



Uniwersytet Jagielloński
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Oddziaływanie digitoniny z
cholesterolem błony komórkowej –
badania fizykochemiczne i
modelowanie teoretyczne**

Autor:

Maria Janikowska-Sagan

Promotor: dr hab. Beata Korchowiec, prof UJ

Kraków, wrzesień 2019

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana Maria Janikowska-Sagan (nr indeksu: 1029816) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. „Oddziaływanie digitoniny z cholesterolem błony komórkowej – badania fizykochemiczne i modelowanie teoretyczne” przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr hab. Beaty Korchowiec. 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 autora

Praca powstała we współpracy z prof. Marie-Paule Mingot-Leclercq z Louvain Drug Research Institute na Université Catholique de Louvain w Louvain-la-Neuve w Belgii.

Praca doktorska została wykonana z wykorzystaniem Infrastruktury PL-Grid.

Niniejszym chciałabym podziękować
mojej Promotorce Pani dr hab. Beacie Korchowiec
za opiekę i cenne wskazówki w pisaniu pracy.

Dziękuję Panu prof. dr hab. Jackowi Korchowiec
Za opiekę naukową, życzliwość, cenne wskazówki
i poświęcony czas podczas studiów doktoranckich.

Serdecznie dziękuję prof. Marie-Paule Mingeot-Leclercq
za możliwość odbycia stażu w laboratorium
na Université Catholique de Louvain w Louvain-la-Neuve w Belgii.

Serdecznie dziękuję dr Annie Stachowicz-Kuśnierz
za owocne dyskusje naukowe, dzielenie się swoją wiedzą
i doświadczeniem z zakresu modelowania molekularnego.

Serdecznie dziękuję Sandrine Verstraeten i kolegom z zespołu na UCL w Belgii
za miłą atmosferę, nieocenioną pomoc udzieloną mi
w trakcie mojego pobytu w Belgii.

Serdecznie dziękuję doktorantom z Zakładu Chemii Teoretycznej na Wydziale Chemii
za wspierającą atmosferę pracy i wszelką pomoc.

Serdecznie dziękuję mgr Sonii Trojan i mgr Katarzynie Pustule
za wszelką pomoc i przyjaźń.

Mojemu mężowi Filipowi, mojemu bratu Adamowi i mojej rodzinie za wszystko.

Spis treści

1	Wprowadzenie i cel pracy	3
2	Część literaturowa	5
2.1	Błona komórkowa	5
2.2	Lipidy	7
2.2.1	Fosfolipidy	7
2.2.2	Sfingolipidy	8
2.2.3	Sterole	9
2.2.4	Kwasy tłuszczowe	10
2.3	Modele błony	11
2.3.1	Monowarstwy Langmuira	11
2.3.2	Liposomy	18
2.3.3	Modelowanie <i>in silico</i>	24
2.4	Saponiny	34
2.4.1	Digitonina	35
2.4.2	Diosgenina	39
2.4.3	Ginsenozyd Rh2	40
3	Materiał badawczy i metody	42
3.1	Materiały	42
3.2	Metody	43
3.2.1	Monowarstwy Langmuira	43
3.2.2	Liposomy	44
3.2.3	Mikroskopia fluorescencyjna	45
3.2.4	Statyczne obliczenia kwantowo-chemiczne	47
3.2.5	Klasyczna dynamika molekularna	47
4	Wyniki pomiarów	49
4.1	Przygotowanie dynamiki	49
4.2	Oddziaływanie monowarstw z digitoniną	50
4.2.1	Izotermy ciśnienia powierzchniowego $\Pi - A$	51

4.2.2	Modelowanie MD	54
4.2.3	Porównanie	65
4.3	Pomiary przy stałej powierzchni	67
4.3.1	Izotermie adsorpcji	68
4.3.2	Modelowanie MD - układ cholesterol - digitonina	69
4.3.3	Porównanie parametrów monowarstw cholesterolu i dosgeniny, dyskusja	77
4.4	Liposomy LUV	78
4.5	Badania mikroskopowe - GUV	82
4.6	Oddziaływanie digitoniny z lipidami	85
4.6.1	Oddziaływanie digitoniny z monowarstwą POPC/SM	86
4.6.2	Oddziaływanie digitoniny z monowarstwą POPC/SM/CHOL	94
4.6.3	Porównanie	103
5	Wnioski	105
6	Bibliografia	106
7	Streszczenie rozprawy doktorskiej	118
8	Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych	120

Wykaz ważniejszych skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy

- A** średnie pole powierzchni cząsteczki w monowarstwie
- A_{coll}** średnie pole powierzchni cząsteczki w punkcie załamania monowarstwy
- A_{12}** średnie pole powierzchni zajmowane przez cząsteczkę w monowarstwie mieszanej
- ATP** adenozynotryfosforan
- BCP** punkt krytyczny wiązania (ang. bond critical point)
- CHOL** cholesterol
- Cs^{-1}** współczynnik ściśliwości monowarstwy
- Cs_{max}^{-1}** maksymalna wartość współczynnika ściśliwości
- DFT** teoria funkcjonału gęstości (ang. density functional theory)
- DIG** digitonina
- DIOS** diosgenina
- DLS** dynamiczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering)
- DMF** dimetyloformamid
- DMSO** dimetylosulfotlenek
- DNA** kwas deoksyrybonukleinowy
- ePC** fosfatydylocholina z jaja kurzego
- GPI** glikofosfatydyloinozytol
- GUV** olbrzymie jednowarstwowe liposomy
- k_b** stała Boltzmana

L długość łańcuchów kwasów tłuszczowych

LC faza ciekła skondensowana monowarstwy

LE faza ciekła rozprężona monowarstwy

LUV duże jednowarstwowe liposomy

NBD-DHPE dipalmitynofosfatydyloetanolamino-N-(nitrobenzoksadiazyl)

p_N ciśnienie normalne

POPC palmitynooleinofosfatydylocholina

QTAIM kwantowa teoria atomów w cząsteczkach

RDF radialna funkcja rozkładu

Rho-DOPE dioleoinofosfatydyloetanolamina rodaminy

S faza stała monowarstwy

S_{mol} parametr uporządkowania łańcuchów lipidowych

SM sfingomielina

SOPC stearynooleinofosfatydylocholina

SUV małe jednowarstwowe liposomy

T temperatura

t czas

U parametr upakowania

V objętość części hydrofobowej cząsteczki

X ułamek molowy

γ napięcie powierzchniowe

ϵ_0 przenikalność dielektryczna próżni

θ kąt odchylenia od normalnej monowarstwy

λ długość fali

Π ciśnienie powierzchniowe

Π_{coll} ciśnienie powierzchniowe w punkcie załamania monowarstwy

Saponiny są wtórnymi metabolitami roślinnymi, posiadającymi ogromne znaczenie biologiczne [1]. Charakteryzują się działaniem antyzapalnym, antywirusowym, a także antybakteryjnym [1, 2, 3]. Ponadto są używane w terapii nowotworów gdyż wykazują aktywność cytotoksyczną i cytostatyczną w kierunku komórek nowotworowych [4]. Wiadomym jest, że saponiny oddziałują z błonami komórkowymi bogatymi w cząsteczki cholesterolu, podczas gdy ich efekt jest znacznie mniejszy gdy błona pozbawiona jest sterolu. Digitonina, steroidowa saponina, jest często kojarzona z jej właściwościami litycznymi w stosunku do erytrocytów [5, 6]. Wiadomo, że digitonina ma znacznie większe powinowactwo do steroli niż do pozostałych lipidów występujących w natywnej błonie komórkowej, jednakże szczegółowy mechanizm molekularny oddziaływania między cząsteczkami sterolu, a digitoniny nie został jak dotąd szczegółowo opisany. Interesujące jest czy cząsteczki oddziałują tylko na zasadzie oddziaływań fizycznych: oddziaływań van der Waalsa, oddziaływań krótkiego i dalekiego zasięgu; czy jest to oddziaływanie typu chemicznego, jak na przykład wytwarzanie kompleksu czy wiązań chemicznych między cząsteczkami cholesterolu i digitoniny. Ponadto w literaturze można znaleźć dwa podejścia do sposobu działania digitoniny na błonę komórkową. Pierwsze znacznie bardziej rozpowszechnione głosi, iż digitonina wiążąc się z cholesterolem błonowym tworzy addukt, bądź kompleks, który jest usuwany z błony, tym samym zwiększając płynność membrany co czyni ją bardziej podatną na uszkodzenia [7, 8]. Drugie podejście głosi iż digitonina penetrując błonę wiąże się także z cholesterolem, ale nie wyciąga go z błony [9, 10]. Natomiast w membranie tworzone są sferyczne micle lub sztywne tubularne struktury składające się głównie z cholesterolu i digitoniny [9].

Wybrano dwa rodzaje badań do charakterystyki oddziaływań międzycząsteczkowych, metody eksperymentalne i teoretyczne. Eksperymenty zostaną wykonane przy użyciu techniki monowarstw Langmuira, która jest doskonałą metodą służącą do badania oddziaływań międzycząsteczkowych, oraz badania liposomów, które są dwuwarstwowymi modelami błony biologicznej o ściśle określonym składzie. Ponadto eksperymenty zostaną uzupełnione modelowaniem *in silico* metodami klasycznej dynamiki molekularnej (MD), a także metodami chemii kwantowej pozwalającej na dokładne zbadanie oddziaływania między cząsteczkami zarówno w modelowej monowarstwie, jak i między dimerami cholesterol - digitonina.

Celem pracy jest zbadanie oddziaływań fizykochemicznych między cholesterolem, a digito-

niną, a następnie porównanie tych interakcji z oddziaływaniem digitoniny z innymi składnikami błony, fosfatydylocholiną oraz sfingomieliną. Na początku zostanie podjęta próba określenia roli łańcucha alifatycznego cholesterolu w interakcji z digitoniną. W tym celu zostaną przeprowadzone badania eksperymentalne i teoretyczne monowarstwy cholesterolu i diosgeniny, cząsteczki różniące się od cholesterolu tym, że w miejsce łańcucha alifatycznego cholesterolu, diosgenina posiada dwie reszty cukrowe: furanozę i piranozę. Następnie zostanie przeprowadzona analiza oddziaływań fizycznych i chemicznych występujących między oddziałującymi cząsteczkami dimeru cholesterol - digitonina i układu porównawczego diosgenina - digitonina. W tym celu z końcowej klatki symulacji MD monowarstwy cholesterolu bądź diosgeniny zostaną „wycięte” oddziałujące cząsteczki cholesterolu i digitoniny lub odpowiednio diosgeniny i digitoniny, a następnie zostaną one poddane badaniom przy użyciu metod chemii kwantowej.

Następnie zostaną przeprowadzone badania eksperymentalne nad wpływem dwóch różnych saponin: digitoniny i ginsenozydu Rh2 na modelowe błony biologiczne. W niniejszych badaniach zostaną wykorzystane duże i olbrzymie jednowarstwowe liposomy, utworzone z równomolowych mieszanin fosfatydylocholiny (ePC) i sfingomieliny (SM) lub ePC, SM i cholesterolu (CHOL). Lipidy zostały tak wybrane gdyż ePC naturalnie tworzy fazę nieuporządkowaną błony (L_d) natomiast SM jest składnikiem bardzo uporządkowanych rejonów membran biologicznych. Ginsenozyd Rh2 został wybrany jako saponina porównawcza gdyż wykazywał on odmienne zachowanie względem komórek nowotworowych niż większość znanych saponin, a konkretnie w badaniach nad komórkami nowotworu piersi jego oddziaływanie z komórkami było słabsze, gdy błony komórkowe były bogate w cholesterol, niż gdy były go pozbawione [11].

Ostatnim elementem badań będzie przeprowadzenie eksperymentów i modelowania *in silico* monowarstw wieloskładnikowych bardziej przypominających składem natywną błonę komórkową niż monowarstwy zbudowane z samego cholesterolu. Monowarstwy będą składać się z równomolowych mieszanin POPC/SM, jak również POPC/SM/CHOL. Celem pracy będzie zbadanie oddziaływań digitoniny z błoną przypominającą składem błonę komórkową. Ponadto dzięki obliczeniom metodami klasycznej dynamiki molekularnej będzie możliwe zbadanie oddziaływania saponiny z innymi składnikami błony niż cholesterol. Interesujące jest czy digitonina będzie oddziaływała identycznie z cholesterolem wchodzącym w skład modelowej rafty lipidowej, czy to oddziaływanie będzie inne niż dla czystego cholesterolu.

2.1 Błona komórkowa

Komórka jest to najmniejsza jednostka strukturalna i funkcjonalna posiadająca zdolność do przeprowadzania wszystkich procesów życiowych. Od środowiska zewnętrznego oddziela ją półprzepuszczalna błona komórkowa zbudowana głównie z lipidów i białek, zachodzą w niej różnorodne procesy, z których najważniejsze to transport materii, wymiana informacji oraz przemiana energii. Biologiczna membrana została opisana w 1972 roku przez amerykańskich cytologów S.J. Singera i G. Nicolsona jako płynna mozaika. Według wspomnianych badaczy najważniejszymi cechami błony są płynność, asymetria, dynamiczność i zdolność do fuzji [12].

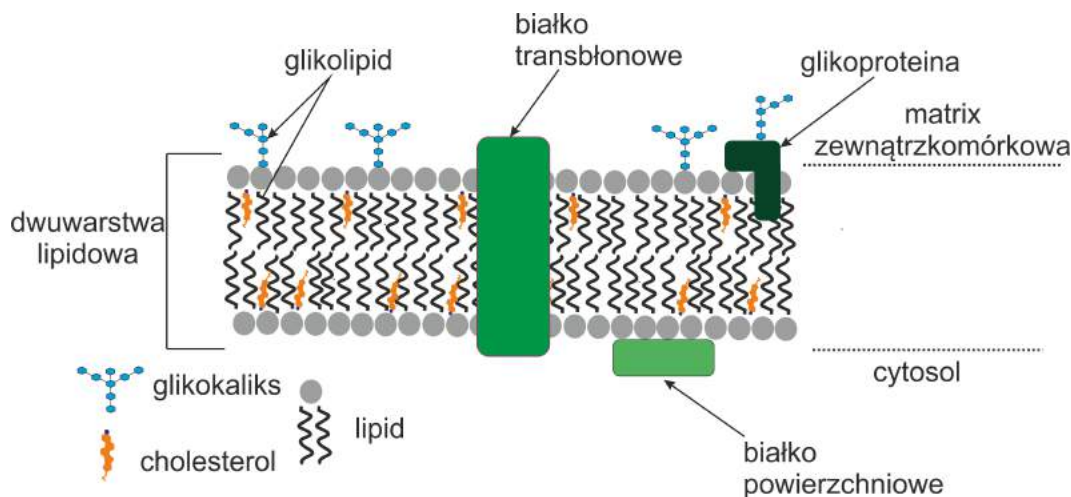
Lipidy mają budowę amfifilową, oznacza to, że posiadają część hydrofobową - tak zwany ogon, oraz część hydrofilową - głowę. Taka budowa sprawia, że w środowisku wodnym spontanicznie tworzy się dwuwarstwa lipidowa, gdzie hydrofilowe głowy lipidów zwrócone są na zewnątrz dwuwarstwy, do środowiska wodnego, natomiast hydrofobowe ogony stykają się ze sobą we wnętrzu błony. Ważną cechą błony jest jej półprzepuszczalność dla różnych związków chemicznych. Dwuwarstwa jest przepuszczalna dla tlenu, dwutlenku węgla, azotu, wody, etanolu, glicerolu, mocznika a także amoniaku. Natomiast jony oraz cząsteczki o większej masie cząsteczkowej jak na przykład glukoza, aminokwasy i nukleotydy nie są w stanie spontanicznie dyfundować przez błonę.

