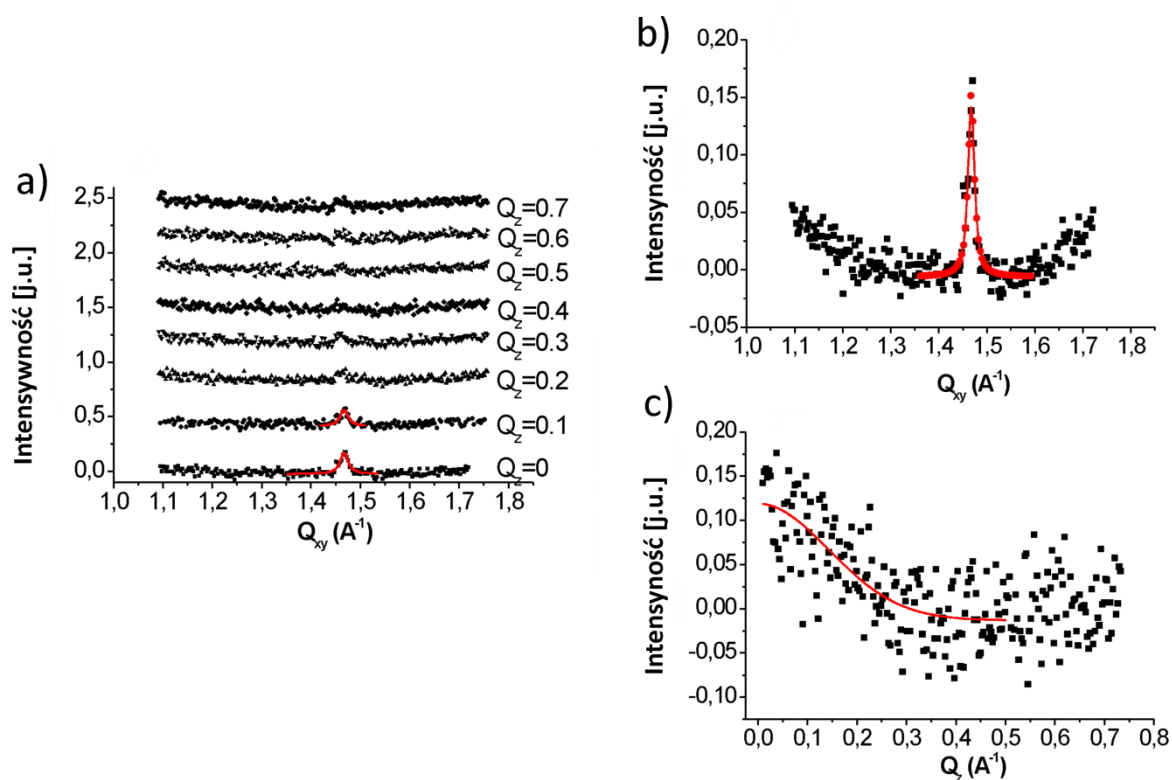
Na kolejnych rysunkach (rys. II.31 - II.33) przedstawiono wyniki eksperymentu GIXD przeprowadzonego na monowarstwach mieszanych o ułamku molowym $X_{\text{ErPC}}=0,3$; $X_{\text{ErPC}}=0,5$ oraz $X_{\text{ErPC}}=0,7$.



Rys.II.31. Dane GIXD zarejestrowane dla monowarstwy mieszanej ErPC/DPPC o ułamku molowym $X_{ErPC}=0,3$ skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m na powierzchni wody: a) piki Bragga b) pręt Bragga c) pręt Bragga



Rys.II.32. Dane GIXD zarejestrowane dla monowarstwy mieszanej ErPC/DPPC o ułamku molowym $X_{ErPC}=0,5$ skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m na powierzchni wody: a) Piki Bragga b) pręt Bragga c) pręt Bragga



Rys.II.33. Dane GIXD zarejestrowane dla monowarstwy mieszanej ErPC/DPPC o ułamku molowym $X_{\text{ErPC}}=0,7$ skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m na powierzchni wody: a) Piki Bragga policzone przy różnych wartościach Q_z a) Pik Bragga b) pręt Bragga

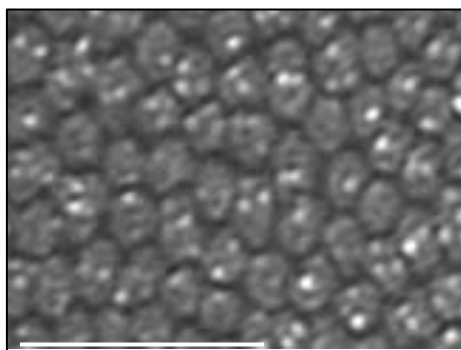
Dla wszystkich trzech mieszanych monowarstw o różnej zawartości ErPC obserwuje się pojedynczy pik dyfrakcyjny o słabej intensywności i maksimum na $1,46 \text{ \AA}^{-1}$. Pojedynczy pik Bragga wskazuje na heksagonalne rozmieszczenie cząsteczek w dwuwymiarowej sieci krystalicznej. Postępując analogicznie jak w przypadku DPPC dla każdej z mieszanin wyznaczono parametry komórek elementarnych oraz ich pola powierzchni, a dane zamieszczono w tabeli zbiorczej na końcu tej sekcji. Dla wszystkich analizowanych układów mieszanych rozmiary domen krystalicznych odzwierciedlone w długościach koherentnych L_{xy} (dane w tabeli II.4.) są do siebie zbliżone i wyższe niż dla DPPC. Wśród mieszanin, dla których zebrano obraz dyfrakcyjny, najwyższą intensywnością charakteryzuje się pik dla $X_{\text{ErPC}}=0,5$. Amplituda tego pików jest 2 razy wyższa niż pików dla pozostałych dwóch frakcji. Stosunek natężeń w kolejności DPPC: $X_{\text{ErPC}}=0,3$: $X_{\text{ErPC}}=0,5$: $X_{\text{ErPC}}=0,7$ wynosi $1,1 : 0,1 : 0,2 : 0,085$.

Pręty Bragga dla wszystkich trzech przypadków mają swoje maksimum dla $Q_z=0 \text{ \AA}^{-1}$, zatem cząsteczki zorientowane są prostopadle do płaszczyzny xy ($\tau=0^\circ$) – co jest

charakterystyczne dla dwuwymiarowej sieci heksagonalnej. Policzone wartości L_Z (tab. II.4.) również są do siebie zbliżone i odpowiadają w granicach błędu wartości L_Z uzyskanej dla DPPC.

W drugiej części eksperymentu badano zachowanie cząsteczek w rejonie wysokich ciśnień. Jak widać na rys II.25. w przebiegu izoterm mieszanych mieszanin ErPC/DPPC o małej zawartości ErPC ($X_{\text{ErPC}} = 0,1-0,3$) obserwuje się obszar plateau występujący przy ciśnieniu zbliżonym do ciśnienia załamania ErPC. Aby wyjaśnić to zjawisko, oraz określić charakter tego przejścia dla wybranej frakcji molowej - $X_{\text{ErPC}}=0,3$ skompresowanej do 50 mN/m wykonano analizę z zastosowaniem BAM oraz GIXD.

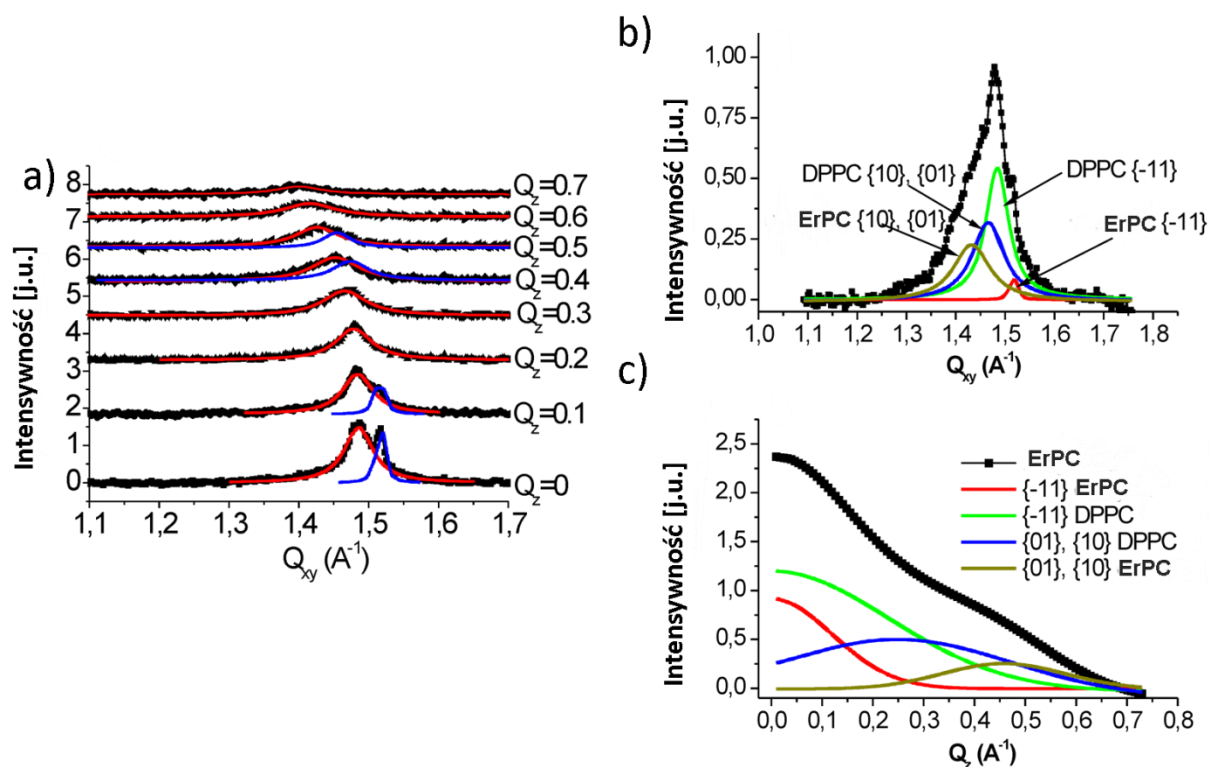
W pierwszym kroku strukturę monowarstwy zobrazowano przy użyciu mikroskopu BAM:



Rys.II.34. Obraz BAM zarejestrowany przy wartości ciśnienia powierzchniowego $\pi = 30 \text{ mN/m}$ dla $X_{\text{ErPC}} = 0,3$ (biały odcinek na zdjęciach odpowiada $100 \mu\text{m}$)

Na obrazie zarejestrowanym w 50 mN/m można zauważyć małe jasne domeny wykrywalne z dużych skondensowanych domen. Istnieją dwie możliwe interpretacje tego zjawiska. Z jednej strony te małe domeny mogą być wielowarstwowymi strukturami, które powstały na drodze kolapsu monowarstwy ErPC; z drugiej – osobnymi domenami o mocno skondensowanym charakterze, powstałymi na skutek usunięcia cząsteczek ErPC z monowarstwy.

Kolejny rysunek ilustruje wyniki eksperymentu GIXD przeprowadzonego dla monowarstwy $X_{\text{ErPC}}=0,3$ przy ciśnieniu powierzchniowym 50 mN/m.



Rys.II.35. Dane GIXD zarejestrowane dla monowarstwy mieszanej ErPC/DPPC o ułamku molowym $X_{\text{ErPC}}=0,3$ skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 50 mN/m na powierzchni wody: a) Piki Bragga policzone przy różnych wartościach Q_z a) pik Bragga b) pręt Bragga c)

Dokładna analiza obrazu dyfrakcyjnego pozwoliła rozróżnić cztery składowe maksimach na $1,432 \text{ \AA}^{-1}$; $1,466 \text{ \AA}^{-1}$; $1,484 \text{ \AA}^{-1}$, $1,517 \text{ \AA}^{-1}$ dające wkład do całkowitych pików i prętów Bragga (rys. II.35 b). Dwa spośród otrzymanych pików cechuje zdegenerowanie. Jako kryterium przyporządkowania składowych obrazu dyfrakcyjnego posłużyły obliczone na podstawie prętów Bragga (rys. II.35 c) wartości L_z . I tak, dwie z nich przypisano DPPC ($L_z \approx 18 \text{ \AA}$), natomiast pozostałe - ErPC ($L_z \approx 11 \text{ \AA}$). Uzyskane dane wyraźnie wskazują, że w 50 mN/m układ mieszany ErPC/DPPC tworzy dwie rozseparowane fazy. Dwuwymiarowa sieć rozdzielonych domen krystalicznych tworzonych przez cząsteczki DPPC i ErPC w obu tych przypadkach może być opisana jako sieć wycelowana prostokątna (zdeformowana heksagonalna). Cząsteczki w monowarstwie są zbiorczo przechylone, a kąt nachylenia dla DPPC wynosi $20,2^\circ$, natomiast w przypadku molekuł ErPC - $14,9^\circ$. Położenie niezdegenerowanego pików {-1,1} blisko płaszczyzny xy ($Q_z \approx 0$) oraz pików zdegenerowanych {0,1}{10} powyżej horyzontu, wskazuje, że w obu przypadkach hydrofobowe fragmenty molekuł

przechylone są w stronę najbliższego sąsiada (NN). Wyliczone parametry komórek elementarnych przedstawiono w tabelach II.4 i II.5.

Monowarstwa	Położenie pików i prętów Bragga		Parametry komórki elementarnej				Długość koherentna $L_{xy} \pm s(L_{xy})$ [Å]	Długość koherentna $L_z \pm s(L_z)$ [Å]	Kąt nachylenia τ [°]
	Q_{xy} [Å ⁻¹]	Q_z [Å ⁻¹]	a [Å]	b[Å]	γ [°]	A[Å ²]			
DPPC	$Q_{\{-11\}} = 1,476$	$Q_{\{-11\}} = 0$					217 ± 6	$18,2 \pm 0,3$	25,3
	$Q_{\{10\}} = 1,435$	$Q_{\{10\}} = 0,526$	4,928	5,044	117,3	22,07	64 ± 5	$19,9 \pm 3$	
	$Q_{\{01\}} = 1,402$	$Q_{\{01\}} = 0,602$					60 ± 4	$20,8 \pm 2$	
$X_{ErPC}=0,3$	1,467	0	4,944	4,944	120	21,17	425 ± 37	$18,6 \pm 0,7$	0
$X_{ErPC}=0,5$	1,464	0	4,954	4,954	120	21,25	357 ± 14	$19,8 \pm 0,3$	0
$X_{ErPC}=0,7$	1,468	0	4,943	4,943	120	21,16	375 ± 32	$19,9 \pm 1,3$	0

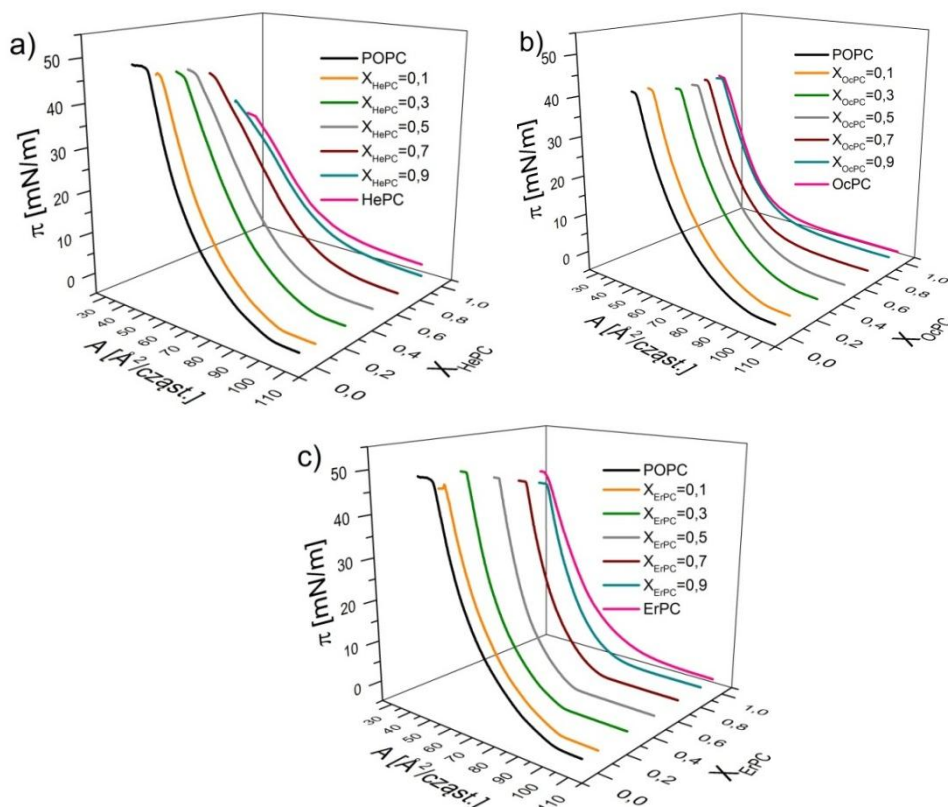
Tab. II.4. Parametry struktury obliczone na podstawie wyników uzyskanych z pomiarów GIXD dla monowarstw DPPC; $X_{ErPC}=0,3$; $X_{ErPC}=0,5$; $X_{ErPC}=0,7$ skompresowanych do ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m

Monowarstwa	Położenie pików i prętów Bragga		Parametry komórki elementarnej				Długość koherentna $L_{xy} \pm s(L_{xy})$ [Å]	Długość koherentna $L_z \pm s(L_z)$ [Å]	Kąt nachylenia τ [°]
	Q_{xy} [Å ⁻¹]	Q_z [Å ⁻¹]	a [Å]	b[Å]	γ [°]	A[Å ²]			
domeny ErPC	$Q_{\{-11\}} = 1,484$	$Q_{\{-11\}} = 0$	4,909	4,909	119,2	21,04	107 ± 2	$11,3 \pm 0,4$	14,9
	$Q_{\{01\}\{10\}} = 1,466$	$Q_{\{01\}\{10\}} = 0,341$					75 ± 1	$10,9 \pm 0,3$	
domeny DPPC	$Q_{\{-11\}} = 1,517$	$Q_{\{-11\}} = 0$	4,883	4,883	116,0	21,42	600 ± 800	$20 \pm 0,3$	20,2
	$Q_{\{01\}\{10\}} = 1,432$	$Q_{\{01\}\{10\}} = 0,474$						$18,0 \pm 1$	

Tab. II.5. Parametry struktury obliczone na podstawie wyników uzyskanych z pomiarów GIXD dla monowarstwy $X_{ErPC}=0,3$ skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 50 mN/m

II.4.3.3. Monowarstwy mieszane APCs z POPC

Następnymi badanymi układami były mieszaniny APCs/POPC. Rezultaty przeprowadzonych eksperymentów prezentuje poniższy rysunek:

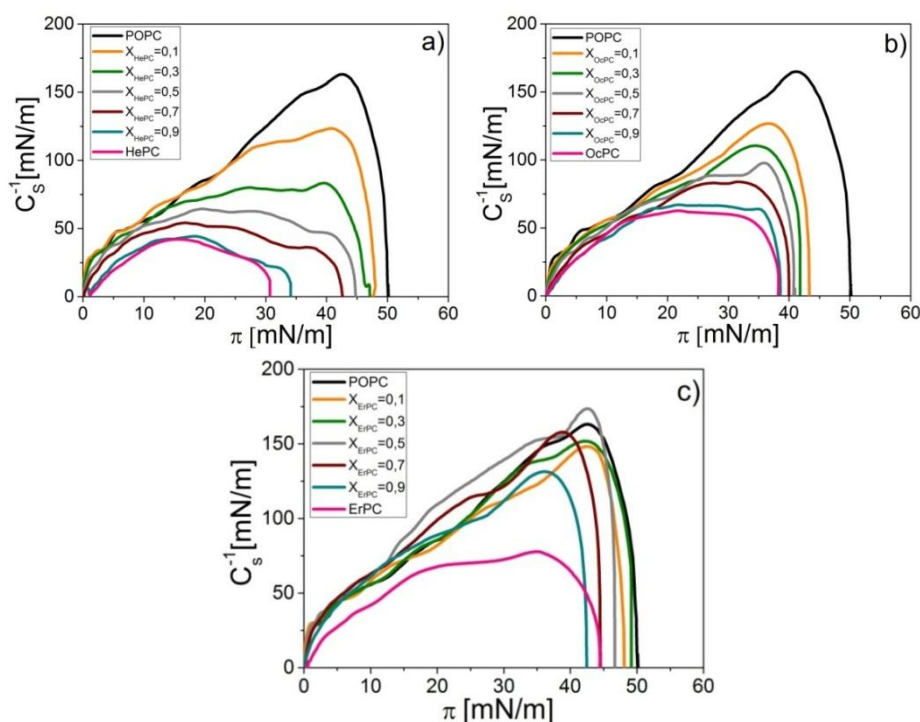


Rys.II.36. Izotermie monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z POPC zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Izotermie dla każdego z badanych układów mieszanych leżą pomiędzy izotermami zarejestrowanymi dla układów jednoskładnikowych. W przebiegu izotermi POPC nie obserwuje się charakterystycznego dla DPPC przejścia fazowego. Wynika to z obecności w łańcuchu alkilowym cząsteczki POPC podwójnego wiązania o konformacji *cis*, ograniczającego swobodną rotację łańcucha (Yun i wsp., 2003). Zwiększenie zawartości APCs w monowarstwie powoduje przesunięcie izotermi w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w stosunku do izotermi czystego fosfolipidu. Dla pierwszego z badanych układów - HePC/POPC - ciśnienie kolapsu

zmienia się liniowo wraz ze zmianą składu monowarstwy w całym zakresie badanych ułamków molowych świadcząc o mieszalności składników tego układu. Dla dwóch pozostałych APCs również obserwuje się zmianę wartości ciśnienia załamania w funkcji składu monowarstwy, jednak zbliżone do siebie wartości kolapsów czystych składników, nie pozwalają na jednoznaczne określenie mieszalności układów.

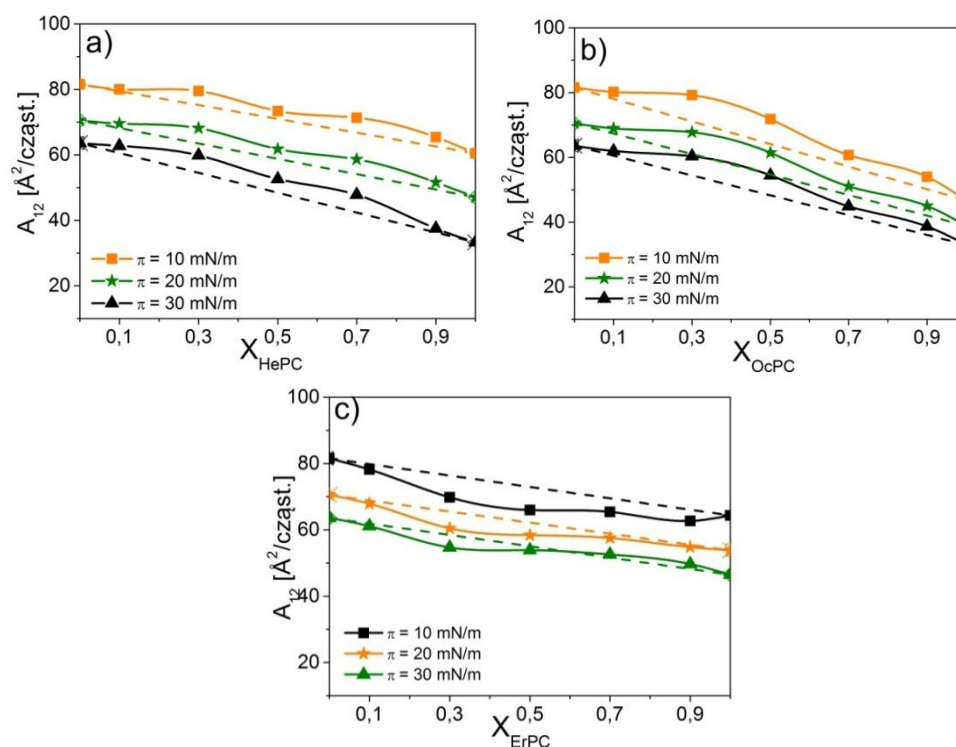
Zależności $C_s^{-1}(\pi)$ obliczone na podstawie powyższych izoterm przedstawia rys. II.37.



Rys.II.37. Przebieg krzywych C_s^{-1} dla monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z POPC zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Wyliczone maksymalne moduły ściśliwości C_s^{-1} wskazują na ciekły stan monowarstw utworzonych zarówno przez cząsteczki APCs, POPC jak i ich mieszaniny ($C_s^{-1_{max}} \leq 175$ mN/m). W przypadku układów HePC/POPC i OcPC/POPC zwiększenie frakcji molowych APCs powoduje systematyczny spadek upakowania monowarstwy. Dla układu ErPC/POPC maksymalne wartości modułów ściśliwości dla mieszanin, zbliżone są do wartości uzyskanej dla czystego POPC.

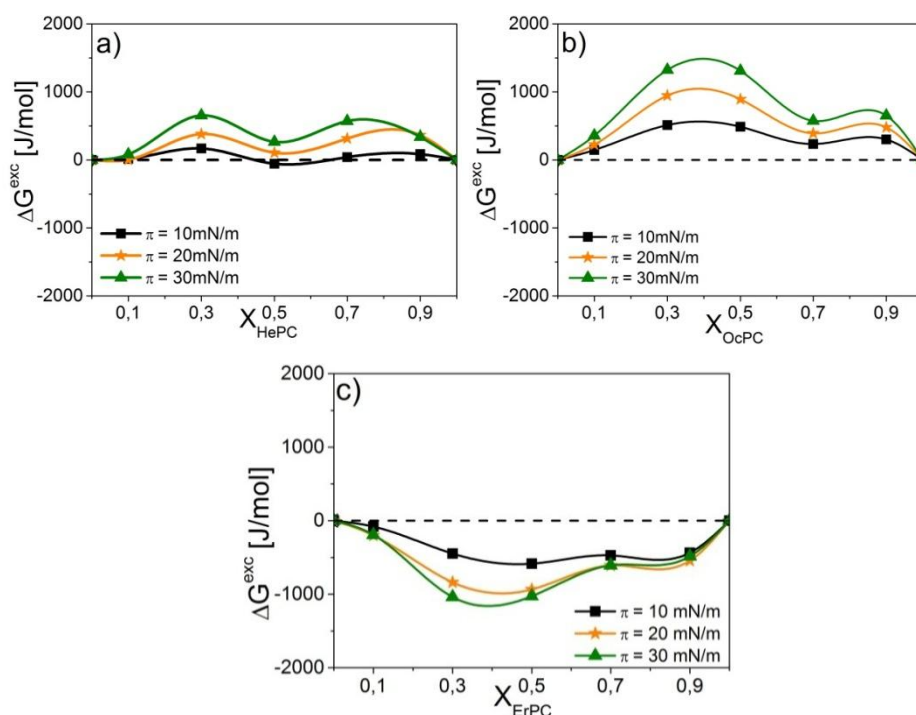
Zależność średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę A_{12} w monowarstwie w funkcji ułamka molowego X_{APCs} przedstawiono poniżej:



Rys. II.38. Wykresy zależności $A_{12}(X_{APCs})$ dla układów a) HePC/POPC, b) OcPC/POPC oraz c) ErPC/POPC w temperaturze 20°C

Zestawienie danych eksperymentalnych A_{12} z krzywą teoretyczną (linia przerywana) pozwala zauważyć, że większość punktów doświadczalnych leży blisko prostej określonej równaniem I.22. Podobne wyniki dla mieszaniny HePC/POPC możemy znaleźć w pracy Rakotomanga i wsp.. Autorzy sugerują, że pomiędzy molekułami POPC a HePC występują proste oddziaływania addytywne (Rakotomanga i wsp., 2004). Podobnie jak w przypadku mieszanin z DPPC - dla dwóch pierwszych mieszanin - niewielkie odstępstwa od liniowości w całym zakresie badanych ułamków molowych mają charakter dodatni, natomiast dla układu ErPC/POPC odstępstwa te są ujemne.

Zmiany nadmiarowej entalpii mieszania w zależności od składu monowarstwy przedstawia rys. II.39:

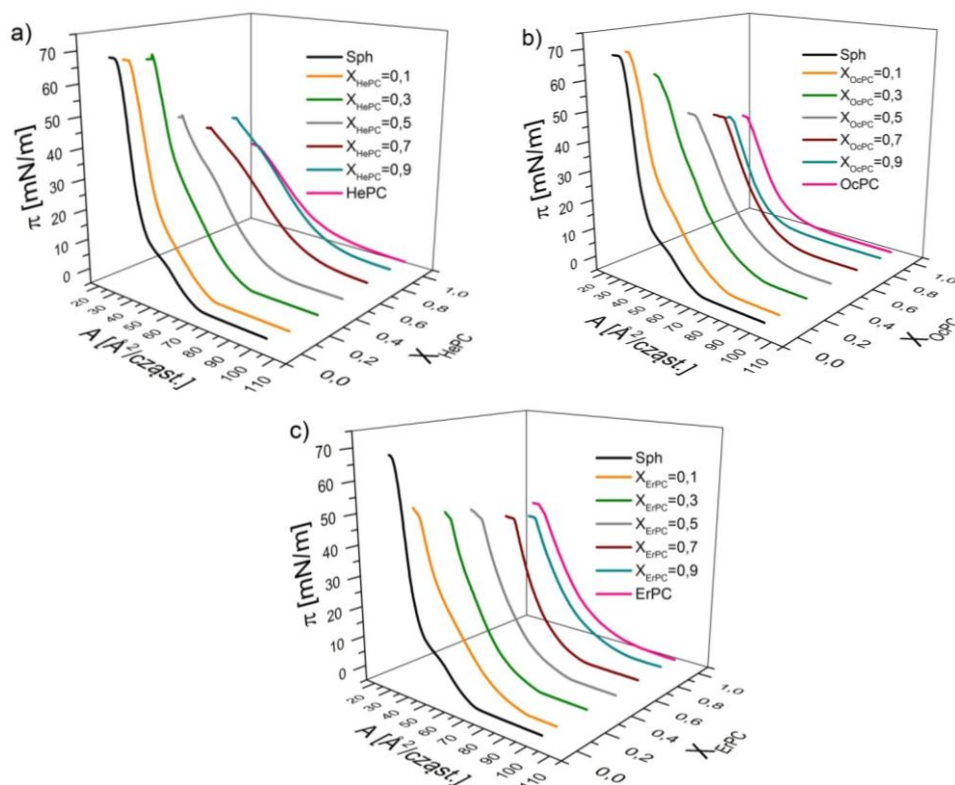


Rys.II.39. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla systemów a) HePC/POPC, b) OcPC/POPC oraz c) ErPC/POPC w temperaturze 20°C

Oddziaływania pomiędzy składnikami w dwóch pierwszych systemach mieszanych mają charakter odpychający (lub mniej przyciągający) w odniesieniu do oddziaływań w filmach jednoskładnikowych, o czym świadczą dodatnie wartości ΔG^{exc} . Utworzone monowarstwy odznaczają się słabą stabilnością termodynamiczną. ErPC tworzy natomiast z POPC stabilne termodynamicznie monowarstwy (ujemne wartości ΔG^{exc}), w których występują przyciągające (bądź mniej odpychające) oddziaływania między cząsteczkami komponentów. Rząd wielkości oddziaływań porównywalny jest do interakcji pomiędzy cząsteczkami w układach mieszanych z DPPC. Dla układu ErPC/POPC obserwuje się przesunięcie maksimum oddziaływania (w porównaniu z mieszaniną z DPPC) w stronę filmów o mniejszej zawartości ErPC ($X_{ErPC} = 0,3-0,5$).