Dwuwarstwa lipidowa tworząca się spontanicznie w środowisku wodnym tworzy szkielet komórki, do którego przytwierdzone są białka powierzchniowe, natomiast białka integralne penetrują przez błonę i mają kontakt zarówno z cytoplazmą jak i z zewnętrznym otoczeniem komórki, rysunek 2.1. Od wnętrza komórki błona jest podpierana przez cytoszkielet komórkowy, natomiast od zewnątrz jest osłaniana przez tak zwany glikokaliks. Grubość dwuwarstwy lipidowej wynosi około 5nm. W stanie fizjologicznym membrana znajduje się w stanie ciekłokrystalicznym. Płynność błony jest definiowana jako odwrotność lepkości, im większa płynność błony tym szybciej lipidy błonowe mogą się przemieszczać. Lepkość błony zależy od jej składu. Za zwiększanie płynności odpowiadają lipidy nienasycone, natomiast za jej usztywnianie odpowiadają lipidy nasycone, a także cholesterol wypełniający przestrzeń między długimi łańcuchami lipidowymi. Komórka może kontrolować płynność błony zwiększając

lub zmniejszając udział lipidów nasyconych i nienasyconych oraz cholesterolu [13].

Błona komórkowa jest asymetryczna, znaczy to że wewnętrzna warstwa jest zbudowana z innych lipidów niż warstwa zewnętrzna. Za zróżnicowanie lipidów w błonie plazmatycznej odpowiedzialne są białka zwane flipazami fosfolipidowymi i translokazy aminofosfolipidowe. Pierwsze z nich charakteryzują się niską specyficznością, odpowiadają one za transport cząsteczek fosfatydylocholiny, fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy. Natomiast translokazy są jednocześnie hydrolazami adenosynotrójfosforanu(ATP). W warunkach fizjologicznych błona plazmatyczna jest asymetryczna, natomiast gdy komórka jest uszkodzona albo znajduje się na szlaku programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) staje się strukturą o symetrycznym rozmieszczeniu lipidów. W warunkach natywnych glikolipidy, sfingolipidy oraz lipidy, których hydrofilową głowę stanowi fosfatydylocholina znajdują się w większości w zewnętrznej warstwie, natomiast z cytoplazmą kontaktują się lipidy, których głowami hydrofilowymi są fosfatydyloetanolamina, a także fosfatydyloinozytol. Cholesterol występuje w obu warstwach membrany.

Składniki błony mogą się poruszać w obszarze membrany. Najczęstszymi ruchami są ruchy w płaszczyźnie błony, tak zwana dyfuzja lateralna. W błonach biologicznych taka dyfuzja lipidów zachodzi z prędkością 10^{-14} m/s. Dodatkowo lipidy mogą rotować wokół własnej osi z prędkością 10^9 obrotów na minutę. Najrzadziej zdarzają się spontaniczne ruchy „flip-flop” czyli przekaskiwanie lipidów między warstwami, takie przemieszczenia lipidów są możliwe dzięki odpowiednim białkom, o których była mowa wcześniej [12].



Rysunek 2.1: Schemat błony komórkowej.

Model płynnej mozaiki zaproponowany przez S.J. Singera i G. Nicolsona zakłada przypadkowe rozmieszczenie lipidów w membranie. Tylko częściowo jest to prawda gdyż błona komórkowa posiada także domeny lipidowe, które są skupiskiem charakterystycznych lipidów i białek. Jedną z najważniejszych funkcji takich domen jest stworzenie optymalnych warunków dla białek pełniących różnorodne funkcje w komórce. Domeny możemy podzielić ze względu

na rozmiar. Najmniejsze domeny są tworzone przez oddziaływanie cholesterolu z cząsteczkami lipidów: jak na przykład z czterema cząsteczkami sfingomieliny, dwoma cząsteczkami fosfatydylocholiny lub jedną cząsteczką fosfatydyloetanolaminy. Są to domeny najmniej trwałe. Mikrodomeny o wielkości około 100 nm są wzbogacone w cząsteczki cholesterolu. Do tych domen ściągane są białka z kotwicą zbudowaną z glikofosfatydyloinozytolu (GPI), glikosfingolipidy oraz białka biorące udział w przekazywaniu informacji [13]. Mikrodomeny mogą się ze sobą łączyć w większe skupiska lipidowe. Głównymi składnikami takich domen są: cholesterol, sfingomielina, glikosfingolipidy oraz fosfatydyloinozytolobisfosforan. Domeny o wielkości co najmniej 500 nm są stabilizowane przez cytoszkielet wewnątrzkomórkowy [12, 14].

Niektóre lipidy w dwuwarstwie oprócz klasycznej dwuwarstwy mogą tworzyć także odwrócone micelle i odwróconą fazę heksagonalną. Wymienione struktury są tworzone przez komórkę w celu ułatwienia fuzji pęcherzyków pochodzących z innych organelli komórkowych do błony plazmatycznej. Pęcherzyki mogą pochodzić z aparatu Golgiego gdzie są wytwarzane i funkcjonalizowane cząsteczki lipidów [12, 13].

W następnym rozdziale zostaną omówione główne klasy lipidów występujących w komórkach zwierzęcych.

2.2 Lipidy

Lipidy tworzą „plastyczny stelaż” komórki. Tworzą one odpowiednie warunki dla białek pełniących rozmaite funkcje w błonie, a także stanowią barierę oddzielającą środowisko zewnętrzne od wewnętrznego (komórkowego). Jednym z wielu stosowanych podziałów lipidów jest podział ze względu na budowę głowy hydrofilowej [13].

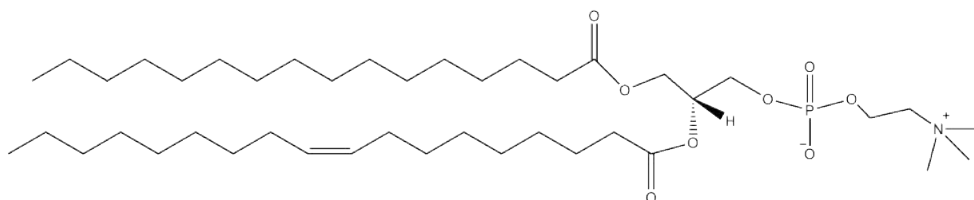
2.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy stanowią najliczniejszą grupę lipidów występującą w błonie komórkowej. Powstają na skutek estryfikacji glicerolu pochodnymi kwasu fosforowego przy atomie węgla C3. Natomiast atomy węgla C1 i C2 połączone są wiązaniami estrowymi z łańcuchem acylowym kwasów tłuszczowych. Hydrofilowa głowa połączona jest wiązaniem estrowym z resztą fosforanową, która z kolei łączy się z jedną z reszt (w nawiasach wypisano nazwy głów hydrofilowych po połączeniu z grupą fosforanową):

- atomem wodoru (kwas fosfatydowy)
- choliną (fosfatydylocholina)
- inozytolem (fosfatydyloinozytol)
- etanolaminą (fosfatydyloetanolamina)
- seryną (fosfatydyloseryna)

- glicerolem (fosfatydyloglicerol).

W warunkach obojętnego pH grupa fosforanowa jest zjonizowana i posiada ładunek ujemny. Wypadkowy ładunek hydrofilowej głowy zależy zatem od reszty dołączonej do grupy fosforanowej. Lipidy o wypadkowym ładunku ujemnym czyli tak zwane fosfolipidy anionowe to: kwas fosfatydowy, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloglicerol. Fosfolipidy neutralne to fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina.



Rysunek 2.2: Wzór strukturalny przykładowego fosfolipidu: cząsteczki POPC.

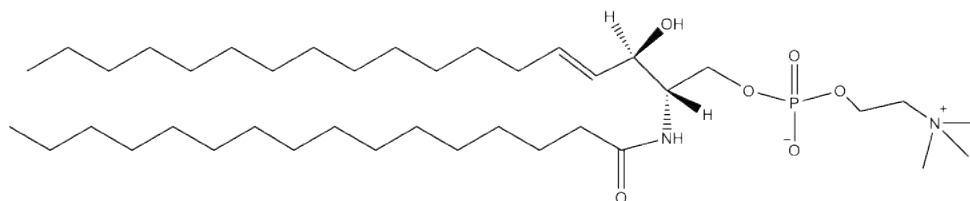
Hydrofobowy ogon utworzony jest ze specyficznych kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn-1* i *sn-2* odpowiednio przy pierwszym i drugim atomie węgla glicerolu. Zwykle w pozycji *sn-1* jest przyłączony nasycony, natomiast w pozycji *sn-2* nienasycony kwas tłuszczowy. Na rysunku 2.2 została przedstawiona cząsteczka palmitynooleinofosfatydylocholiny (POPC). POPC jest najczęstszym lipidem spotykanym w błonach komórkowych [15, 16]. Dzięki swoim nienasyconym wiązaniom odpowiada za płynność membrany. W modelach błon biologicznych jest wykorzystywany jako reprezentant lipidów błonowych, tworzący fazę lipidów nieuporządkowanych (z ang. liquid disordered L_d)[16].

2.2.2 Sfingolipidy

Podstawowym elementem budulcowym sfingolipidów jest ceramid czyli sfingozyna połączona przez wiązanie amidowe z długołańcuchowym kwasem tłuszczowym. Skład kwasu tłuszczowego tak samo jak ilość wiązań podwójnych jest zróżnicowany. Sfingolipidy możemy podzielić ze względu na typ głowy hydrofilowej. Możemy wyróżnić albo fosfosfingolipidy albo glikosfingolipidy. Jeśli chodzi o pierwszą klasę to podstawniki i podział są takie jak w przypadku fosfolipidów. Drugi typ związków to tak zwane cerebrozydy powstałe w wyniku połączenia ceramidów z jedną lub wieloma resztami cukrowymi.

Najpowszechniej występującym sfingolipidem jest sfingomielina(SM) należąca do fosfosfingolipidów. Ceramido-1-fosfocholina to inna nazwa sfingomieliny. Powstaje ona przez podstawienie grupy alkoholowej ceramidu poprzez fosfocholinę [13]. Przykładowa budowa sfingomieliny została przedstawiona na rysunku 2.3.

Sfingolipidy najobficiej występują w komórkach nerwowych, budując otoczkę mielinową, a tym samym przyspieszając przekazywanie impulsu elektrycznego na drodze mózg - organ wykonawczy [12]. W komórkach somatycznych sfingomielina wraz z cholesterolem wchodzi

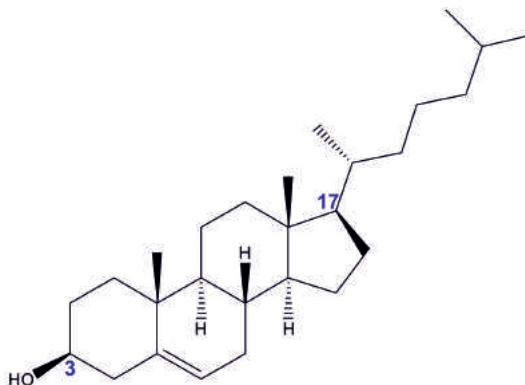


Rysunek 2.3: Wzór strukturalny przykładowego sfingolipidu: cząsteczki SM.

w skład domen lipidowych, zapewniając odpowiednie środowisko dla białek integralnych. Sfin-gomielina może być także wykorzystywana przez komórkę jako źródło ceramidów [17]. SM jest ważnym lipidem używanym w modelach błon biologicznych. Najczęściej jest używany razem z cholesterolem do tworzenia modeli raft lipidowych, ale też czasem jest wykorzystywany do modelowania fazy uporządkowanej lipidów (z ang. liquid ordered L_o) [14, 17].

2.2.3 Sterole

Sterole swoją budową bardzo odbiegają od pozostałych lipidów. Podstawą budowy steroli jest pierścień cyklopentanoperhydrofenantrenowy. Sterole występują w królestwie bakterii, roślin oraz zwierząt. W tym ostatnim najbardziej rozpowszechniony jest cholesterol, który stanowi do 30% a do nawet 50% [18] wszystkich lipidów w błonach biologicznych [13]. Cholesterol jest dwudziestosiedmiowęglowym alkoholem, którego formuła $C_{27}H_{46}O$ została zaproponowana w 1888 roku przez F. Reinitzera, rysunek 2.4.



Rysunek 2.4: Wzór strukturalny przykładowego sterolu: cząsteczki cholesterolu.

Występuje zarówno w błonie komórkowej jak i w membranach innych organelli komórkowych. Cholesterol jest zanurzony praktycznie w całości w błonie komórkowej, jedynie grupa hydroksylowa kontaktuje się z powierzchnią błony oddziałując z głowami lipidowymi pozostałych lipidów. Jego obecność w błonie prowadzi do usztywnienia membrany i zmniejszenia jej płynności, a w konsekwencji do uporządkowania łańcuchów acylowych lipidów [15, 16, 14, 19]. Cholesterol jest ważnym składnikiem domen lipidowych występujących w komórce. [14].

Cholesterol jest bardzo często używany w układach modelowych takich jak monowarstwy Langmuira czy liposomy, jako jeden ze składników błony [14, 20]. Zazwyczaj razem ze sfingomieliną jest jednym z najważniejszych składników modelowych rafty lipidowych [14, 21]. W przypadku badań nad separacją faz wchodzi w skład fazy L_o [22]. Zwykle jego obecność lub brak bardzo zmienia właściwości modelowej membrany [16].

2.2.4 Kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe występujące w komórkach najczęściej stanowią część hydrofobową większości lipidów błonowych. W błonie komórkowej występują niewielkie ilości wolnych form kwasów tłuszczowych. Budowa tych związków jest bardzo zróżnicowana, można je podzielić na cząsteczki o łańcuchach nienasyconych lub nasyconych. Długość łańcuchów acylowych wynosi od dwunastu do dwudziestuczących atomów węgla. Ilość wiązań podwójnych mieści się w granicach przeważnie od jednego do czterech, czasem sześciu [13]. Kwasy tłuszczowe charakterystyczne dla błon biologicznych zostały zebrane w tabeli 2.1.

Tablica 2.1: Przykłady kwasów tłuszczowych występujących w komórkach eukariotycznych.

Symbol	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa
C12:0	<i>n</i> -dodekanowy	laurynowy
C14:0	<i>n</i> -tetradekanowy	mirystynowy
C16:0	<i>n</i> -heksadekanowy	palmitynowy
C18:0	<i>n</i> -oktadekanowy	stearynowy
C20:0	<i>n</i> -eikozanowy	arachidowy
C22:0	<i>n</i> -dokozaanowy	behenowy
cis Δ^9 C16:1	<i>cis</i> 9- heksadekenowy	palmitooleinowy
cis Δ^9 C18:1	<i>cis</i> 9- oktadekenowy	oleinowy
cis $\Delta^{9,12}$ C18:2	<i>cis, cis</i> 9, 12- oktadekadienowy	linolowy
cis $\Delta^{9,12,15}$ C18:3	<i>cis, cis, cis</i> 9, 12, 15- oktadekatrienowy	alfa-linolenowy
trans Δ^9 C18:1	<i>trans</i> 9- oktadekenowy	elaidowy
cis $\Delta^{5,8,11,14}$ C20:4	<i>cis, cis, cis, cis</i> 5, 8, 11, 14- eikozatetratrienowy	arachidonowy
cis $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	<i>cis, cis, cis, cis, cis, cis</i> 4,7,10, 13, 16, 19 -dokozaheksaenowy	dokozaheksaenowy

W pierwszej i drugiej kolumnie podano długość łańcucha acylowego, a następnie ilość, konformację oraz miejsce występowania wiązań nienasyconych

2.3 Modele błony

2.3.1 Monowarstwy Langmuira

Rys historyczny

Od starożytności żeglarze nieświadomie wykorzystywali efekt obniżania napięcia powierzchniowego wody, a tym samym uciszali wzburzone wody poprzez wylanie oliwy przez burtę statku. Jednakże za początek badań nad monowarstwami można przyjąć XVIII wiek, kiedy to w 1757 roku Benjamin Franklin wykonał doświadczenie na niespokojnych wodach jeziora Mo-und Pond znajdującego się w Wielkiej Brytanii na terenie parku Clapham Common. Franklin wylał jedną łyżeczkę oliwy z oliwek na powierzchnię jeziora i zaobserwował uciszenie się fal, co zostało zinterpretowane jako rozprzestrzenienie się cząsteczek oliwy po całej powierzchni jeziora. Grubość warstwy filmu powierzchniowego została określona na około $25 \text{ \AA}$. Zjawisko obniżania napięcia powierzchniowego wody przez oliwę z oliwek zostało wyjaśnione dopiero przez Lorda Rayleigha w XIX w., który powtórzył eksperyment Franklina w warunkach laboratoryjnych. Zapostulował on, że na powierzchni wody tworzy się monowarstwa cząsteczkowa. Niezależnie od badań Lorda Rayleigha, w Niemczech prowadzone były eksperymenty nad monowarstwami znajdującymi się na granicy faz gaz-ciecz. Agnes Pockels w 1891 roku zmierzyła pierwszą izotermę ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającą na pojedynczą cząsteczkę. Do pomiaru zostały użyte bariery powodujące kompresję nierozpuszczalnego w wodzie filmu. Niemiecka badaczka zauważyła, że ciśnienie powierzchniowe ulega niewielkiej zmianie tylko do momentu kiedy na pojedynczą cząsteczkę przypada więcej niż $20 \text{ \AA}^2$, natomiast gdy kontynuuje się kompresję monowarstwy i cząsteczki osiagają powierzchnię mniejszą niż $20 \text{ \AA}^2$ ciśnienie powierzchniowe gwałtownie wzrasta. Punkt, w którym ciśnienie powierzchniowe zaczyna gwałtownie rosnać został nazwany „punktem Pockels” [23, 24].

Kolejną ważną w historii monowarstw postacią był Irving Langmuir, który zainspirowany wcześniejszymi badaniami, opracował metodę do pomiaru monowarstw. Aparatura składała się z wanny połączonej z ruchomymi barierami, takie urządzenia stosowane są do dnia dzisiejszego, a metoda badawcza na cześć twórcy została nazwana metodą Langmuira. Ponadto Langmuir zauważył, że niezależnie od długości łańcucha kwasu tłuszczowego, punkt Pockels zawsze wynosi około $20 \text{ \AA}^2$ i jedynie grubość monowarstwy się zmienia, co pozwoliło mu określić orientację cząsteczek lipidu na powierzchni wody. Zapostulował, że grupy hydrofilowe lipidu są zanurzone w wodzie, natomiast łańcuchy hydrofobowe lipidu sterczą ponad powierzchnię [24].

Przenoszenie monowarstw z powierzchni wody na stały substrat nauka zawdzięcza Katherine Blodgett, która zademonstrowała metodę osadzania monowarstw, a także wielowarstw na stałym podłożu, technikę tę nazywa się od nazwisk twórców: Langmuir-Blodgett.

Metoda Langmuira szybko stała się popularna ze względu na swoją prostotę. Langmuir i niezależnie Harkins pracowali nad jej rozwojem. Langmuir zdefiniował właściwości cząsteczek

tworzących monowarstwy, a także charakteryzował utworzone monowarstwy. Coraz częściej metoda była używana do charakterystyki cząsteczek chemicznych, i ich właściwości fizyko-chemicznych. Między innymi badano zwilżalność materiałów, kontrolę parowania wody z rezerwuarów wodnych pokrytych cienkimi warstwami Langmuira [23].

W niedługim czasie monowarstwy Langmuira znalazły także zastosowanie w badaniach biologicznych. Naukowcy zaczęli tworzyć modele błon biologicznych zbudowanych nie tylko z lipidów ale i białek, a także badać oddziaływania błony ze związkami powierzchniowo-czynnymi, takimi jak leki [25], enzymy [26] czy hormony [27].

Fizyczne podstawy metody pomiaru ciśnienia powierzchniowego

W metodzie Langmuira rozpatruje się cząsteczki zanurzone głowami polarnymi w cieczy i ogonami hydrofobowymi stykającymi się z otaczającym je gazem. W praktyce nie występuje ostra granica między dwoma ośrodkami: cieczą i gazem, a także dwoma cieczami, cieczą i ciałem stałym, a także gazem i ciałem stałym. Między fazami występuje stan przejściowy, gdzie cząsteczki z jednej fazy mieszają się z cząsteczkami drugiej fazy. W naszych rozważaniach ograniczymy się do rozważania układu ciecz-gaz. W układzie doświadczalnym nie ma większego znaczenia jaki gaz zastosujemy, argon, powietrze czy nasyconą parę wodną, wyniki pomiarów będą do siebie bardzo zbliżone [28].

Funkcje termodynamiczne na styku faz gaz-ciecz najwygodniej rozważać gdy układ będzie składał się z cieczy i nasyconej pary tej cieczy. Można wtedy zdefiniować dla niego podstawowe funkcje termodynamiczne. W realnych układach zawsze będzie występowała energia nadmiarowa układu (albo ujemna albo dodatnia), energię tę można opisać wzorem:

$$dU = TdS + \sum_i \mu_i dn_i - PdV + \gamma ds \quad (2.1)$$

gdzie U oznacza energię wewnętrzną, T temperaturę, S entropię, μ_i potencjał chemiczny *i*tego składnika, n_i liczbę moli *i*tego składnika, P ciśnienie, V objętość, γ napięcie powierzchniowe, s powierzchnię.

Aby obliczyć energię swobodną Helmholtza F należy równanie 2.1, podstawić do wzoru: $F \equiv U - TS$, aby otrzymać:

$$dF = -SdT + \sum_i \mu_i dn_i - PdV + \gamma ds \quad (2.2)$$

skąd możemy uzyskać zależność napięcia powierzchniowego wyrażonego jako różniczkę energii swobodnej Helmholtza po powierzchni, przy stałych wartościach temperatury, objętości i liczby cząstek:

$$\gamma = \left. \frac{\partial F}{\partial s} \right|_{T, V, n_i} \quad (2.3)$$

Energię swobodną Gibbsa G można zdefiniować jako: $G \equiv U - TS + PV$. Napięcie powierzch-

niowe można wyrazić również jako różniczkę energii swobodnej Gibbsa po powierzchni, przy stałych wartościach temperatury, ciśnienia i liczby cząstek.

$$\gamma = \left. \frac{\partial G}{\partial s} \right|_{T, P, n_i} \quad (2.4)$$

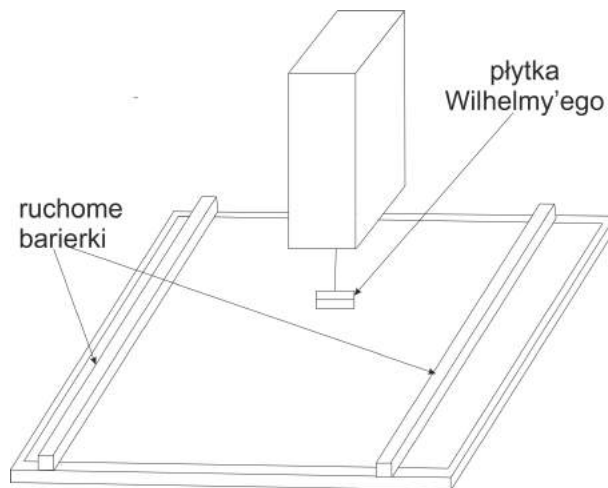
Jednostką napięcia powierzchniowego jest $\frac{N}{m}$. Jednakże częściej stosowanym parametrem niż napięcie powierzchniowe jest ciśnienie powierzchniowe, które można zdefiniować jako:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.5)$$

gdzie Π oznacza ciśnienie powierzchniowe, γ_0 napięcie powierzchniowe subfazy, a γ to napięcie powierzchniowe subfazy z naniesionym filmem. Wymiar ciśnienia powierzchniowego jest taki jak napięcia powierzchniowego [28].

Metoda Wilhelmy'ego

Najczęściej mierzonym parametrem monowarstw jest ciśnienie powierzchniowe. Metod pomiaru jest wiele. Najprostszą i najczęściej stosowaną jest metoda Wilhelmy'ego, polega ona na zanurzeniu płytki wykonanej ze szkła, kwarcu, miki lub platyny w subfazie. Ważną własnością płytki jest jej całkowita zwilżalność przez ciecz subfazy, która w trakcie pomiaru tworzy menisk wklęsły na płytce [24], rysunek 2.5.



Rysunek 2.5: Pomiar izoterymy, ruchome barierki przesuwają się do środka wanny powodując ścisnięcie monowarstwy, płytkę Wilhelmy'ego połączona z oprogramowaniem rejestruje zmiany napięcia powierzchniowego.

W metodzie Wilhelmy'ego mierzona jest siła działająca na zanurzoną w subfazie płytkę. Wypadkowa siła działająca w tej metodzie jest skierowana w dół. Można wyróżnić trzy składowe rozważanej siły: składowa grawitacyjna, składowa związana z efektem napięcia powierzchniowego, a także siła częściowo równoważąca dwie poprzednie, siła wyporu.

$$\mathbf{F} = \rho_p g a b c + 2\gamma(a + b) \cos \theta - \rho_l g a b h \quad (2.6)$$

gdzie $\mathbf{F}$ to wypadkowa siła, ρ_p i ρ_l to gęstości odpowiednio płytki i subfazy, g to stała grawitacyjna, a , b , c to wymiary płytki, h to głębokość zanurzenia płytki. W momencie gdy cała płytka jest zwilżona subfazą parametr $\cos \theta$ przyjmuje wartość 1. Pomiar może następować przy zmiennej sile działającej na płytkę i stałym zanurzeniu, lub przy stałej sile, a zmiennym zanurzeniu [24].

Otrzymane wyniki przelicza się na ciśnienie powierzchniowe. Gdy pomiar jest prowadzony przy zmieniającej się sile, otrzymaną zależność można zapisać jako:

$$\Pi = -\Delta\gamma = -\left[\frac{\Delta\mathbf{F}}{2(a + b)}\right] \quad (2.7)$$

natomiast gdy pomiar prowadzony jest przy stałej sile, a zmiennym zanurzeniu płytki, ciśnienie powierzchniowe można zdefiniować jako:

$$\Pi = -\Delta\gamma = -\left[\frac{\rho_l g a b}{2(a + b)}\right]\Delta h \quad (2.8)$$

gdy płytka jest bardzo cienka, wtedy grubość a jest zaniedbywalna i końcowy wzór na ciśnienie powierzchniowe można zapisać jako:

$$\Pi = -\frac{1}{2}\rho_l g b \Delta h \quad (2.9)$$

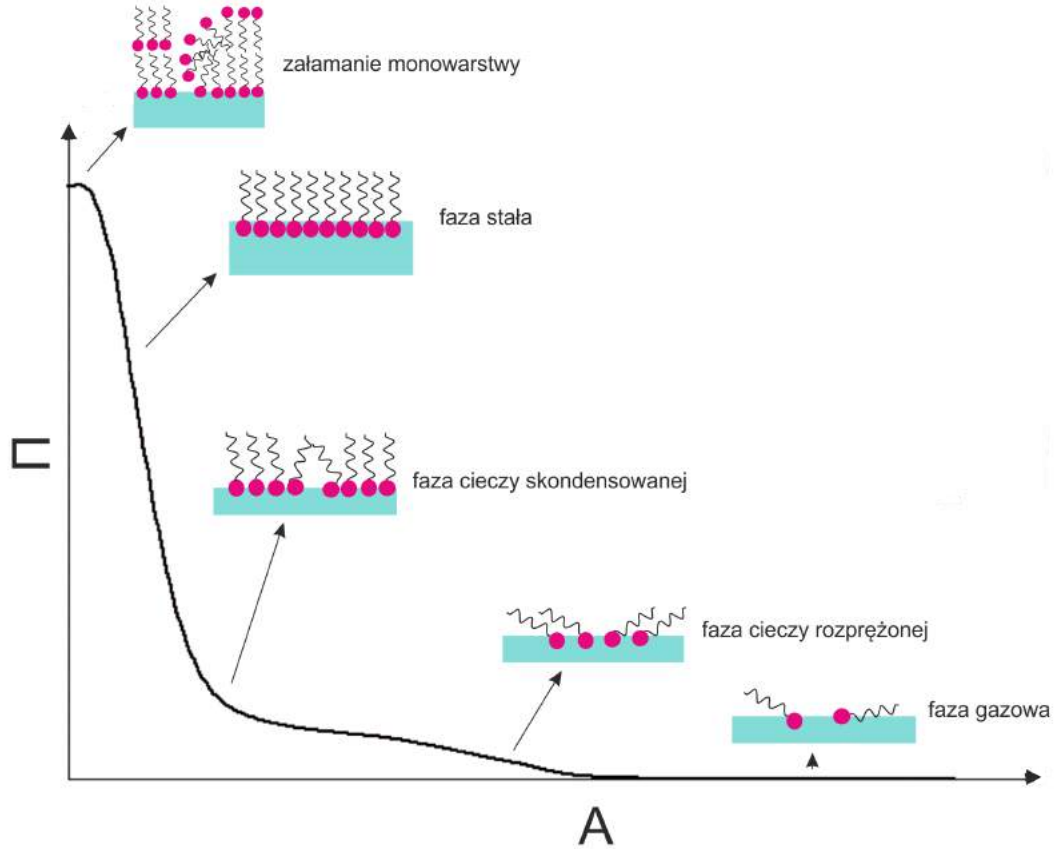
Pomiar jest tym dokładniejszy im cieńszą płytkę zastosujemy [24].

Charakterystyka filmów monomolekularnych

W badaniach filmów powierzchniowych umieszczonych na ciekłych subfazach wykonuje się najczęściej pomiar zależności ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni cząsteczkowej A wyrażonej w $\text{\AA}^2/\text{cząsteczkę}$. Badania wykonywane są w stałej temperaturze i przy stałym ciśnieniu zewnętrznym, dlatego pomiar nazywany jest izotermą $\Pi - A$.