II.4.3.4. Monowarstwy mieszane APCs ze sfingomieliną (Sph)

Kolejna seria eksperymentów dotyczyła oddziaływań w układach APCs/Sph. Zarejestrowane izotermy prezentuje rys. II.40:



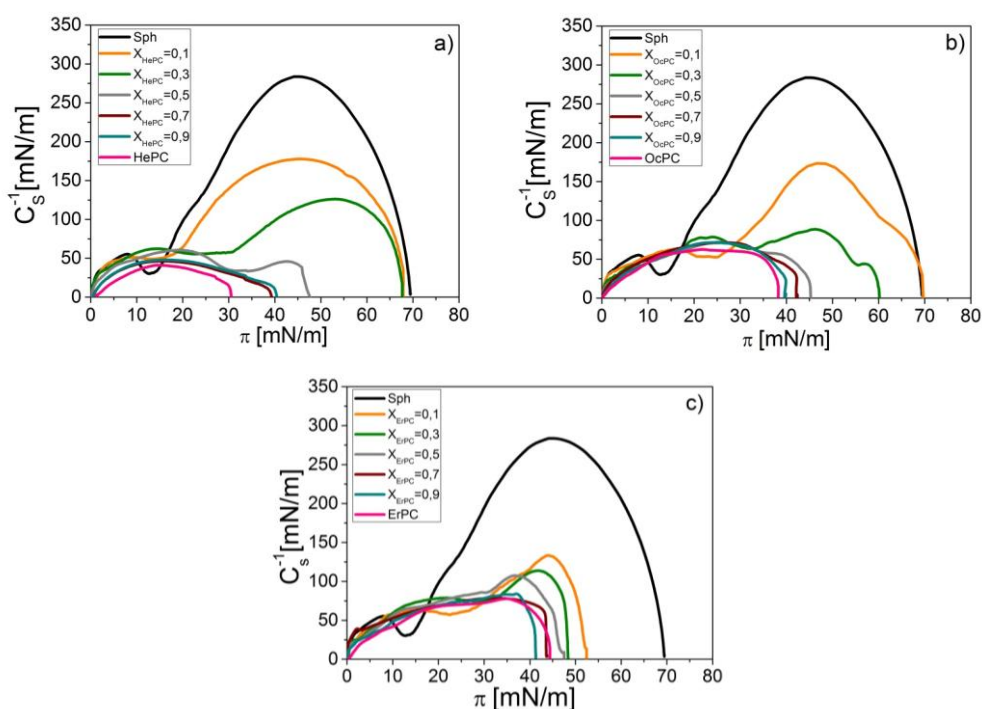
Rys. II.40. Izotermy monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z Sph zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Izoterma zarejestrowana dla monowarstwy utworzonej z samej sfingomieliny zaczyna wznosić się przy powierzchni 78 Å²/cząsteczkę. W jej przebiegu zaobserwować można obszar związany z przejściem fazowym między L₁ a L₂ zachodzącym przy ciśnieniu ok. 15 mN/m. Obszar ten widoczny jest również dla układów mieszanych o małych frakcjach molowych APCs ($X_{\text{HePC}}, X_{\text{OcPC}} = 0,1 - 0,3$ oraz $X_{\text{ErPC}} = 0,1$). Dalsze dodawanie APCs powoduje systematyczną zmianę przebiegu krzywych π -A w kierunku kształtu odpowiedniego dla APCs. Przy małych ułamkach molowych badanych APCs obserwuje się dodatkowo przesunięcie punktu „lift off” w stronę wyższych powierzchni

przypadających na cząsteczkę w filmie. Zwiększanie frakcji molowej APCs powoduje - w przypadku dwóch pierwszych układów - systematyczny spadek wartości ciśnienia załamania π_{coll} . W przypadku trzeciego układu ciśnienie kolapsu dla wszystkich mieszanin pozostaje praktycznie na stałym poziomie, zbliżonym do ciśnienia załamania monowarstwy utworzonej przez cząsteczki ErPC. Obniżenie wartości π_{coll} świadczy o mniejszej stabilności analizowanych filmów w stosunku do monowarstwy Sph.

Zależności $C_s^{-1}(\pi)$ obliczone na podstawie powyższych izoterm przedstawia rys.

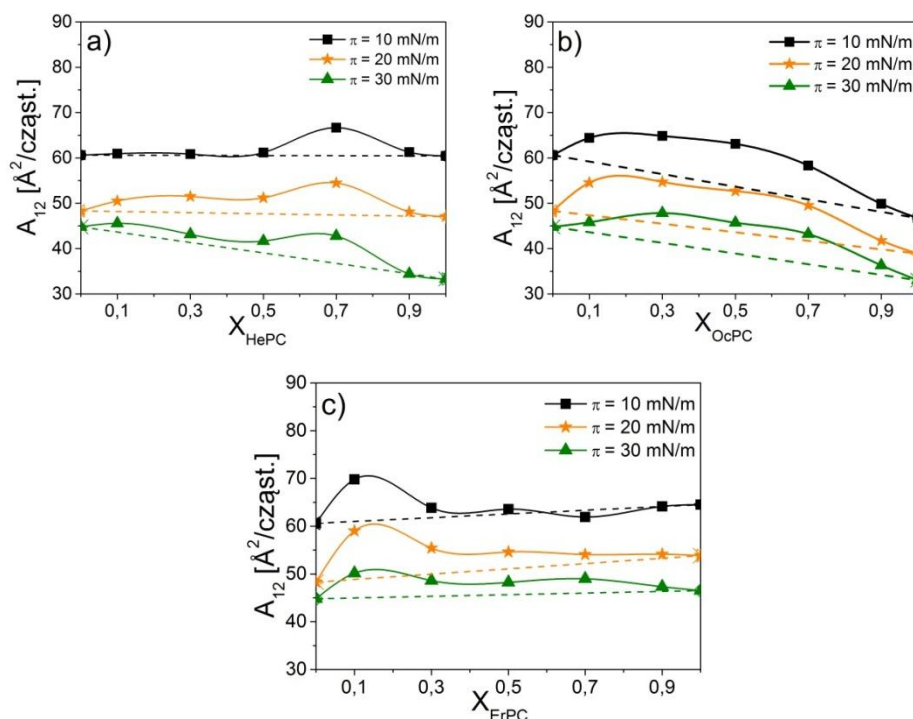
II.41:



Rys. II.41. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ Izotermy monowarstw mieszaniny HePC, OcPC oraz ErPC z Sph zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Dla wszystkich trzech badanych układów obserwuje się spadek upakowania tworzonych filmów na skutek dodania do nich APCs. Dla układów HePC/Sph oraz OcPC/Sph spadek ten następuje systematycznie wraz ze zwiększaniem frakcji molowej badanych lipidów antynowotworowych, podczas gdy dla trzeciego z układów - ErPC/Sph - już niewielka ilość leku ($X_{ErPC}=0,1$) powoduje wyraźny spadek uporządkowania filmów. W przebiegu krzywych $C_s^{-1}(\pi)$ dla sfingomieliny oraz niskich frakcji molowych X_{APCs} obserwuje się obecność minimum związanego ze wspomnianym wyżej przejściem fazowym.

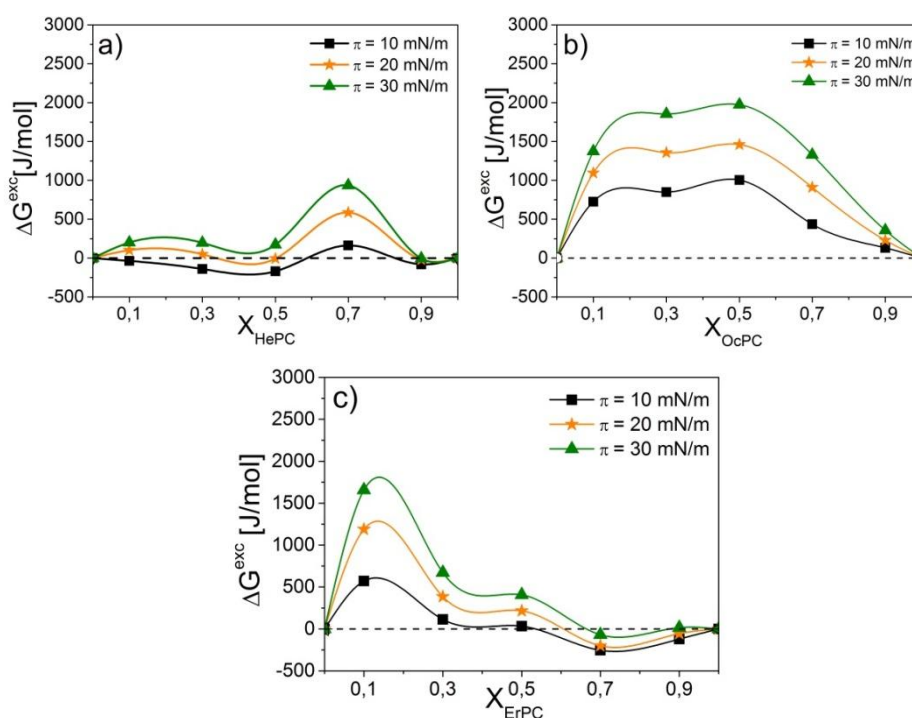
Zależność średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie w funkcji ułamka molowego X_{APCs} ilustruje rys. II.42.:



Rys. II.42. Wykresy zależności $A_{12}(X_{APCs})$ dla układów a) HePC/Sph, b) OcPC/Sph oraz c) ErPC/Sph w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Średnie powierzchnie A_{12} zajmowane przez cząsteczki w filmach mieszanych mają charakter dodatni. Odstępstwa od liniowości są jednak niewielkie i świadczą o słabych oddziaływaniach między cząsteczkami sfingolipidu, a cząsteczkami badanych lipidów antynowotworowych. Jedynie dla układu OcPC/Sph wartości A_{12} są wyraźnie większe od wartości powierzchni zajmowanych przez cząsteczki w mieszaninach idealnych bądź w przypadku zupełnego braku oddziaływań w niemal całym zakresie badanych ułamków molowych ($X_{OcPC}=0,1-0,7$).

Dla układów APCs/Sph wyznaczono ΔG^{exc} w funkcji ułamków molowych badanych syntetycznych lipidów antynowotworowych. Wyniki przedstawiono na rys. II.43.:

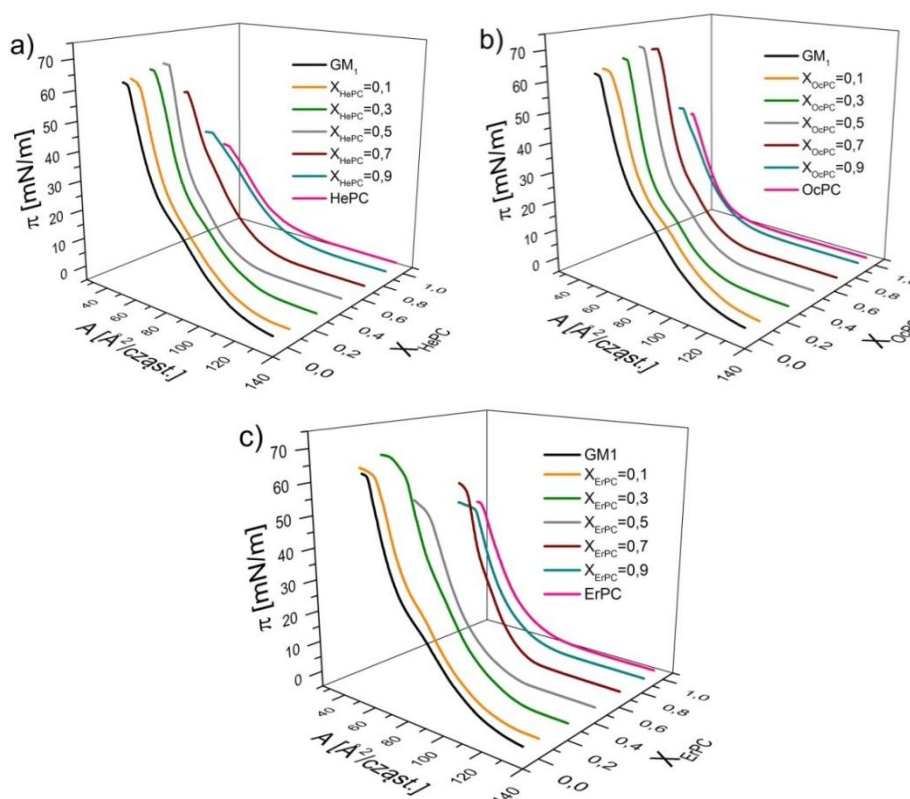


Rys. II.43. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla układów: a) HePC/Sph, b) OcPC/Sph oraz c) ErPC/Sph w temperaturze 20°C

Przy wyższych wartościach ciśnienia powierzchniowego ($\pi \geq 20$ mN/m) wartości ΔG^{exc} są dodatnie. Jedynie dla ułamków molowych $X_{ErPC} = 0,7-0,9$ mają one wartości są ujemne. Dla układu ErPC/Sph zdecydowanie najsilniejsze oddziaływania występują dla najniższej frakcji molowej ErPC ($\Delta G^{exc} \approx 1700$ J/mol przy ciśnieniu 30 mN/m) i mają charakter odpychający. Dla dwóch pozostałych układów różnice analizowanej wielkości w funkcji składu monowarstwy nie są tak bardzo widoczne. Przebieg funkcji ΔG^{exc} (X_{APCs}) świadczy o niskiej termodynamicznej stabilności mieszanin.

II.4.3.5. Monowarstwy mieszane APCs z gangliozydem GM₁

W ostatnim etapie badań nad układami dwuskładnikowymi zbadano i przeanalizowano oddziaływania w układach APCs/GM₁. Wyniki eksperymentu prezentuje rys. II.44.:



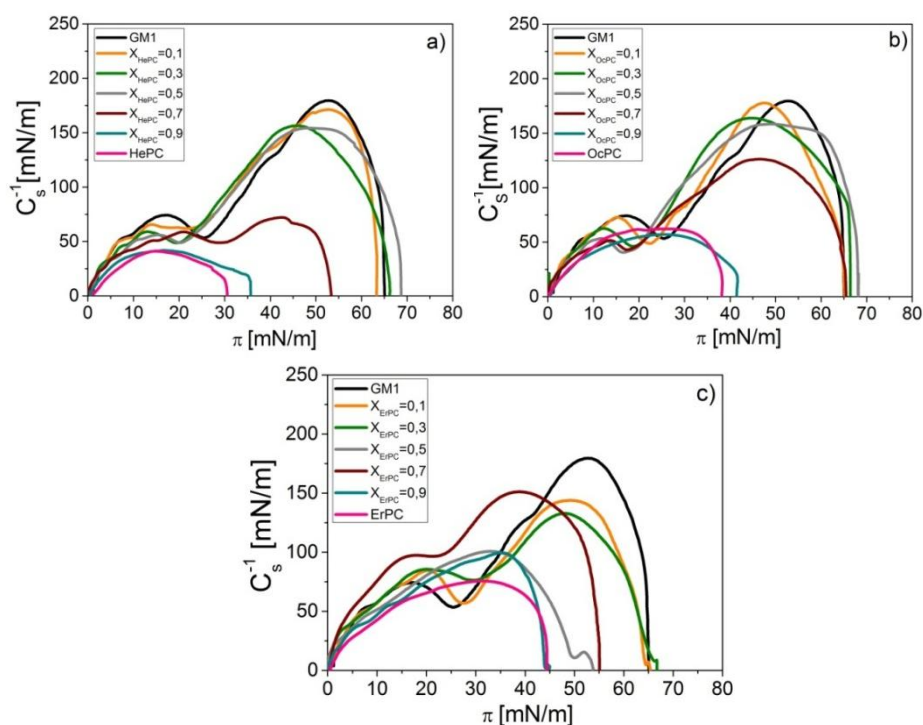
Rys. II.44. Izotermy monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z GM₁ zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Izoterma czystego GM₁ zaczyna wznosić się przy bardzo dużych powierzchniach przypadających na cząsteczkę (znacznie większych niż w przypadku pozostałych badanych lipidów membranowych). Jest to wynikiem zarówno dużych rozmiarów hydrofilowej głowy tego związku jak i elektrostatycznych oddziaływań pomiędzy ujemnie naładowanymi sąsiadującymi ze sobą głowami cząsteczek GM₁. Dla czystego GM₁ oraz mieszanin o wysokiej zawartości gangliozydu w przebiegu izotermy zaobserwować można przegięcie związane z przejściem fazowym ze stanu rozprężonego do stanu skondensowanego, które wraz ze zwiększaniem frakcji molowej

APCs zanika. Dodawanie APCs powoduje przesunięciem punktu „lift off” w stronę niższych powierzchni przypadających na cząsteczkę w filmie i powolną zmianę kształtu izoterm w charakterystyczny dla czystych APCs. Brak dwóch kolapsów w przebiegu izoterm świadczy o mieszalności składników we wszystkich trzech analizowanych układach. Inkorporacja APCs do filmów utworzonych przez GM₁ powoduje początkowo niewielki wzrost ciśnienia kolapsu, a następnie po osiągnięciu pewnej wartości maksymalnej, zależnej od rodzaju APCs, wartość ta zaczyna spadać. Wysokie wartości ciśnienia przy których następuje załamanie filmu świadczą o dużej stabilności mieszanin o ułamkach molowych $X_{\text{HePC}}=0,1-0,5$ oraz $X_{\text{OcPC, ErPC}}=0,1-0,7$.

Zależności $C_s^{-1}(\pi)$ obliczone na podstawie powyższych izoterm przedstawia rys.

II.45:

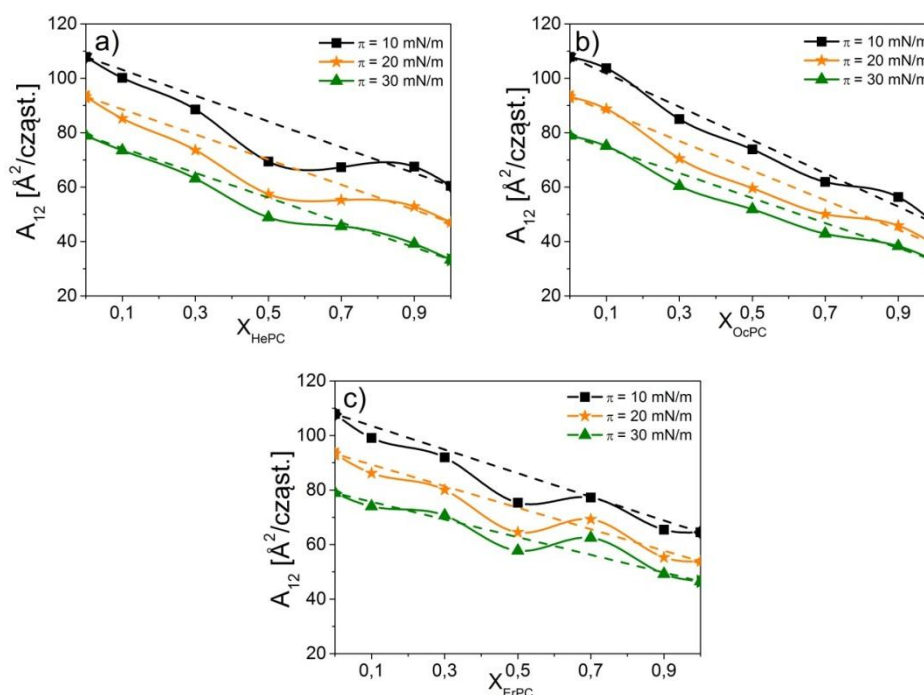


Rys. II.45. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ Izotermy monowarstw mieszanych HePC, OcPC oraz ErPC z GM₁ zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Duże głowy GM₁ nie pozwalają na ścisłe upakowanie łańcuchów węglowodorowych, dlatego też filmy utworzone przez cząsteczki gangliozydów tworzą monowarstwy o charakterze ciekłym skondensowanym. Również mieszaniny APCs/GM₁ tworzą monowarstwy o charakterze ciekłym. Wraz ze zwiększaniem frakcji molowej APCs spada maksymalna wartość modułów ściśliwości. W przebiegu

krzywych C_s^{-1} (π) dla czystego gangliozydu oraz mieszanin o wysokiej jego zawartości zaobserwować można minimum związane z przejściem fazowym.

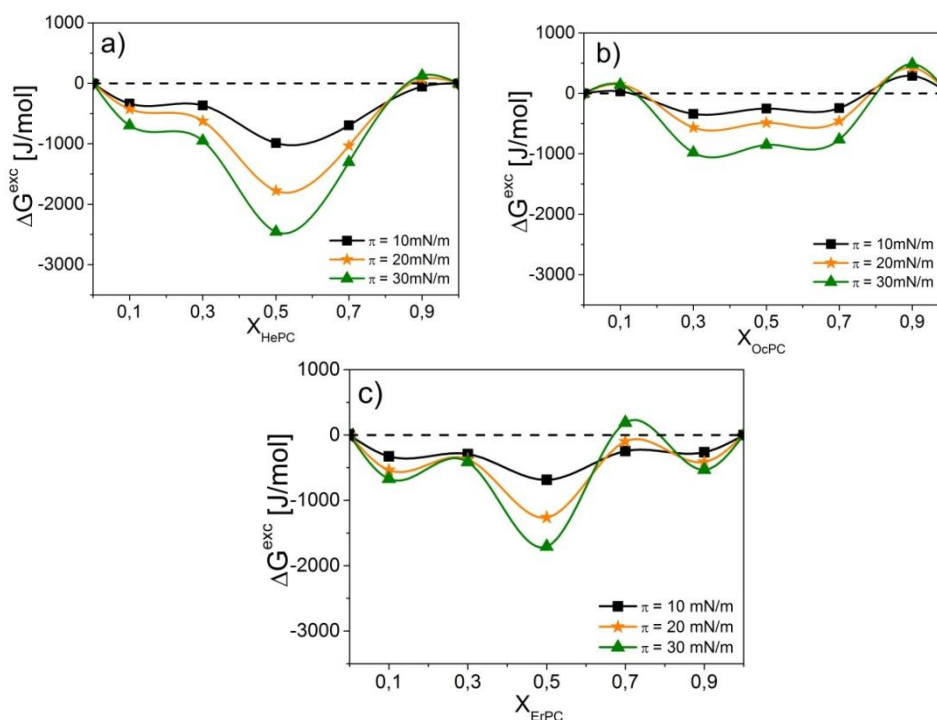
Zależność średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie w funkcji ułamka molowego X_{APCs} ilustruje poniższy rysunek:



Rys.II.46. Wykresy zależności $A_{12}(X_{APCs})$ dla układów a) HePC/ GM_1 , b) OcPC/ GM_1 oraz c) ErPC/ GM_1 w temperaturze 20°C

Na wykresie $A_{12}(X_{APCs})$ zaobserwować można odstępstwa od liniowości określonej równaniem $A_{12}=A_1X_1 + A_2X_2$. Średnie powierzchnie zajmowane przez cząsteczki w filmach mieszanych są mniejsze od powierzchni zajmowanych przez cząsteczki w monowarstwach utworzonych przez czysty GM_1 . Wyjątek stanowią filmy bogate w HePC i OcPC oraz $X_{ErPC}=0,7$.

Dla układów APCs/ GM_1 wyznaczono ΔG^{exc} w funkcji ułamków molowych badanych syntetycznych lipidów antynowotworowych. Wyniki przedstawiono na rys. II.47.:

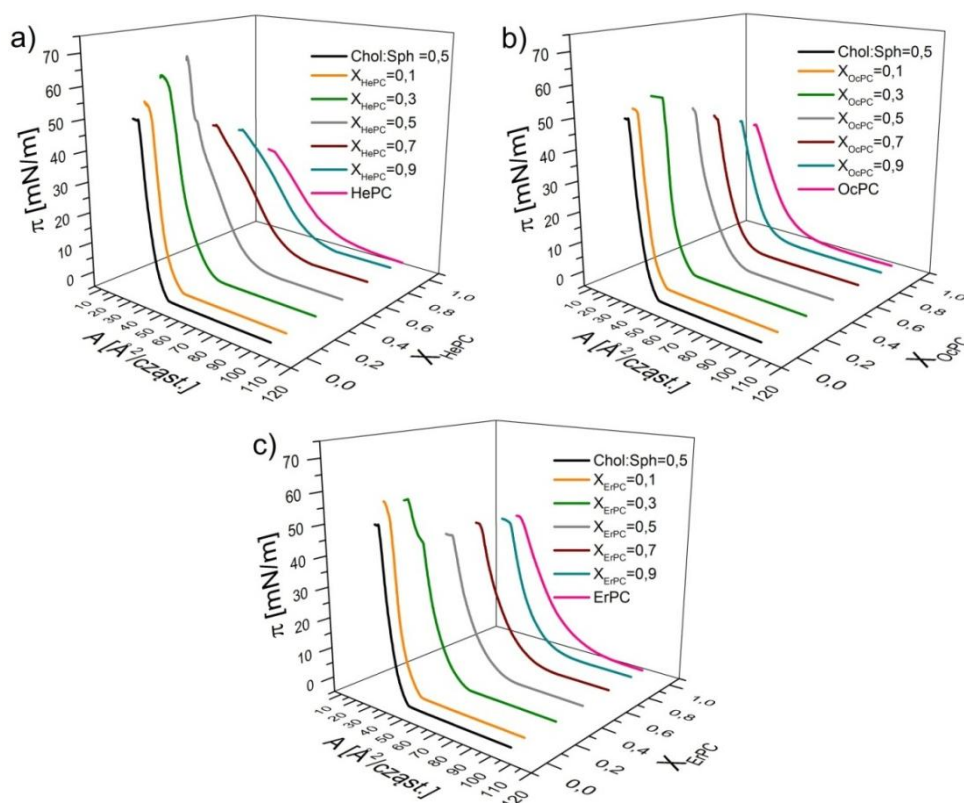


Rys.II.47. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla systemów a) HePC/ GM₁, b) OcPC/ GM₁ oraz c) ErPC/ GM₁ w temperaturze 20°C

Analiza powyższych danych wskazuje na podobne zachowanie się cząsteczek w monowarstwach mieszanych utworzonych przez wszystkie trzy badane syntetyczne lipidy antynowotworowe i GM₁. Ujemne wartości ΔG^{exc} w zakresie badanych ciśnień wskazują na istnienie bardziej przyciągających (lub mniej odpychających) oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w układach mieszanych w porównaniu do oddziaływań w układach jednoskładnikowych (APC/APC i GM₁/GM₁). W przypadku układów HePC/GM₁ oraz ErPC/GM₁ najbardziej stabilne wydają się być frakcje molowe o stechiometrii 1:1 ($\Delta G^{exc} \approx -2000$ J/mol). W układzie OcPC/GM₁ oddziaływania dla ułamków z zakresu $X_{OcPC}=0,3-0,7$ wydają się być do siebie zbliżone i słabsze niż w dwóch pozostałych układach. Ujemne wartości ΔG^{exc} są najprawdopodobniej wynikiem separującego efektu cząsteczek APCs na hydrofilowe ujemnie naładowane części GM₁ - wbudowywanie się APCs pomiędzy cząsteczki GM1 zmniejsza bowiem odpychające oddziaływania pomiędzy głowami glikosfingolipidu.

II. 4.4. Oddziaływania APCs z modelowymi raftami lipidowymi

W kolejnej części eksperymentu badano wpływ APCs na modelowe rafty lipidowe. W tym celu sporządzono mieszaniny cholesterolu i sfingomieliny w proporcji Chol:Sph = 0,5. Do tak przygotowanych mieszanin dodawano kolejne ułamki molowe APCs. Izotermy zarejestrowane dla monowarstw trójskładnikowych w temp 20 °C prezentuje poniższy rysunek:

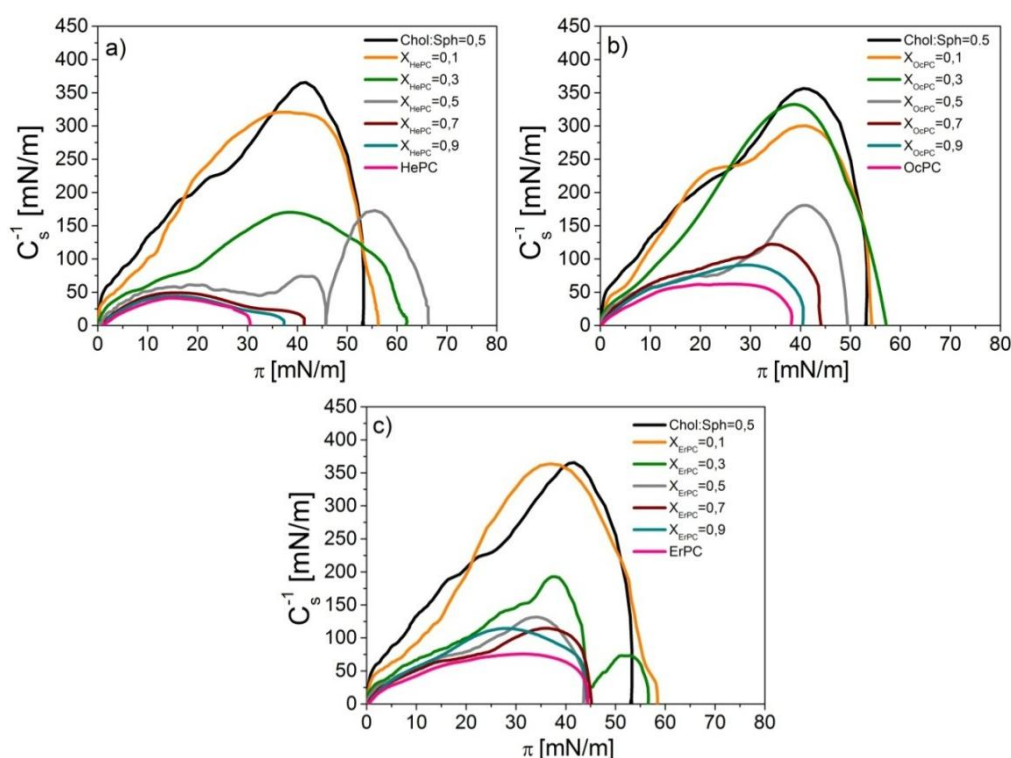


Rys.II.48. Izotermy monowarstw mieszanych HePC/Chol/Sph, OcPC/Chol/Sph oraz ErPC/Chol/Sph (Chol:Sph =0,5) zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Izoterma zarejestrowana dla układu Chol/Sph charakteryzuje się stromym przebiegiem. Krzywe zarejestrowane dla mieszanin ubogich w APCs ($X_{\text{APCs}} = 0,1-0,3$) w zakresie ciśnień poniżej ciśnienia załamania czystych APCs mają kształt niemal identyczny jak izotermy dla układu dwuskładnikowego Chol/Sph i są nieznacznie przesunięte w stronę niższych powierzchni. Zwiększanie ilości syntetycznych lipidów antynowotworowych powoduje przesuwanie się punktu „lift off” w stronę wyższych

powierzchni przypadających na cząsteczkę w monowarstwie w odniesieniu do izoterm Chol/Sph. Dla kolejnych badanych stężeń leków obserwuje się stopniowe przejście kształtu izoterm w kierunku krzywych charakterystycznych dla APCs. Dodanie APCs do monowarstwy mieszanej Chol/Sph powoduje początkowy wzrost wartości ciśnienia kolapsu. Dla układów HePC/Chol/Sph i ErPC/Chol/Sph wzrost ten następuje, aż do ułamka molowego APCs przy którym obserwuje się dwa kolapsy ($X_{\text{HePC}}=0,5$ i $X_{\text{ErPC}}=0,3$). Dla mieszanin z HePC wartość ciśnienia załamania dla ułamków molowych $X_{\text{HePC}} > 0,5$ zaczyna spadać, podczas gdy dla układów zawierających ErPC w stężeniu $X_{\text{ErPC}} > 0,3$ wartość załamania nie zmienia się i jest zbliżona do wartości ciśnienia kolapsu czystej ErPC. Takie zachowanie filmów może świadczyć o niemieszalności HePC i ErPC z modelowymi raftami lipidowymi w obszarze wysokich ciśnień ($\pi > 35 \text{ mN/m}$). W przypadku układu OcPC/Chol/Sph nie obserwuje się obecności dwóch kolapsów w żadnej z badanych mieszanin. Przy małej zawartości OcPC ciśnienie załamania nieznacznie wzrasta, a następnie dla $X_{\text{OcPC}} > 0,3$ zaczyna systematycznie spadać.