Początkowo film powierzchniowy znajduje się w stanie gazowym G . Charakteryzuje się on dużą powierzchnią cząsteczkową i niewielkim zorganizowaniem. Oddziaływanie cząsteczek znajdujących się na powierzchni subfazy jest zaniedbywalne, wartość ciśnienia powierzchniowego jest bliska zeru. Taki stan monowarstwy można opisać równaniem dwuwymiarowego gazu doskonałego, w którym cząsteczki poruszają się ze średnią energią kinetyczną wynoszącą $1/2k_B T$ dla każdego stopnia swobody. Dwa wymiary na powierzchni subfazy dają średnią energię wynoszącą $k_B T$. W konsekwencji równanie dwuwymiarowego gazu doskonałego przyjmuje postać:

$$\Pi A = k_B T \quad (2.10)$$



Rysunek 2.6: Przebieg przykładowej izotermy $\Pi - A$.

gdzie k_B odpowiada stałej Boltzmanna. Jednakże częściej do opisu stanu gazowego monowarstwy stosuje się równanie opisujące dwuwymiarowy gaz rzeczywisty, równanie 2.11.

$$\Pi(A - A_0) = k_B T \quad (2.11)$$

gdzie A_0 jest rzeczywistą powierzchnią przypadającą na cząsteczkę w monowarstwie [24]. Ściskanie filmu powierzchniowego prowadzi do większej organizacji cząsteczek w warstwie monomolekularnej, średnia powierzchnia przypadająca na cząsteczkę maleje, natomiast ciśnienie powierzchniowe zaczyna wzrastać. Cząsteczki w monowarstwie zaczynają ze sobą oddziaływać. Monowarstwa przechodzi do stanu ciekłego rozprężonego LE (ang. Liquid Expanded). Taki stan monowarstwy można opisać jako dwuwymiarową ciecz, takie rozwiązanie zostało zaproponowane przez Langmuira w 1933 roku [29]:

$$(\Pi - \Pi_0)(A - A_0) = k_B T \quad (2.12)$$

w którym Π_0 odpowiada ciśnieniu związanemu z odpychaniem naładowanych fragmentów

cząsteczek.

Podczas dalszej kompresji cząsteczki organizują się w monowarstwie w ten sposób, że hydrofilowa część zanurzona jest w subfazie wodnej, natomiast część hydrofobowa znajduje się na granicy faz ciecz - powietrze. Części hydrofobowe są mocno zorganizowane w monowarstwie i oddziałują ze sobą poprzez stabilizujące oddziaływania van der Waalsa. Taki stan fizyczny monowarstwy nazywany jest ciekłym skondensowanym LC (ang. Liquid Condensed), charakteryzuje się znacznym wzrostem ciśnienia powierzchniowego w przebiegu izotermy $\Pi - A$. Harkins zaproponował matematyczny opis stanu LC , równanie 2.13.

$$\Pi = b - aA \quad (2.13)$$

gdzie a i b są stałymi [24, 30].

Przy dalszym sprężaniu filmu dochodzi do przejścia fazowego z LC do stanu stałego S monowarstwy. Cząsteczki są maksymalnie zorganizowane w monowarstwie, hydrofobowe części cząsteczek są uporządkowane i skierowane prostopadłe do powierzchni subfazy. Zarówno części hydrofilowe jak i hydrofobowe cząsteczek mocno oddziałują ze sobą. Monowarstwa charakteryzuje się znacznie mniejszą ściśliwością niż w poprzednich stanach fizycznych.

Współczynnik ściśliwości C_S^{-1} wyznaczany dla monowarstw pozwala na dokładniejszą charakterystykę badanych związków amfifilowych, został on zdefiniowany w następujący sposób:

$$C_S^{-1} = -A \left(\frac{\partial \Pi}{\partial A} \right) \quad (2.14)$$

Im wyższa wartość parametru elastyczności tym mniejsza zdolność cząsteczek do kompresji w monowarstwie [38, 39]. Na podstawie C_S^{-1} można określić w jakim stanie fizycznym znajduje się monowarstwa, charakterystyczne wartości i odpowiadające im fazy uporządkowania, tabela 2.2 [40]. Ponadto wartość różniczki $\frac{\partial \Pi}{\partial A}$ określa nachylenie krzywej, natomiast wartość A określa średnią powierzchnię zajmowaną przez cząsteczki w monowarstwie [39].

Stan fizyczny monowarstwy, a także przebieg izotermy $\Pi - A$ zależy od właściwości fizycznych i chemicznych badanej substancji amfifilowej. Ponadto zachowanie badanego układu silnie zależy od temperatury, pH i składu chemicznego subfazy [31, 32]. Wyżej wymienione czynniki wpływają na wartość ciśnienia powierzchniowego, przy której następuje załamanie monowarstwy. Gdyż kompresja filmu monomolekularnego może odbywać się tylko do pewnego granicznego punktu, powyżej którego cząsteczki są usuwane z monowarstwy. Taki punkt graniczny jest nazywany punktem załamania monowarstwy i występuje przy określonej wartości średniej powierzchni cząsteczkowej A_{coll} (ang. collapse) i przy określonym ciśnieniu powierzchniowym Π_{coll} . Klasyczne podejście do załamania monowarstwy głosi iż cząsteczki są wypychane z monowarstwy, po czym następuje kolejne załamanie i tworzone są struktury wielowarstwowe [24]. Najnowsze badania pokazują, że sposób załamania monowarstwy zależy silnie od właściwości fizykochemicznych badanego amfifilu i może przebiegać w różny sposób [33].

Tablica 2.2: Wartości parametru elastyczności dla poszczególnych faz monowarstw Langmuira.

Faza monowarstwy	Wartość współczynnika Cs^{-1} [mN/m]	Schemat
Gazowy	0 - 12,5	
Ciekły rozprężony	12,5 - 50	
Ciekły skondensowany	100 - 250	
Stały	≥ 1000	

Elektryczne właściwości filmów powierzchniowych

Potencjał powierzchniowy ΔV monowarstwy to zmiana potencjału Volty występująca na skutek nałożenia filmu powierzchniowego na granicę ośrodków ciecz-gaz lub ciecz-ciecz [24]. Potencjał powierzchniowy wyliczany jest z powierzchniowego momentu dipolowego $\mu_{\perp}$ wyrażanego wzorem:

$$\mu_{\perp} = \frac{1}{4} \pi \frac{\Delta V}{n} \quad (2.15)$$

gdzie n wyraża liczbę cząsteczek na cm^2 monowarstwy. Fluktuacje wartości potencjału powierzchniowego świadczą o występowaniu niejednorodności w warstwie monomolekularnej. Do wykonywania pomiarów izoterm $\Delta V - A$ wykorzystywane są dwie główne metody: wibrującej elektrody Kelwina i metoda radioaktywna.

W pierwszej metodzie wykorzystuje się wibrującą elektrodę Kelwina umieszczoną w niewielkiej odległości od subfazy, natomiast przeciwelektrodę umieszcza się w subfazie, rysunek 2.7. Film monomolekularny tworzy na powierzchni kondensator płaski o określonej pojemności wyrażonej równaniem Helmholtza, równanie 2.16 [34].

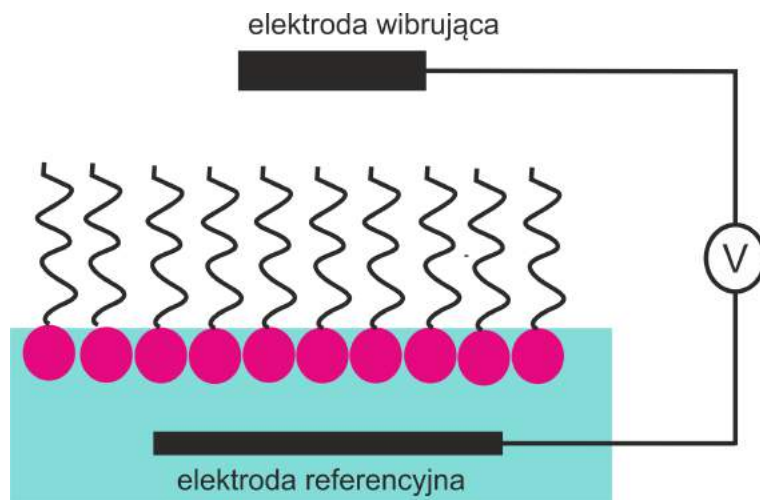
$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{A\epsilon_0\epsilon_r} \quad (2.16)$$

gdzie ϵ_0 jest przenikalnością dielektryczną próżni, natomiast ϵ_r wyraża przenikalność dielektryczną monowarstwy. Powierzchniowy moment dipolowy wyrażony jest przez zależność:

$$\mu_{\perp} = \bar{\mu} \cos \theta \quad (2.17)$$

$\bar{\mu}$ jest wewnętrznym momentem dipolowym tworzącym kąt θ z normalną monowarstwy.

Równanie Helmholtza traktuje całą cząsteczkę amfifu jako dipol do wyznaczania wartości



Rysunek 2.7: Schemat pomiaru potencjału powierzchniowego $\Delta V - A$.

$\mu_{\perp}$. Vogel i Moebius [35] w swojej pracy zaproponowali poprawkę do równania Helmholtza uwzględniającą uwodnione części hydrofilowe cząsteczek i hydrofobowe łańcuchy, równanie 2.18.

$$\mu_{\perp} = \mu_{\alpha} + \mu_{\omega} \quad (2.18)$$

gdzie μ_{α} wyraża moment dipolowy zarówno uwodnionych grup hydrofilowych jak i cząsteczek subfazy ulegających reorganizacji w obecności filmu powierzchniowego. Powyższy model jest czasem nazywany modelem dwuwarstwowego kondensatora.

Dalsze prace nad obliczaniem potencjału powierzchniowego prowadzili Davies i Rideal [138], a następnie rozwijali Demchak i Fort [36], którzy zaproponowali model trójwarstwowego kondensatora. Do efektywnego momentu dipolowego są wliczane przyczynki pochodzące od grup hydrofobowych μ_1 , grup hydrofilowych μ_2 oraz cząsteczek wody μ_3 . Każdy z tych obszarów układu charakteryzuje się różną względną przenikalnością dielektryczną (ϵ_1 , ϵ_2 i ϵ_3). Po uwzględnieniu wszystkich parametrów równanie Helmholtza przyjmuje następującą postać:

$$\Delta V = \frac{1}{A\epsilon_0} \left[\frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3} \right] \quad (2.19)$$

2.3.2 Liposomy

Aby lepiej zrozumieć oddziaływania między cząsteczkami występującymi naturalnie w błonach biologicznych stosowane są także inne modele błon. Jednym z wielu są liposomy będące kulistymi pęcherzykami zbudowanymi najczęściej z lipidów, swoją budową przypominają uproszczoną błonę komórkową.

Liposomy mają szerokie zastosowanie w naukach biomedycznych. Mogą one imitować uproszczony model błony komórkowej o dokładnie znanym składzie i właściwościach. Pozwalają

określić rolę poszczególnych lipidów w błonie komórkowej, a także zdefiniować oddziaływanie między lipidami tworzącymi błonę liposomu a różnorodnymi substancjami chemicznymi lub pochodzenia naturalnego. Liposomy mogą być wykorzystywane między innymi do badania oddziaływania między lipidami błonowymi a saponinami. Jednym z przykładów takich badań jest charakterystyka oddziaływań liposomów złożonych z fosfatydylocholinej jajecznej, sfingomieliny jajecznej, fosfatydyloinozytolu oraz cholesterolu z α -hederyną, triterpenową saponiną [42].

Bardzo prężnie rozwijającą się metodą jest zamykanie substancji leczniczej w liposomach, a następnie dostarczanie zamkniętego leku do komórek docelowych w organizmie człowieka. Pęcherzyki tworzone są w taki sposób aby były biologicznie obojętne, słabo immunizujące i nietoksyczne dla organizmu [43]. Często też funkcjonalizuje się powierzchnię liposomów aby charakteryzowały się wysoką specyficznością w stosunku do komórek docelowych [43, 44]. Obecnie stosuje się dwa rodzaje liposomów, albo naturalnie albo sterycznie stabilizowane [45]. Naturalne pęcherzyki mają stosunkowo krótki czas półtrwania w krwioobiegu. Ponadto szybkość rozpadu liposomów wzrasta proporcjonalnie wraz ze wzrostem średnicy, ładunku ujemnego i płynności błony [46]. Sterycznie stabilizowane liposomy są wzbogacone albo gangliozydem GM1, albo fosfatydyloinozytolem. Dodanie tych substancji do błony liposomów znacząco wydłuża ich czas półtrwania w organizmie. Wypadkowy ładunek liposomów dodatni bądź ujemny wpływa na powinowactwo liposomów do różnych typów komórek. Liposomy kationowe lepiej wiążą DNA i są przyswajane częściej przez komórki mózgu, śledziony i szpiku kostnego. Natomiast liposomy z ujemnie naładowaną powierzchnią mają większe powinowactwo do komórek płuc [47].

Liposomy mogą być wykorzystywane w celach diagnostycznych bądź terapeutycznych. W pierwszym przypadku wykorzystuje się na przykład liposomy wypełnione płynnym kontrastem do obrazowania metodą tomografii komputerowej [48]. W echokardiografii mogą być stosowane liposomy wypełnione gazem [49].

Liposomy mogą być także używane w terapii chorób skórnych, dla przykładu hydrokortyzon ośmiokrotnie lepiej przenika przez warstwę rogową naskórka gdy jest zamknięty w otoczce liposomowej niż podawany w tradycyjny sposób [50]. Ponadto liposomy mogą pasywnie transportować substancje bioaktywne do mieszków włosowych przyspieszając porost lub wypadanie włosów [51].

Pęcherzyki pokryte glikolem polietylenu i wypełnione lekami antynowotworowymi, na przykład doksorubicyną, mogą być wykorzystywane w terapii antynowotworowej. Tak zaprojektowana terapia zakończyła się sukcesem w przypadku komórek nowotworów piersi [52] i mięsaka Kaposiego [53].

Liposomy można podzielić ze względu na liczbę warstw na: liposomy wielowarstwowe i jednowarstwowe. Warstwy w liposomach wielowarstwowych przypominają wyglądem cebulę. Stężenie lipidu użytego do budowy takich liposomów jest wyższe niż liposomów jednowarstwowych o takiej samej średnicy.

Do liposomów jednowarstwowych zaliczamy:

- małe liposomy jednowarstwowe (SUV - small unilamellar vesicles), ich średnica nie przekracza 100 nm . Charakteryzują się niskim stosunkiem fazy wodnej zamkniętej w liposomie do ilości lipidu budującego pęcherzyk. Posiadają niskie zdolności do agregacji i charakteryzują się długim czasem życia w krwioobiegu [54].
- duże liposomy jednowarstwowe (LUV - large unilamellar vesicles), ich średnica to przynajmniej 100 nm . Charakteryzują się wysokim stosunkiem fazy wodnej zamkniętej w liposomie do stężenia lipidu. Najczęściej wykorzystywane są do transportu leków o budowie hydrofilowej. Wykorzystuje się je także do badania spektroskopowego błon biologicznych. [54, 55]
- olbrzymie liposomy jednowarstwowe (GUV -giant unilamellar vesicles), o średnicy między 10 a $100\text{ }\mu\text{m}$. Nie posiadają zastosowania w transporcie leków ale są używane do badania zarówno modelu jak i realnej błony komórkowej, jak również procesu tworzenia się domen i raft lipidowych w błonie komórkowej. GUV są doskonałym narzędziem do badań z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej [22, 56].

Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Zjawisko rozpraszania światła zostało pierwszy raz opisane przez Tyndalla w 1868 roku. Uczony zaobserwował rozpraszanie się światła na cząsteczkach koloidu, których wielkość znacznie przekraczała długość światła użytą w doświadczeniu. Niewiele później Lord Rayleigh opisał rozpraszanie światła na cząsteczkach mniejszych niż długość światła. Wyjaśnił on niebieski kolor nieba jako wynik rozpraszania światła na cząsteczkach atmosfery. Kluczową rolę w tym procesie pełni współczynnik załamania światła ośrodka. Intensywność światła rozproszonego jest zależna od długości fali λ jak $\frac{1}{\lambda^4}$.

Ważny wkład w rozwój wiedzy o rozproszeniu światła w cieczy miał polski profesor Marian Smoluchowski, który wskazał, że ciecz powinna być rozważana jako ciągłe medium, a ewentualne nieciągłości są spowodowane przez termiczne fluktuacje cieczy [57, 58].

W 1908 roku Gustav Mie opublikował swoją teorię opisującą rozpraszanie się światła na cząsteczkach absorbujących i nieabsorbujących promieniowanie. Wielkość tych cząstek jest znacznie większa od rozmiaru padającej na nie fali elektromagnetycznej. Teoria Mie jest zależna od kształtu cząstek oraz współczynnika załamania światła na cząstce i w otaczającym roztworze [28, 58].

W XIX stuleciu szkocki botanik Robert Brown obserwując pyłek kwiatowy pod mikroskopem zaobserwował, że pyłek porusza się w wodzie, a jego ruchy podobne są do błędzenia, nie są zależne od zewnętrznego pola elektrycznego, magnetycznego czy od grawitacji. Ruchy te zostały nazwane od nazwiska odkrywcy [28].

Powyższe odkrycia stały się podwalinami do rozwoju metody DLS pozwalającej na określenie wielkości cząsteczek, ich wagi i objętości, a także określenie ich stabilności w roztworze.

Fizyczne podstawy metody DLS

W metodzie DLS rozpatruje się sferyczne cząsteczki zawieszone w fazie ciekłej. Korzystając z modelu rozpraszania światła zaproponowanego przez Lorda Rayleigh'a światło padające na cząsteczkę o średnicy mniejszej niż długość fali światła, rozprasza się izotropowo. Intensywność odbitego światła została zdefiniowana jako:

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 r^6 \quad (2.20)$$

gdzie I_0 i λ odnoszą się do niespolaryzowanego światła padającego na roztwór i oznaczają jego intensywność oraz długość fali. R to odległość do cząstki, θ to kąt załamania światła. Następnie wielkość n określa współczynnik załamania światła przez badaną cząstkę o promieniu r . Fragment $1 + \cos^2 \theta$ uwzględnia różną polaryzację światła. Światło spolaryzowane prostopadłe do płaszczyzny wyznaczonej przez źródło światła, próbkę i obserwatora nie zależy od kąta rozproszenia światła, natomiast światło o polaryzacji równoległej zależy od kąta rozproszenia światła jak $\cos^2 \theta$ [59].

W wyniku rozproszenia światła powstają tak zwane speckle świetlne, czyli plamki ciemne i jasne, które są wynikiem interferencji destruktywnej bądź konstruktywnej fal świetlnych.

Jednakże obraz nie jest statyczny, cząsteczki są w ciągłym ruchu, opisanym jako ruchy Browna. Matematycznie ruchy zostały opisane przez Smoluchowskiego i Einsteina jako kwadrat średniego przesunięcia cząstek z następującego w czasie t .

$$\overline{z^2} = 2Dt \quad (2.21)$$

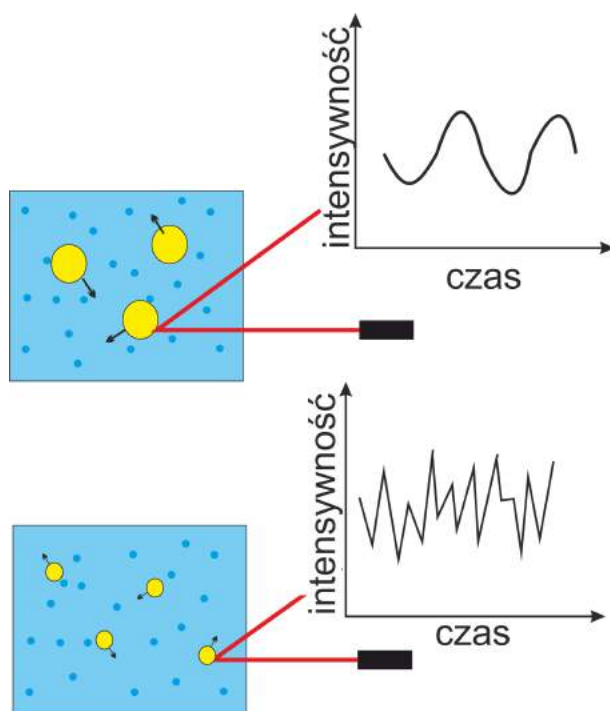
gdzie współczynnik dyfuzji D jest odwrotnie proporcjonalny do hydrodynamicznego promienia cząstki a uwzględnionego w równaniu Einsteina-Smoluchowskiego 2.22.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2.22)$$

k_B to stała Boltzmana, T to temperatura, natomiast η to lepkość roztworu. Najważniejszą informacją płynącą z równania 2.22 jest zależność szybkości ruchów Browna od wielkości cząstki. Małe cząstki poruszają się w roztworze znacznie szybciej niż duże.

Rozmiary cząstek można też powiązać z intensywnością rozpraszania światła zdefiniowaną przez Lorda Reileigha. Z równania 2.20 wynika, że cząstki duże cechują się większą intensywnością światła rozproszonego niż cząstki mniejsze. W równaniu 2.20 intensywność rozproszonego światła jest proporcjonalna do szóstej potęgi promienia cząstki.

Oświetlone laserem cząstki rozpraszają promieniowanie, na detektorze tworzy się „obraz” speckli świetlnych. Rozpraszanie światła jest mierzone w niewielkich odstępach czasu. Wzory speckli zmieniają się w czasie. Następnie są porównywane przez urządzenie zwane analizatorem, wyszukuje on korelacji między dwoma obrazami. Tutaj także można powiązać szybkość zaniku korelacji z wielkością cząstek poruszających się ruchami Browna. Im większe cząstki



Rysunek 2.8: Ruchy Browna oraz zależności ich intensywności od czasu. Większe cząsteczki poruszają się wolniej niż mniejsze.

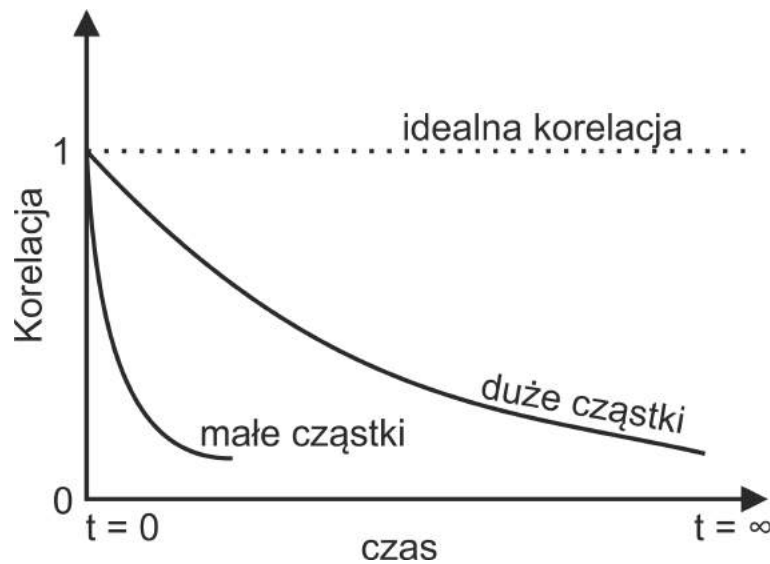
tym korelacja między obrazem odczytanym w chwili t a odczytanym w chwili $t + \tau$ wolniej zanika, dla małych cząstek korelacja zanika bardzo szybko, Rys 2.9 [59].

Metody wykorzystujące zjawisko fluorescencji

Spektroskopia fluorescencyjna opiera się na mierzeniu fluorescencji pochodzącej od wzbudzonych promieniowaniem elektromagnetycznym cząstek. Zjawisko fluorescencji zostało schematycznie przedstawione przez polskiego fizyka Aleksandra Jabłońskiego w 1933 w tak zwanym diagramie Jabłońskiego. Cząsteczka lub jej część zwana fluoroforem absorbując falę elektromagnetyczną zostaje wzbudzona, jej energia jest wyższa niż w stanie podstawowym. Następnie część energii zostaje wypromieniowana w postaci innej fali elektromagnetycznej o energii niższej niż fala wzbudzająca, natomiast pozostała energia jest redystrybuowana w procesach wewnętrznych albo zamieniana na energię cieplną [28]. Fluorescencja jest procesem bardzo szybkim i zajmuje zaledwie 10^{-9} s [60].

Spektroskopia fluorescencyjna jest techniką wykorzystywaną między innymi do badań błon biologicznych, ich składu, ułożenia lipidów, przepuszczalności błony, przejść fazowych. Podczas wytwarzania błony jest ona znakowana specjalnym znacznikiem fluorescencyjnym o odpowiednich właściwościach [22].

W latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia argentyński naukowiec Gregorio Weber po raz pierwszy wykorzystał metody spektroskopowe do badań układów biologicznych [61]. Ważną



Rysunek 2.9: Porównanie zaniku korelacji w obrazach ze speckli świetlnych dla dużych i małych cząstek.

właściwością światła laserowego używanego w pomiarach spektroskopowych jest polaryzacja fali elektromagnetycznej oświetlającej fluorofor. Kolejnym istotnym elementem pomiaru jest detekcja polaryzacji fali emitowanej przez znacznik fluorescencyjny. W układach biologicznych następuje tak zwana fotoselekcja światła, innymi słowy tylko światło o polaryzacji równoległej do osi fluorofora zostanie zaabsorbowane. Proces absorpcji jest szybszy niż rotacja molekuł w błonie. Natomiast proces wypromieniowywania energii jest znacznie wolniejszy niż rotacja cząsteczek zajmująca około 10^{-12} s. W efekcie uzyskuje się składową światła wypromieniowanego prostopadłą i równoległą do polaryzacji światła wzbudzającego. Intensywność fluorescencji F można zdefiniować jako sumę intensywności fluorescencji światła spolaryzowanego równoległe $I_{\parallel}$ i dwóch składowych prostopadłych $I_{\perp}$ i wyrazić wzorem: $F = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$.

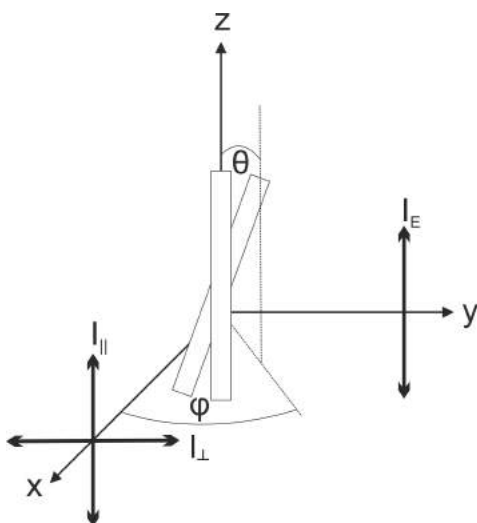
Na rysunku 2.10 zostało przedstawione schematycznie zjawisko anizotropii fluorescencji. Cząsteczka fluoroforu po zaabsorbowaniu światła może rotować, następnie zachodzi proces fluorescencji, intensywność światła wypromieniowanego jest rozkładana na dwie składowe, prostopadłą i równoległą [62].

Podstawowymi parametrami mierzonymi w spektroskopii fluorescencyjnej są stopień polaryzacji fluorescencyjnej (P) definiowany jako:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 1} \quad (2.23)$$

oraz anizotropia fluorescencji (r_A) opisywana równaniem 2.24

$$r_A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 2} = \frac{2P}{3 - P} \quad (2.24)$$



Rysunek 2.10: Anizotropia fluorescencji cząsteczki fluoroforu, oś cząsteczki jest symetryczna do dipoli wzbudzenia i emisji I_E

Do badań ułożenia lipidów w błonie używane są różne znaczniki fluorescencyjne. Cząsteczka markera fluorescencyjnego posiada zwykle w swojej budowie część aromatyczną, odpowiedzialną za absorpcję i emisję promieniowania [62].

Znaczniki fluorescencyjne oprócz spektroskopii są również używane na przykład w mikroskopii fluorescencyjnej, bądź konfokalnej. Jako przykład można rozważyć dwa związki NBD-PE (cząsteczka nitrobenoksadiazolu połączona z dipalmitoiloglicerofosfoetanolaminą) i Rhodope (cząsteczka rodaminu połączona z lipidem dioleoiloglicerofosfoetanolaminą) dodawane do filmu lipidowego używanego do tworzenia gigantycznych liposomów jednowarstwowych. Pierwszy z nich lokalizuje się w fazie lipidów uporządkowanych czyli na przykład raftach lipidowych zbudowanych głównie ze sfingomieliny i cholesterolu, natomiast drugi preferuje fazę lipidów nieuporządkowanych, czyli takich które posiadają nienasycone łańcuchy alifatyczne. Po dodaniu tych fluoroforów do GUV w mikroskopie fluorescencyjnym możliwa jest obserwacja separacji faz, oraz wyznaczenie fazy odpowiedzialnej na przykład za pączkowanie [56, 63].

2.3.3 Modelowanie *in silico*

Teoria funkcyjna gęstości - DFT (Density Functional Theory)

Teoria funkcyjna gęstości jest metodą wariacyjną pozwalającą na wyznaczenie struktury elektronowej układów wieloelektronowych z użyciem względnie małej mocy obliczeniowej. DFT opiera się na twierdzeniach Hohenberga-Kohna [64], którzy udowodnili, że znając gęstość elektronową układu można określić wszystkie właściwości stanu podstawowego tegoż układu. Ponadto dla znanego funkcyjna gęstości $E(\rho)$ spełniona jest zasada wariacyjna: $E(\rho) \geq E(\rho_0)$. Równość, $E(\rho) = E(\rho_0)$, jest spełniona gdy $E(\rho)$ jest funkcyjna gęstości

stanu podstawowego. W metodzie wariacyjnej wyznaczona energia stanowi granicę dolną możliwych energii układu [65].