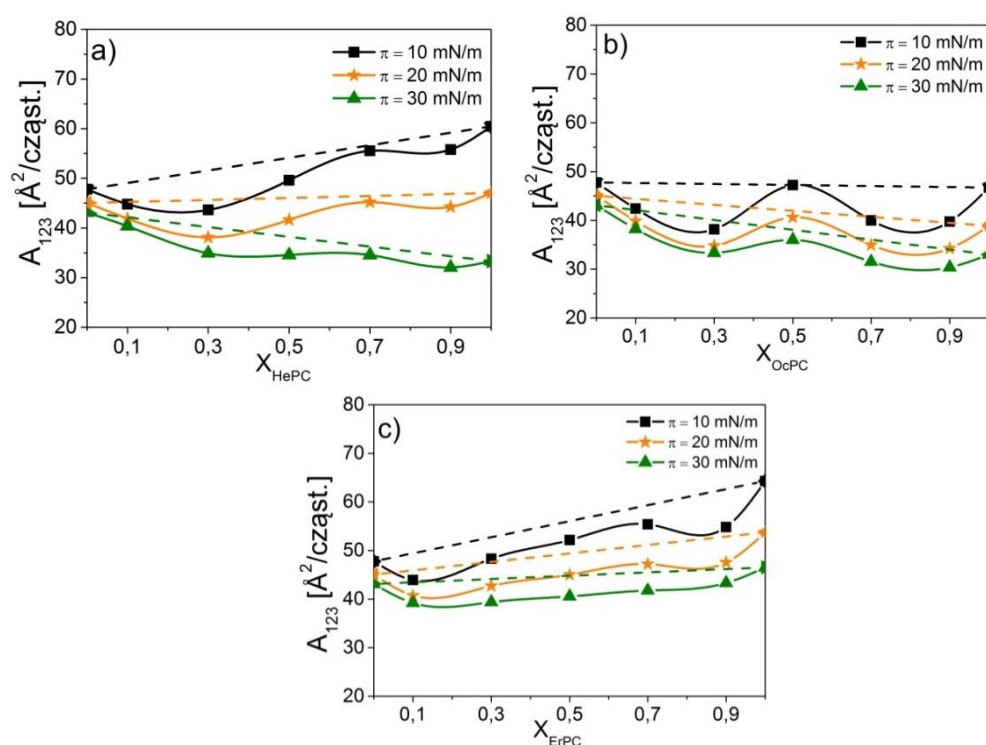
Dla wszystkich badanych układów obliczono wartości współczynnika ściśliwości C_s^{-1} i przedstawiono je w funkcji ciśnienia powierzchniowego:



Rys.II.49. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ monowarstw mieszanych HePC/Chol/Sph, OcPC/Chol/Sph oraz ErPC/Chol/Sph ($\text{Chol:Sph} = 0,5$) zarejestrowanych w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Maksymalna wartość modułu ściśliwości obliczana dla modelowego raftu lipidowego ($C_s^{-1} \approx 350$ mN/m) wskazuje na wysoki stopień uporządkowania cząsteczek w filmie. Również frakcje molowe $X_{\text{HePC}}, X_{\text{ErPC}}=0,1$ oraz $X_{\text{OcPC}}=0,1-0,3$ charakteryzują się wysokim współczynnikiem upakowania. Dalsze wprowadzanie cząsteczek APCs do monowarstw utworzonych przez molekuły cholesterolu i sfingomieliny powoduje – dla wszystkich badanych układów – spadek maksymalnej wartości jej współczynnika ściśliwości, wskazując na mniejszą kondensację utworzonych monowarstw. Na powyższych wykresach dla frakcji $X_{\text{HePC}}=0,5$ i $X_{\text{ErPC}}=0,3$ można zaobserwować pojawiające się minima odpowiadające wartościom pierwszego kolapsu (widocznym na izotermach $\pi - A$).

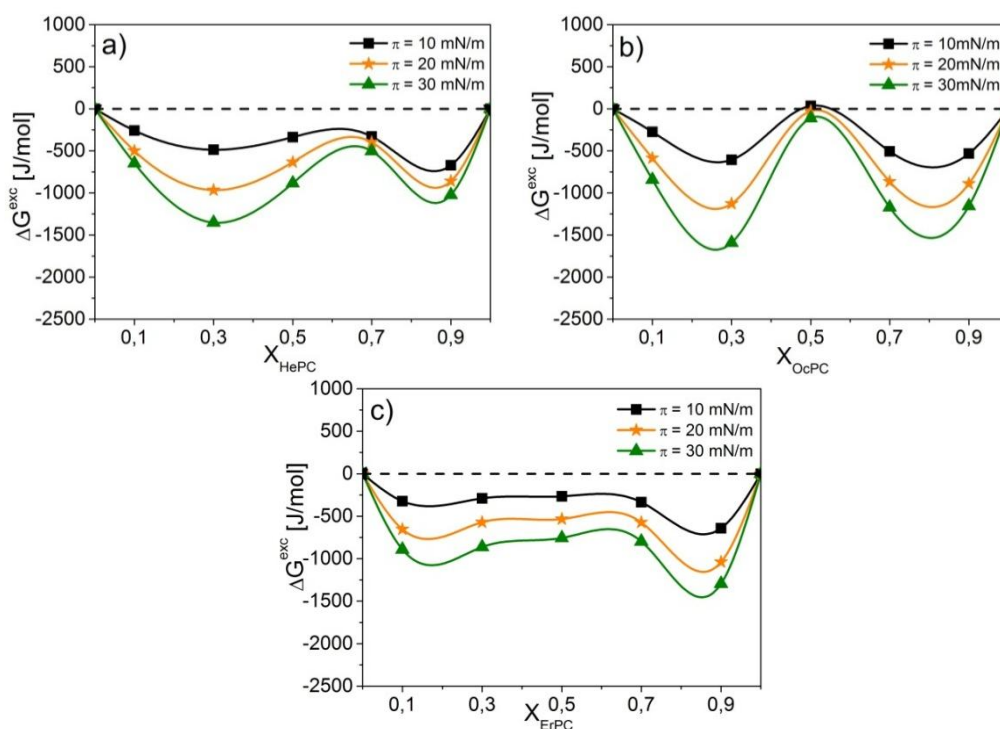
Na poniższych rysunkach przedstawiono zależności wartości średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w mieszanej monowarstwie A_{123} w funkcji ułamka molowego APCs (X_{APCs}). Linie przerywane na wykresach odpowiadają sytuacji, opisanej równaniem I.22, które dla układu trójskładnikowego przyjmuje postać: $A_{123}^{\text{id}} = A_{12}(X_1 + X_2) + A_3 X_3$.



Rys.II.50. Zależność A_{123} dla monowarstw mieszanych: a) HePC/Chol/Sph, b) OcPC/Chol/Sph oraz c) ErPC/Chol/Sph w funkcji ułamka molowego APCs

Dla wszystkich badanych układów mieszanych zależności $A_{123}=f(X_{APCs})$ wykazują odstępstwa od prostoliniowości, co dowodzi istnieniu oddziaływań pomiędzy składnikami filmów i ich mieszalności w zakresie ciśnień powierzchniowych ≤ 30 mN/m. Odchylenia w kierunku niższych powierzchni przypadających na cząsteczkę świadczą o bardziej przyciągających (lub mniej odpychających) oddziaływaniach molekuł w stosunku do oddziaływań w układach Chol/Sph oraz APC/APC.

Ilościowo oddziaływania pomiędzy składnikami monowarstw analizowano w oparciu o wartości nadmiarowych entalpii swobodnych mieszania ΔG^{exc} . Wyniki przedstawiono poniżej:



Rys. II.51. Zależność ΔG^{exc} dla monowarstw mieszanych: a) HePC/Chol/Sph, b) OcPC/Chol/Sph oraz c) ErPC/Chol/Sph w funkcji ułamka molowego APCs

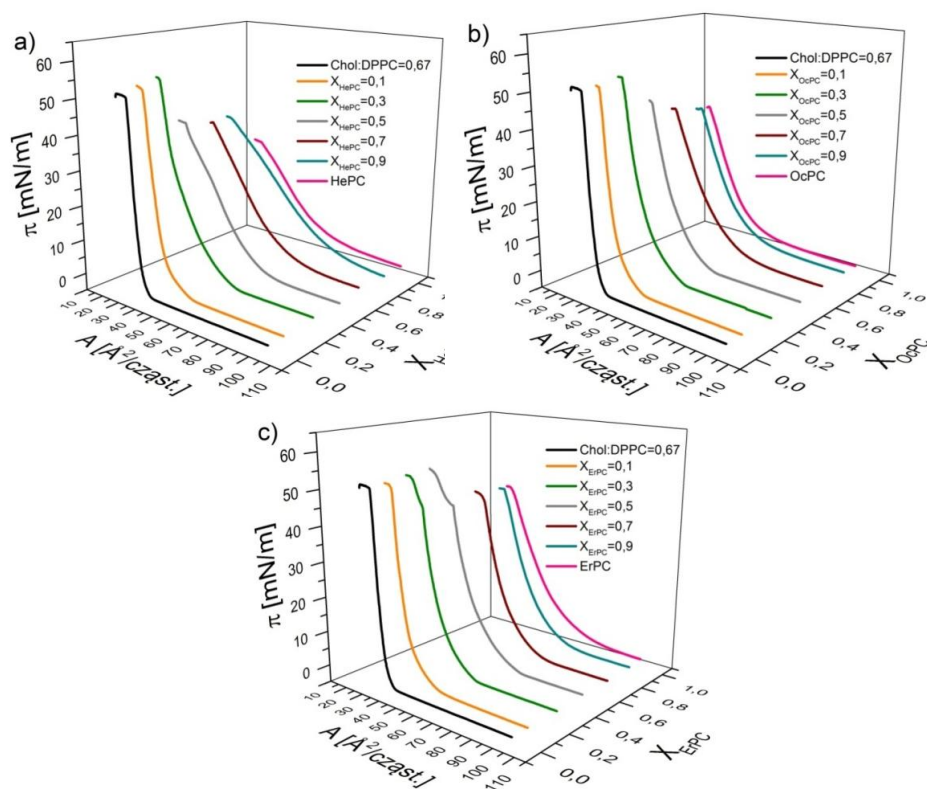
Analiza powyższych wykresów pozwala zauważyć, że dla wszystkich badanych układów funkcja $\Delta G^{exc}=f(X_{APCs})$ przyjmuje wartości ujemne w całym zakresie badanych ciśnień powierzchniowych i świadczy o stabilności badanych mieszanin. Największe ujemne odchylenia pojawiają się przy układach HePC/Chol/Sph i OcPC/Chol/Sph dla $X_{HePC,OcPC}=0,3$ gdzie ΔG^{Exc} przy ciśnieniu $\pi=30$ mN/m wynosi ≈ -1500 J/mol. Dla monowarstw ErPC/Chol/Sph w zakresie ułamków molowych od $X_{ErPC}=0,1 - 0,7$ odchylenia są porównywalne ($\Delta G^{exc} \approx 900$ J/mol), a minimum występuje przy

stechiometrii 3:1 ($\Delta G^{\text{exc}} \approx 1200 \text{ J/mol}$). Porównanie minimalnych wartości ΔG^{exc} wyliczonych dla badanych układów trójskładnikowych do minimalnej wartości ΔG^{exc} uzyskanej dla modelowych raft lipidowych (Chol:Sph=0,5) wynoszącej ok - 600 J/mol (przy $\pi=30 \text{ mN/m}$), pozwala zauważyć stabilizujący efekt APCs na domeny cholesterolowo-sfingomielinowe.

II.4.5. Wpływ APCs na modelowe błony komórkowe - układy trójskładnikowe APCs/Chol/DPPC(POPC)

W następnym etapie pracy badano oddziaływania APCs z modelowymi błonami komórki zdrowej i zmienionej patologicznie. Do badań wybrano błonę komórki nowotworu białaczki, zbudowaną z cholesterolu i POPC w proporcji 0,25 oraz błonę komórkową zdrowych leukocytów (cholesterol i DPPC w proporcji 0,67) (Tsuchiya i wsp., 2002). Do tak przygotowanych mieszanin dodawano badane syntetyczne lipidy antynowotworowe w ułamkach molowych 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 oraz 0,9.

W pierwszej kolejności zbadano oddziaływania APCs na błonę komórki zdrowej. Izotermie π -A zarejestrowane dla badanych monowarstw przedstawia poniższy rysunek:

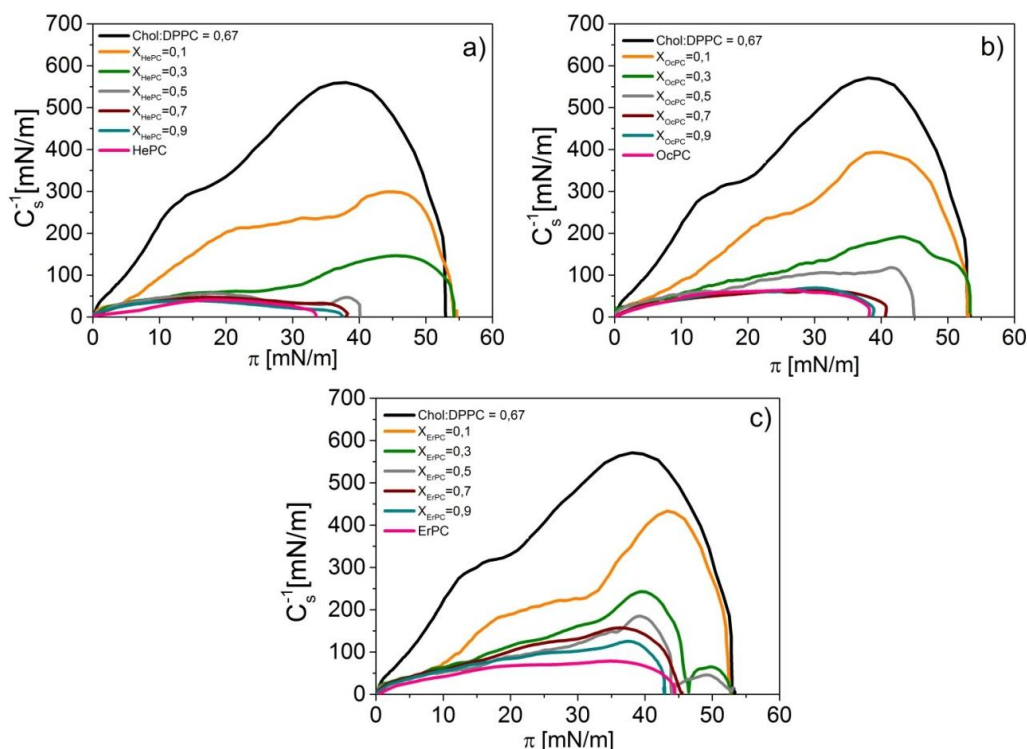


Rys.II.52. Izotermie monowarstw mieszanych HePC/Chol/DPPC, OcPC/Chol/DPPC oraz ErPC/Chol/DPPC (Chol:DPPC=0,67) zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

W przebiegu izotermi zarejestrowanej dla monowarstwy będącej modelem błony biologicznej komórki zdrowej leukocyta obserwuje się wyraźnie zaznaczony punkt „lift-off” dla wartości ok. 48 Å²/cząsteczkę i następujący po nim szybki wzrost ciśnienia

powierzchniowego π do wartości 54 mN/m, przy którym następuje załamanie monowarstwy. Krzywe dla monowarstw mieszanych leżą pomiędzy izotermami dla monowarstw APCs i Chol/DPPC i wraz ze wzrostem zawartości APCs przesuwają się w stronę większych powierzchni przypadających na cząsteczkę w filmie, zmieniając kształt na charakterystyczny dla odpowiedniego APCs. Dla układu ErPC/Chol/DPPC obserwuje się w przebiegu izoterm dwa kolapsy ($X_{\text{ErPC}}=0,3$ i $X_{\text{ErPC}}=0,5$). Dla dwóch pierwszych układów (HePC/Chol/DPPC oraz OcPC/Chol/DPPC) wartości ciśnienia załamania mieszanych monowarstw pozostają stałe w zakresie ułamków $X_{\text{HePC}, \text{OcPC}} \leq 0,3$. Dla frakcji molowej $X_{\text{HePC}, \text{OcPC}} > 0,3$ następuje nagły spadek wartości ciśnienia załamania, które dla filmów bogatych w alkilofosfocholiny oscyluje blisko wartości kolapsu monowarstw HePC i OcPC. Dla trzeciego z układów - ErPC/Chol/DPPC - dla frakcji $X_{\text{ErPC}} = 0,3-0,5$ widoczne są dwa punkty załamania, z których pierwszy odpowiada ciśnieniu załamania ErPC, natomiast drugi - załamaniu filmu Chol/DPPC. Takie zachowanie może świadczyć o separacji faz.

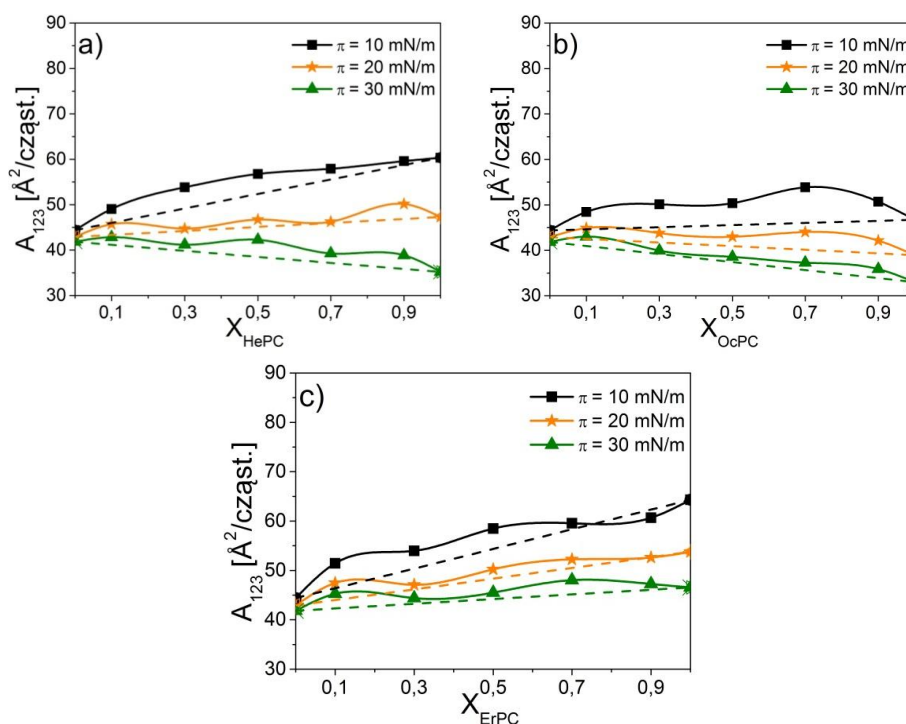
Na podstawie powyższy izoterm obliczono wartości współczynnika ściśliwości C_s^{-1} i przedstawiono je w funkcji ciśnienia powierzchniowego:



Rys.II.53. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ monowarstw mieszanych HePC/Chol/DPPC, OcPC/Chol/DPPC oraz ErPC/Chol/DPPC (Chol:DPPC=0,67) zarejestrowanych w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Monowarstwy utworzone przez cząsteczki cholesterolu i DPPC oraz monowarstwy o ułamku molowym $X_{\text{APCs}}=0,1$ charakteryzuje skondensowany stan fizyczny ($C_S^{-1} \approx 590 \text{ mN/m}$ i $C_S^{-1} \approx 300\text{-}450 \text{ mN/m}$, odpowiednio dla Chol/DPPC i $X_{\text{APCs}}=0,1$). Dalsze zwiększanie zawartości APCs w monowarstwach powoduje stopniowy spadek maksymalnych wartości modułu ściśliwości, a filmy wykazują charakter ciekły - co świadczy o malejącym stopniu kondensacji monowarstw. Dla monowarstw o ułamku molowym $X_{\text{HePC}} = 0,5\text{-}0,9$ i $X_{\text{OcPC}} = 0,7\text{-}0,9$ przebieg zależności $C_S^{-1} = f(\pi)$ jest prawie identyczny jak dla czystych APCs. Dla układu ErPC/Chol/DPPC w przebiegu krzywych o zawartości ErPC $X_{\text{ErPC}}=0,3\text{-}0,5$ obserwuje się minima, odpowiadające kolapsom widocznym na izotermach π -A.

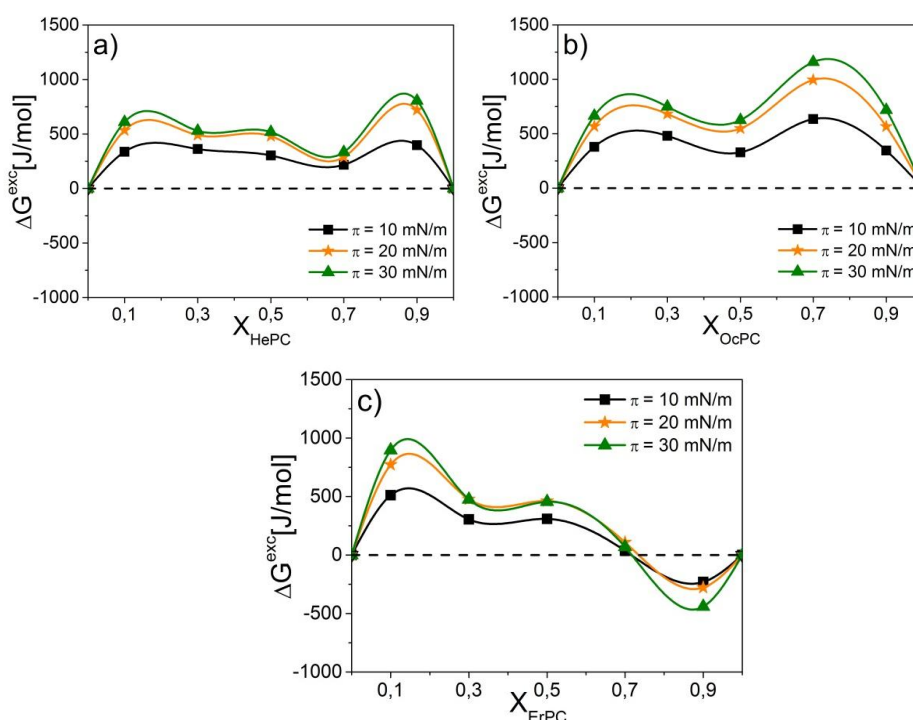
Wykresy zależności A_{123} w funkcji ułamka molowego APCs dla mieszanych monowarstw utworzonych w temperaturach 20°C przedstawiono na rysunku:



Rys.II.54. Zależność A_{123} (X_{APCs}) monowarstw mieszanych HePC/Chol/DPPC, OcPC/Chol/DPPC oraz ErPC/Chol/DPPC (Chol:DPPC = 0,67) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Monowarstwy mieszane APCs/Chol/DPPC dla małych wartości ciśnień ($\pi=10$ mN/m) wykazują dodatnie odchylenia od przebiegu prostoliniowego. Jedynie dla $X_{\text{ErPC}}=0,9$ pojawia się odchylenie ujemne. Powyżej ciśnienia 20 mN/m odstępstwa od prostoliniowości zmniejszają się, a dla frakcji molowych $X_{\text{ErPC}} = 0,9$ praktycznie zanikają.

Zmiany nadmiarowych entalpii swobodnych mieszania ΔG^{exc} przedstawiono w funkcji ułamka molowego:

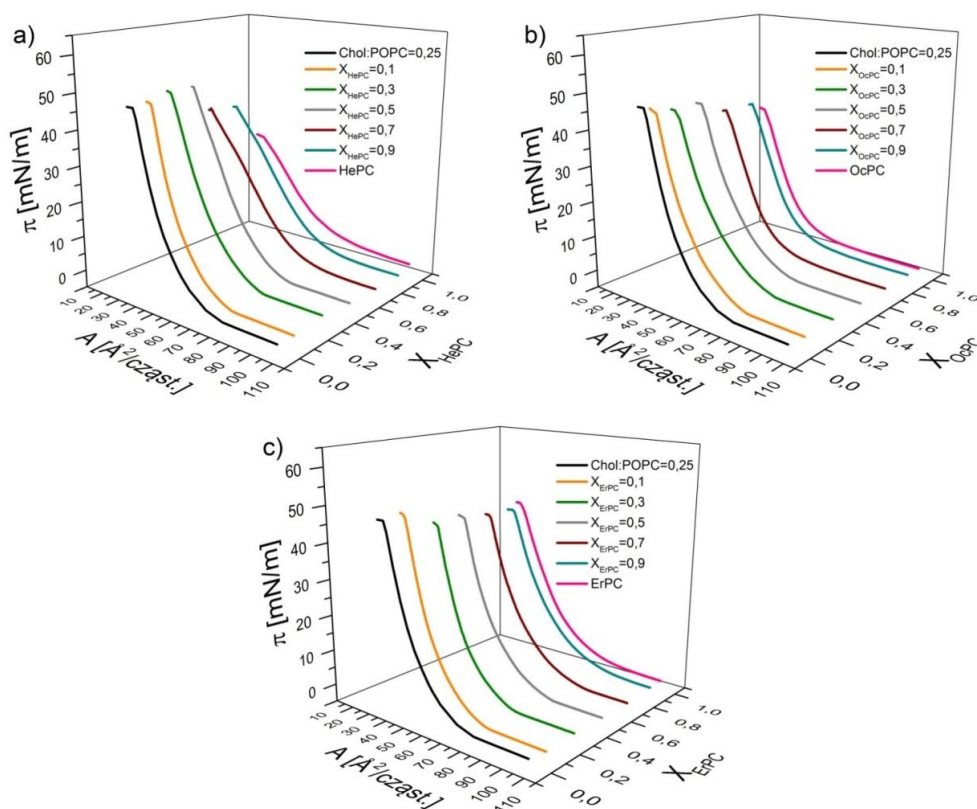


Rys. II.55. Wykresy zależności $\Delta G^{\text{exc}} = f(X_{\text{APCs}})$ dla monowarstw mieszanych HePC/Chol/DPPC, OcPC/Chol/DPPC oraz ErPC/Chol/DPPC (Chol:DPPC = 0,67) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Analizując powyższe wykresy można zauważyć, że dla układów HePC/Chol/DPPC oraz OcPC/Chol/DPPC ΔG^{exc} przyjmuje wartości dodatnie w całym zakresie badanych ułamków molowych i ciśnień. Maksymalne wartości ΔG^{exc} wynoszą odpowiednio: ≈ 550 - 650 J/mol dla $X_{\text{HePC}} = 0,1$ - $0,7$; ≈ 800 J/mol dla $X_{\text{HePC}} = 0,9$; ≈ 680 - 750 J/mol dla $X_{\text{OcPC}} = 0,1$ - $0,5$ i $X_{\text{OcPC}}=0,9$; ≈ 1200 J/mol dla $X_{\text{OcPC}}=0,7$. Dodatnie wartości świadczą o istnieniu w mieszanych monowarstwach oddziaływań międzycząsteczkowych o charakterze odpychającym (lub mniej przyciągającym) w odniesieniu do monowarstw utworzonych przez cząsteczki HePC i OcPC oraz monowarstwy modelowej błony. Dla trzeciego układu ErPC/Chol/DPPC ΔG^{exc}

przyjmuje dodatnie wartości w zakresie ułamków $X_{\text{ErPC}} = 0,1-0,5$, przy czym najsilniejsze oddziaływanie występuje przy najmniejszej zawartości ErPC ($\Delta G^{\text{exc}} \approx 980$ przy 30 mN/m). W przypadku tych trzech frakcji można mówić o separacji faz. Dla kolejnego ułamka molowego $X_{\text{ErPC}} = 0,7$ wartość ΔG^{exc} zbliżona jest do zera, co świadczy o bardzo słabych oddziaływań w monowarstwie (bądź zupełnym ich braku). Dla $X_{\text{ErPC}} = 0,9$ sytuacja całkowicie się zmienia, gdyż ΔG^{exc} przyjmuje wartości ujemne (≈ -450 J/mol dla $\pi = 30$ mN/m), a monowarstwa staje się stabilna.

W drugim kroku zbadano oddziaływania APCs na błonę komórki nowotworu białaczki. Izotermy π -A zarejestrowane dla badanych układów przedstawia rys. II.56:

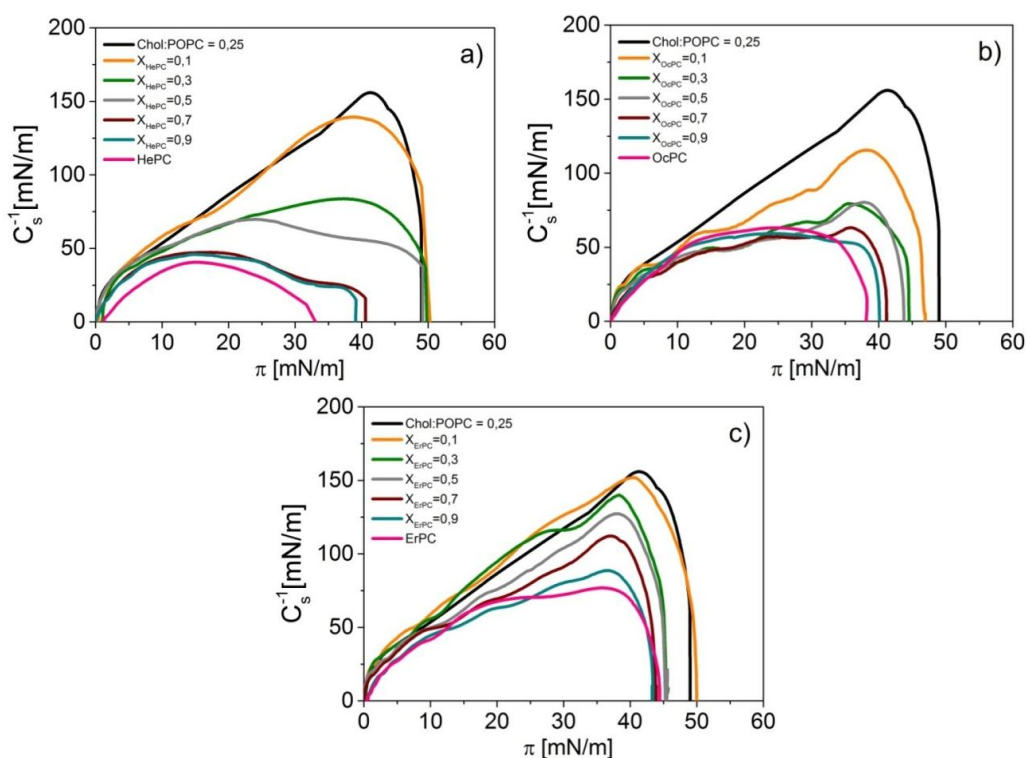


Rys.II.56. Izotermy monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,25) zarejestrowane w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Dla izotermy monowarstwy będącej modelem błony biologicznej komórki nowotworowej wartość ciśnienia powierzchniowego zaczyna rosnąć od wartości ok. 88 Å²/cząsteczkę, a załamania następuje przy ciśnieniu 49 mN/m. Krzywe dla monowarstw mieszanych leżą pomiędzy izotermami dla monowarstw APCs i

Chol/POPC i wraz ze wzrostem zawartości APCs przesuwają się w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w filmie, a ich kształt zmienia się na typowy dla badanych APCs. Dla układu HePC/Chol/POPC w zakresie ułamków $X_{\text{HePC}} \leq 0,5$ wartości ciśnienia załamania monowarstw mieszanych pozostają stałe i równe wartości ciśnienia przy którym załamaniu ulega monowarstwy Chol/POPC. Dla frakcji molowych $X_{\text{HePC}} > 0,5$ wartości ciśnienia kolapsu zaczynają spadać. Również dla układu OcPC/Chol/POPC widoczna jest - zależna od składu monowarstwy - zmiana wartości ciśnienia kolapsu. W przypadku trzeciego z analizowanych systemów ErPC/Chol/POPC - z uwagi na zbliżone wartości kolapsu monowarstw Chol/DPPC i ErPC - podobna analiza jest niemożliwa.