Energia stanu podstawowego w metodzie DFT jest wyrażona poprzez równanie:

$$E = T_0 + \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} + J(\rho) + E_{ex}(\rho) \quad (2.25)$$

w równaniu 2.25 nie uwzględnia się energii kinetycznej oddziałujących elektronów, energia kinetyczna przyjmuje postać:

$$T_0 = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | \Delta \phi_i \rangle \quad (2.26)$$

gdzie ϕ_i to spinorbital definiowany jako funkcja współrzędnych kartezjańskich i spinowej wybranego elektronu.

Drugi człon równania 2.25 opisuje oddziaływanie elektronów z jądrami. v oznacza potencjał zewnętrzny, który możemy zapisać za pomocą wzoru:

$$v_i = \sum_{\alpha} \left(-\frac{Z_{\alpha}}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{\alpha}|} \right) \quad (2.27)$$

grecka litera α odnosi się do jądra atomowego, natomiast Z oznacza liczbę atomową. Mianownik określa odległość rozważanego elektronu od jądra.

Kolejnym elementem równania 2.25 jest człon odpowiadający za odpychanie coulombowskie chmury elektronowej z samą sobą, zdefiniowany jako:

$$J(\rho) = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.28)$$

w równaniu 2.28 chmura elektronowa zostaje podzielona na wiele małych sześciątów o ładunku punktowym $-\rho d\mathbf{r}$, dzięki czynnikowi $\frac{1}{2}$ oddziaływania tych samych sześciątów są liczone tylko raz [65].

Ostatni człon równania 2.25 to tak zwana energia korelacyjno - wymienna. Aby obliczyć tę energię stosuje się różnorodne przybliżenia. Najbardziej podstawowym jest przybliżenie lokalnej gęstości LDA (Local Density Approximation), które jest przybliżeniem najmniej dokładnym. Dokładniejsze ale bardziej kosztowne jeśli chodzi o czas obliczeń są przybliżenia gradientowe GGA (ang. generalized gradient approximation), natomiast bardziej zaawansowane są tak zwane przybliżenia hybrydowe, a wśród nich funkcjonal B3LYP, dający wyniki bardzo dobrze porównywalne z wynikami eksperymentalnymi [65].

Funkcje zlokalizowane w przestrzeni wokół określonego centrum to orbitale atomowe. Zbiór orbitali „atomowych” nazywa się bazą. W obliczeniach kwantowo-chemicznych stosuje się bazy wykładnicze o wzorze ogólnym:

$$g(\mathbf{r}) = f(x, y, z) \exp[-\zeta r^n] \quad (2.29)$$

w którym f jest wielomianem, natomiast stopień rozmycia orbitalu wokół centrum zależy od wykładnika ζ , im większa ζ tym zanik funkcji szybszy. Orbitale slaterowskie posiadają w wykładniku $n = 1$, natomiast w przypadku orbitali gaussowskich $n = 2$ [65].

Tak jak wspomniano wyżej zbiór orbitali stanowi bazę. Wybór odpowiedniej bazy nie jest rzeczą prostą. W celu uzyskania wiarygodnych wyników najlepiej użyć bazy zawierającej wiele orbitali atomowych, co niestety skutkuje wzrostem zapotrzebowania na moc obliczeniową, gdyż koszt obliczeniowy metody DFT formalnie skaluje się jak $O(n^4)$, gdzie n jest wielkością układu [66].

Optymalizacja geometrii

Cząsteczki występujące w przyrodzie dążą do uzyskania konformacji o jak najniższej energii, dlatego chcąc symulować układy rzeczywiste, w obliczeniach także wykorzystuje się struktury posiadające jak najniższą energię. Aby to osiągnąć początkowe geometrie cząsteczek są optymalizowane, w tym procesie obniża się ich energia.

Wyróżnia się dwa rodzaje optymalizacji geometrii, metody gradientowe oraz metody niegradientowe. Do metod gradientowych należą metody najszybszego spadku i sprzężonych gradientów. Natomiast do metod niegradientowych można zaliczyć na przykład algorytmy genetyczne.

W optymalizacji można wykorzystać różne rodzaje współrzędnych. Najczęściej stosuje się współrzędne kartezjańskie, współrzędne wewnętrzne (opierające się na macierzy- Z), lub współrzędne mieszane.

Optymalizacja geometrii układu polega na znalezieniu punktu stacjonarnego. Proces optymalizacji geometrii dąży do takiego stanu, aby pierwsze pochodne z energii po położeniach zerowały się. Klasyfikacja znalezionych punktów stacjonarnych dokonuje się w oparciu o wartości obliczonych Hessjanów. Gdy wartości Hessjanu były dodatnie układ znajdował się w stanie stacjonarnym. Jeżeli jedna z wartości Hessjanu jest ujemna to układ znajduje się w punkcie siodłowym na powierzchni energii potencjalnej. Po wykonaniu optymalizacji geometrii układ znajduje się najczęściej w minimum lokalnym lub punkcie siodłowym na powierzchni energii potencjalnej [68].

Błąd superpozycji bazy

W ramach metod *ab initio* obliczanie energii oddziaływania E_{oddz} międzycząsteczkowego może odbywać się w dwojaki sposób: z wykorzystaniem metody supermolekularnej bądź metody perturbacyjnej. Aby otrzymać wiarygodne wyniki z obliczeń kwantowo-chemicznych trzeba w swoich obliczeniach zachować konsystencję numeryczną i metodologiczną. Konsystencja numeryczna jest zachowana gdy w obliczeniach wykorzystywana jest dokładnie ta sama baza, natomiast konsystencja metodologiczna jest zachowana gdy korzysta się z tej samej metody obliczeniowej. W metodzie supermolekularnej energia oddziaływania definiowana

jest jako różnica między energią dimeru AB a energią monomerów A i B przyjmujących geometrię taką samą jak w dimerze. Podczas obliczeń monomeru A , monomer B nie jest obecny, a w jego miejsce używane są „orbitale duchy”, tak samo postępuje się w przypadku obliczania energii monomeru B :

$$E_{oddz} = E(AB)_{ab} - E(A)_{ab} - E(B)_{ab} \quad (2.30)$$

gdzie $_{ab}$ oznacza bazę dimeru. W ten sposób bazy dla monomerów w układzie są takie same. Struktura geometryczna A i B w minimum lokalnym jest inna niż w dimerze dlatego korekta z tym związana to energia deformacji E_{def} , wyrażona wzorem:

$$E_{def} = E(A)_a - E(A^0)_a + E(B)_b - E(B^0)_b, \quad (2.31)$$

$$E_{def} > 0$$

Suma E_{oddz} i E_{def} daje energię kompleksacji. Przy takim podejściu błąd superpozycji bazy zostaje wyeliminowany [68].

Teoria atomów w cząsteczkach

Richard Bader jest autorem teorii atomów w cząsteczkach (AIM z ang. atoms in molecules). Teoria ta opisuje atomy jako topologiczne baseny gęstości elektronowej. Gęstość elektronowa przyjmuje najwyższą wartość na jądrach atomowych. Baseny atomowe są rozłącznymi obszarami w przestrzeni fizycznej. Powierzchnia graniczna między basenami zdefiniowana jest warunkiem 2.32:

$$\nabla\rho(\vec{r}) \cdot \vec{n}(\vec{r}) = 0 \quad (2.32)$$

gdzie $\vec{r}$ jest wektorem wodzącym, a $\vec{n}$ jest jednostkowym wektorem normalnym do powierzchni $\nabla\rho(\vec{r})$. Z praktycznego punktu widzenia najważniejsze do opisu właściwości cząsteczek są punkty stacjonarne, które w przypadku gęstości elektronowej nazywamy punktami krytycznymi, spełniają one warunek: $\nabla\rho(\vec{r}) = \vec{0}$. Aby scharakteryzować punkty krytyczne należy policzyć hesjan czyli macierz drugich pochodnych gęstości elektronowej po położeniu, następnie zdiagnozować otrzymaną macierz i wyznaczyć jej ślad czyli laplasjan. Diagonalizacja Hessjanu w punktach krytycznych daje informacje niezbędne do klasyfikacji punktów krytycznych. Liczba niezerowych wartości własnych tak zwana ranga i sygnatura, będąca algebraiczną sumą znaków obliczonych wartości własnych, dzieli punkty krytyczne na cztery typy w zależności od wartości rangi i sygnatury:

- (3, -3) punkt krytyczny jądra atomowego (z ang. nuclear critical point)
- (3, -1) punkt krytyczny wiązania (z ang. bond critical point, BCP)

- (3, +1) punkt krytyczny pierścienia (z ang. ring critical point)
- (3, +3) punkt krytyczny wnęki molekularnej (z ang. ring critical point)

W niniejszej pracy będą rozważane tylko krytyczne punkty wiązania. Znając gęstość elektronową ρ w punkcie krytycznym można określić rodzaj wiązania. Jeżeli ρ jest większe od 0.2 to między atomami występuje wiązanie kowalencyjne, natomiast ρ mniejsze niż 0.1 charakteryzuje oddziaływania słabe [69].

Metoda klasycznej dynamiki molekularnej

Metoda klasycznej dynamiki molekularnej MD (ang. Molecular Dynamics) opiera się na rozwiązywaniu klasycznych równań Newtona dla układów molekularnych. W obliczeniach wyznacza się położenia oraz prędkości atomów badanego układu, co jest określane terminem „trajektoria układu”. Energia potencjalna układu wyznaczana jest za pomocą pola siłowego, FF (ang. force field), opisującego funkcję potencjału.

Pole siłowe Pole siłowe jest energią cząsteczki w funkcji położenia jej jąder atomowych. Pole siłowe jest wielkością skalarną opisującą hiperpowierzchnię energii potencjalnej V dla ruchu jąder w przestrzeni 3N-6 wymiarowej. Parametry FF wyznaczone są empirycznie najczęściej metodami krystalograficznymi i spektroskopowymi. Pola siłowe stosowane są do badań dużych układów, gdy obliczanie elektronowego równania Schroedingera trwałoby za długo, lub wręcz byłoby niemożliwe. Najczęściej używana jest następująca definicja funkcji potencjału V :

$$V = V_b + V_a + V_t + V_{vdW} + V_{cc} \quad (2.33)$$

pierwsze trzy człony równania odnoszą się do struktury kowalencyjnej, natomiast kolejne dwa określają przyczynki od oddziaływań niekowalencyjnych. Skróty stosowane w równaniu 2.33 zostaną szczegółowo omówione poniżej:

1. V_b odnosi się do energii potencjalnej zmiany długości wiązania między dwoma atomami charakteryzującej się określoną długością wiązania r_0 i harmoniczną stałą siłową k , są to oddziaływania 1-2, rysunek 2.11. W polu siłowym zamiast sztywnego wiązania między atomami stosuje się przybliżenie harmoniczne, które wyraża się wzorem: $\frac{1}{2}k(r - r_0)^2$, gdzie r to odległość między atomami.
2. V_a oznacza energię potencjalną związaną ze zmianą kąta wyznaczanego przez trzy sąsiednie atomy o ściśle określonych długościach wiązań, oddziaływania 1-3, rysunek 2.11. Tutaj również stosuje się przybliżenie harmoniczne, tak aby sprężyna została umieszczona między pierwszym i trzecim atomem. Podobnie jak w przypadku wiązań, kąty między atomami posiadają pewne charakterystyczne wartości α_0 i harmoniczną stałą

siłową k_α . Gdy próbuje się wyprowadzić kąt z położenia równowagi, jego wartość wynosi α . Wyrażenie opisujące kąty jest analogiczne do tego opisującego wiązania, to znaczy: $\frac{1}{2}k_\alpha(\alpha - \alpha_0)^2$.

3. V_t odnosi się do energii potencjalnej związanej ze zmianą kąta torsyjnego opisującego jak zmieni się energia gdy nastąpi rotacja o kąt ω dookoła wiązania między atomami 2 i 3 w sekwencji wiązań chemicznych 1-2-3-4, rysunek 2.11. Człon torsyjny jest opisywany równaniem $G(1 - \cos(n\omega))$, gdzie n to krotność wystąpienia bariery przy pełnym obrocie, natomiast G to stała.
4. V_{vdW} to energia potencjalna związana ze zmianą oddziaływań van der Waalsa, rysunek 2.11. Oddziaływania te zapobiegają przed zbliżeniem się atomów na odległość mniejszą niż suma ich promieni van der Waalsa. Gdy takie oddziałujące atomy zbliżają się do siebie energia potencjalna gwałtownie rośnie i atomy zaczynają się odpychać, natomiast oddalenie się atomów powoduje wzrost sił dyspersyjnych proporcjonalne do r^{-6} . Takie oddziaływania zostały opisane jako potencjał Lennarda-Jonesa i wyrażone wzorem:

$$V_{LJ} = \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (2.34)$$

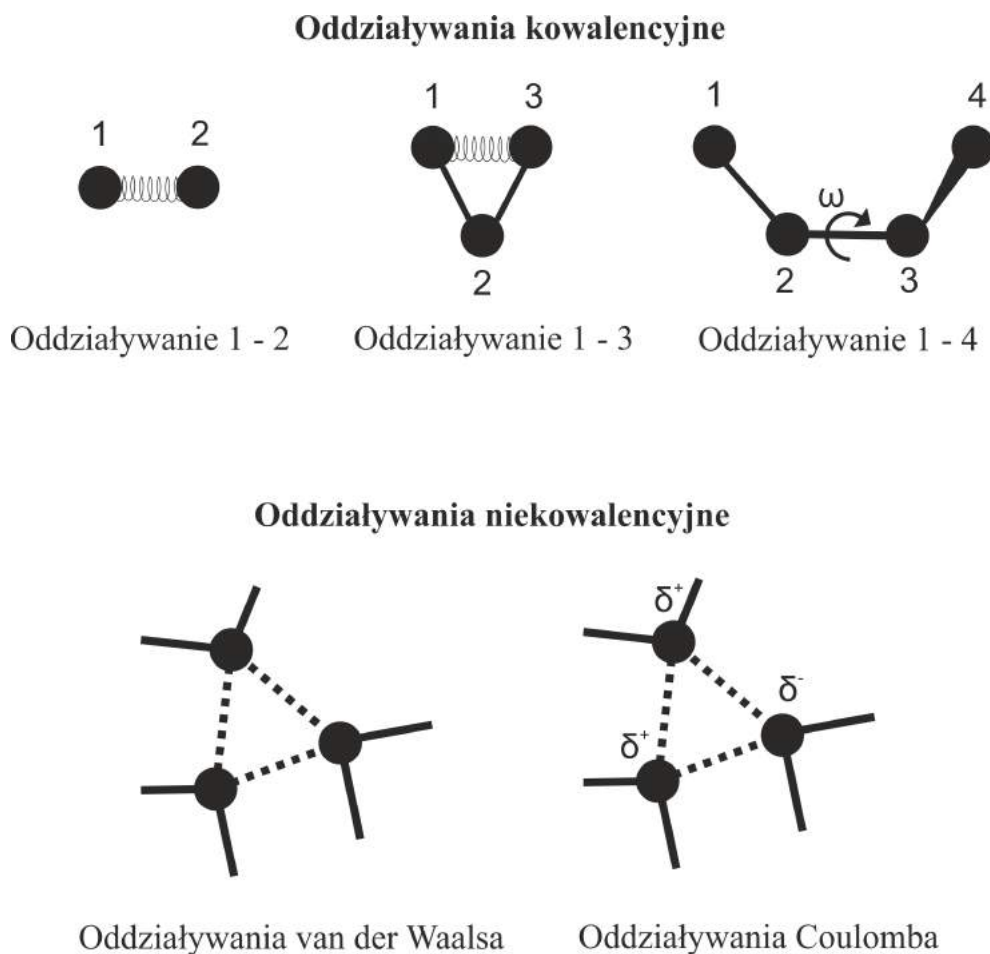
5. V_{cc} to energia potencjalna związana ze zmianą oddziaływań elektrostatycznych, które zależą od ładunków rozważanych atomów (q_1 i q_2), można to uwzględnić wprowadzając do pola siłowego przyczynę pochodzący od energii elektrostatycznej opisany wzorem q_1q_2/r .