Wartości modułów ściśliwości C_s^{-1} w funkcji ciśnienia powierzchniowego obliczone na podstawie powyższych izoterm prezentuje poniższy rysunek:

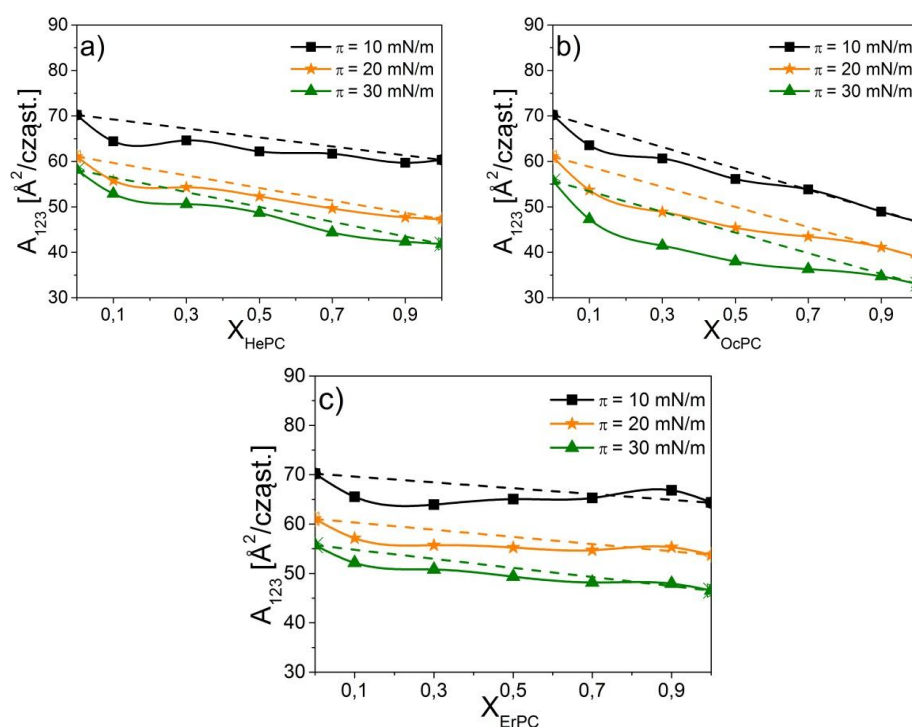


Rys.II.57. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,25) zarejestrowanych w temperaturze 20°C na wodzie (pH 5,6)

Cząsteczki cholesterolu i POPC w stosunku 0,25 tworzą monowarstwy o charakterze ciekłym skondensowanym ($C_s^{-1}{}_{\text{max}} \approx 160$ mN/m). Inkorporacja cząsteczek APCs do monowarstwy Chol/POPC powoduje spadek kondensacji filmów, a wartości

maksymalnych modułów ściśliwości $C_S^{-1}_{max}$ monowarstw trójskładnikowych leżą pomiędzy wartościami $C_S^{-1}_{max}$ monowarstw Chol/POPC i APCs.

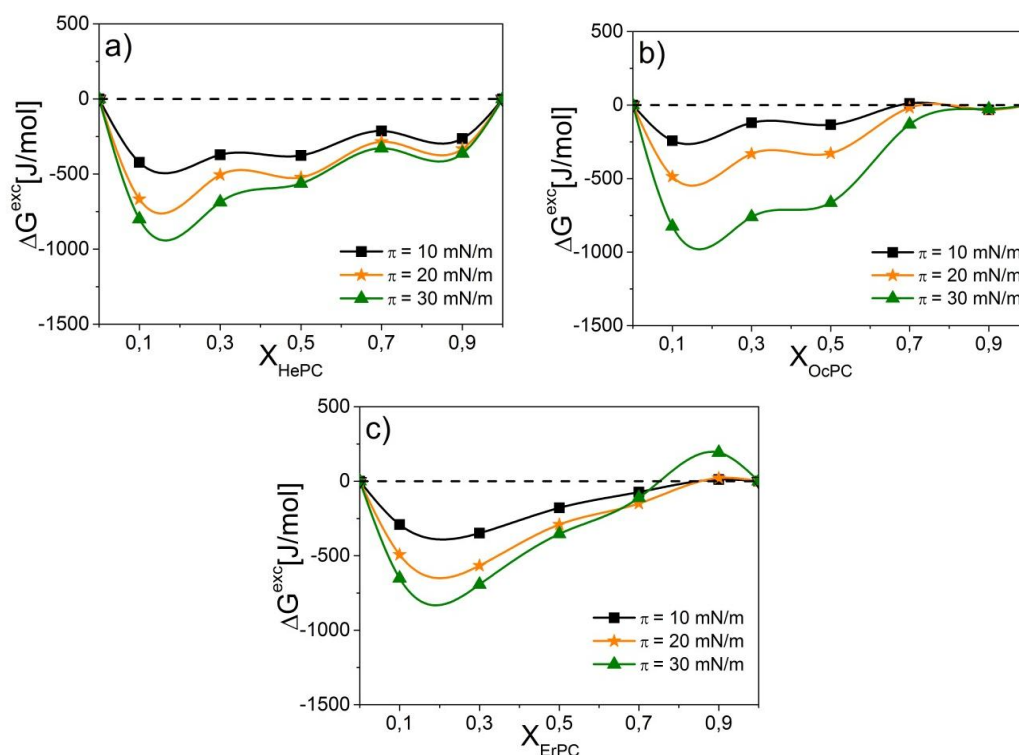
Wykresy zależności A_{123} w funkcji ułamka molowego APCs dla mieszanych monowarstw utworzonych w temperaturach 20° C przedstawiono na rys. II.58.:



Rys. II.58. Zależność A_{123} (X_{APCs}) monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,25) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Monowarstwy mieszane HePC/Chol/POPC oraz OcPC/Chol/POPC wykazują ujemne odchylenia od przebiegu prostoliniowego, prawie w całym zakresie badanych ułamków molowych i ciśnień. Odstępstw nie obserwuje się jedynie przy ciśnieniu 10 mN/m dla frakcji molowej $X_{OcPC}=0,7 - 0,9$ oraz ciśnieniach 20 mN/m i 30 mN/m dla $X_{OcPC}=0,9$. Dla układu ErPC/Chol/POPC przy małej zawartości leku cząsteczki zajmują powierzchnie mniejsze w stosunku do powierzchni określonych dla mieszanin idealnych (linia przerywana). Dla frakcji bogatych w ErPC ($X_{ErPC}>0,7$) pojawia się odchylenie dodatnie.

Zmiany nadmiarowych entalpii swobodnych mieszania ΔG^{exc} przedstawiono w funkcji ułamka molowego:

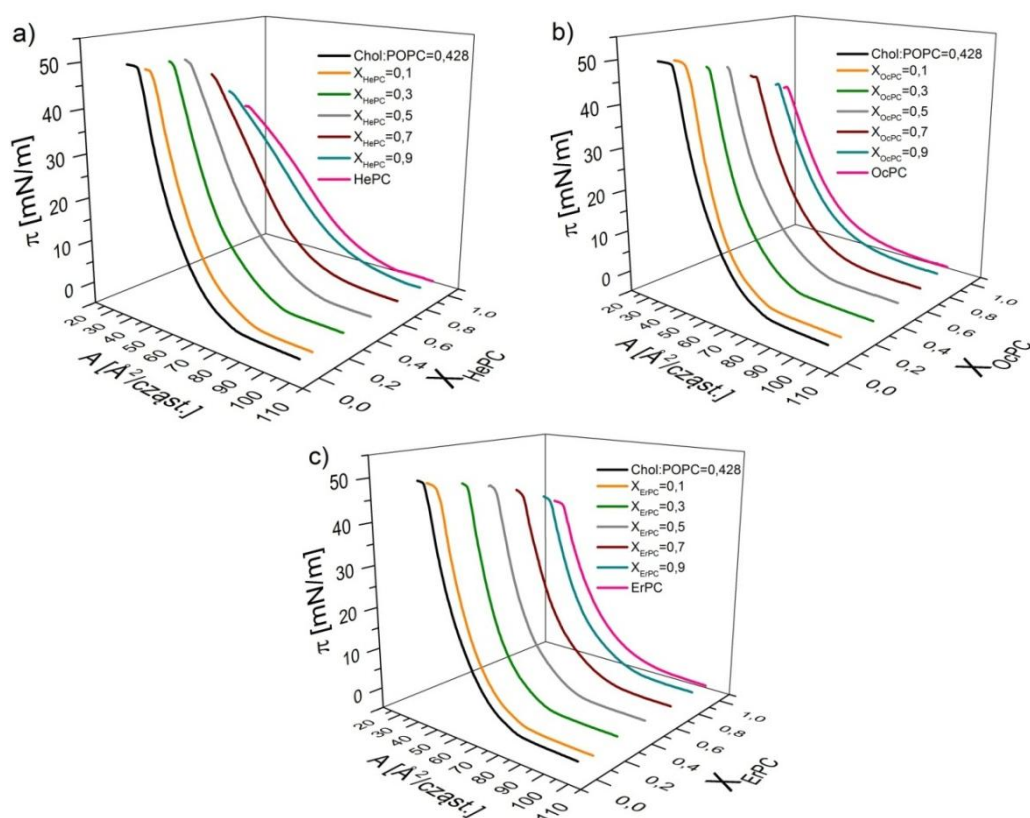


Rys. II.59. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,25) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Na podstawie powyższych wykresów można stwierdzić, że monowarstwy mieszane APCs/Chol/POPC są stabilne prawie w całym zakresie badanych ułamków molowych. Dowodzą temu ujemne wartości ΔG^{exc} , rosnące wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego π . Minimum ΔG^{exc} osiągane jest dla monowarstw o frakcjach molowych $X_{HePC, OcPC} = 0,1$ ($\Delta G^{exc} \approx 800$ J/mol) oraz $X_{ErPC} = 0,3$ ($\Delta G^{exc} \approx 740$ J/mol). Dla układu zawierającego OcPC dla ułamków molowych $X_{OcPC} \geq 0,7$ ΔG^{exc} przyjmuje wartości bliskie 0. Dla trzeciego układu ErPC/Chol/POPC dla frakcji molowej $X_{OcPC} \geq 0,7$ obserwuje się zmianę charakteru oddziaływań z przyciągających na odpychające (ΔG^{exc} przyjmuje wartości dodatnie). Porównując wszystkie trzy układy można wnioskować, że najbardziej stabilną jest monowarstwa dla mieszaniny HePC/Chol/POPC, która wykazuje wartości ujemne ΔG^{exc} w całym swym przebiegu.

II.4.6. Powinowactwo APCs do błony komórkowej nowotworu prostaty

Aby zbadać powinowactwo badanych alkilofosfocholin do błony komórkowej nowotworu prostaty, a tym samym zweryfikować dane uzyskane z badań linii komórkowej wykonano dodatkowy eksperyment. Korzystając z techniki monowarstw Langmuira wymodelowano błonę nowotworu prostaty. W tym celu sporządzono mieszaninę cholesterolu i POPC w proporcji 0,428 (Calderon i wsp., 1991), a następnie do tak przygotowanych mieszanin dodawano badane APCs w ułamkach molowych 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 oraz 0,9. Izotermie monowarstw utworzonych na subfazie wodnej rejestrowano w temperaturze 37°C. Wyniki przedstawiono poniżej:

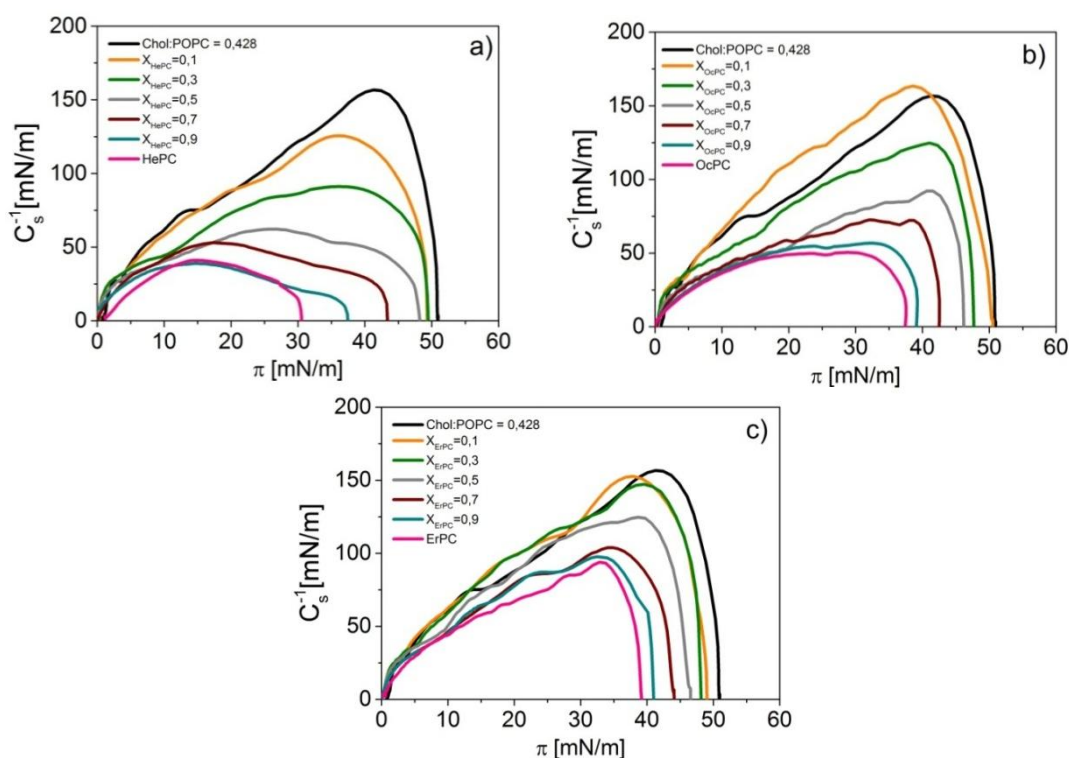


Rys.II.60. Izotermie monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,428) zarejestrowane w temperaturze 37°C na wodzie (pH 5,6)

W przypadku izotermi zarejestrowanej dla monowarstwy stanowiącej model błony komórki nowotworu prostaty (Chol:POPC = 0,428) ciśnienie powierzchniowe rośnie systematycznie od powierzchni ok. 90 Å²/cząsteczkę do wartości powierzchni

48 Å²/cząsteczkę, gdzie osiąga maksymalną wartość 50 mN/m. Krzywe dla monowarstw mieszanych leżą pomiędzy izotermami dla monowarstw APCs i Chol/POPC. Dla frakcji molowych $X_{APCs} \leq 0,5$ obserwuje się przesuwanie punktu „lift off” w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w filmie, natomiast dla filmów bogatych w APCs punktu „lift off” przesunięty jest w stronę większych powierzchni, a izotermy mają kształt zbliżony do izoterm zarejestrowanych dla odpowiedniego APCs. Dla wszystkich trzech badanych układów w całym zakresie ułamków molowych wartości ciśnienia załamania monowarstw mieszanych zmieniają się liniowo świadcząc o mieszalności składników.

Bardziej wnikliwa analiza zjawisk zachodzących w przebiegu izoterm jest możliwa na podstawie zależności modułu ściśliwości C_s^{-1} .

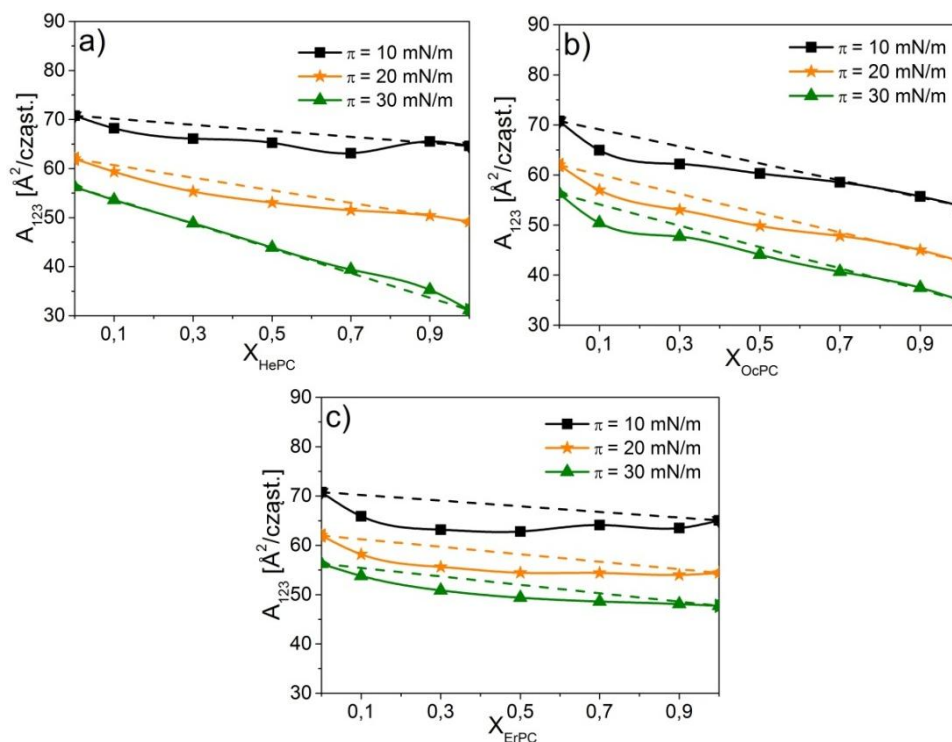


Rys.II.61. Zależność $C_s^{-1}(\pi)$ monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,428) zarejestrowanych w temperaturze 37°C na wodzie (pH 5,6)

Monowarstwy utworzone przez cząsteczki cholesterolu i POPC charakteryzuje ciekły skondensowany stan fizyczny ($C_s^{-1} \approx 160$ mN/m). Zwiększanie zawartości APCs w monowarstwach powoduje niewielki stopniowy spadek maksymalnych wartości

modułu ściśliwości, a kolejne filmy charakteryzują się mniejszym stopniem uporządkowania cząsteczek.

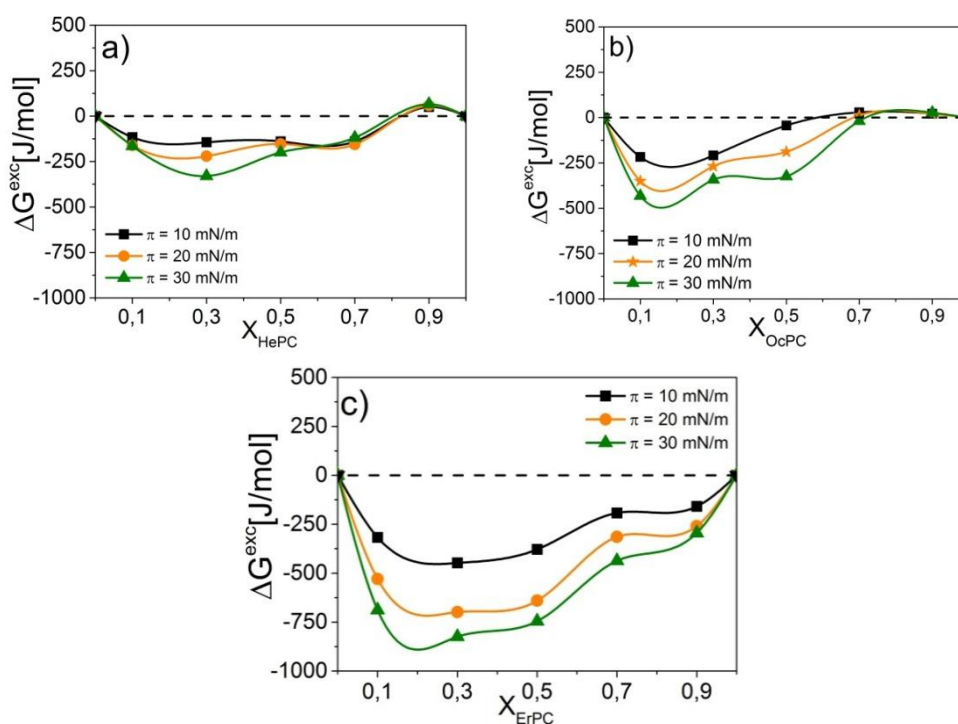
Wykresy zależności A_{123} w funkcji ułamka molowego APCs dla mieszanych monowarstw utworzonych w temperaturach 20° C przedstawiono na rys. II.62.:



Rys. II.62. Zależność A_{123} (X_{APCs}) monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,428) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Monowarstwy mieszane APCs/Chol/DPPC wykazują niewielkie ujemne odchylenia od przebiegu prostoliniowego, które maleją wraz ze wzrostem ciśnienie powierzchniowego. Dla układu mieszanego z HePC w 30 mN/m funkcja $A_{123}=f(X_{HePC})$ ma przebieg liniowy w zakresie ułamków $X_{HePC}=0,1-0,7$. Dla tej samej wartości ciśnienia dla frakcji molowej $X_{HePC}=0,9$ pojawia się odchylenie dodatnie. Również dla monowarstw bogatych w OcPC obserwuje się brak odchyżeń od prostej opisanej równaniem I.22.

Zmiany nadmiarowych entalpii swobodnych mieszania ΔG^{exc} przedstawiono w funkcji ułamka molowego:



Rys. II.63. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla monowarstw mieszanych HePC/Chol/POPC, OcPC/Chol/POPC oraz ErPC/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,428) zarejestrowanych w temperaturze 20°C

Analiza powyższych wykresów pozwala zauważyć, że monowarstwy mieszane APCs/Chol/POPC są stabilne prawie w całym zakresie badanych ułamków molowych, czemu dowodzą ujemne wartości ΔG^{exc} . Dla układu ErPC/Chol/POPC obserwuje się najsilniejsze oddziaływania między cząsteczkami w odniesieniu do siły oddziaływań w dwóch pozostałych układach. W żadnym z układów nie obserwuje się wyraźnie zaznaczonego minimum.

III. Dyskusja wyników

III.1. Właściwości APCs

Badane APCs mają strukturę amfifilową. Wszystkie trzy posiadają tę samą grupę hydrofilową, którą stanowi ugrupowanie choliny, natomiast różnią się częścią hydrofobową. Miltefozyna (HePC) posiada najkrótszy 16-węglowy łańcuch acylowy, oktadecylfosfocholina 18-węglowy, a erucylfosfocholina (ErPC) 22-węglowy z wiązaniem podwójnym usytuowanym między 13 a 14 atomem węgla. Charakterystykę fizykochemiczną APCs przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym badano ich tekstury przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego, a otrzymane obrazy skorelowano z wynikami krzywych DSC. W drugim kroku badano właściwości mechaniczne i elektryczne utworzonych przez te związki monowarstw Langmuira.

III.1.1. Ciekłokrystaliczne właściwości badanych APCs

Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego pokazują, że tekstury każdego ze związków są do siebie zbliżone. Zarówno podczas ogrzewania jak i chłodzenia na zdjęciach widoczne są charakterystyczne „nici” typowe dla fazy nematycznej. W fazie tej cząsteczki uporządkowane są wzdłuż jednego kierunku, natomiast środki ich ciężkości rozmieszczone są chaotycznie.

Różnice pomiędzy badanymi związkami widoczne są w temperaturach przejść fazowych. Dla HePC i OcPC przejście do fazy nematycznej podczas procesu ogrzewania następuje w temperaturze nieco wyższej od 100°C (ok. 103°C dla HePC oraz 108°C dla OcPC). W przypadku ErPC temperatura ta jest zdecydowanie niższa (ok. 23°C). Na temperaturę przejścia fazowego wpływa długość i stopień nasycenia łańcucha węglowodorowego. Im dłuższy łańcuch tym temperatura jest wyższa. Z kolei wprowadzenie do łańcucha wiązań nienasyconych powoduje obniżenie temperatury przejścia fazowego (Murray i wsp., 2012). Na podstawie uzyskanych wyników można więc przypuszczać, że niższa temperatura przejścia dla ErPC w odniesieniu do dwóch pozostałych związków zdeterminowana jest obecnością w jej łańcuchu acylowym wiązania podwójnego. W przebiegu krzywych DSC zarejestrowanych dla APCs również

widoczne są rozbieżności. Dla HePC i OcPC obserwuje się wyraźny pojedynczy pik (Cr2-N), natomiast w przypadku ErPC pik jest podwójny (przejście Cr1-Cr2 oraz Cr2-N). Kolejną ważną obserwacją jest przesunięcie temperatur przejścia podczas chłodzenia w kierunku niższych wartości, co jest typowe dla substancji wykazujących właściwości ciekłokrystaliczne.

III.1.2. Mechaniczne i elektryczne właściwości monowarstw Langmuira utworzonych przez APCs

Aby scharakteryzować właściwości mechaniczne filmów Langmuira utworzonych przez syntetyczne lipidy antynowotworowe, dla każdego ze związków przeprowadzono pomiar ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie, podczas jej kompresji przy pomocy barierki. Otrzymane izotermy π -A potwierdzają, że wszystkie trzy badane związki - HePC, OcPC oraz ErPC - wykazują zdolność tworzenia stabilnych warstw monomolekularnych na swobodnej powierzchni wody. Porównując wartości graniczne powierzchni A_0 otrzymane dla badanych związków można przypuszczać że są one zdeterminowane głównie rozmiarami grupy polarnej. Analiza maksymalnych wartości modułów ściśliwości $C_S^{-1}_{\max}$ pozwala określić stan badanych monowarstw jako ciekły (OcPC i ErPC) oraz ciekły rozprężony (HePC). Rosnące w kolejności HePC < OcPC < ErPC wartości $C_S^{-1}_{\max}$ wskazują na zwiększające się wraz z wydłużaniem łańcucha acylowego upakowanie filmów. Wraz z długością łańcucha węglowodorowego wzrasta też stabilność monowarstw, o czym świadczą coraz wyższe wartości ciśnienia kolapsu π_{coll} . Strukturę utworzonych przez APCs monowarstw podczas kompresji zwizualizowano przy pomocy mikroskopii kąta Brewstera, jednak zarejestrowane obrazy pokazują całkowitą homogeniczność monowarstw (przykładowy obraz otrzymany dla ErPC ilustruje rys. II.20) i nawet po kolapsie monowarstwy nie są widoczne żadne struktury.

Dla badanych związków zmierzono także zależność zmian potencjału powierzchniowego ΔV od powierzchni przypadającej na cząsteczkę (ΔV -A). W każdym z przypadków przebieg zależności ΔV -A jest zbliżony do siebie, niezależnie od długości i stopnia nasycenia łańcucha acylowego danej APC. Dla każdego z badanych związków potencjał powierzchniowy zaczyna rosnąć przy większych powierzchniach przypadających na cząsteczkę niż ciśnienie powierzchniowe. W literaturze można

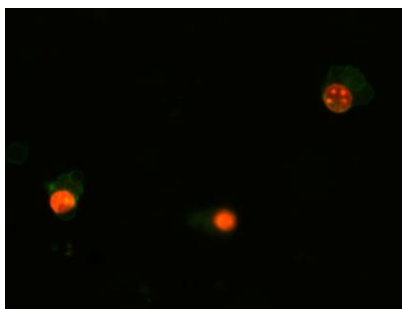
spotkać następującą interpretację takiego zachowania (Leite i wsp., 1998). Przy dużych wartościach powierzchni cząsteczki związku tworzącego monowarstwę zorientowane są na powierzchni wody równolegle, a pomiędzy ich grupami polarnymi i cząsteczkami wody tworzą się wiązania wodorowe. W wyniku kompresji w pierwszej kolejności dochodzi do zrywania tych wiązań (co przejawia się zmianą właściwości elektrycznych filmu i uwidacznia się w przebiegu krzywej ΔV - A jako jej wzrost lub spadek), a dopiero później do „podnoszenia się” łańcuchów acylowych (co z kolei przejawia się wzrostem ciśnienia powierzchniowego) (Leite i wsp., 1998). Otrzymane dodatnie wartości ΔV wskazują na zwiększanie potencjału powierzchniowego wody przez badane APCs. Maksymalne wartości zarejestrowanych potencjałów powierzchniowych (i jednocześnie wyliczonych względnych momentów dipolowych) odpowiadają osiągnięciu maksymalnego upakowania, co ma miejsce przy wartościach powierzchni zbliżonych do tych, przy których dana monowarstwa ulega załamaniu.

W kolejnym kroku zbadano wpływ parametrów eksperymentalnych na charakterystykę izoterm $\pi - A$ dla ErPC. Szczegółowy opis wyników został podany w części eksperymentalnej, dlatego w tej części zostaną przytoczone tylko najważniejsze obserwacje. Uzyskane wyniki wskazują, że na przebieg izoterm dla ErPC nie wpływają takie warunki eksperymentalne, jak pH czy ilość naniesionych cząsteczek. Minimalny wpływ na położenie izoterm ma jedynie szybkość kompresji, a co za tym idzie czas trwania pomiaru. Podczas kompresji monowarstwy z szybkością 20 cm²/min obserwuje się nieznaczne przesunięcie izoterm w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę, co może świadczyć o częściowej utracie cząsteczek z monowarstwy przy tak powolnym sprężaniu. Przypuszczenie to wydaje się potwierdzać eksperyment, w którym badano czas jaki upłynął od naniesienia monowarstwy do momentu rozpoczęcia kompresji. Przy najdłuższym z badanych czasów wynoszącym 25 minut obserwuje się minimalne (o ok. 2 Å) przesunięcie izoterm w stronę mniejszych powierzchni. Również temperatura subfazy ma pewien wpływ na charakterystykę izoterm $\pi - A$. O ile w temperaturze 20-30°C nie obserwuje się żadnych zmian w przebiegu izoterm, to obniżenie temperatury subfazy do 10°C powoduje przesunięcie izoterm w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w monowarstwie, aczkolwiek kształt izoterm pozostaje bez zmian. Spadek wartości π_{coll} obserwowany wraz ze wzrostem temperatury świadczy o zmniejszaniu się stabilności monowarstw tworzonych przez ErPC.

Podsumowując, zarówno ErPC jak i pozostałe alkilofosfocholiny tworzą na powierzchni swobodnej wody monowarstwy charakteryzujące się wysoką stabilnością i stanowią idealne związki do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w modelowych błonach biologicznych przy pomocy techniki Langmuira.