Zatem podsumowując, najprostsze pole siłowe może zawierać takie człony:

$$V = \sum_{A-B} \frac{1}{2}k(r - r_0)^2 + \sum_{A-B-C} \frac{1}{2}k_\alpha(\alpha - \alpha_0)^2 + \sum_{A-B-C-D} G(1 - \cos(n\omega)) \\ + \sum_{A,B} \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] + \sum_{A,B} \frac{q_A q_B}{r}$$

oznaczenia są analogiczne jak w opisie pola siłowego. Wadą opisanych pól siłowych jest to, że nie da się przeprowadzić reakcji z użyciem pól siłowych, wiązania chemiczne nie mogą zostać rozerwane, natomiast układ dąży do optymalizacji ich parametrów [65].

W przypadku kiedy jest potrzeba przeprowadzania reakcji chemicznych używa się model oscylatorów anharmonicznych zaproponowany przez Philipa Morse'a. Model ten jest znacznie bardziej skomplikowany i kosztowny jeśli chodzi o moc obliczeniową [65].



Rysunek 2.11: Oddziaływania kowalencyjne i niekowalencyjne.

Mechanika molekularna

Mechanika molekularna jest analizą topologiczną pozwalającą na znalezienie punktów stacjonarnych na hiperpowierzchni energii potencjalnej. Dąży się do tego minimalizując energię potencjalną badanego układu. Energia jest minimalizowana do momentu kiedy obliczony z niej gradient wynosi „zero”. Problemem tej metody jest to, że nie zawsze, a właściwie dosyć rzadko osiąga się minimum globalne, szczególnie jeżeli minimalizuje się energię dużych cząstek. Zwykle znajdowane są punkty stacjonarne zerowego i pierwszego rzędu.

Dynamika molekularna (MD)

Procesy dynamiczne zachodzą w czasie i temperaturze. W dynamice molekularnej wykorzystuje się związek między energią kinetyczną układu, a jego temperaturą. Aby zdefiniować warunki początkowe symulacji należy podać początkowe położenia, prędkości, które w bardzo krótkim odcinku czasu Δt mogą być wartością stałą. Następnie w kolejnym kroku czasowym ustala się nową prędkość i nowe położenie. W ten sposób można uzyskać trajektorię czyli zmianę położenia w czasie.

Przedmiotem rozważań MD są atomy, a procedura obliczeniowa opiera się na numerycznym scałkowaniu równań ruchu Newtona:

$$\mathbf{F}_i(t) = -\frac{dV}{d\mathbf{r}_i} = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}, \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (2.35)$$

gdzie $\mathbf{F}_i$ to siła działająca na atom i , V to potencjał, $\mathbf{r}_i$ to wektor położenia atomu zapisany we współrzędnych kartezjańskich, m_i to masa, natomiast t to czas. Położenie atomów w kolejnym kroku czasowym można uzyskać stosując rozwinięcie w szereg Taylora funkcji położenia w czasie:

$$\mathbf{r}_{i+1} = \mathbf{r}_i + \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t}(\Delta t) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2}(\Delta t)^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \mathbf{r}}{\partial t^3}(\Delta t)^3 + \dots \quad (2.36)$$

We wzorze 2.36 pierwsza pochodna położenia po czasie to prędkość, natomiast druga pochodna to przyspieszenie. Następnie zostanie wyznaczone położenie układu w czasie $t + \Delta t$.

$$\mathbf{r}_{i-1} = \mathbf{r}_i - \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t}(\Delta t) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2}(\Delta t)^2 - \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \mathbf{r}}{\partial t^3}(\Delta t)^3 + \dots \quad (2.37)$$

po czym od równania 2.36 zostanie odjęte równanie 2.37 przez co wartości położenia i pędu przyjmują wartości dyskretne.

$$\mathbf{r}_{i+1} = (2\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i-1}) + \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2}(\Delta t)^2 + \dots \quad (2.38)$$

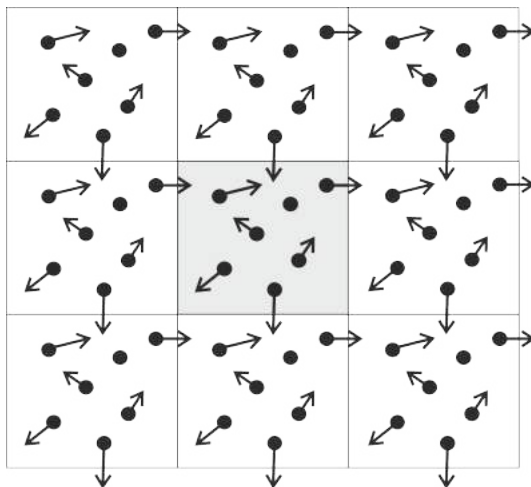
przyspieszenie można obliczyć ze wzoru 2.35. Powyższy sposób numerycznego rozwiązywania równań Newtona został nazwany algorytmem Verleta. W każdym kroku iteracji przyspieszenie cząstek w układzie powinno zostać obliczone na nowo. Dodatkowo im mniejszy krok czasowy zostanie przyjęty tym położenia atomów zostaną dokładniej obliczone [68].

Metoda MD dostarcza informacji na poziomie mikroskopowym aby wymodelować warunki makroskopowe stosuje się różne metody mechaniki statystycznej. Do kontroli temperatury i ciśnienia wykorzystywane są odpowiednio termostat i barostat. Obliczenia można prowadzić w różnych zespołach statystycznych, najbardziej rozpowszechnione są zespół kanoniczny (NVT) i izobaryczno-izotermiczny (NPT). Pierwszy zespół statystyczny przyjmuje stałą liczbę atomów (N), obliczenia prowadzone są w stałej objętości (V) i temperaturze (T). Gdy wyniki symulacji mają być porównywane z eksperymentami prowadzonymi w warunkach stałego ciśnienia i temperatury wykorzystywane są zespoły statystyczne izotermiczno-izobaryczne o stałej liczbie atomów, stałej temperaturze i przy stałym ciśnieniu (P).

Periodyczne warunki brzegowe (PBC)

Zakładamy, że do obliczeń wykorzystano realistyczny model układu otoczonego przez cząsteczki rozpuszczalnika. Przy tworzeniu modelu podaje się trzy wektory określające kształt komórki symulacyjnej, najprostszym jest kształt prostopadłościanu, rysunek 2.12. W tak utworzonej replice warunki panujące na brzegach sześciangu są нефизyczne. Aby pozbyć się нефизyczności stosuje się periodyczne warunki brzegowe, w których badany prostopadłościan

otoczony jest z każdej strony przez swoje repliki, takich replik potrzebnych do otoczenia sześcianu jest 26, por. rysunek 2.12. Następnie aby otoczyć układ drugą warstwą replik należy zużyć 96 takich samych sześcianów i tak dalej.



Rysunek 2.12: Periodyczne warunki brzegowe na przykładzie komórki symulacyjnej prostokątnej, dla uproszczenia przedstawiono tylko dwa z trzech wymiarów.

W obliczeniach dynamiki molekularnej stosuje się zwykle model quasi - periodyczne. Oznacza to, że jeżeli środek masy cząsteczki z modelu wyjdzie poza wytyczoną komórkę symulacyjną cząsteczka jest dodawana z przeciwnej strony układu, tak aby zachować stałą liczbę atomów w prowadzonej symulacji. Takie zachowanie pociąga za sobą oddziaływania dalekiego zasięgu. Aby ograniczyć te oddziaływania stosuje się parametr odcięcia (cutoff), który zwykle jest ustalany na 10-12 Å. Jeżeli dwa atomy znajdują się w odległości większej niż cutoff to oddziaływanie van der Waalsa między nimi nie jest liczone.

Narzędziem przyspieszającym obliczenia oddziaływań elektrostatycznych jest metoda sieciowych komórek Ewalda (z ang. Particle Mesh Ewald). Metoda polega na podzieleniu oddziaływań na krótko- i dalekozasięgowe. Ładunki znajdujące się w układzie traktowane są jak funkcje gausowskie. W przypadku gdy dwa ładunki znajdują się blisko siebie ich funkcje gausowskie są zliczane bezpośrednio. Natomiast do zliczeń oddziaływań dalekiego zasięgu jest używana transformata Fouriera lub przestrzeń odwrotna. W wyniku tego zabiegu obliczenia zamiast skalować się jak N^2 , skalują się jak $N \ln N$ [68].

Modele wody

Woda jest najczęstszym rozpuszczalnikiem używanym w badaniach biologicznych, posiada unikalne właściwości wynikające z możliwości tworzenia wiązań wodorowych między poszczególnymi cząsteczkami wody [70]. Istnieje wiele modeli opisujących wodę, jednakże bardzo trudno jest wymodelować wszystkie właściwości wody. Dlatego w zależności od potrzeb używa się modeli, które dobrze symulują konkretne własności wody. W niniejszej pracy został użyty model wody TIP3P (transferable intermolecular potential 3P), który jest zaimplementowany do pola siłowego CHARMM i dzięki swojej prostocie jest bardzo często używany w

symulacjach układów biologicznych [71]. Porównanie właściwości wody opisanej przez model TIP3P i eksperyment zostały zebrane w tabeli 2.3.

Tablica 2.3: Porównanie właściwości wody; zestawienie wyników uzyskanych eksperymentalnie i z modelu TIP3P [68].

	TIP3P	Eksperyment
temperatura topnienia [K]	146	273
gęstość * [g/ml]	0.98	0.997
ciepło parowania [kJ/mol]	42	44
pojemność cieplna	79	75
stała dielektryczna	94	78

* gęstość w temperaturze 298 K.

Jak wynika z tabeli 2.3, model poprawnie odtwarza gęstość, ciepło parowania i pojemność cieplną wody, natomiast nie radzi sobie z temperaturą topnienia i stałą dielektryczną. Ponadto dużą wadą modelu jest to, że nie odtwarza poprawnie radialnej funkcji rozkładu par, także napięcie powierzchniowe wody nie jest dobrze odtworzone.

Uzyskiwanie informacji z symulacji

Poprawnie przeprowadzone obliczenia metodą dynamiki molekularnej powinny zawierać następujące po sobie kroki. Pierwszy to minimalizacja energii, po nim następuje równowagowanie w zespole kanonicznym, następnie równowagowanie w docelowym zespole statystycznym, po którym następuje faza „produkcyjna” (ang. production run). Bardzo ważny jest odpowiedni dobór kroku czasowego w prowadzonej symulacji. Poprawnie dobrana wartość powinna być o rząd wielkości mniejsza niż najszybsze drgania w układzie [72], a konkretnie drgania oscylacyjne w cząsteczkach, występujące w czasie 10^{-14} do 10^{-13} s. Dlatego w symulacjach stosuje się najczęściej krok czasowy wynoszący 1 fs. Zamrożenie najszybszych drgań w badanym układzie pozwala na wydłużenie kroku czasowego do 2 fs.

Poprawność danych uzyskanych z symulacji należy zweryfikować, wykorzystując do tego metody statystyczne, jak na przykład metodę zaproponowaną przez Flyvberga i Petersena [68]. Uzyskane dane mogą służyć do porównania z wartościami eksperymentalnymi [65]. Jeżeli obie metody, eksperymentalna i obliczeniowa zgadzają się ze sobą można wykorzystać dane uzyskane z obliczeń do wyjaśnienia zjawisk w skali nano.

Przykładem informacji uzyskanej z symulacji jest radialna funkcja gęstości $g(r)$, mierząca prawdopodobieństwo napotkania zadanej cząstki w funkcji odległości. Zlicza ona liczbę zadanych molekuł w pierścieniach o przekroju Δr , w rezultacie dając informację ile razy bardziej prawdopodobne jest napotkanie danej molekuly w konkretnej odległości niż napotkanie tej molekuly w systemie, który ma jednorodny rozkład cząstek. Granica gazu doskonałego powinna dawać wartość 1 [68].

Parametr uporządkowania (S_{mol}) jest kolejną informacją, którą można uzyskać z analizy wyników symulacji MD. Można go wyliczyć ze wzoru:

$$S_{mol} = -(3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) \quad (2.39)$$

gdzie θ jest kątem między wiązaniem C-H, a normalną monowarstwy, $\langle \rangle$ oznacza średnią po czasie. Parametr jest obliczany dla wszystkich cząsteczek w układzie, a także dla każdego wiązania C-H w łańcuchu alifatycznym. Wartości parametru porządku wynoszą od zero do jeden, zero odpowiada stanowi nieuporządkowanemu, a wraz ze wzrostem wartości parametru badany układ staje się bardziej uporządkowany [73, 74, 75].

2.4 Saponiny

Saponiny są glikozydami naturalnie występującymi w roślinach, organizmach morskich i w niektórych bakteriach, pełnią funkcję antyzapalną, antybakteryjną i antywirusową [1]. Dzięki swojej amfifilowej budowie są cząsteczkami powierzchniowo czynnymi i podobnie jak mydło powodują pienienie się wody, czemu zawdzięczają swoją nazwę, gdyż słowo „sapo” po grecku znaczy mydło [76].

Ze względu na budowę części hydrofobowej - aglikonu, saponiny dzielimy na steroidowe i triterpenowe. Te pierwsze występują między innymi w owsie, papryce, bakłażanie, czosnku, nasionach pomidora oraz w żeń-szeniu. Natomiast drugie występują w roślinach strączkowych, czosnku, herbacie, szpinaku, buraku cukrowym i w słoneczniku [1]. Saponiny steroidowe posiadają silniejsze działanie hemolityczne niż saponiny triterpenowe [77, 78].

Saponiny można także podzielić ze względu na liczbę miejsc połączeń reszt cukrowych z aglikonem. Najczęściej spotykanymi saponinami są monodesmosydyczne i bidesmosydyczne. Te pierwsze posiadają jedno połączenie reszty cukrowej z aglikonem zwykle przy atomie węgla C3, natomiast drugie charakteryzują się występowaniem dwóch takich miejsc, cukry przyłączone są także do atomu węgla C26 lub C28 [4, 6]. Saponiny monodesmosydyczne wykazują trzydziestokrotnie większe działanie hemolityczne niż saponiny bidesmosydyczne [78, 79]. W części glikonowej występują następujące ugrupowania glikonowe: D-glukoza, D-galaktoza, kwas D-glukuronowy, D-fukoza, D-ksyloza, L-ramnoza, L-arabinoza [6, 4].