III.2. Zdolność APCs do indukcji procesu apoptozy

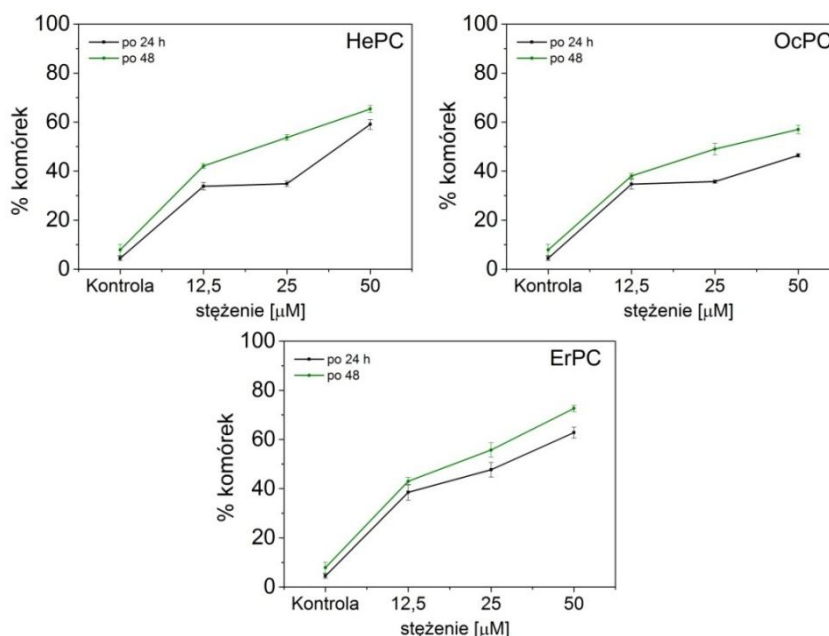
Powszechnie wiadomo, że cytotoksyczne działanie APCs wynika z ich powinowactwa do błony komórkowej – wbudowując się w nią modyfikują jej właściwości biologiczne (Gajate and Mollinedo, 2002). Głównym skutkiem ich działania jest wywołanie procesu apoptozy w komórkach zmienionych nowotworowo. Przed przystąpieniem do pomiarów langmuirowskich monowarstw mieszanych wykonano badania mające na celu potwierdzenie zdolności HePC, OcPC oraz ErPC do indukcji procesu zaprogramowanej śmierci komórki. Eksperyment przeprowadzono na linii komórkowej nowotworu prostaty Du145 wykorzystując do detekcji mikroskop fluorescencyjny. Stosowany barwnik - aneksyna V wykazuje silne powinowactwo do FS. Z kolei drugi ze stosowanych znaczników jodek propidyny po dostaniu się do wnętrza komórki wybarwia kwasy nukleinowe. Uzyskane obrazy dla komórek inkubowanych z poszczególnymi lekami w różnym stężeniu (12,5 μ M, 25 μ M i 50 μ M) i przy różnych czasach ekspozycji (24 h i 48 h) potwierdzają skuteczność APCs w wywoływaniu procesu apoptozy. Na poniższym obrazie uzyskanym przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego widoczne są komórki nowotworowe znajdujące się w późnym stadium apoptozy po 24 godzinnej inkubacji z HePC.



Rys. III.1. Obraz komórek w późnym stadium apoptozy po inkubacji z HePC uzyskany przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego

Jedną z pierwszych zmian zachodzących w komórkach we wczesnym stadium apoptozy jest zaburzenie asymetrii ich błony komórkowej, w wyniku którego dochodzi do przemieszczenia się FS z cytozolowej warstwy błony do zewnętrznej, gdzie może być

sprzężona ze znacznikiem. Apoptoza jest niezwykle ważna w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. W odróżnieniu od nekrozy wywołującej stan zapalny i martwicę apoptoza inicjowana w stanach patologicznych dotyczy tylko pojedynczych komórek i jest procesem dużo bardziej pożądanym. W komórkach, w których proces apoptozy nie został wywołany FS pozostaje po wewnętrznej warstwie błony, w związku z czym nie dochodzi do jej związania z barwnikiem i nie obserwuje się wyświecania. Na zdjęciu widoczne są także wybarwione jodkiem propidyny na czerwono jądra komórkowe. Przy poprawnie funkcjonującej błonie komórkowej jądra nie zostałyby wybarwione na skutek usuwania przez pompy jonowe dodatnio naładowanych cząsteczek tego barwnika z wnętrza komórki. Świecenie jest więc oznaką dysfunkcji błony komórkowej, charakterystycznej dla komórek nekrotycznych lub - jak w przypadku pokazanym na zdjęciu - komórek w późnym stadium apoptozy. Na zdjęciach komórek traktowanych APCs można zauważyć efekty związane z procesem nasilonej apoptozy w porównaniu z analogicznymi zdjęciami uzyskanymi dla hodowli kontrolnej (obrazy nie pokazane). Na poniższych wykresach przedstawiono dla każdego z badanych APCs procent komórek, u których wystąpiła śmierć komórkowa na drodze apoptozy.



Rys. III.2. Ilość komórek we wczesnym i późnym stadium apoptozy w funkcji stężenia leku

Analiza wykresów przedstawionych na rys. III.1 pozwala zauważyć zwiększenie efektu terapeutycznego związanego z wydłużeniem czasu ekspozycji na badane APCs oraz stosowaniem większych stężeń. Nasilenie procesu zaprogramowanej śmierci komórki

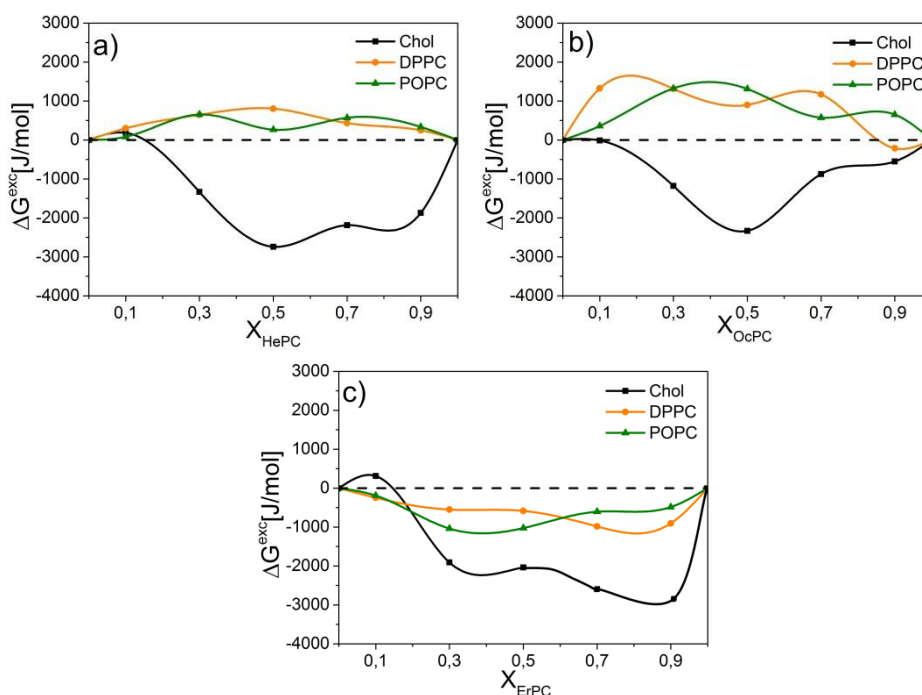
względem komórek pochodzących z hodowli kontrolnej występowało już przy najmniejszym zastosowanym stężeniu leków (12,5 μM). Co ciekawe w przypadku jednodobowej inkubacji komórek z HePC i OcPC wzrost dawki leku z 12,5 na 25 μM nie spowodował zmian w umieralności komórek na drodze apoptycznej. Jednak traktowanie lekami w najwyższym stężeniu doprowadziło do radykalnego wzrostu liczby komórek obumierających na drodze apoptozy. W przypadku ErPC zwiększenie dawki leku każdorazowo prowadzi do wzrostu procentu komórek, u których obserwuje się apoptozę. Lek ten wykazuje też największą skuteczność w indukcji apoptozy ($\approx 70\%$ wszystkich komórek). Warto przypomnieć, że komórki nekrotyczne stanowią tylko niewielki procent analizowanych komórek (rys. II.11), co świadczy o tym, że APCs wywołują śmierć przede wszystkim poprzez aktywną samodestrukcję komórki. Porównując statystycznie uzyskane wyniki (poziom istotności $p \leq 0,05$) do wyników dla komórek kontrolnych, wśród których obserwuje się znikomy procent komórek apoptycznych można jednoznacznie potwierdzić zależną od dawki i czasu inkubacji skuteczność badanych APCs w indukcji procesu apoptozy.

III. 3. Oddziaływania APCs z cholesterolem i fosfolipidami (DPPC i POPC)

W niniejszej sekcji przedyskutowane zostaną oddziaływania pomiędzy cząsteczkami APCs a trzema głównymi lipidami błonowymi: cholesterolem, DPPC i POPC w monowarstwach dwuskładnikowych. Cholesterol został wybrany z uwagi na jego kluczową rolę w regulowaniu właściwości fizykochemicznych komórek eukariotycznych oraz w formowaniu uporządkowanych domen w obrębie błony biologicznej (tratw lipidowych). Z kolei DPPC i POPC są najczęściej występującymi lipidami budującymi błony biologiczne, posiadającymi odpowiednio wszystkie wiązania wysyczone (DPPC), oraz pojedyncze wiązanie podwójne (POPC). Izotermy π -A zarejestrowane dla w/w fosfolipidów zostały szeroko opisane w literaturze naukowej i są zgodne z danymi uzyskanymi w niniejszej pracy (Chol: Cadena-Nava i wsp., 2006; DPPC: Dunkan i Larson, 2008; POPC: Yun i wsp. 2003). Cholesterol tworzy filmy mocno skondensowane, które ulegają załamaniu przy wartości ciśnienia powierzchniowego ok. 45 mN/m. Izoterma DPPC wykazuje istnienie charakterystycznego przejścia fazowego przypisanego zmianom orientacji cząsteczek na skutek kompresji. Filmy utworzone przez DPPC kolapsują przy wartości ciśnienia około 63 mN/m. Z kolei POPC tworzy

monowarstwy o charakterze ciekłym, kolapsujące przy wartości ciśnienia powierzchniowego ok. 50 mN/m. W przebiegu izoterm utworzonych przez ten fosfolipid nie obserwuje się przejścia fazowego.

Wpływ APCs na monowarstwy utworzone przez cholesterol, DPPC i POPC badany był w szerokim zakresie składu monowarstw i ciśnień powierzchniowych. Uzyskane wyniki pokazują, że na siłę wzajemnego oddziaływania w analizowanych monowarstwach mieszanych wpływają zarówno wzajemne proporcje tworzących je składników, jak i wartość ciśnienia powierzchniowego. W podwyższonych ciśnieniach interakcje są znacznie silniejsze, co z uwagi na bliższe upakowanie molekuł wydaje się być logiczne. Na poniższym rysunku zestawiono przebieg zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla mieszanin badanych alkilofosfocholin z cholesterolem, DPPC i POPC przy ciśnieniu 30 mN/m, które odpowiada rzeczywistemu ciśnieniu w błonach biologicznych w warunkach fizjologicznych.



Rys. III.3. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla APCs i głównych lipidów błonowych w temperaturze 20°C

Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, że charakter oddziaływań pomiędzy APCs a cholesterolem jest zbliżony. Już sam przebieg izoterm π -A pokazał, że obecność cholesterolu powoduje silne kontrakcje utworzonych filmów. Termodynamiczna analiza układów APCs/Chol potwierdziła istnienie pomiędzy cząsteczkami silnych oddziaływań o charakterze bardziej przyciągającym lub mniej

odpychającym niż w filmach jednoskładnikowych. W przypadku HePC i OcPC w przebiegu funkcji $\Delta G^{exc} = f(X_{HePC, OcPC})$ przy ciśnieniu 30 mN/m widoczne jest wyraźne minimum dla składu równomolowego. Obecność takiego minimum świadczy o tworzeniu kompleksów powierzchniowych pomiędzy HePC, OcPC i cholesterolem o stechiometrii 1:1. W tego typu połączeniach cząsteczki składników oddziałują ze sobą przede wszystkim na drodze oddziaływań hydrofobowych pomiędzy grupami apolarnymi (Su i wsp.), co skutkuje mniejszą powierzchnią zajmowaną przez cząsteczki w filmie mieszanym, w odniesieniu do filmów jednoskładnikowych. Potwierdzają to ujemne odchylenia od liniowości na wykresach $A_{12}(X_{APCs})$. Również wartości ciśnienia kolapsów, które dla ułamków molowych $X_{HePC, OcPC}=0,5$ osiągają największe wartości, wskazują na najwyższą stabilność filmów o w/w składzie. Z kolei dla ErPC silne oddziaływania z cholesterolem obserwowane są w szerokim zakresie ułamków molowych ($X_{ErPC}=0,3 -0,9$). Tak silne powinowactwo pomiędzy składnikami sugeruje, że cholesterol może mieć duże znaczenie w procesie inkorporacji APCs do błony biologicznej. Mianowicie cząsteczki tego sterolu mogą „unieruchamiać” molekuly APCs poprzez tworzenie z nimi kompleksów, w wyniku czego tylko niewielka ilość leków w postaci swobodnej (niezwiązanej z cholesterolem) zdolna jest przeniknąć przez błonę i wywrzeć biologiczną aktywność. Słabsze wchłanianie edelfozyny, będącej prekursorem APCs, przez bogate w cholesterol błony biologiczne został opisany w pracy (Diomedea i wsp, 1990). Dla APCs do tej pory nie udało się znaleźć bezpośredniej korelacji pomiędzy ilością cholesterolu a ich aktywnością antynowotworową, jednak porównując różne linie komórkowe można zauważyć, że te które odznaczają się najwyższym stosunkiem fosfolipidów do cholesterolu (m.in. linia komórkowa KB) wykazują wyższą zdolność wchłaniania leku (Fleer i wsp., 1993). W oparciu o uzyskane w niniejszej pracy wyniki wydaje się to być zrozumiałe.

Wyraźne minimum w przebiegu funkcji $\Delta G^{exc} = f(X_{HePC, OcPC})$ sugeruje, że w mieszaninach o ułamkach molowych $X_{HePC, OcPC}<0,5$ cząsteczki HePC i OcPC całkowicie związane są w formie wspomnianych kompleksów, a na powierzchni nie występuje żadna nadwyżka „wolnych” alkilofosfocholin. Z kolei w mieszaninach bogatszych w HePC i OcPC ($X_{HePC, OcPC} > 0,5$) poza kompleksami obecne są niezwiązane cząsteczki alkilofosfocholin, co najprawdopodobniej odpowiada za hemolityczny efekt obserwowany dla HePC i OcPC. Wartości ciśnień kolapsu świadczą ponadto o tym, że mieszaniny o dużej zawartości HePC i OcPC nie mieszają się ze sobą. Układ ErPC/Chol

zachowuje się inaczej: praktycznie w całym zakresie badanych ułamków molowych (z wyjątkiem obszaru o małej zawartości ErPC: $X_{\text{ErPC}}=0,1$) oddziaływania między cząsteczkami ErPC i cholesterolu są silne. Zatem ilość niezwiązanych cząsteczek ErPC jest na tyle mała, że nie wywołuje hemolizy.

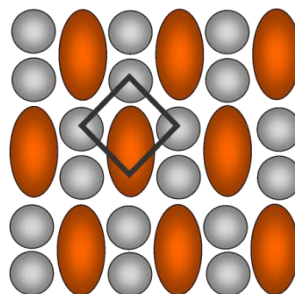
Na podstawie analizy oddziaływań międzycząsteczkowych badanych APCs z DPPC i POPC można wnioskować o istnieniu słabych oddziaływań pomiędzy w/w substancjami w monowarstwach Langmuira. Widoczny natomiast staje się wpływ różnic w strukturze chemicznej badanych APCs na charakter tych oddziaływań. W temperaturze 20°C zarówno A_{12} jak i ΔG^{exc} wykazują w przypadku układów HePC/DPPC(POPC) oraz OcPC/DPPC(POPC) dodatnie odstępstwa od idealności, natomiast dla ErPC/DPPC(POPC) odstępstwa mają charakter ujemny. Siła oddziaływania przy ciśnieniu 30 mN/m jest jednak znacznie mniejsza ($\Delta G^{\text{exc}} \approx -1000 \div -1200$ J/mol), aniżeli w przypadku mieszanin z cholesterolem (gdzie wartości ΔG^{exc} wahają się w granicach $(-2600 \div -3300)$ J/mol). Z analizy wartości ΔG^{exc} wynika ponadto, że zasięg oddziaływania pomiędzy APCs a badanymi fosfatydylocholinami jest podobny i niezależny od stopnia nasycenia tych drugich (HePC: $\Delta G^{\text{exc}} \approx 1000$ J/mol; OcPC: $\Delta G^{\text{exc}} \approx 1200$ J/mol; ErPC: $\Delta G^{\text{exc}} \approx -1000$ J/mol).

III.3.1. Mieszalność cząsteczek w układzie ErPC/DPPC

W przebiegu izoterm π -A zarejestrowanych dla mieszanin APCs z DPPC w szerokim zakresie ułamków molowych widoczne są dwa punkty załamania. Dla każdej z analizowanych mieszanin ciśnienia pierwszego kolapsu oscylują wokół wartości ciśnień, przy których załamaniu ulegają filmy utworzone przez czyste APCs, drugi kolaps odpowiada z kolei załamaniu monowarstwy czystego DPPC. O ile dla układów HePC/DPPC oraz OcPC/DPPC przebieg funkcji $A_{12} = f(X_{\text{HePC}}, X_{\text{OcPC}})$ oraz $\Delta G^{\text{exc}} = f(X_{\text{HePC}}, X_{\text{OcPC}})$ wykazuje dodatnie odstępstwa od idealności sugerując zachodzącą separację faz, to w przypadku trzeciego z układów ErPC/DPPC przebieg tych funkcji wyraźnie wskazuje na istnienie przyciągających oddziaływań pomiędzy składnikami i ich wzajemną mieszalność. Powszechnie wiadomo, że mieszalność składników błon biologicznych (bądź ich separacja) wpływa na szereg właściwości błon (m.in. ich przepuszczalność, potencjał powierzchniowy, oraz zdolność oddziaływania z białkami błonowymi). Wzajemna mieszalność ma też duże znaczenie w wielu procesach biologicznych, włączając w to transport, procesy fuzji oraz podziały komórkowe.

Dlatego też zbadanie wzajemnej mieszalności pomiędzy cząsteczkami w układzie ErPC/DPPC może pomóc w zrozumieniu mechanizmów działania leków z grupy alkilofosfocholin. Dla układu ErPC/DPPC przeprowadzano więc dodatkowe badania z użyciem mikroskopii kąta Brewstera. Zmiany w kształcie, rozmiarze oraz liczbie domen zachodzące wraz ze zmianą proporcji X_{ErPC} oraz obecność tylko jednego typu domen przy danym składzie filmu obserwowane na zdjęciach BAM (rys. II.29) stanowią jednoznaczne argumenty za wzajemną mieszalnością DPPC i ErPC przy wartości ciśnienia powierzchniowego $\pi=30$ mN/m. Jednak BAM zapewnia informację dotyczące organizacji cząsteczek w skali mikrometrowej. Aby więc lepiej poznać ułożenie cząsteczek w monowarstwach mieszanych przeprowadzono eksperymenty wykorzystujące rozpraszanie promieniowania X (GIXD). GIXD pozwala na zbadanie struktury monowarstw z nanometrową rozdzielczością. Przeprowadzenie tego typu badań było możliwe dzięki temu, że analizowane mieszaniny w ciśnieniu 30 mN/m mają charakter skondensowany. Piki dyfrakcyjne zostały zarejestrowane dla czystego DPPC oraz mieszanin ErPC/DPPC o ułamku molowym $X_{\text{ErPC}} = 0,3; 0,5$ i $0,7$. Pierwsza ważna obserwacja wynika z wartości powierzchni krystalograficznej obliczonej dla czystego DPPC w 30 mN/m. Wartość tej powierzchni wynosząca $44,14 \text{ \AA}^2$ znajduje się pomiędzy wartością powierzchni granicznej ($53,8 \text{ \AA}^2$), a powierzchnią przy której monowarstwa ulega załamaniu ($42,2 \text{ \AA}^2$). Jako, że obszar ten leży w pobliżu kolapsu można przypuszczać, że prawie wszystkie cząsteczki DPPC obecne są w domenach skondensowanych, a faza amorficzna praktycznie nie występuje. Z kolei słaba intensywność pików zarejestrowanych dla mieszanin $X_{\text{ErPC}} = 0,3; 0,5$ i $0,7$ świadczy o tym, że większość cząsteczek w tych filmach tworzy fazę rozprężoną i tylko niewielka ich liczba zaangażowana jest w tworzenie skondensowanych domen. Co więcej, wśród nanodomen tworzących mikrodomeny obserwowane pod BAM, tylko pewien ułamek charakteryzuje się periodycznym ułożeniem. Potwierdzają to obrazy BAM, na których dla frakcji molowych od $X_{\text{ErPC}}=0,3$ do $X_{\text{ErPC}}=0,7$ obserwuje się stopniowe zmniejszanie liczby skondensowanych domen przypadających na jednostkę powierzchni. Wśród mieszanin dla których udało się zarejestrować obraz dyfrakcyjny najwyższą intensywnością charakteryzuje się pik dla $X_{\text{ErPC}}=0,5$ (amplituda tego piku jest 2 razy wyższa od amplitudy pików dla pozostałych dwóch frakcji). Wszystkie inne parametry (położenie piku, wielkość domen oraz długości fragmentu cząsteczki rozpraszającego promieniowanie X) są takie same. Wszystkie te obserwacje prowadzą do hipotezy, że

domeny obserwowane przy różnej zawartości ErPC mają taki sam skład (proporcja 1:1). Zatem w takiej sieci na dwa łańcuchy DPPC przypada 1 łańcuch ErPC. Zaproponowany dla układu model sieci prezentuje rys. III.4:



Rys. III.4. Model sieci utworzonej przez cząsteczki ErPC i DPPC wraz z zaznaczoną komórką elementarną

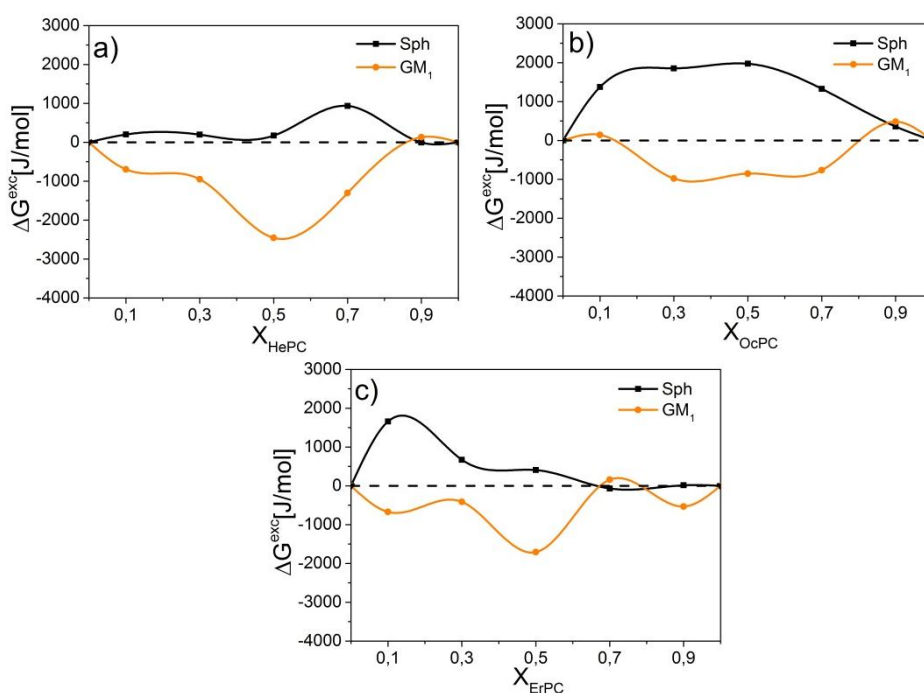
W świetle uzyskanych wyników nasuwają się zatem pytania: dlaczego dla stężenia $X_{\text{ErPC}}=0,1$ nie obserwuje się piku dyfrakcyjnego, skoro - jak wynika z obrazów BAM - większość cząsteczek jest zaangażowana w tworzenie domen? Dlaczego tak mała ilość ErPC wprowadzona do monowarstw utworzonych przez DPPC całkowicie zaburza uporządkowanie cząsteczek w płaszczyźnie? Aby odpowiedzieć na te pytania należy przeanalizować strukturę obydwu związków. Łańcuch acylowy ErPC na skutek obecności podwójnego wiązania ma zupełnie inną strukturę i dużo większy przekrój poprzeczny niż łańcuchy kwasu palmitynowego obecne w cząsteczce DPPC. Dlatego też, dla promieniowania X łańcuchy te stanowią dwa zupełnie inne ośrodki rozpraszające. Jeśli więc mała ilość ErPC zostanie wprowadzona do monowarstwy (1 łańcuch ErPC na 18 łańcuchów palmitynowych) to periodyczność takiego układu w skali nanometrowej zostaje całkowicie zaburzona, jako, że łańcuchy ErPC są rozmieszczone zupełnie przypadkowo w płaszczyźnie monowarstwy. Przy większych frakcjach molowych ErPC istnieje większe prawdopodobieństwo, że niektóre z domen uzyskają proporcję 1:1, co prowadzi do tworzenia układu periodycznego i daje przyczynek do obrazu dyfrakcyjnego. Pozostałe domeny (o proporcji różnej niż 1:1) rozmieszczone są chaotycznie w związku z czym nie uginają promieni X , co przejawia się słabą intensywnością pików zarejestrowanych dla $X_{\text{ErPC}} = 0,3$ i $0,7$. W przypadku $X_{\text{ErPC}} = 0,7$ pojedynczy łańcuch alkilofosfocholiny mającej skłonności do tworzenia filmów o charakterze ciekłym zaczyna dominować w monowarstwie. Zatem jedynie dla $X_{\text{ErPC}}=0,5$ wzajemne proporcje ErPC i DPPC są idealne do tworzenia periodycznie rozmieszczonych domen.

Aby w pełni zrozumieć wzajemną mieszalność ErPC i DPPC konieczne jest wyjaśnienie zjawiska związanego z istnieniem dodatkowego plateau w przebiegu izoterm π -A oraz określenie charakteru tego przejścia. Dlatego w drugim etapie tego eksperymentu zbadano strukturę monowarstwy $X_{\text{ErPC}} = 0,3$ w $\pi = 50$ mN/m, czyli powyżej wartości kolapsu monowarstw ErPC. Uzyskane z eksperymentu GIXD wyniki jednoznacznie wskazują na to, że małe domeny, obserwowane w 50 mN/m na obrazach BAM (rys.II.34) powstały na skutek usunięcia cząsteczek ErPC z monowarstwy. Gdyby dochodziło do załamania monowarstwy mieszanej, utworzone wielowarstwowe domeny charakteryzowałyby się przypadkowym składem i różniłyby się grubością, nie dając przyczynku do obrazu dyfrakcyjnego. Co więcej, jeśli nawet doszłoby do utworzenia krystalicznej wielowarstwy, to miałyby to odzwierciedlenie w szerokości prętów Bragga i w konsekwencji w wartościach L_z . Jednak otrzymane wyniki nie dostarczają żadnej informacji na temat tego aby podobne struktury się formowały. Zatem w rejonie wysokich ciśnień dochodzi do całkowitej separacji faz.

III.4. Oddziaływania ze sfingolipidami

Sfingomieline i GM_1 to związki o charakterze amfifilowym należące do grupy lipidów zawierających sfingozynę, czyli tzw. sfingolipidów. Do badań w niniejszej pracy sfingomielinę wybrano z uwagi na fakt, iż obok cholesterolu stanowi główny składnik raft lipidowych, jak również ze względu na jej znaczącą rolę w procesie przekazywania sygnałów między komórkami (Ramstedt and Slotte, 2002). Natomiast gangliozyd wybrano ze względu na jego nadekspresję występującą w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek zdrowych (Fuentes i wsp., 1997). Porównując izotermy π -A (rys. II.36 i II.40) zarejestrowane dla tych związków, zauważyć można, że w przypadku GM_1 ciśnienie powierzchniowe zaczyna wzrastać przy znacznie większej wartości powierzchni ($>130 \text{ \AA}^2$) niż dla Sph ($78 \text{ \AA}^2$). Wynika to z odmiennej budowy chemicznej tych związków. W sfingomielinie część polarną stanowi ugrupowanie cholinowe, natomiast dwa łańcuchy acylowe tworzą część apolarną. W przypadku GM_1 polarną głowę stanowią oligosacharydy i kwas sialowy, podczas gdy ceramid jest częścią niepolarną cząsteczki. Dodatkowo w warunkach fizjologicznych (pH 7) sfingomieline ma charakter zwitterjonowy, natomiast GM_1 jest naładowany ujemnie. Zatem można przypuszczać, że za duże powierzchnie przypadające na cząsteczkę w monowarstwach utworzonych przez GM_1 odpowiadają zarówno rozmiary polarnych głów GM_1 , jak i

odpychające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy nimi. Obliczone dla sfingomieliny i GM₁ wartości $C_s^{-1}_{max}$ wskazują na różny, aczkolwiek skondensowany charakter tworzonych przez te związki filmów: cząsteczki GM₁ tworzą monowarstwy o charakterze ciekłym skondensowanym ($C_s^{-1}_{max} \approx 180$), natomiast cząsteczki sfingomieliny tworzą monowarstwy o charakterze silnie skondensowanym ($C_s^{-1}_{max} > 250$). Różnica w stopniu skondensowania monowarstw utworzonych przez te dwa sfingolipidy sprawia, iż zaburzenie ich organizacji na skutek wprowadzenia cząsteczek APCs zachodzi na dwa sposoby. W przypadku filmów utworzonych przez sfingomielinę, charakteryzujących się większym uporządkowaniem inkorporacja niewielkiej ilości APCs znacznie obniża moduły ściśliwości. Niemniej jednak podczas dalszego wprowadzania cząsteczek leku ($X_{APCs} > 0,3$) płynność filmu pozostaje praktycznie bez zmian, wskazując na niedostępność monowarstwy sfingomieliny dla cząsteczek APCs. Inne zjawisko jest obserwowane w przypadku monowarstw utworzonych przez GM₁: cząsteczki APCs stopniowo wbudowują się do filmu, w wyniku czego stopień jego upakowania wzrasta i ostatecznie przy dużej zawartości leku organizacja monowarstwy zostaje zaburzona, co przejawia się spadkiem modułu ściśliwości. Analizę zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ przy ciśnieniu 30 mN/m dla obu badanych sfingolipidów przedstawia poniższy rysunek.



Rys. III.5 Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla APCs i sfingolipidów w temperaturze 20°C

Otrzymane wyniki potwierdzają istnienie oddziaływań pomiędzy cząsteczkami APCs a badanymi sfingolipidami. Charakter tych oddziaływań jest jednak inny. Dla układów mieszanych ze sfingomieliną obserwuje się dodatnie odchylenia od idealności, świadczące o bardziej odpychających (lub mniej przyciągających) oddziaływaniach w porównaniu do monowarstw jednoskładnikowych APC/APC oraz Sph/Sph. Z kolei monowarstwy mieszane z GM₁ prawie w całym zakresie ułamków molowych wykazują ujemne odstępstwa od idealności (z wyjątkiem monowarstw o najwyższej zawartości HePC, $X_{\text{OcPC}} = 0,1$ i $0,9$ oraz $X_{\text{ErPC}}=0,7$). Również przebiegi krzywych $\Delta G^{\text{exc}}=f(X_{\text{APCs}})$ dla poszczególnych APCs różnią się między sobą. W przypadku GM₁ dla HePC i ErPC obserwuje się wyraźne minimum dla mieszanin o stechiometrii 1:1 (sugerujące tworzenie się kompleksów powierzchniowych), podczas gdy dla OcPC w przedziale ułamków $X_{\text{OcPC}}=0,3-0,7$ wartości ΔG^{exc} nie zmieniają się. Ujemne wartości ΔG^{exc} dla układów mieszanych z GM₁ są wynikiem zmniejszenia siły oddziaływań odpychających pomiędzy ujemnie naładowanymi głowami glikosfingolipidu na skutek wbudowywania się pomiędzy nie cząsteczek APCs. Z kolei, dla monowarstw mieszanych ze Sph dla układów HePC/Sph i ErPC/Sph w przebiegu funkcji $\Delta G^{\text{exc}}=f(X_{\text{APCs}})$ obserwuje się wyraźne maksima. Dla pierwszego z tych układów najsilniejsze oddziaływania występują przy ułamku molowym $X_{\text{HePC}}=0,7$, podczas gdy w przypadku układu ErPC/Sph maksimum występuje dla monowarstw ubogich w ErPC ($X_{\text{ErPC}}=0,1$). Mieszaniny z OcPC podobnie jak w przypadku GM₁ charakteryzują się brakiem wyraźnego ekstremum w całym zakresie badanych ułamków molowych.

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że badane APCs wykazują małe powinowactwo do monowarstw tworzonych przez cząsteczki sfingomieliny. Ma to szczególnie znaczenie w kontekście tworzenia przez ten związek tratw lipidowych, które zostaną omówione w dalszej części pracy. Z kolei cząsteczki gangliozydów mogą dla APCs stanowić potencjalne „targety” na powierzchni błony. Hipoteza ta wydaje się być słuszna w oparciu o liczne badania potwierdzające akumulację gangliozydów w przypadku zmian nowotworowych.

III.5. Zasada komplementarności

Powinowactwo APCs do badanych lipidów błonowych można także tłumaczyć w oparciu o geometryczną komplementarność oddziałujących ze sobą cząsteczek. Upakowanie cząsteczek może być określone przy pomocy tzw. krytycznego parametru upakowania s , który zależy od powierzchni głowy a oraz objętości V i długości l_c łańcucha węglowodorowego (Israelachvili, 2011):

$$s = \frac{V}{a \cdot l_c} \quad (\text{III.1})$$

Wartości a , V , l_c występujące w powyższym wzorze są charakterystyczne dla danej cząsteczki. Zarówno V jak i l_c można łatwo policzyć korzystając z zależności:

$$V = (27,4 + 26,90n_c) \text{ [Å}^3\text{]} \quad (\text{III.2})$$

$$l_c = (1,5 + 1,265n_c) \text{ [Å]} \quad (\text{III.3})$$

gdzie n_c jest liczbą atomów węgla w łańcuchu, 27,4 i 26,9 są objętościami grup - odpowiednio CH_3 i CH_2 , 1,265 jest długością wiązania C-C, natomiast 1,5 - radialnym zasięgiem grupy CH_3 . Jako, że na wartość powierzchni efektywnej głowy a wpływa wiele czynników (m.in. objętość i ładunek) parametr a jest bardzo trudny do oszacowania. Dla głównych lipidów błonowych parametr ten został policzony i wynosi odpowiednio 71,7 dla PC, 19 dla Chol, 95 dla GM_1 (Kumar, 1993, Frey i wsp., 2008). Wyliczona wartość parametru s dla związków stosowanych w doświadczeniach oraz określony tym parametrem typ agregacji przedstawia tab. III.1. Rachunki przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pokazały, że HePC, OcPC posiadają kształt stożkowy, natomiast ErPC charakteryzuje się kształtem ściętego stożka. W kombinacji z cholesterolem - posiadającym kształt odwróconego ściętego stożka - taki przeciwny układ cząsteczek zapewnia geometrycznie korzystne upakowanie, przejawiające się w silnych przyciągających oddziaływaniach międzymolekularnych obserwowanych na wykresach ΔG^{exc} . Z kolei cząsteczki najliczniej występujących fosfolipidów - DPPC i POPC - posiadają kształt ściętych stożków. Połączenie tych fosfolipidów z cząsteczkami APCs nie spełnia więc warunku geometrycznej komplementarności, co tłumaczy istnienie słabych oddziaływań w układach APCs/DPPC oraz APCs/POPC.

Składnik		Parametry				
		a [Å ²]	l_c [Å]	V [Å ³]	s	Kształt
APCs	HePC	71,7	20,475	430,9	0,29	 Stożek
	OcPC	71,7	23,005	484,7	0,29	 Stożek
	ErPC	71,7	24,400	582,9	0,33	 Ścięty stożek
Lipidy błonowe	Cholesterol	19	17,250	400	1,22	 Odwrócony ścięty stożek
	DPPC	71,7	20,475	847	0,57	 Ścięty stożek
	POPC	71,7	20,475	910	0,62	 Ścięty stożek
	Sfingomielina	71,7	20,475	837,6	0,57	 Ścięty stożek
	Gangliozyd GM1	95	26,800	1100	0,43	 Ścięty stożek

Tab. III.1. Parametry upakowania molekularnego wyliczone dla stosowanych w eksperymentach lipidów błonowych oraz APCs

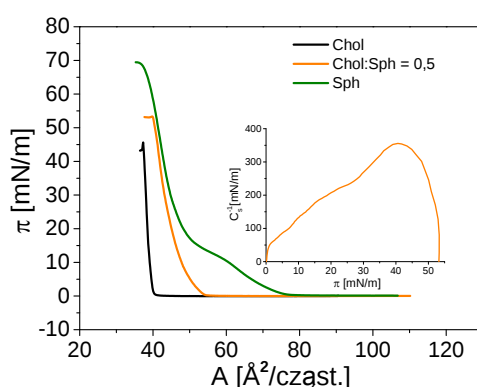
Podobne wnioski można wyciągnąć dla sfingomieliny, która również posiada kształt odwróconego stożka. Interesujące natomiast wydają się wyniki uzyskane dla układów APCs/GM₁. Analiza danych pokazała, że pomiędzy cząsteczkami glikosfingolipidu a APCs występują oddziaływania o charakterze przyciągającym, natomiast kształt GM₁ opisany jest jako ścięty stożek, co uniemożliwia ścisłe upakowanie molekuł. Należy podkreślić jednak, że molekularne kształty oszacowane są na podstawie wartości

krytycznej parametru pakowania s , który nie uwzględnia specyficznych oddziaływań pomiędzy składnikami mieszaniny. W monowarstwach utworzonych przez cząsteczki GM_1 i APCs korzystne upakowanie może wynikać z siły elektrostatycznej pomiędzy dodatnio naładowaną grupą choliny badanych leków, a ujemnie naładowaną resztą kwasu sialowego w cząsteczce GM_1 , która przeważa nad niekomplementarnością kształtu obu cząsteczek.

III.6. Wpływ APCs na modelowe rafty lipidowe

Wielu autorów wskazuje na rafty lipidowe jako miejsce wiązania wielu leków, w tym leków o działaniu antynowotworowym. Badania przeprowadzone przez Ausili i wsp. wskazują na wysoki stopień akumulacji edelfozyny ($(21 \pm 4,3) \%$ całkowitej zawartości lipidów) (Ausili i wsp., 2008). Z kolei van der Luit przeprowadził podobne eksperymenty z peryfozyną wskazując na zbliżony poziom nagromadzenia leku (van der Luit i wsp., 2007). Otrzymane przez tych autorów wyniki dowodzą także, że akumulacja leków w błonie prowadzi do redystrybucji steroli i tym samym wpływa na zmianę właściwości biofizycznych tratw lipidowych. W niniejszej pracy przeprowadzono eksperymenty mające na celu sprawdzenie powinowactwa APCs do domen lipidowych oraz ich wpływu na stopień uporządkowania domen.

Izotermę zarejestrowaną dla monowarstwy stanowiącej model tratwy lipidowej (Chol:Sph=0,5) wraz z zależnością $C_s^{-1}(\pi)$ przedstawia poniższy rysunek.



Rys. III.6. Izoterma monowarstwy mieszanej stanowiącej model raft lipidowych (Chol:Sph=0,5) wraz z izotermami zarejestrowanymi dla czystych składników w temperaturze 20°C na wodzie o pH 5,6; inset: zależność $C_s^{-1}(\pi)$ dla modelowej tratwy lipidowej

Cząsteczki mieszaniny tworzą filmy o wysokim stopniu uporządkowania, wynikającym z korzystnego geometrycznego upakowania molekuł. Utworzone monowarstwy

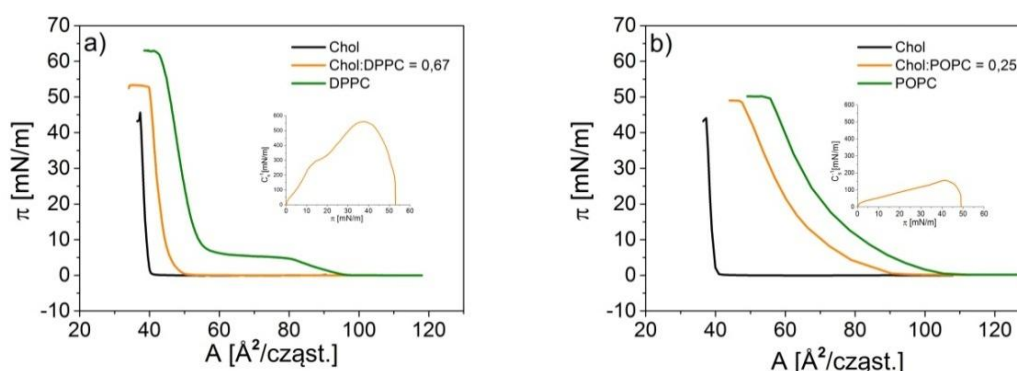
charakteryzują się także dość wysoką stabilnością o czym świadczy wartość ciśnienia powierzchniowego, przy którym dochodzi do załamania filmu (54 mN/m).

Na podstawie maksymalnych wartości modułów ściśliwości odczytanych z wykresów zależności C_s^{-1} (X_{APCs}) (rys. II.49) dla ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m można stwierdzić, że dodanie najmniejszego ułamka molowego APCs $X_{APCs}=0,1$ do monowarstw stanowiących model tratw lipidowych nie wywołuje znaczących zmian w ich upakowaniu. Jednak dalsze zwiększanie ilości APCs skutkuje wyraźnym wzrostem fluidyzacji monowarstw. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami Ausili i wsp. uzyskanymi dla edelfozyny. Autorzy badając metodą spektroskopii NMR układ trójskładnikowy POPC/Chol/Sph pokazali, że dodanie do układu leku powoduje przy wyższych temperaturach zaburzenie uporządkowania cząsteczek.

Rosnące wartości ciśnień kolapsu monowarstw mieszanych ubogich w APCs ($X_{APCs}=0,1-0,3$) świadczą o większej stabilności tych układów w porównaniu do mieszanin Chol/Sph. O dużej stabilności mieszanin świadczą także ujemne wartości funkcji $\Delta G^{exc}=f(X_{APCs})$. Można więc jednoznacznie stwierdzić, że APCs wykazują stabilizujący efekt na domeny lipidowe. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami Heczkovej i Slotte (Heczková i Slotte, 2006), którzy także postulują stabilizację domen pod wpływem syntetycznych lipidów antynowotworowych (edelfozyny i miltefozyny). Analiza oddziaływań w układach dwuskładnikowych APCs/Chol oraz APCs/Sph pozwala stwierdzić, że w procesie inkorporacji APCs w tratwy lipidowe kluczową rolę odgrywają oddziaływania z cholesterolem (ujemne wartości $\Delta G^{exc}=f(X_{APCs})$ w całym zakresie badanych ułamków molowych). Z kolei, dodatnie wartości $\Delta G^{exc}=f(X_{APCs})$ otrzymane dla układów mieszanych ze Sph dowodzą istnieniu mniej przyciągających oddziaływań pomiędzy składnikami i świadczą o małym powinowactwie leku do Sph. Dodatkowo van der Luit i wsp. dowiedli, że inkorporacja APCs (peryfozyny) jest niezależna od ilości sfingomieliny w domenach lipidowych (van der Luit i wsp., 2007). Zatem można przypuszczać, że obecność Sph w raftach lipidowych nie wpływa znacząco na proces wnikania APCs do komórki.

III.7. Wpływ APCs na modelowe błony biologiczne

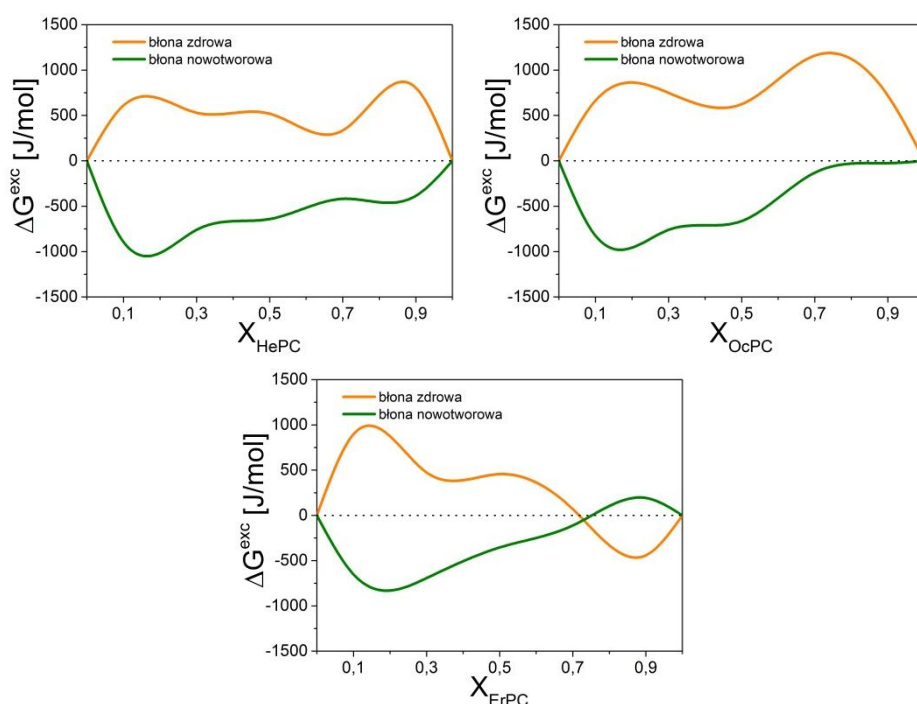
W części literaturowej opisano różnice w składzie błon biologicznych komórek normalnych oraz zmienionych nowotworowo. Jak wykazano, transformacja nowotworowa powoduje z reguły zwiększenie wartości stosunku fosfolipidów do cholesterolu oraz wzrost procentowej zawartości lipidów o charakterze nienasyconym (Inbar, 1976; Tsuchiya i wsp., 2002). Różnice te pozwalają - w oparciu o technikę monowarstw Langmuira - na stworzenie prostych modeli błony normalnej i patologicznej. W niniejszej pracy jako modele błon wykorzystano monowarstwy dwuskładnikowe, składające się z cholesterolu i właściwego fosfolipidu (DPPC - błona zdrowa oraz POPC - błona nowotworowa) zmieszanych ze sobą w odpowiedniej proporcji (Chol:DPPC = 0,67 oraz Chol:POPC = 0,25). Izotermy zarejestrowane dla poszczególnych monowarstw modelowych błon wraz z izotermami czystych związków prezentuje poniższy rysunek:



Rys. III.7. Izotermy monowarstw mieszanych stanowiących modele błon biologicznych: a) zdrowej b) nowotworowej wraz z izotermami zarejestrowanymi dla czystych składników w temperaturze 20°C na wodzie o pH 5,6; inset: zależność $C_s^{-1}(\pi)$ dla modelowych błon biologicznych

Krzywe π -A dla poszczególnych układów modelowych różnią się znacznie pod względem kształtu i położenia. Izoterma normalnej błony komórkowej ma ostrzejszy przebieg i przesunięta jest w stronę mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę w stosunku do izotermy zarejestrowanej dla monowarstwy modelowej błony nowotworowej. Różnice widoczne są także w upakowaniu błon. Film układu mieszanego z POPC charakteryzuje się ciekłym stanem fizycznym, natomiast monowarstwę stanowiącą model błony komórki zdrowej cechuje silne skondensowanie. Analiza przebiegu funkcji ΔG^{exc} (w 30 mN/m) pozwala zauważyć, że pomiędzy APCs, a

cząsteczkami lipidów budujących modelowe błony (zarówno zdrowe jak i nowotworowe) pojawiają się oddziaływania.

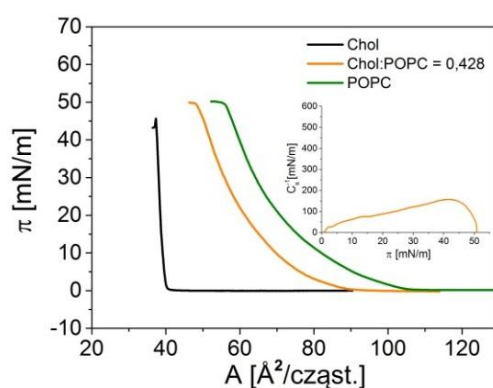


Rys.III.8. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla modelowych błon biologicznych w temperaturze 20°C

Charakter tych oddziaływań jest w obu przypadkach różny. Ujemne wartości w przebiegu funkcji dla układu APCs/Chol/POPC wskazują na istnienie korzystniejszych oddziaływań w tym trójskładnikowym układzie w odniesieniu do układu dwuskładnikowego Chol/POPC. Z drugiej strony dodatnie wartości ΔG^{exc} odnotowane dla układów APCs/Chol/DPPC pokazują, że oddziaływania w tym układzie są słabsze (mniej atrakcyjne lub bardziej odpychające), a utworzone filmy są termodynamicznie mniej stabilne w porównaniu do układu Chol/DPPC. W związku z tym można stwierdzić, że inkorporacja APCs do błon komórek zdrowych jest termodynamicznie niekorzystna. Badania mieszanych monowarstw Chol/DPPC (Dynarowicz-Łątka i wsp., 2002) i Chol/POPC (Jurak, 2013) dowodzą, że powinowactwo cholesterolu do DPPC jest dużo większe niż do POPC. Dlatego też wprowadzanie jednołańcuchowych cząsteczek APCs do filmów o charakterze bardziej płynnym i mniej uporządkowanym (Chol/POPC) jest o wiele łatwiejsze niż inkorporacja cząsteczek leku do filmu Chol/DPPC. Wszystko to pozwala nam stwierdzić, że błona komórki normalnej stanowi niejako naturalną barierę, zapobiegającą wnikanii cząsteczek leku do wnętrza komórek i może tym samym tłumaczyć wysoką selektywność z APCs.

III.8. Powinowactwo APCs do błony komórki nowotworu prostaty

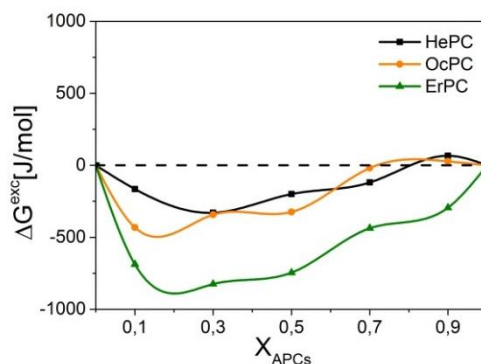
Na podstawie danych dotyczących składu lipidowego błon stworzono model błony imitującej błonę komórki nowotworu prostaty (Chol:POPC=0,428). Izotermę zarejestrowaną dla opisanego modelu prezentuje rys. III.9.



Rys. III.9. Izoterma monowarstwy mieszanej stanowiącej model błony komórki nowotworu prostaty (Chol:POPC=0,428) wraz z izotermami zarejestrowanymi dla czystych składników w temperaturze 20°C na wodzie o pH 5,6; inset: zależność $C_s^{-1}(\pi)$ dla modelowej tratwy lipidowej

Jak można zauważyć, izoterma kształtem przypomina izotermę zarejestrowaną dla POPC jest jednak przesunięta w stronę mniejszych powierzchni. Modelowa monowarstwa znajduje się w stanie ciekłym skondensowanym. Niski stopień uporządkowania łańcuchów acylowych w mieszanej monowarstwie wynika z obecności podwójnego wiązania w łańcuchu POPC. Powszechnie wiadomo, że powinowactwo cholesterolu do fosfolipidów nienasyconych jest dużo mniejsze niż do fosfolipidów nasyconych, co przejawia się osłabieniem kondensujących właściwości tego sterolu.

Pierwszym zaobserwowanym zjawiskiem związanym z inkorporacją APCs był spadek maksymalnych wartości modułów ściśliwości, świadczący o zwiększeniu płynności monowarstw. Analiza przebiegu funkcji $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla wszystkich trzech badanych syntetycznych lipidów antynowotworowych pozwala wnioskować o istnieniu korzystnych, przyciągających oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w monowarstwach trójskładnikowych.



Rys. III.10. Wykresy zależności $\Delta G^{exc} = f(X_{APCs})$ dla APCs i modelowej błony nowotworu prostaty w temperaturze 20°C

Zatem można stwierdzić, iż wnikanie cząsteczek leków do modelowej błony biologicznej nowotworu prostaty jest procesem termodynamicznie korzystnym. Wyniki eksperymentu na linii komórkowej Du145 wskazywały, że najwięcej komórek apoptycznych obserwowano po inkubacji z ErPC. Porównanie oddziaływań w analizowanych modelowych układach pozwala z kolei zauważyć, że najsilniejsze oddziaływania występują właśnie dla mieszanin z ErPC, co świadczy o największym powinowactwie tego leku do błony nowotworu prostaty i może tłumaczyć najwyższą skuteczność w wywoływaniu procesu zaprogramowanej śmierci komórki.

IV. Wnioski

1. Badane związki z grupy alkilofosfocholin - HePC, OcPC i ErPC - wykazują zależną od dawki i czasu inkubacji zdolność do wywoływania śmierci w komórkach linii nowotworu prostaty Du145. Zastosowanie różnych barwników pozwoliło na rozróżnienie pomiędzy dwoma rodzajami śmierci interfazalnej i wskazanie na apoptozę jako główny proces indukowany w komórkach traktowanych lekami i prowadzący do ich umieralności. Spośród analizowanych leków największą skutecznością odznaczyła się ErPC wywołując - przy największej dawce i dłuższym czasie inkubacji - apoptozę w ponad 70 % komórkach. Badanie powinowactwa leków do modelowych błon nowotworu prostaty również wskazało na najwyższą afiniczność ErPC do analizowanego modelu.
2. HePC, OcPC i ErPC wykazują właściwości ciekłokrystaliczne generując fazy nematyczne, a temperatura przejścia fazowego Cr2-N silnie zależy od obecności w łańcuchu acylowym podwójnego wiązania; dla HePC i OcPC przejście do fazy ciekłokrystalicznej następuje w temperaturze niewiele wyższej od 100°C, natomiast dla ErPC temperatura ta jest zdecydowanie niższa i w zakresie temperatur fizjologicznych związek jest nematykiem.
3. Wszystkie trzy badane alkilofosfocholiny są zdolne do tworzenia na powierzchni swobodnej wody stabilnych monowarstw Langmuira. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego rośnie stopień uporządkowania tworzonych filmów (monowarstwy HePC charakteryzuje stan ciekły rozprężony, natomiast OcPC i ErPC - ciekły) oraz ich stabilność (coraz wyższe wartości ciśnienia kolapsu π_{coll}).
4. Obrazy struktury monowarstw uzyskane za pomocą mikroskopu BAM wskazują na całkowitą homogeniczność monowarstw utworzonych przez APCs i nawet po kolapsie nie obserwuje się żadnych struktur.
5. Zarówno przebiegi krzywych ΔV -A zarejestrowanych dla APCs jak i maksymalne wartości ΔV osiągane podczas kompresji monowarstw są do siebie zbliżone i nie zależą od długości części węglowodorowej cząsteczek oraz obecności w niej wiązania o

charakterze nienasyconym; dodatnie wartości ΔV wskazują na podwyższanie przez badane związki potencjału powierzchniowego wody.

6. Szczegółowa charakterystyka monowarstw utworzonych przez cząsteczki ErPC pokazuje, brak istotnego wpływu na zmianę warunków doświadczalnych, takich jak pH czy ilość naniesionych cząsteczek, natomiast minimalny wpływ na położenie izoterm ma szybkość kompresji, czas pomiaru oraz temperatura.

7. Na siłę wzajemnego oddziaływania w analizowanych monowarstwach mieszanych wpływają zarówno wzajemne proporcje tworzących je składników jak i wartość ciśnienia powierzchniowego i w podwyższonych ciśnieniach interakcje są znacznie silniejsze.

8. Termodynamiczna analiza układów APCs/Chol dowiodła istnieniu pomiędzy cząsteczkami silnych oddziaływań o charakterze bardziej przyciągającym (lub mniej odpychającym) niż w filmach jednoskładnikowych. Uzyskane wyniki pozwoliły wyjaśnić brak hemolitycznego działania ErPC. Zakłada się, że za hemolityczny efekt dwóch pozostałych alkilofosfocholin (HePC i OcPC) odpowiadają wolne, niezwiązane cząsteczki leku obecne w mieszaninach bogatych w HePC i OcPC ($X_{\text{HePC, OcPC}} > 0,5$). Dla ErPC silne oddziaływania z cholesterolem obserwowane są w szerokim zakresie ułamków molowych ($X_{\text{ErPC}}=0,3 - 0,9$), w związku z czym w warstwie powierzchniowej, nie występuje nadwyżka leku, mogąca wywołać zjawisko hemolizy, a prawie wszystkie cząsteczki ErPC tworzą z cholesterolem stabilne kompleksy.

9. Silne powinowactwo pomiędzy APCs a cholesterolem sugeruje, że sterol ten może mieć duże znaczenie w procesie transportu APCs przez błony biologiczne. Unieruchamiając cząsteczki APCs poprzez wiązanie je w kompleksy powierzchniowe o stechiometrii 1:1, cholesterol najprawdopodobniej zapobiega ich przenikaniu przez błonę biologiczną. Zakłada się, że w wyniku wzajemnych oddziaływań, tylko niewielka ilość leków może przechodzić przez błonę i wywierać aktywność biologiczną.

10. Analiza oddziaływań międzycząsteczkowych badanych APCs z DPPC i POPC pozwoliła stwierdzić istnienie słabych oddziaływań pomiędzy w/w substancjami w monowarstwach Langmuira w odniesieniu do oddziaływań z cholesterolem. Zasięg oddziaływania pomiędzy APCs a badanymi fosfatydylocholinami jest podobny i niezależny od stopnia nasycenia tych drugich. Na charakter oddziaływań wpływają

natomiast różnice w strukturze chemicznej badanych fosfatydylocholin: w układach HePC/DPPC(POPC) oraz OcPC/DPPC(POPC) oddziaływania są mniej korzystne energetycznie w porównaniu do monowarstw jednoskładnikowych, natomiast w układzie ErPC/DPPC(POPC) oddziaływania mają charakter korzystny.

11. Obrazy struktury monowarstw mieszanych ErPC/DPPC uzyskane za pomocą mikroskopu BAM oraz obrazy dyfrakcyjne uzyskane przy zastosowaniu GIXD wskazują na wzajemną mieszalność składników w obszarze ciśnień powierzchniowych do 30 mN/m.

12. Zastosowanie komplementarnych technik pomiaru (izotermy π -A, BAM oraz GIXD) pozwoliło określić naturę przejścia fazowego widocznego przy podwyższonych ciśnieniach na izotermach π -A zarejestrowanych dla monowarstw o małej zawartości ErPC. Widoczne w przebiegu izoterm plateau jest wynikiem usuwania z monowarstw cząsteczek ErPC i zachodzącej w konsekwencji separacji faz.

13. Wyniki badań przeprowadzonych na modelowych raftach lipidowych sugerują stabilizujący efekt APCs na domeny lipidowe. W procesie inkorporacji APCs w tratwy lipidowe kluczową rolę odgrywają oddziaływania z cholesterolem; z kolei analiza oddziaływań pomiędzy APCs i sfingomieliną wskazuje na małe powinowactwo leków do tego sfingolipidu.

14. Ujemne wartości ΔG^{exc} dla układów mieszanych z GM₁ są wynikiem zmniejszenia siły oddziaływań odpychających pomiędzy ujemnie naładowanymi głowami glikosfingolipidu na skutek wbudowywania się pomiędzy nie jednołańcuchowych cząsteczek APCs i świadczą o wysokim powinowactwie leków do tego związku. Zakłada się, że GM₁ może na powierzchni błony stanowić potencjalne miejsce wiążące dla APCs i w związku ze swoją nadekspresją w komórkach nowotworowych odpowiadać za selektywność leków.

15. Analiza oddziaływań leków z modelowymi błonami komórki normalnej oraz nowotworowej pozwoliła zauważyć, że błony komórek zdrowych stanowią naturalną barierę, zapobiegającą wnikanii cząsteczek APCs do wnętrza komórek, co również może tłumaczyć wybiórczość działania APCs.

Bibliografia

- Adam** N., 1922, The Properties and Molecular Structure of Thin Films. Part III. Expanded Films; Proc. R. Soc. Lond. A. 101 516-531;
- Alberts** B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2009, Essential cell biology, wydanie 3, Garland Science, Nowy Jork;
- Albi** E., Tomassoni M.L., Viola-Magni M., 1997, Effect of Lipid Composition on Rat Liver Nuclear Membrane Fluidity, Cell Biochem. Funct. 15: 181-190;
- Alonso** C., Alig T., Yoon J., Bringezu F., Warriner H., Zasadzinski J.A., 2004, More Than a Monolayer: Relating Lung Surfactant Structure and Mechanics to Composition, Biophys. J. 87: 4188-4202;
- Als-Nielsen** J., Jacquemain D., Kjaer K., Leveiller F., Lahav M., Leiserowitz L., 1994, Principles and applications of grazing incidence X-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface, Phys. Rep. 246: 251-313;
- Aston** M.S., Herrington T.M., 1989, The effect of added electrolyte on surface pressure/area per molecule isotherms, J. Coll. Interface Sci. 141: 50-59;
- Atkins** P.W., 2007, Chemia fizyczna, (wydanie 6) PWN, Warszawa;
- Ausili** A., Torrecillas A., Aranda F.J., Mollinedo F., Gajate C., Corbalan-Garcia S., de Godos A., Gómez-Fernández J., 2008, Edelfosine is incorporated into rafts and alters their organization. J Phys Chem B 112: 11643-11654;
- Baoukina** S., Monticelli L., Amrein M., Tieleman D.P., 2007, The Molecular Mechanism of Monolayer-Bilayer Transformations of LungmSurfactant from Molecular Dynamics Simulations, Biophys. J. 93: 3775-3782;
- Barenholz** Y., Thompson T.E., 1999, Sphingomyelin: biophysical aspect, Chem. Phys. Lipids 102: 29-34;
- Barnes** G.T., Gentle I., 2011, Interfacial Science: An Introduction, Oxford University Press, (wydanie 2) USA;
- Bartlett** K., Eaton S., 2004, Mitochondrial b-oxidation, Eur. J. Biochem. 271, 462-469;
- Battula** V.L., Shi Y., Evans K.W., Wang R.Y., Spaeth E.L., Jacamo R.O., Guerra R., Sahin A.A., Marini F.C., Hortobagyi G., Mani S.A., Andreeff M., 2012, Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis, J Clin Invest. 122:2066-2078;
- Benson** A.A., 1966, On the Orientation of Lipids in Chloroplast and Cell Membranes, Journal of the American Oil Chemists Society 43: 265-270;
- Berg** J.M., Stryer L., Tymoczko J.L., 2011, Biochemia, PWN, Warszawa;
- Bergenheim** B., Fahraeus R., 1936, Über spontane Hämolyisin-Bildung im Blut unter besonders Berücksichtigung der Milz, Z. Ges. Exp. Med. 97, 555-556;
- Berman** J., 2005, Miltefosine to treat leishmaniasis, Expert. Opin. Pharmacother. 6:1381-1388;
- Berra** B., Bordoni A., Rapelli S., Biagi P.L., Pezzotta S., Malgrassi L., Montorfano G., Hrelia S., 1994, Altered membrane lipid composition in a human meningiosarcoma, Int. J. Clin. Lab. Res. 24:54-57;
- Bevers** E.M., Williamson P.L., 2010, Phospholipid scramblase: An update, FEBS Lett. 584: 2724-2730;
- Bibo** A. M., Knobler C. M., Peterson I. R., 1991, A Monolayer Phase Miscibility Comparison of Long-chain Fatty Acids and Their Ethyl Esters, J. Phys. Chem. 95: 5591-5599;
- Binks** B.P.(ed.), 1999, Modern characterization methods of surfactant systems, Marcel Dekker, INC, New York, Basel;
- Birbes** H., el Bawab S., Hannun Y.A., Obeid L.M., 2001, Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis, FASEB J. 15:2669-79;
- Blau** L., Bittman R., 1978, Cholesterol distribution between the two halves of the lipid bilayer of human erythrocyte ghost membranes, J. Bioll. Chem. 253: 8366-8368;
- Blodgett** K.B., 1935, Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface , J. Am. Chem. Soc. 57: 1007-1022;
- Bloor** W.R., 1920, Outline of a classification of the lipids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 17: 138-140;
- Bonet** M.L., Ribot J., Palou A., 2012, Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid, Biochim. Biophys. Acta 1821: 177-189;
- Bremer** E.G., Schlessinger J., Hakomori S., 1986, Ganglioside-mediated Modulation of Cell Growth, J. Biol. Chem. 261: 2434-2440;
- Bretscher** M.S. , Munro S. , 1993, Cholesterol, and the Golgi Apparatus, Science 261: 1280 -1281;

- Bretscher** M.S., 1971, A major protein which spans the human erythrocyte membrane, *J. Cell Biol.* 59:351-57;
- Brezesinski** G., Dietrich A., Struth B., Böhm C., Bouwan W.G., Kjaer K., Möhwald H., 1995, Influence of ether linkages on the structure of double-chain phospholipid monolayers, *Chem. Phys. Lipids* 76: 145-157;
- Brockman** H., 1999, Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 438-443;
- Brooks** C.F., Fuller G.G., Frank C.W., Robertson C.R., 1999, An interfacial stress rheometer to study rheological transitions in monolayers at the air-water interface, *Langmuir* 15: 2450-2459;
- Brown** D.A., London E., 1998, Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 111-136;
- Burstein**, M., Fine, J. M., 1959, On the level of beta-lipoproteins in myelomas and in Waldenstroem's macroglobulinemia, *Rev. Hematol.* 14: 380-383;
- Cadena-Nava** R.D., Martin-Mirones J.M., Vázquez-Martínez E.A., Roca J.A., Ruiz-García J., 2006, Direct observations of phase changes in Langmuir films of cholesterol, *Rev. Mex. Fis.* 52: 32 - 40;
- Calderon** R.O., Mclean Grogan W., Collins J.M., 1991, Membrane Structural Dynamics of Plasma Membranes of Living Human Prostatic Carcinoma Cells Differing in Metastatic Potential, *Exp. Cell Res.* 196: 192-197;
- Callegarin** F., Gallo J-A.,Q., Debeaufort F., Voilley A., 1997, Lipids and Biopackaging, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 1183-1192;
- Carrasco** M.P., Jiménez-López J.M., Ríos-Marco P., Segovia J.L., Marco C., 2010, Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues, *Br J Pharmacol* 160: 355-366;
- Carrasco** M.P., Jiménez-López J.M., Segovia J.L., Marco C., 2008, Hexadecylphosphocholine interferes with the intracellular transport of cholesterol in HepG2 cells, *FEBS J.* 275:1675-1686;
- Carter** G.C., Bernstone L., Sangani D., Bee J.W., Harder T., James W., 2009, HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts, *Virology.* 386:192-202;
- Cernescu** A., Luchian T., 2005, Biophysical changes induced by cholesterol on phosphatidylcholine artificial biomembranes containing alamethicin oligomers, *Central European Journal of Physics* 4: 155-167;
- Chamberlain** J.R., Pemberton J.E., 1997, Raman spectroscopy of Langmuir monolayers at the air-water interface, *Langmuir* 13: 3074-3079;
- Chapman** R., Urbina J., 1974, Biomembrane Phase Transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry, *J. Biol. Chem.* 249: 2512-2521;
- Chen** Q., Kang X., Li R., Du X., Shang Y., Liu H., Hu Y., 2012, Structure of the Complex Monolayer of Gemini Surfactant and DNA at the Air/Water Interface, *Langmuir* 28: 3429-3438;
- Clive** S., Gardiner J., Leonard, R.C., 1999, Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44 (Suppl.), S29-S30;
- Constantino** C.J.L., Dhanabalan A., Oliveira O.N., 1999, Experimental artifacts in the surface pressure measurement for lignin monolayers in Langmuir troughs, *Rev. Sci. Instrum.* 70: 3674-3680;
- Cook** H.W., McMaster C.R., 2002, Rozdział 7: Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes w *Biochemistry of Lipids, lipoproteins and Membranes*, wydanie 4, Elsevier;
- Costin** I.S., Barnes G.T., 1975, Two-component monolayers. II. Surface pressure – area relations for the octadecanol – docosyl sulphate system, *J. Colloid Interface Sci.* 51: 106-121;
- Cotter** D.G., d'Avignon D.A., Wentz A.E., Weber M.L., Crawford P.A., 2011, Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis, *J. Biol. Chem.* 286: 6902-10;
- Crul** M., Rosing H., de Klerk G.J., Dubbelman R., Traiser M., Reichert S., Knebel N.G., Schellens J.H., Beijnen J.H., ten Bokkel Huinink W.W. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours, *Eur. J. Cancer* 38: 1615-1621;
- Cullis** P.R., de Kruijff B., Hope M.J., Nayar R., Schmid S.L., 1980, Phospholipids and membrane transport, *Can J Biochem* 58: 1091-1100;
- da Silva** P., Branton D., 1970, Membrane splitting in freeze etching, *J. Cell Biol.* 45:598-605;
- de Silva** A.M., Viseu M.I., Campos C.S., Recheña T., 1998, Effect of the spreading procedure on the formation of cationic- anionic mixed monolayers, *Thin Solid Films* 320: 236-240;
- Daleke** D.L., 2003, Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry, *J. Lipid Res.* 44: 233-242;
- Daleke** D.L., 2007, Phospholipid flippases, *J. Biol. Membr.* 287: 821-825;
- Davson** H., Danielli J.F., 1952, *The Permeability of Natural Membranes* (wydanie 2). London, New York: Cambridge Univ. Press;

- Demchak** R.J., Fort Jr. T.J., 1974, Surface dipole moments of close-packed un-ionized monolayers at the air-water interface, *J. Coll. Interface Sci.* 46: 191-202;
- Deeley** J.M., Hankin J.A., Friedrich M.G., Murphy R.C., Truscott R.J.W., Mitchell T.W., Blanksby S.J., 2010, Sphingolipid distribution changes with age in the human lens, *Journal of Lipid Research* 51: 2753-2760;
- Delhaes** P., Yartsev V. M. (ed R J H Clark and R E Hester), 1993, Electronic and spectroscopic properties of conducting Langmuir-Blodgett films spectroscopy of new materials, New York: Wiley;
- den Engelsen** D., de Koning B., 1974, Ellipsometry of Spread Monolayers. 2. Colored Systems. Chlorophyll, a Carotenoid Acid, Rhodamine 6G and a Cyanine Dye, *J. Chem. Soc Faraday* 1 70: 2100-2112;
- Dervichian** D. G., 1939; Changes of Phase and Transformations of Higher Order in Monolayers, *J. Chem. Phys.* 7, 931 -948;
- Devaux** P.F., Zachowski A., 1993, Transmembrane lipid asymmetry in eukaryotes, *NATO ASI Series* 246: 213-226;
- Diamant** H., Witten T.A., Ege C., Gopal A., Lee K.Y.C, (2001), Topography and instability of monolayers near domain boundaries., *Phys. Rev. E* 63:061602;
- Diamant** H., Witten T.A., Gopal A., Lee K.Y.C, 2000, Unstable topography of biphasic surfactant monolayers, *Europhys. Lett.* 52:171-77;
- Diomedea** L., Bizzi, A., Magistrelli, A., Modest, E. J., Salmons, M., Nosedà A., 1990, Role of cell cholesterol in modulating antineoplastic ether lipid uptake, membrane effects and cytotoxicity, *Int. J. Cancer* 46: 341-346.
- Dluhy** R.A., Cornell D.G., 1985, In-situ measurement of the infrared spectra of insoluble monolayer at the airwater interface, *J. Phys. Chem.* 89: 3195-3197;
- Dowhan** W., Bogdanov M. (eds. Vance J.E., Vance D.), 2002, Rozdział 1: Functional roles of lipids in membranes w *Biochemistry of Lipids, lipoproteins and Membranes*, Elsevier;
- Dummer** R., Krasovec M., Röger J., Sindermann H., Burg G., 1993, Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study, *J. Am. Acad. Dermatol.* 29:963-70;
- Duncan** S.L., Larson R.G., 2008, Comparing Experimental and Simulated Pressure-Area Isotherms for DPPC, *Biophys. J.* 94: 2965-2986;
- Dynarowicz - Łątka** P., Dhanabalan A., Oliviera Jr., O.N, 2001, Modern physicochemical research on Langmuir monolayers, *Adv Colloid Interfac* 91:221-293;
- Dynarowicz - Łątka** P., Dhanabalan A., Oliviera Jr., O.N, 1999, A Study on Two-Dimensional Phase Transitions in Langmuir Monolayers of a Carboxylic Acid with a Symmetrical Triphenylbenzene Ring System, *J. Phys. Chem. B* 103: 5992-6000;
- Dynarowicz-Łątka** P., Seoane, R., Miñones J., Jr., Velo, M., Miñones J., 2002, Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers, *Colloids Surf. B* 25: 249-263;
- Dynarowicz-Łątka** P., Kita K., 1999, Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 79: 1-17;
- Eaton** S., Bartlett K., Pourfarzam M., 1996, Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J.* 320: 345-357;
- Ebara** Y., Itakura K., Okahata Y., 1996, Kinetic studies of molecular recognition based on hydrogen-bond at the airwater interface by using a highly sensitive quartz crystal microbalance, *Langmuir* 12: 5165-5170;
- Eddin** M., 2003, Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers, *Nature* 4: 414-418;
- Eeman** M., Deleu M., 2010, From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14: 719-736;
- Eibl** H., Arnold D., Weltzien H.U., Westphal O., 1967, On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs, *Justus Liebigs. Ann. Chem.* 704:226-30;
- Eibl** H., Hilgard P., Unger C., 1992. Alkylphosphocholines: New Drugs in Cancer Therapy, Karger, Basel;
- Eibl** H., Kaufmann-Kolle P., 1995, Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs, *J. Liposome Res* 5: 131-148;
- Eibl** H., Unger C., 1990. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug, *Cancer Treat. Rev.* 17: 233-242;
- Erdlenbruch** B., Jendrosseck V.; Gerriets A.; Vetterlein F.; Eibl H.; Lakomek M., 1999, Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution, and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44: 484-490;

- Estrela-Lopis I.**, Brezesinski G., H. Möhwald, 2004, Miscibility of DPPC and DPPA in monolayers at the air/water interface, *Chem. Phys. Lipids* 131: 71–80;
- Feigenson G. W.** Phase boundaries and biological membranes., 2007, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36: 63–77;
- Ferreira M.**, Olivati C.A., Machado A.M., Assaka A.M., Giacometti J.A., Akcelrud L., 2007, Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Polyfluorenes and Their Use in Polymer Light-Emitting Diodes, *J. of Polym. Res.* 14: 39–44;
- Fischer H.**, 1964, Lysolecithin and the Action of Complement, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 116: 1063–1070;
- Fisher K.A.**, 1976, Analysis of membrane halves: cholesterol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 173–177;
- Flasiński M.**, Broniatowski M., Vila Romeu N., Dynarowicz-Łątka P., Moreno A.G., Vilas A.M., Martin M.L.G., 2008, nPer-6-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)cyclodextrins (TBDMS-CDs) in Langmuir Monolayers: The Importance of a Spreading Solvent in the Preparation of LB Layers Suitable for Sensor Application, *J. Phys. Chem. B* 112: 4620–4628;
- Fleer E.A.M.**, Berkovic, D., Eibl, H., Unger, C., 1993, Investigations on the cellular uptake of hexadecylphosphocholine. *Lipids* 28: 731–736;
- Freeman M.R.**, Solomon K.R., 2004, Cholesterol and Prostate Cancer, *J. Cell. Biochem.* 91:54–69;
- Frey S.L.**, Chi E.Y., bal Arratia C., Majewski J., Kjaer K., Lee K.Y.C., 2008, Condensing and Fluidizing Effects of Ganglioside GM1 on Phospholipid Films, *Biophys. J.* 94: 3047–3064;
- Fu L.**, Kim Y.A., Wang X., Wu X., Yue P., Lonial S., Khuri F.R., Sun S.Y., 2009, Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy, *Cancer Res.* 69: 8967–8976;
- Fuentes R.**, Allman R., Mason M.D., 1997, Ganglioside expression in lung cancer cell lines, *Lung Cancer* 18:21–33;
- Gaines Jr G.L.**, 1966, Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. Interscience, New York;
- Gaines Jr G.L.**, 1991, Surface Activity of Semifluorinated Alkanes: $F(CF_2)_m(CH_2)_nH$, *Langmuir* 7: 3054–3056;
- Gajate C.**, Mollinedo F., 2002, Biological Activities, Mechanisms of Action and Biomedical Prospect of the Antitumor Ether Phospholipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine), A Proapoptotic Agent in Tumor Cells. *Curr. Drug Metab.* 3: 491–526;
- Gajate C.**, Mollinedo F., 2007, Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts, *Blood* 109: 711–719;
- Gajate C.**, Santos-Beneit A., Modolell M., Mollinedo F., 1998, Involvement of c-Jun NH₂-Terminal Kinase Activation and c-Jun in the Induction of Apoptosis by the Ether Phospholipid 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, *Mol. Pharmacol.* 53:602–612;
- Gallant J.**, Lavoie H., Tessier A., Munger G., Leblanc R. M., Salesse C., 1998, Surface and Spectroscopic Properties of Photosystem II Core Complex at the Nitrogen/Water Interface, *Langmuir* 14 : 3954–3963;
- Garcia A.**, Cayla X., Fleischer A., Guernon J., Alvarez-Franco Cañas F., Rebollo M.P., Roncal F., Rebollo A., 2003, Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution, *Biochimie.* 85:727–31;
- Gault C.R.**, Obeid L.M., Hannun Y.A., 2010, An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown, *Adv. Exp. Med. Biol.* 688: 1–23;
- Geard M.**, Choubey A., Malhotra B. D., 2002, Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors – Bioelectro.* 17 : 345–359;
- Gibbons G.F.** 2003, Regulation of fatty acid and cholesterol synthesis: co-operation or competition?, *Prog. Lipid Res.* 42: 479–497;
- Girgert R.**, Schweizer P., Bock I., Narr R., Bruchelt G., 1995, Cytotoxicity of ether phospholipid BM 41.440 on neuroblastoma cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1995;121(5):262–6.
- Gong K.**, Feng S-S. a,b,* , Mei Lin Go c, Pei Hsing Soew, 2002, Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air–water interface, *Coll. Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 207 (2002) 113–125;
- Gopal A.**, Lee K.Y.C., 2001., Morphology and collapse transitions in binary phospholipid monolayers, *J. Phys. Chem. B* 105:10348–54;
- Gorter E.**, Grendel F., 1925, On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, *The Journal of Experimental Medicine* 41: 439–443;
- Gottfried E.L.**, 1967, Lipids of human leukocytes: relation to cell type, *J. Lipid Res.* 8: 321–327;
- Gómez J.**, Sagués F., Reigada R., 2008, Actively maintained lipid nanodomains in biomembranes, *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* 77:021907 (1–5);
- Gruszecki W.I.**, Strzałka K., 2005, Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties, *Biochim Biophys Acta* 1740: 108–115;

- Guyot-Sionnest P.**, Hunt J.H., Shen Y.R., 1987, Sum frequency vibrational spectroscopy of a Langmuir film study of molecular orientation of a two-dimensional system, *Phys. Rev. Lett.* 59: 1597-1600;
- Hanzal-Bayer M.F.**, Hancock J.F., 2007, Lipid rafts and membrane traffic, *FEBS Lett.* 581:2098-2104;
- Harder T.**, Scheiffele P., Verkade P., Kai Simons K., 1998, Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components, *J. Cell Biol.* 141: 929-942 ;
- Harkins W.D.**, 1954, The physical chemistry of surface films, Reinhold Publishing Co., Nowy Jork;
- Hąc - Wydro K.**, Dynarowicz - Łątka P., 2008, Biomedical applications of the Langmuir monolayer technique, *Annales UMCS, Ser. AA (Chemia)* 63: 47-60;
- Hąc Wydro K.**, Dynarowicz - Łątka P., 2010, The relationship between the concentration of ganglioside GM1 and antitumor activity of edelfosine-the Langmuir monolayer study , *Colloid Surface B: Interfaces* 81: 385-388;
- He Q.**, Li J., 2007, Hydrolysis characterization of phospholipid monolayers catalyzed by different phospholipases at the air-water interface, *Adv. Colloid Interface Sci.* 131: 91-98;
- Heczková B.**, Slotte J.P., 2006, Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes, *FEBS Letters* 580: 2471-2476.
- Heinz T.F.**, Tom H.W.K., Shen Y.R., 1983, Determination of molecular orientation of monolayer adsorbates by optical second harmonic generation, *Phys. Rev. A* 28: 1883-1885;
- Herrmann D.B.**, Phalke W., Opitz H.G., Bicer U., 1990, In vivo antitumor activity of ilmofosine, *Cancer Treat. Rev.* 17: 247-252;
- Hiemenz P.C.**, 1986, Principles of colloid and surface chemistry, (wydanie 2), Marcel Dekker, Inc, New York, Basel;
- Holthuis J.C.M.**, Levine T.P., 2005, Lipid traffic: floppy drives and a superhighway, *Mol. Cell Biol.* 6: 209-220;
- Hönig D.**, Möbius D., 1991, Direct Visualizaton of Monolayers at the Air-Water Interface by Brewster Angle Microscopy, *J. Phys. Chem.* 95: 4590-4592;
- Ikeda M.**, Kihara A., Igarashi Y., 2006, Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes, *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1542-1546;
- Inbar M.**, 1976, Fluidity of Membrane Lipids: A Single Cell Analysis of Mouse Normal Lymphocytes and Malignant Lymphoma Cells, *Federation European Biochem. Soc. Letters*, 67: 180-185;
- Inbar M.**, Shinitzky M., 1974, Cholesterol as a Bioregulator in the Development and Inhibition of Leukemia, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 4229-4231;
- Incardona J.P.**, Eaton S., 2000, Cholesterol in signal transduction, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12:193-203;
- Israelachvili J.N.**, 2011, Intermolecular and Surface Forces. (wydanie 3), Academic Press, New York;
- Iwamoto M.**, Kubota T., Ou-Yang Z., 1996, Maxwell-displacement-current across phospholipid monolayers due to phase transition, *J. Chem. Phys.* 104 : 736-741
- Iwamoto M.**, Majima Y., Naruse H., Noguchi T., Fuwa H., 1991, Generation of Maxwell displacement current across an azobenzene monolayer by photoisomerization, *Nature* 353: 645-647;
- Jablin M.S.**, Flasiński M., Dubey M., Ratnaweera D.R., Broniatowski M., Dynarowicz-Łątka, Majewski J., 2010, Effects of b-Cyclodextrin on the Structure of Sphingomyelin/Cholesterol Model Membranes, *Biophys J.* 99: 1475-1481;
- Janes P.W.**, Ley S.C., Magee A.I., 1999, Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor , *J. Cell Biol.* 147: 447-461;
- Jendrossek V.**, Müller I., Eibl H., Belka C., 2003, Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis, *Oncogene* 22: 2621-2632;
- Jiménez-López J.**, Ríos-Marco P., Marco C., Segovia J.L., Carrasco M.P., 2010, Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids, *Jiménez- Lipids in Health and Disease*, 9:33;
- Jurak M.**, 2013, Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayer study, *J Phys Chem B* 117:3496-3502.
- Kaganer V.M.**, Loginov E.B., 1993, Crystallization Phase Transitions and Phase Diagram of Langmuir Monolayers, *Phys. Rev. Lett.*; 71: 2599-2602;
- Kaganer V.M.**, Möhwald H., Dutta P.; 1999, Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Rev. Mod. Phys.* 71: 779-819;
- Kaucic K.**, Etue N., LaFleur B., Woods W., Ladisch S., 2001, Neuroblastomas of infancy exhibit a characteristic ganglioside pattern, *Cancer*. 91:785-793;
- Kell D.B.**, 1981. Are liposomes good models for biomembranes?. *Trends Biochem. Sci.* 6: 8-9;
- Kenn R. M.**, Biihm C., Bib A. M., Peterson I. R., Möhwal H.; 1991; Mesophases and Crystalline Phases In Fatty Acid Monolayer; *J. Phys. Chem.* 95: 2092-2097;

- Kjaer K.** 1994, Some simple ideas on X-ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films, *Phys. B* 198: 100-109;
- Kojima K.**, 1993, Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells, *Nagoya J. Med. Sci.* 56: 1 - 18;
- Kumar B.**, Suresh K. A., Satyam K., Gupta S.K., Kumar S., 2009, Stress-strain relation in the collapse of Langmuir monolayer of a dimer of disk shaped moiety, *J. Chem. Phys.* 133: 044701;
- Kumar V.**, 1993, Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 444-448;
- Kusumi A.**, Koyama-Honda I., Suzuki K., 2004, Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* 5: 213-230;
- Landha S.**, 2000, The lipid organisation of the cell membrane, *Grasas y Aceites* 51: 56-65;
- Lange Y.**, Swaisgood M.H., Ramos B.V., Steck T.L., 1989, Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 264: 3786-3793;
- Langmuir I.**, 1917, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 39: 1848-1906;
- Langmuir I.**, 1933, Oil Lenses on Water and the Nature of Monomolecular Expanded Films, *J. Chem. Phys.* 1, 756 - 776;
- Ledeer R.W.**, Wu G., Sphingolipids of the nucleus and their role in nuclear signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 588-598;
- Lee K.Y.C.**, 2008, Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59:771-791;
- Leite V.B.P.**, Cavalli A., Oliveira, Jr. O.N., 1998, Hydrogen-bond control of structure and conductivity of Langmuir films, *Phys. Rev. E* 57: 6835-6839;
- Lenard J.**, Singer S.J., 1966, Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotary dispersion and circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:1828-35;
- Levade T.**, Augé N., Veldman R.J., Cuvillier O., Nègre-Salvayre A., Salvayre R., 2001, Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology, *Circ. Res.* 89: 957-968;
- Leyton J.Y.**, Drury P.J., Crawford M.A., 1987, Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat, *Br. J. Nutr.* 51: 383-393;
- Li M.**, Acero A.A., Huang Z., Rice S.A., 1994, Formation of an ordered Langmuir monolayer by a non-polar chain molecule, *Nature* 367:151-153;
- Li Z.**, Tan F., Liewehr D.J., Steinberg S.M., Thiele C.J., 2010, In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine, *J. Natl. Cancer Inst.* 102:758-770;
- Ling G.**, 2007, History of the Membrane (Pump) Theory of the Living Cell from Its Beginning in Mid 19th Century to Its Disproof 45 Years Ago – though Still Taught Worldwide Today as Established Truth, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* 39: 1-67;
- Lord Rayleigh**, 1899, Investigations in capillarity, *Philos. Mag.* 48: 321 -337;
- Lösche M.**, Möhwald H., 1984, Fluorescence microscope to observe dynamical processes in monomolecular layers at the air/water interface, *Rev. Sci. Instrum.* 55: 1968-1972;
- Lucas L.**, Hernandez-Alcoceba R., Penalva V., Lacal J.C., 2001, Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. *Oncogene* 20: 1110-1117;
- Maccarrone M.**, Bellincampi L., Melino G., Finazziagrò A., 1998, Cholesterol, but not its esters, triggers programmed cell death in human erythroleukemia K562 cells, *Eur. J. Biochem.* 253: 1072113;
- Maget-Dana R.**, 1999, The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 109 -140;
- Mann H. B.**, Whitney, D. R., 1947, On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, *Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60;
- Marsh D.**, 1996, Lateral Pressure in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1286: 183-223;
- McConlogue C.W.**, Vanderlik T.K., 1997, A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers, *Langmuir* 13: 7158-7164;
- McFate C.**, Ward D., Olmsted III J., 1993, Organized Collapse of Fatty Acid Monolayers, *Langmuir* 9: 1036-1039;
- Menendez J.A.**, Lupu R., 2004, Fatty acid synthase-catalyzed de novo fatty acid biosynthesis: from anabolic-energy-storage pathway in normal tissues to jack-of-all-trades in cancer cells, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 52: 414-426;
- Menke M.**, Kuenneke S., Janshoff A., 2002, Lateral organization of GM1 in phaseseparated monolayers visualized by scanning force microscopy, *Eur. Biophys. J.* 31: 317-322;

- Merrill** A.H., Schmelz Jr. E-M., Dillehay D. L., Spiegel S., Shayman J. A., Schroeder J.J., Riley R.T., Voss K.A., Wang E., 1997, Sphingolipids – The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 208-225;
- Mestres** C., Alsina M.A., Espina M., Rodriguez L., Reig F., 1992, Miscibility of Dipalmitoylphosphatidylcholine and Sulfatides in Mono- and Bilayers, *Langmuir* 8: 1388-1391;
- Milanowska** J., Polit A., Wasylewski Z., Gruszecki W.I., 2003, Interaction of isomeric forms of xanthophyll pigment zeaxanthin with dipalmitoylphosphatidylcholine studied in monomolecular layers, *J Photochem Photobiol B: Biology* 72: 1-9;
- Miller** C.E., Majewski J., Faller E., Satija S., Kuhl T.L., 2004, Cholera Toxin Assault on Lipid Monolayers Containing Ganglioside GM1, *Biophys. J.* 86K 3700-3708;
- Milner** S.T., Joanny J.F., Pincus P (1989), Buckling of Langmuir monolayers, *Europhys. Lett.* 9:495-500;
- Miñones** J., Sandez Macho I., Iribarnegaray, E., Sanz Pedrero P., 1981, Phospholipid monolayers, *Colloid Polym Sci* 259: 382-390.
- Miñones** Jr. J., Dynarowicz-Łątka P., Miñones J., Rodriguez Patino J.M.R., Iribarnegaray E., 2003, Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers, *J. Coll. Interface Sci.* 265: 380-385;
- Miñones** Jr. J., Dynarowicz-Łątka, Seoane R., Iribarnegaray E., Casas M., 2004, Brewster angle microscopy studies of the morphology in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol monolayers spread on subphases of different pH, *Progr Colloid Polym Sci* 123: 160-163;
- Miyaji** M., Jin Z.X., Yamaoka S., Amakawa R., Fukuhara S., Sato S.B., Kobayashi T., Domae N., Mimori T., Bloom E.T., Okazaki T., Umehara H., 2005, Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis, *J. Exp. Med.* 18:249-59;
- Möbius** D., Miller R. (ed.) , 2001, Novel Method to study interfacial layers; Elsevier, Amsterdam, Holandia;
- Mollinedo** F., Gajate C., 2006, Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: New targets for apoptosis-directed cancer therapy, *Drug Resist Updat* 9: 51-73;
- Mondal** M., Mesmin B., Mukherjee S., Maxfield F.R., 2009, Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells, *Mol. Biol. Cell.* 20:581-588;
- Morell** P., Braun P., 1976, Biosynthesis and metabolic degradation of sphingolipids not containing sialic acid, *J. Lipid Res.* 13:293-310;
- Mouritsen** O.G., Jørgensen K., 1994, Dynamical order and disorder in lipid bilayers, *Chem. Phys. Lipids* 73: 2-35;
- Müller** P., Herrmann A., 2002, Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes, *Biophys. J.* 82: 1418-1428;
- Munder** P.G., Modolell M., Andreesen R., Weltzien H.U., Westphal O., 1979, Lysophosphatidylcholine (Lysolecithin) and its Synthetic Analogues. Immunomodulating and Other Biologic Effects, *Springer Semin. Immunopathol.* 2: 187-203;
- Munder** P.G., Westphal O. (Ishizaka K, Lachmann PJ, Lerner R, Waksman BH (eds)), 1990, Antitumoral and Other Biomedical Activities of Synthetic Ether Lysophospholipids (Part 2 of 2) 1939-1989: Fifty Years Progress in Allergy. *Chem Immunol. Basel*, Karger, pp.221-235;
- Murray** R.K., Granner D.K., Rodwell V.W. (Kokot F. – red. wyd. pol.), 2012, *Biochemia Harpera*, wyd. 6 PZWL, Warszawa;
- Nakazawa** I., Iwaizumi M. A role of the cancer cell membrane fluidity in the cancer metastases: an ESR study, *Tohoku. J. Exp. Med.* 1989;157:193-198;
- Nikomarov** E.S., 1990, A slow collapse of a monolayer spread on an aqueous surface. *Langmuir* 6:410-14;
- Norman** L.L., Oetama R.J., Dembo M., Byfield F., Hammer D.A., Levitan I., Aranda-Espinoza H., 2010, Modification of Cellular Cholesterol Content Affects Traction Force, Adhesion and Cell Spreading, *Cellular and Molecular Bioengineering* 3: 151-162;
- Nostro** P.L., Gabrielli G., 1993, Temperature and subphase Effects on aliphatic alcohol films at the air-water interface, *Langmuir* 9: 3132-31-37;
- O'Brien** J.S., Rouser G., 1964, The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate, *J. Lipid Res* 5:339-42.
- Obeng** Y.S., Bard A.J., Langmuir films of C60 at the air-water interface, *J. Am. Chem. Soc* 113: 6279-6280;
- Oberle** C., Massing U., Krug H., 2005, On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells, *Biol. Chem.* 386: 237-245;
- Ono** A., Freed E.O., 2005, Role of lipid rafts in virus replication, *Adv. Virus Res.* 64:311-58;

- Orlandi P.A.**, Fishman P.H., 1998, Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation caveolae-like domains, *J. Cell Biol.* 141: 905-915;
- Ottova A.L.**, Tien H. T., 1997, Self-assembled bilayer lipid membranes: from mimicking biomembranes to practical applications. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 42: 141-152;
- Overton E.**, 1899, The probable origin and physiological significance of cellular osmotic properties. *Vierteljahrsschrift der Naturforschende gesselschaft* 44, 88-135, W Biological Membrane Structure, trans. Park, R. B. Boston: Little Brown, 1968;
- Pagano R.E.**, Gershewald N.L., A millidyne film balance for measuring intermolecular energies in lipid films, *J. Coll. Interface Sci.* 41: 311-317;
- Peetla C.**, Stine A., Labhasetwar L., 2009, Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery, *Mol. Pharmaceutics* 6: 1264 – 1276;
- Peterson I.R.**, 1990, Langmuir-Blodgett films, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 23 379-395;
- Pigoń K.**, Ruziewicz Z., 2005, *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa;
- Pike L.J.**, 2003, Lipid rafts: bringing order to chaos, *J. Lipid Res.* 44:655-67;
- Pike, L.J.**, 2006, Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function, *J. Lipid Res.* 4: 1597-1598
- Pockels A.**, 1894, On the spreading of oil upon water, *Nature* 50: 223-224;
- Podkowiński J.**, Tworak A., 2011, Acetyl-coenzyme A carboxylase – an attractive enzyme for biotechnology, *Journal of Biotechnology, Computat. Biol. and Bionanotech.* 92: 321-335;
- Pralle A.**, Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber J.K., 2000, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Cell. Biol.* 148:997-1008;
- Prasad R.**, Kumar V., 2005, Thyroid hormones stimulate Na⁺-Pi transport activity in rat renal brush-border membranes: Role of membrane lipid composition and fluidity, *Mol. Cell. Biochem.* 268: 75-82;
- Pucadyil T.J.**, Chattopadhyay, A., 2006, Effect of cholesterol on lateral diffusion of fluorescent lipid probes in native hippocampal membranes. *Chem. Phys. Lipids* 143:11-21;
- Quickendern T.I.**, Tanv G.K., 1974, Random packing in two dimensions and the structure of monolayers, *J. Colloid Interface Sci.* 48 382-393;
- Rajvanshi A.K.**, 2008, Irving Langmuir a pioneering industrial physical chemistry, *Resonance* 619-623;
- Rakotomanga M.**, Loiseau P.M., Saint-Pierre-Chazalet M., 2004, Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers, *Biochim Biophys Acta.* 1661(2): 212-218;
- Ramos S.**, Castillo R., 1999, Langmuir monolayers of C17, C19, and C21 fatty acids: Textures, phase transitions, and localized oscillations, *J. Chem. Phys.* 110 : 7021-7030;
- Ramstedt B.**, Slotte J.P., 2002, Membrane properties of sphingomyelins, *FEBS Lett.* 531: 33-37;
- Razani B.**, Wang X.B., Engelman J.A., Battista M., Lagaud G., Zhang X.L., Kneitz B., Hou H. Jr, Christ G.J., Edelmann W., Lisanti M.P., 2002, Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 22:2329-44;
- Reed R.A.**, Shipley G.G., 1996, Properties of Ganglioside GM₁ in Phosphatidylcholine Bilayer Membranes, *Biophys. J.* 70: 1363-1372;
- Rey-Gomez-Serranillos I.**, Minones Jr. J., Dynarowicz-Łątka P., Iribarnegaray E., Casas M., 2004, Study of the π -A isotherms of miltefosine monolayers spread at the air/water interface, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6: 1580-1586;
- Richardson P.G.**, Eng C., Kolesar J., Hideshima T., Anderson K.C., 2012, Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity, *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8:623-633;
- Richter R.P.**, Berat R., Brisson A.R., 2006, Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View., *Langmuir* 22: 3497-3505;
- Riedl S.**, Zwegytick D., Lohner K., 2011, Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs, *Chem. Phys. Lipids* 164: 766-781;
- Ries H. E.**, H. Swift, 1987, Twisted Double-Layer Ribbons and the Mechanism for Monolayer Collapse; *Langmuir* 3 : 853-855;
- Robertson J.D.**, 1964, Unit membranes: a review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes. In *Cellular Membranes in Development* (ed. M Locke), New York, London: Academic;
- Rübel A.**, Handrick R., Lindner L.H., Steiger M., Eibl H., Budach W., Belka C., Jendrosseck V., 2006. The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro, *Radiat. Oncol.* 1: 1-17;

- Ruiter** G.A., Verheij M., Zerp S.F., van Blitterswijk, W.J., 2001, Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 49: 415-419;
- Russel** D.W., 1992, Cholesterol Biosynthesis and Metabolism, *Cardiovasc. Drug. Therapy* 6:103-110;
- Rybczyńska** M., Spitaler M., Knebel N.G., Boeck G., Grunicke H., Hofmann J., 2001, Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities, *Biochem. Pharm.* 62: 765-772;
- Safran** S.A., 1994, *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. New York: Addison-Wesley;
- Sández** I., Gonzalez-López J., Suárez A., Gil-Gonzalez A., Vila-Romeu N., Nieto-Suárez M., 2002, Surface Pressure-Area Isotherms and Fluorescent Behavior of a α -6-(N-Methyl-N-alkylamine) Naphthoylalkanoic Acid (MANA), *Langmuir* 18:9824-9829;
- Santos** C.R., Schulze A., 2012, Lipid metabolism in cancer, *FEBS J.* 279: 2610-2623;
- Savage** D.B., Petersen K.F., Shulman G.I., 2007, Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance; *Physiol. Rev* 87: 507-520;
- Scheetz** M.P., Singer S.J., 1976, Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71:4457-4461;
- Schlegel** R.A., Williamson P.L., 2001, Phosphatidylserine, a death knell, *Cell Death Differ.* 8: 551 - 563;
- Schneider** P.B., Welzel M.M., Cammenga H.K., 1995, "Ghost-Isotherms". Problems with cleaning Langmuir troughs, *Langmuir* 11: 1846-1848;
- Schroeder** F., Nemezc G., Wood W.G., Joiner C., Morrot G., Ayraud-Jarrier M., Devaux P.F., 1991, Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1066: 183-192;
- Schroeder** F., Atshaves B.P., McIntosh A.L., Gallegos A.M., Storey S.M., Parr R.D., Jefferson J.R., Ball J.M., Kier A.B., 2007, Sterol Carrier Protein-2: New roles in regulating lipid rafts and signaling, *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 700-718;
- Schuettauf** F., Eibl K.H., Thaler S., Shinoda K., Rejdak R., May C.A., Blatsios G., Welge-Lussen U., 2005, Toxicity study of erucylphosphocholine in a rat model, *Curr. Eye Res.* 30:813-820;
- Schulze** H., Kolter T., Sandhof K., 2008, Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 674-683;
- Šentjarc** M., Schara M., Auersperg, M. Jezernik M. Kveder M., Characterization of malignant tissue by EPR, *Studia Biophys.* 136:201-208;
- Seoane** R., Dynarowicz-Łątka P., Minones Jr. J., Rey-Gomez-Serranillos I., 2001, Mixed Langmuir monolayers of cholesterol and essential fatty acids, *Colloid. Polym. Sci.*, 279: 562-570;
- Seoane** R., Romeu N.V., Minones J, Miñones J., Conde O., Dynarowicz-Łątka P., Casas M., 1997, The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water, *COLLOID AND POLYMER SCI* 105: 173-179;
- Seoane** R., R., Miñones, J., Conde, O., Casas, M., Iribarnegaray, E., 1998. Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 1375, 73-83.
- Shi** Y., Massague J., 2003, Mechanisms of TGF- α Signaling from Cell Membrane to the Nucleus, *Cell* 113: 685-700;
- Shibata** A., Kiba Y., Akati N., Fukuzawa K., Terada H., 2001, Molecular characteristics of astaxanthin and β -carotene in the phospholipid monolayer and their distributions in the phospholipid bilayer, *Chem. Phys. Lipids* 113: 11-22;
- Simons** K., Ehehalt R., 2002, Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J. Clin. Invest* 110: 597-603;
- Simons** K., Gerl M.J., 2010, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11:688-99;
- Simons** K., Ikonen E., 1997, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387: 569-572 ;
- Simons** K., Toomre D., 2000, Lipid rafts and signal transduction, *Nature* 1: 31-41;
- Singer** S.J., Nicolson G.L., 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175: 720-731 ;
- Singer** S.J., 2004, Some early history of membrane molecular biology, *Annu. Rev. Physiol* 66:1-27;
- Singh** A.K., Harrison S.H., Schoeniger J.S., 2000, Gangliosides as receptors for biological toxins: development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes, *Anal. Chem.* 72: 6019-6024;
- Slagel** D. E., Dittmer J. C, Wilson C. B., 1967, Lipid composition of human glial tumour and adjacent brain, *J Neurochem* 14: 789-798;
- Slotte** J.P., Ramstedt B., 2007, The functional role of sphingomyelin in cell membranes, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 977-981;

- Smith T.**, 1967, Monolayers on water: I. A theoretical equation for the liquid expanded state, *J. Coll. Interface Sci.* 23: 27-35;
- Smith R. D.**, **Berg J. C.**, 1980, The collapse of surfactant monolayers at the air – water interface, *J. Colloid Inter. Sci.* 74, 273-286;
- Sobczyk A.**, **Kisza L.**, 1981, *Chemia fiyczna dla przyrodników*, (wydanie 3), PWN, Warszawa,;
- Sok M.**, **Šentjarc M.**, **Schara M.**, 1999, Membrane fluidity characteristics of human lung cancer, *Cancer Lett.* 139: 215-220;
- Sonnino S.**, **Mauri L.**, **Chigorno V.**, **Prinetti A.**, 2007, Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiol.* 17: 1-13;
- Spreecher H.**, 2002, The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent. Fatty Acids* 67:79-83;
- Steck T.L.**, **Ye J.**, **Lange Y.**, 2002, Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin, *Biophys J.* 83:2118-2125;
- Strassheim D.**, **Shafer S.H.**, **Phelps S.H.**, **Williams C.L.**, 2000, Small cell lung carcinoma exhibits greater phospholipase C-beta1 expression and edelfosine resistance compared with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 60: 2730-2736;
- Su Y.**, **Li Q.**, **Chen L.**, **Yu Z.**, 2007, Condensation effect of cholesterol, stigmasterol, and sitosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine in molecular monolayers, *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 293: 123-129;
- Surma M.A.**, **Klose C.**, **Simons K.**, 2012, Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network, *Biochim. Biophys. Acta* 1821:1059-1067;
- Suzuki K.G.N.**, 2012, Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes, *Biotechnol. J.* 7 : 753-761;
- Sweet W.D.**, **Wood W. G.** and **Schroeder F.**, 1987, Charged anesthetics selectively alter plasma membrane order, *Biochemistry* 26: 2828-2835;
- Szachowicz-Petelska B.**, **Dobrzynska I.**, **Sulkowski S.**, **Figaszewski Z.**, 2010, Characterization of the cell membrane during cancer transformation, *J Environ. Biol.* 31: 845-850;
- Teissie J.**, **Prats M.**, **Gabriel B.**, 1992, Lateral proton conduction along lipid monolayers spread at the air/water interface, *Thin Solid Films* 210-211: 713-715;
- Teissie J.**, **Prats M.**, **Soucaille P.**, **Tocanne J.F.**, 1985, Evidence for conduction of protons along the interface
- Tekpli X.**, **Holme J.A.**, **Sergenta O.**, **Lagadic-Gossman D.**, 2013, Role for membrane remodeling in cell death: Implication for health and disease, *Toxicology* 304: 141-157;
- Teorell T.**, **Stenhagen E.**, 1938, Universal buffer over the pH range 2.0 to 12.0, *Biochem. Z.* 299, 416-419;
- Toimil P.**, **Prieto G.**, **Miñones Jr.J.**, **Trillo J.M.**, **Sarmiento F.**, 2012, Monolayer and Brewster angle microscopy study of human serum albumin – Dipalmitoyl phosphatidyl choline mixtures at the air-water interface, *Colloid Surf B* 92: 64-73;
- Tomoaia-Cotisel M.**, **Chifu E.**, 1983, Xanthophyll films: II. Two-component monolayers of some xanthophylls and egg lecithin at the air/water interface, *J. Coll. Interface Sci.* 95 : 355-361;
- Tomoaia-Cotisel M.**, **Chifu E.**, **Zsako J.**, 1985, Mixed monolayers of egg-lecithin and carotenoids, *Colloids Surf.* 14: 239-246;
- Tonks A.**, **Morris R.H.**, **Price A.J.**, **Thomas A.W.**, **Jones K.P.**, **Jackson S.K.**, 2001, Dipalmitoylphosphatidylcholine modulates inflammatory functions of monocytic cells independently of mitogen activated protein kinases, *Clin Exp Immunol.* 124:86-94;
- Tsuchiya H.**, **Nagayama M.**, **Tanaka T.**, **Furusawa M.**, **Kashimata M.**, **Takeuchi H.**, 2002, Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors, *BioFactors* 16: 45-56;
- Uttaro A.D.**, 2006, Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Lower Eukaryotes, *IUBMB Life* 58: 563 – 571;
- van Blitterswijk W.J.**, **Verheij M.**, 2008, Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects, *Curr. Pharm. Des.* 14: 2061-2074;
- van der Luit A.H.**, **Vink S.R.**, **Klarenbeek J.B.**, **Perrissoud D.**, **Solary E.**, **Verheij M.**, **Blitterswijk W.J.**, 2007, A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 6: 2337-2345;
- van Meer G.**, **Voelker D.R.**, **Feigenson G.W.**, 2008, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature* 9: 113-124;
- van Weeghel M.**, **te Brinke H.**, **van Lenthe H.**, **Kulik W.**, **Minkler P.E.**, **Stoll M.S.**, **Sass J.O.**, **Janssen U.**, **Stoffel W.**, **Schwab K.O.**, **Wanders R.J.**, **Hoppel C.L.**, **Houten S.M.**, 2012, Functional redundancy of mitochondrial enoyl-CoA isomerases in the oxidation of unsaturated fatty acids, *FASEB J.* 26:4316-26;

- Verclas** S.A.W., Howes P.B., Kjaer K., Wurlitzer A., Weygand M.J., Büldt G., Dencher N.A., Lösche M., 1999, X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air-water interface, *J. Mol. Biol.* 287: 837-843;
- Veldhuizen** R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F., 1998, The role of lipids in pulmonary surfactant, *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 90-108;
- Verkleij** A.J., Post J.A., 2000, Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction, *J. Membr. Biol.* 178:1-10.;
- Vink** S.R., Lagerwerf S., Mesman E., Schellens J.H.M., Begg A.C., van Blitterswijk W.J., Verheij M., 2006, Radiosensitization of Squamous Cell Carcinoma by the Alkylphospholipid Perifosine in Cell Culture and Xenografts, *Clin. Cancer Res.* 12: 1615-1622;
- Vink** S.R., Schellens J.H.M., Wim J van Blitterwijk, Verheij M., 2005, Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid, *Inves. New Drug.* 23:279-286;
- Vogler** W.R., Berdel W.E., Geller R.B., Brochstein J.A., Beveridge R.A., Dalton W.S., Miller K.B., Lazarus H.M., 1996, A phase II trial of autologous bone marrow transplantation (ABMT) in acute leukemia with edelfosine purged bone marrow, *Adv. Exp. Med. Biol.* 416:389-396;
- Vollhardt** D., Fainerman V.B., 2006, Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility, *Adv. Colloid Interface Sci.* 127 (2006) 83-97;
- Vrablic** A.S., Albright C.D., Craciunescu C.N., Salganik R.I., Zeisel S.H., 2001, Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes, *FASEB J.* 15:1739-1744;
- Wang** D-N., Stieglitz H., Marden J., Tamm L.K., 2013, B., Philadelphia's Favorite Son, was a Membrane Biophysicist, *Biophys. J.* 104 :287-291;
- Wieder** T., Orfanos C.E., Geilen C.C., 1998, Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine, *J. Biol. Chem.* 273: 11025-11031.
- Wilkening** G., Linke T., Uhlhorn-Dierks G., Sandhoff K., 2000, Degradation of Membrane-bound Ganglioside GM1, *J. Biol. Chem.*, 275: 35814-35819;
- Wolf** A.A., Fujinaga Y., Lencer W.I., 2002, Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol, *J. Biol. Chem.* 277:16249-16256;
- Wong** J.T., Chan M., Lee D., Jiang J.Y., Skrzypczak M., Choy P.C., 2000, Phosphatidylcholine metabolism in human endothelial cells: Modulation by phosphocholine, *Mol. Cell. Biochem.* 207: 95-100;
- Wood** W.G., Igbavboa U., Müller W.E., Eckert G.P., 2011, Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes, *J. Neurochem.* 116 :684-689;
- Wróbel** S., Marzec M., 2006, Różnicowa kalorymetria skaningowa, w: *Komplementarne metody badań przemian fazowych*, redakcja Mikuli E., Migdał-Mikuli A., Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
- Wu** Z-L., Schwartz E., Seeger R., Ladisch S., 1986, Expression of GD2Ganglioside by Untreated Primary Human Neuroblastomas, *Cancer Research* 46: 440-443;
- Wydro** P., 2013, The influence of cardiolipid on phosphatidylglycerol/phosphatidylethanolamine monolayers – studies on ternary films imitating bacterial membranes, *Colloid Surf. B* 106: 217-223;
- Xue** Q., Yang K., Xiao C., Zhang Q., 1999, Direct observation of 2-D phase transitions of Chiral liquid crystals at the air/water interface, *Thin Solid Films* 347 :263-271;
- Yamamura** Y., Saito K., 2011, Effect of Cis and Trans Double Bonds on Conformational Disordering of the Hydrocarbon Chain of Lipid, Unsaturated Monoacylglycerols, in the Lamellar Phase of a Binary System with Water, *J. Phys. Chem. B* 115: 14963-14968;
- Ybert** C., Lu W., Möller G., Knobler C.M., 2002, Collapse of a monolayer by three mechanisms, *J. Phys. Chem. B* 106:2004-8;
- Yeagle** P.L., 1989, Lipid regulation of cell membrane structure and function *FASEB J.* 3: 1833-1842;
- Yethiraj** A., Weisshaar J.C. , 2007, Why Are Lipid Rafts Not Observed In Vivo?, *Biophys. J.* 93: 3113-3119;
- Yokoyama** Y., Negishi L., Kitoh T., Sonoyama M., Asami Y., Mitaku S., 2010, Effect of Lipid Phase Transition on Molecular Assembly and Structural Stability of Bacteriorhodopsin Reconstituted into Phosphatidylcholine Liposomes with Different Acyl-Chain Lengths, *J. Phys. Chem. B*, 114: 15706-15711;
- Yu** S.H., Possmayer F., 2003. Lipid compositional analysis of pulmonary surfactant and monolayer-associated reservoirs, *J. Lipid Res.* 44:621-29;

- Yun** H., Choi Y-W., Kim N.J., Sohn D., 2003, Physicochemical Properties of Phosphatidylcholine (PC) Monolayers with Different Alkyl Chains, at the Air/Water Interface, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24: 377-383.
- Zeisel** S.H., 1994, Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis, *FASEB J.* 7: 551-557;
- Zhao** L., Feng S-S., 2004, Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes, *J. Coll. Interf. Sci.* 274: 55-68;
- Zhou** X.L., Chenc S.H., 1995, Theoretical foundation of X-ray and neutron reflectometry, *Phys. Rep.* 257: 223-348;
- Zsako** J., Tomoaia-Cotisel M., Chifu E., 1984, Insoluble mixed monolayers. I. Phase equilibria at the collapse of binary monolayers at gas/liquid interfaces, *J. Coll. Interface Sci.*, 102 (1984) 186.

Streszczenie

W niniejszej pracy podjęta została próba wyznaczenia oddziaływań pomiędzy alkilofosfocholinami (APCs), stanowiącymi nową generację leków o działaniu antynowotworowym, a składnikami błon biologicznych w monowarstwach Langmuira utworzonych na swobodnej powierzchni wody. Do badań wybrano trzy alkilofosfocholiny różniące się strukturą części hydrofobowej: heksadecylfosfochoinę (HePC, posiadającą 16 węglowy łańcuch węglowodorowy), oktadecylfosfochoinę (OcPC, z 18 węglowym łańcuchem węglowodorowym) oraz erucylfosfochoinę (ErPC, z 22 węglowym łańcuchem węglowodorowym i podwójnym wiązaniem usytuowanym pomiędzy 13 a 14 atomem węgla).

Rozprawa doktorska obejmuje cztery zasadnicze części.

Pierwsza część poświęcona jest przeglądowi literatury przedmiotu i obejmuje trzy podrozdziały, w których opisano kolejno: błony biologiczne, syntetyczne lipidy antynowotworowe oraz podstawy fizyczne techniki monowarstw Langmuira. Na wstępie zarysowano historię badań nad błonami biologicznymi oraz opisano ich składniki ze szczególnym uwzględnieniem lipidów błonowych stosowanych w eksperymentach objętych niniejszą pracą (cholesterolu (Chol), 1,2-dipalmitoil- sn-glicero-3-fosfocholiny (DPPC), 1-palmitoil-2-oleoil- sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC), sfingomieliny (Sph) oraz ganglizydu (GM₁)). Jedną z sekcji poświęcono także deskrypcji ogółu procesów metabolicznych w/w lipidów błonowych. W części tej znajduje się opis asymetrii dystrybucji lipidów w błonach biologicznych i dysfunkcje wynikające z jej zaburzenia. Ponadto przedstawiono ogólną charakterystykę traw lipidowych oraz ich rolę w funkcjonowaniu błon oraz procesie zaprogramowanej śmierci komórki. Na koniec części poświęconej membranom biologicznym opisano różnice strukturalne pomiędzy komórkami zdrowymi a komórkami dotkniętymi procesem nowotworzenia. W dalszej części pracy zaprezentowano należące do rodziny syntetycznych lipidów antynowotworowych APCs. Przedstawiono genezę badań nad tą grupą związków oraz ich ogólną specyfikację. Sekcja ta zawiera także opis dotychczasowych wyników badań dotyczących potencjalnego mechanizmu działania tej grupy leków. Ostatni rozdział części literaturowej zawiera charakterystykę techniki monowarstw Langmuira i obejmuje zarówno historyczne aspekty badań, jak i najnowszy stan wiedzy związany z tą tematyką. W rozdziale tym zaprezentowane zostało klasyczne i współczesne spojrzenie na filmy Langmuira. Szczególną uwagę poświęcono mechanizmowi kolapsu monowarstw oraz oddziaływaniom w układach wieloskładnikowych. Dodatkowo przedstawiono szereg metod służących do analizy filmów Langmuira (w tym metody spektroskopowe i mikroskopowe), a następnie opisano te, które znalazły zastosowanie w

niniejszej pracy (BAM i GIXD). Podsumowaniem części literaturowej jest opis monowarstw Langmuira jako modelu błon biologicznych.

Na początku części eksperymentalnej zaprezentowano wszystkie stosowane związki i odczynniki chemiczne, przedstawiono procedurę pomiarów oraz opisano wpływ warunków eksperymentalnych na przebieg i stabilność otrzymywanych izoterm π -A. W dalszej części przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań. W pierwszej kolejności zaprezentowano właściwości mechaniczne i elektryczne monowarstw utworzonych przez cząsteczki APCs (oparte o pomiar izoterm π -A i zależności ΔV -A) oraz wyniki badań w cieple stałym z użyciem różnicowego kalorymetru skaningowego (DSC) oraz mikroskopu polaryzacyjnego. Zastosowanie tych technik pozwoliło na dokładną charakterystykę stosowanych związków oraz określenie (w przypadku ErPC) parametrów pomiarowych. Badania DSC i mikroskopia polaryzacyjna pozwoliły dodatkowo na scharakteryzowanie ciekłokrystalicznych właściwości APCs. W dalszej części pracy przedstawiono wyniki badań na materiale biologicznym – linii komórkowej nowotworu prostaty Du145. Badania te miały na celu sprawdzić zdolność APCs do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych przy różnych czasach ekspozycji oraz różnych stężeniach leków. Apoptozę badano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Zaprezentowane w pracy wyniki jednoznacznie potwierdzają, że APCs wywołują śmierć komórek na drodze apoptozy. Kolejna część pracy obejmuje prezentację wyników eksperymentów langmuirowskich. W kolejnych sekcjach zaprezentowano wyniki pomiarów dla dwuskładnikowych układów mieszanych (APCs/Chol, APCs/DPPC, APCs/POPC, APCs/Sph, APCs/GM₁) oraz układów trójskładnikowych imitujących rafty lipidowe (APCs/Chol/Sph (Chol:Sph=0,5)) oraz modelowe błony biologiczne: leukocytów (APCs/Chol/DPPC (Chol:DPPC=0,67)), komórek nowotworu białaczki (APCs/Chol/POPC (Chol:POPC=0,25)) i komórek nowotworu prostaty (APCs/Chol/POPC (Chol:POPC=0,428)). Do interpretacji równowag termodynamicznych w w/w monowarstwach mieszanych zastosowano termodynamiczny opis właściwości roztworów nieidealnych za pomocą nadmiarowych funkcji mieszania. Odchylenia od reguł addytywności posłużyły jako wskaźnik oddziaływań pomiędzy składnikami. Dla każdego z badanych układów określono charakter oddziaływań w szerokim zakresie ułamków molowych i ciśnień powierzchniowych. Zbadanie zmian maksymalnych wartości modułów ściśliwości C_s^{-1} w funkcji składu monowarstwy pozwoliło ponadto określić wpływ APCs na upakowanie monowarstw utworzonych przez cząsteczki lipidów błonowych. Dodatkowo przeprowadzono analizę mieszalności składników w układzie ErPC/DPPC przy użyciu techniki rozpraszania promieniowania X (GIXD) oraz mikroskopii kąta Brewstera (BAM). Dzięki zastosowaniu komplementarnych metod udało się jednoznacznie opisać wzajemną mieszalność składników oraz określić charakter przejścia fazowego obserwowanego przy

wysokich ciśnieniach powierzchniowych na izotermach π -A zarejestrowanych dla monowarstw ubogich w ErPC.

Trzeci rozdział pracy obejmuje dyskusję otrzymanych wyników. W rozdziale tym zestawiono ze sobą wyniki dla różnych lipidów, co umożliwiło porównanie wzajemnych oddziaływań. Jednoznacznie określono powinowactwo APCs do konkretnych lipidów błonowych (stosując m.in. zasadę komplementarności molekularnej) oraz do modelowych błon biologicznych, wskazując potencjalny mechanizm selektywności tej grup leków w stosunku do komórek nowotworowych.

Całość pracy podsumowana została 15 wnioskami przedstawionymi w rozdziale czwartym, z których najważniejsze wymieniono poniżej:

1. Kluczową rolę w procesie transportu APCs przez błonę odgrywa cholesterol, z którym wszystkie badane związki wykazują silne oddziaływania przyciągające;
2. Znacznie mniejsza rolę odgrywają fosfolipidy błonowe (DPPC i POPC), z którymi APCs oddziałują słabo, a charakter tych oddziaływań zależy od struktury chemicznej leków;
3. Badane APCs wpływają stabilizująco na rafty lipidowe, a efekt ten uwarunkowany jest głównie oddziaływaniami z cholesterolem;
4. Częsteczki gangliozydu GM₁ mogą na powierzchni błony stanowić potencjalne miejsca wiążące APCs i odpowiadać za wysoką selektywność leków.;
5. Błony komórek zdrowych stanowią naturalną barierę, zapobiegającą wnikaniu cząsteczek APCs do wnętrza komórek;

Pracę kończy bibliografia zawierająca 308 pozycji.

Część wyników zaprezentowanych w niniejszej pracy została opublikowana w następujących artykułach:

1. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., Marzec M., 2012, *Langmuir Monolayer Characteristics of Erucylphosphocholine – A Novel Anti-Tumor Drug*, Acta Phys. Pol. A, 121: 468-473;
2. Dynarowicz-Łątka P., Wnętrzak A., Broniatowski M., Flasiński M., 2013, *Miscibility and phase separation in mixed erucylphosphocholine-DPPC monolayers*, Colloid Surf B Biointerfaces 107:43-57;
3. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., 2013, *Interactions of Alkylphosphocholines with Model Membranes – The Langmuir Monolayer*, J Membr Biol 246: 453- 466;
4. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., 2013, *Interactions between antitumor alkylphosphocholines and membrane sphingolipids in Langmuir monolayers*, wysłane do druku w Acta Phys. Pol. A.

Summary

The main objective of this PhD thesis was to determine the interactions between alkylphosphocholines (APCs), which are new generation of antitumor agents, and cellular membrane lipids in Langmuir monolayers formed at the free water surface. For investigations, three alkylphosphocholines were chosen, which differ in the structure of their hydrophobic part: hexadecylphosphocholine, HePC (possessing C16 alkyl chain), octadecylphosphocholine, OcPC (with C18 hydrocarbon tail) and erucylphosphocholine, ErPC (with 22-carbon hydrocarbon chain and double *cis* bond between 13 and 14 carbon atoms).

The doctoral dissertation consists of four main parts.

The first part is a literature review and includes three subsections, which describe the following issues: biological membranes, anticancer synthetic lipids and physical principles of Langmuir monolayers technique. The introduction presents the history of biological membranes and describes major membrane components, with particular regard to membrane lipids used in this study (cholesterol (Chol), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), sphingomyelin (Sph) and ganglioside (GM₁)). One part of this subsection contains the description of all the metabolic processes of the above-mentioned membrane lipids. This subsection also describes the asymmetric distribution of lipids in biological membranes and dysfunctions resulting from its disorder. In addition, the general characteristic of lipid rafts is presented, as well as their role in the membrane function and in the process of programmed cell death. At the end of this subsection, the structural differences between normal cells and cells affected by carcinogenesis are described. The next subsection deals with alkylphosphocholines, representing a structural class of promising antineoplastic synthetic phospholipid analogs. The genesis of research on these drugs is shown, as well as their general specifications. This subsection provides a description of the recent study on the potential mode of action of this drug class. The last part of the literature review concerns the description of the Langmuir monolayers technique and includes historical aspects of this method and state of the art associated with this subject. This subsection presents both classical and contemporary look at the Langmuir films. The particular attention is paid to the mechanism of monolayer collapse and interactions in multicomponent systems. Furthermore, a number of methods for the analysis of Langmuir films (including spectroscopic and microscopic techniques) are presented and described, especially those that were used in this study (BAM and GIXD). The description of the Langmuir monolayer as a model of biological membranes can be found in the summary of the literature part.

At the beginning of the experimental section, all the used compounds and chemical reagents, as well as experimental procedure are presented. Moreover, the influence of experimental conditions on the course of the obtained π -A isotherms and stability of monolayers is described. Then, the results of experiments are shown. First, basing on the measurements of π -A isotherms and ΔV -A dependences, the mechanical and electrical properties of monolayers formed by APCs molecules are presented. This section also demonstrates the results of study in solid state, using differential scanning calorimeter (DSC) and polarizing microscope. The application of these techniques allowed to obtain the characteristic of the investigated compounds and determine the optimum measurements conditions (for ErPC). The DSC study complemented with polarised light microscopy allowed also to characterize the liquid crystalline properties of the studied APCs. Next, the results of research on biological material - a prostate cancer cells line Du145 - are presented. These studies were aimed to verify the ability of APCs to induce apoptosis in cancer cells, depending on the dose and time of incubation. Apoptosis was measured using a fluorescence microscope. The obtained results clearly confirm that APCs induce cell death through apoptosis. Another part of the work includes the results of the Langmuir study. The following subsections present the results of measurements of binary mixed systems (APCs/Chol, APCs/DPPC, APCs/POPC, APCs/Sph, APCs/GM1) and ternary systems imitating lipid rafts (APCs/Chol/Sph (Chol:Sph = 0,5)) and model biological membranes of: leukocytes (APCs/Chol/DPPC (Chol:DPPC = 0,67)), leukemia cancer cells (APCs/Chol/POPC (Chol: POPC = 0,25)) and prostate cancer cells (APCs/Chol/POPC (Chol:POPC = 0,428)). To interpret thermodynamic equilibrium above-mentioned mixed monolayers, the thermodynamic description of the properties of non-ideal solutions were applied, using the excess mixing functions. Deviations from the additivity rules were used as an indicator of the interaction between the components. For each investigated systems, the character of mutual interaction was determined over a wide range of mole fractions and various surface pressures. Changes in the maximum compressibility modulus values (C_s^{-1}) as a function of the composition of the monolayer allowed to determine the influence of APCs on molecular packing of monolayers, which are formed by the membrane lipid molecules. Additionally, an analysis of the miscibility of the components in the system ErPC/DPPC was performed, using the GIXD technique and Brewster angle microscopy (BAM). Thanks to the applied complementary techniques, the mutual miscibility of the components was described. Moreover, GIXD experiments helped to elucidate the origin of the plateau observed at high surface pressure in the course of π -A isotherms for monolayers of low ErPC content.

The third section includes a discussion of the obtained results. This part summarizes the results for each different lipids, what allowed to compare the mutual interactions. In this thesis, the affinity of APCs to definite membrane lipids (using i.e. molecular packing complementarity rule),

as well as to biomembrane model was clearly defined, indicating the potential mechanism of APCs selectivity in relation to the tumor cells.

This work has been summarized with 15 conclusions, which are presented in section IV, from which the main conclusions are presented below:

1. Cholesterol, among all the investigated compounds, exhibits a strong attractive interactions with all the studied APCs, and – in this way- plays a crucial role in the transport of APCs through the biological membrane,
2. Interactions between investigated phospholipids (DPPC and POPC) and APCs are much weaker and seem to be less important in this aspect; the character of these interactions depends on the chemical structure of APCs.
3. APCs stabilize lipid rafts, and this effect is mainly due to the interactions with cholesterol;
4. GM₁ molecules may be considered as molecular targets, attracting APCs molecules to cancer cells and can be responsible for the high selectivity of these drugs;
5. Membrane of normal cells is a natural barrier, preventing drug molecules from penetrating into healthy cells;

At the end of this thesis there is a bibliography containing 308 references. Some of the results presented in this dissertation have already been published in the following articles:

1. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., Marzec M., 2012, *Langmuir Monolayer Characteristics of Erucylphosphocholine – A Novel Anti-Tumor Drug*, Acta Phys. Pol. A, 121: 468-473;
2. Dynarowicz-Łątka P., Wnętrzak A., Broniatowski M., Flasiński M., 2013, *Miscibility and phase separation in mixed erucylphosphocholine-DPPC monolayers*, Colloid Surf B Biointerfaces 107:43-57;
3. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., 2013, *Interactions of Alkylphosphocholines with Model Membranes – The Langmuir Monolayer*, J Membr Biol 246: 453- 466;
4. Wnętrzak A., Łątka K., Dynarowicz-Łątka P., 2013, *Interactions between antitumor alkylphosphocholines and membrane sphingolipids in Langmuir monolayers*, submitted to Acta Phys. Pol. A.