Saponiny znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu jak i w medycynie. Steroidowe saponiny wyizolowane z rodzaju *Yucca* są używane w przemyśle spożywczym do podniesienia jakości produktów, między innymi zapewniają utrzymanie odpowiedniej porowatości, gęstości, a także twardości wyrobów [80]. Korzenie rośliny z rodzaju *Glycyrrhiza* są używane jako substancje słodzące i wzbogacające smak potraw [81]. Saponiny wyizolowane z rośliny z rodzaju *Quillaja* są stosowane w przemyśle chemicznym jako środek pieniący i są dodawane do szamponów, past do zębów i ciekłych detergentów [82]. W przemyśle farmaceutycznym diosgenina wyizolowana z bulw rośliny *Dioscorea villosa* jest używana jako prekursor kortyzonu, progesteronu, a także pregnenolonu [83, 84].

Saponiny najczęściej kojarzone są z efektem hemolitycznym jaki wywierają na komórki ery-

trocytów. Ich toksyczność w stosunku do czerwonych krwinek jest czynnikiem limitującym ich zastosowanie w medycynie. Jednakże saponiny posiadają także wiele dobroczynnych właściwości. Saponiny wyizolowane z korzenia rośliny *Panax Ginseng* przyspieszają gojenie się ran poprzez zwiększenie migracji keratynocytów do chorobowo zmienionego obszaru [6, 85]. Saponiny triterpenowe wyizolowane z roślin *Sargentodoxa cuneata* i *Thinouia coriacea* hamują syntezę DNA i kapsydu wirusa HSV1 [2, 6]. Ponadto niektóre saponiny wykazują działanie antyzapalne, na przykład saponiny wyizolowane z *Caulophyllum thalictroides* hamują wydzielanie cytokin prozapalnych, indukowanej syntazy tlenu azotu, a także cytooksygenazy drugiej w nadnerczach mysich [3, 6].

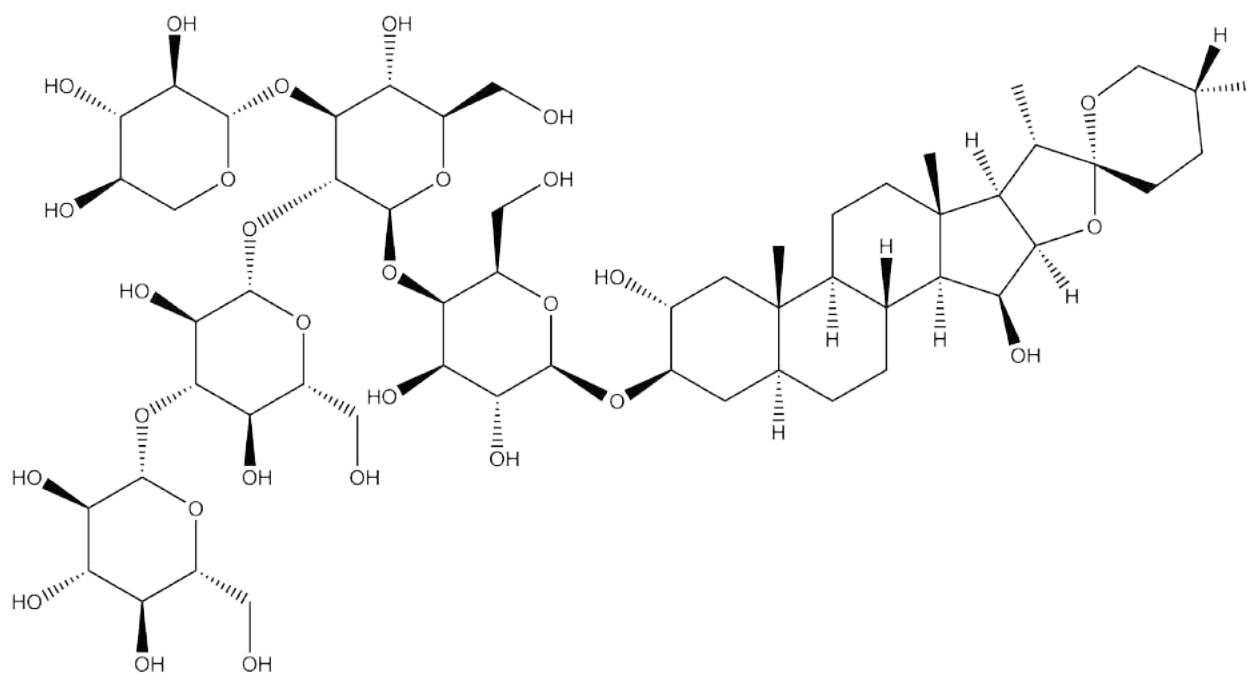
Saponiny są intensywnie badane na działanie antynowotworowe przeciwko różnym typom komórek nowotworowych. Saponiny wyizolowane z roślin z rodzaju *Astragalus* posiadają właściwości antynowotworowe przeciwko komórkom raka jelita grubego i wątrobiaka (HCC). Obniżają one poziom α -fetoproteiny występującej naturalnie w organizmie w okresie ciąży oraz w przypadku nowotworu wątroby. Hamują wzrost komórek nowotworu poprzez supresję czynnika wzrostu. Następnie prowadzą komórkę na szlak metaboliczny niezależny od ERK (kinaza regulowana czynnikami zewnętrznymi) co powoduje zwiększenie wydzielania czynnika NF- κ B (czynnik transkrypcyjny kappa B) i w konsekwencji prowadzi do programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy [86, 87]. Awicyna D, saponina z grupy saponin triterpenowych wykazuje właściwości cytotoksyczne skierowane przeciwko komórkom kostniakomięsaka, nowotworu kości. Awicyna penetrując wewnątrz komórki zaburza gospodarkę energetyczną komórki, poprzez zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej i upośledzenie oddychania komórkowego. Ponadto w obecności awicyny wpływa na supresję genów kinazy aktywowanej 5'AMP (adenozynomonofosforan), odpowiedzialnej za homeostazę energetyczną komórki, oraz zwiększa ekspresję tuberyny, która jest białkiem odpowiedzialnym między innymi za autofagię komórki [87, 88, 89, 90].

W niniejszej pracy zostanie zbadane oddziaływanie modelowych błon komórkowych z dwoma saponinami: digitoniną i ginsenozydem Rh2. Ponadto diosgenina, steroidowa saponina, o budowie bardzo zbliżonej do cholesterolu zostanie wykorzystana do badań nad rolą łańcucha alifatycznego w cząsteczce cholesterolu.

2.4.1 Digitonina

Digitonina jest steroidową saponiną naturalnie występującą w naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea*), w roślinie pełni funkcję ochronną - antybakteryjną, przeciwgrzybiczną i antywirusową [1]. Digitonina dzięki swojej amfifilowej budowie jest związkiem powierzchniowo czynnym, składa się ze spiromanowej części hydrofobowej, oraz pięciu reszt cukrowych: dwóch glukozy, dwóch galaktoz oraz ksylozy, Rys 2.13.

W roku 1909 Adolf Windaus zaproponował metodę wyznaczania ilości cholesterolu bazującą na tworzeniu osadu tworzonego przez oddziałujące ze sobą cząsteczki cholesterolu i digitoniny



Rysunek 2.13: Wzór strukturalny cząsteczki digitoniny.

[7]. Następnie metoda ta przez wiele lat służyła do szacowania ilości wolnego cholesterolu we krwi. Co więcej digitonina oddziałuje także z 3β -oksysterolem, a także alkoholami [7, 91, 92]. W naukach biomedycznych jest także wykorzystywana w terapii antynowotworowej, ze względu na jej właściwości cytotoksyczne i cytostatyczne w stosunku do chorobowo zmienionych komórek [79]. Digitonina znajduje także zastosowanie w przypadku nowotworów cechujących się wielolekoopornością. Taka terapia prowadzona jest z użyciem więcej niż jednej substancji, z których każda oddziałuje na komórkę w inny sposób. Digitonina blokuje białko posiadające kasetę wiążącą ATP (ABC transporter) w błonie komórkowej, przez co ułatwia wnikanie do komórki leków oddziałujących na jądro komórkowe i w konsekwencji powodujących apoptozę komórki nowotworowej [93].

Bardzo ważną właściwością digitoniny jest oddziaływanie z cholesterolem. Pierwszy artykuł poświęcony temu oddziaływaniu został napisany przez naukowców Rideal i Schulman, którzy pokazali nagły wzrost ciśnienia powierzchniowego monowarstwy cholesterolu po dodaniu digitoniny do subfazy. Ciśnienie początkowe wynosiło 10 mN/m, a po dodaniu digitoniny wzrosło do około 60 mN/m [9]. Niedługo po tym odkryciu Langmuir oszacował stosunek stechiometryczny cholesterolu i digitoniny na 1:0.72 [5]. W literaturze pojawiają się także doniesienia, iż stosunek stechiometryczny cholesterol-digitonina wynosi 1:1 [94, 95, 96].

Kolejnym przedmiotem badań było określenie wpływu stężenia cholesterolu oraz digitoniny na ich wzajemne oddziaływanie w błonach biologicznych. Digitonina słabiej oddziałuje z lipidami błonowymi innymi niż cholesterol i jego pochodne. Jednakże w literaturze można znaleźć informację, że w przypadku braku cholesterolu w membranie digitonina nie zmie-

nia rozmiaru liposomów, jednakże może wbudowywać się w błony liposomowe gdy stężenie saponiny będzie znacznie przekraczać CMC, a ponadto roztwór liposomowy będzie bardzo stężony. W takiej sytuacji podczas kolizji miceli digitoniny z liposomem może następować wymiana, lipid zostaje wbudowany w micelę, natomiast digitonina zostaje wbudowana w zewnętrzną błonę liposomu. Digitonina pozostaje w zewnętrznej błonie i nie wykonuje ruchów flip-flop [97]. Następnie gdy stężenie cholesterolu w błonie jest niższe niż 10 % mol digitonina wbudowując się w błonę biologiczną zwiększa jej płynność ale błona nie ulega uszkodzeniu. Powyżej stężenia 10 % mol cholesterolu w błonie tworzą się agregaty digitonina -cholesterol, które powodują powstanie asymetrii w błonie, przez co tworzone są pęknięcia, a także błona ulega poważnym uszkodzeniom, a w konsekwencji rozpuszczeniu [97].

Naukowiec Irene Schulz zbadła wpływ stężenia digitoniny na jej oddziaływanie z błoną komórkową. W niniejszej pracy zostało pokazane, że digitonina o stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tworzy pory w błonie komórkowej o średnicy 8-10 nm, przez które swobodnie migrują białka o masie do 200 kDa. Organelle wewnętrzne komórki nie zostają uszkodzone przy takim stężeniu saponiny. Digitonina wraz z błonowym cholesterolem tworzą w błonie sferyczne micelle gdzie części hydrofobowe obu cząsteczek skierowane są do wnętrza miceli, natomiast cukry na zewnątrz. Ponadto oddziałujące cząsteczki tworzą sztywne tubularne struktury. Wszystkie oddziaływania sterolu z saponiną występują we wnętrzu błony komórkowej i zostały zaobserwowane z użyciem mikroskopii elektronowej [98].

Stężenie digitoniny między 200 a 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jest przyczyną uwalniania około 50 % białek cytozolowych z komórki. Stężenie powyżej 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powoduje usunięcie pozostałych białek cytozolowych oraz rozpuszczenie lipidów i białek błonowych. Zwiększenie stężenia do 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powoduje zniszczenie organelli komórkowych takich jak lizosomy i mitochondria i w konsekwencji liżę komórek [98].

W literaturze można znaleźć wiele prób wyjaśnienia mechanizmu działania saponiny z cholesterolem błonowym [7, 8, 20, 99, 100]. Ze względu na bardzo skomplikowaną budowę błony komórkowej badania prowadzone są na uproszczonych błonach takich jak liposomy, czy monowarstwy Langmuira. Do tej pory w nauce pojawiło się wiele propozycji wyjaśnienia tego oddziaływania.

Takagi i współpracownicy badali oddziaływania digitoniny oraz jej pochodnych posiadających mniejszą część glikonową z cholesterolem oraz jego pochodnymi o różnej długości łańcucha acylowego. Naukowcy wnioskowali, że im dłuższy łańcuch alifatyczny tym oddziaływanie między digitoniną (lub jej pochodnymi) a cholesterolem (lub jego pochodnymi) mocniejsze. Ponadto łańcuch acylowy cholesterolu może poprawiać dopasowanie między częściami sterylowymi digitoniny i cholesterolu, w wyniku czego powstaje silniejsze oddziaływanie między tymi dwoma cząsteczkami. Takagi i współpracownicy zaproponowali model tworzenia klatratu: digitonina - cholesterol, w którym saponina pełni rolę gospodarza, a cholesterol rolę gościa. Siła oddziaływania międzycząsteczkowego w tym klatracie jest zależna od wzajemnego dopasowania cząsteczek [100].

Podobne wyjaśnienie oddziaływania digitoniny z cholesterolem podali Wojciechowski i współpracownicy. Badali oni monowarstwy Langmuira zbudowane z DPPC:cholesterol (10:9) i skompresowane do ciśnienia powierzchniowego 32,5 mN/m oddziałujące z digitoniną rozpuszczoną w subfazie wodnej. Naukowcy rozważali względne ułożenie cząsteczek cholesterolu i digitoniny w monowarstwie. Zaproponowali, że digitonina penetruje monowarstwę prostopadłe do jej powierzchni, ponadto saponina jest hydratowana przez około 70 cząsteczek wody i zajmuje objętość 2040 Å³. Cholesterol może zostać wyciągnięty z monowarstwy i tworzyć wraz z saponiną drugą warstwę pod powierzchnią pierwszej. Monowarstwa pozbawiona cholesterolu jest bardziej przepuszczalna i podatna na uszkodzenia. Digitonina tworzy kompleks z cholesterolem, co wynika z mniejszej powierzchni kompleksu niż cząsteczek go budujących. Kompleks ten przypomina kryształ, w którym analogicznie do pracy Takagi'ego i współpracowników digitonina pełni rolę gospodarza, a cholesterol gościa. Oddziaływania Londona stabilizujące kompleks występują między sterolami obu badanych molekuł [7].

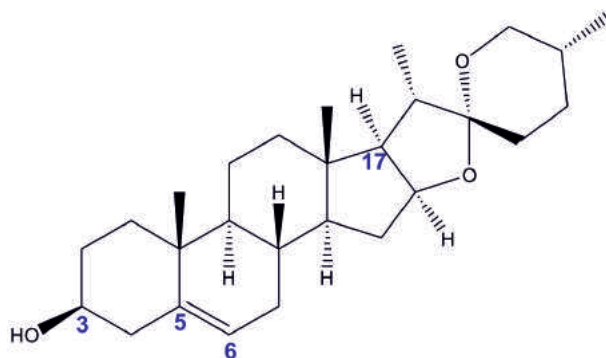
W pracy Ikhwana R. Sudji i współpracowników zostało zbadane oddziaływanie digitoniny z cholesterolem w liposomach zbudowanych z POPC/SM/cholesterol (2:2:1), POPC/cholesterol (4:1), SOPC/cholesterol (4:1). Wykonano także liposomy referencyjne nie zawierające cholesterolu zbudowane z POPC i SOPC. Naukowcy zaproponowali, że digitonina oddziałując z cholesterolem zwiększa przepuszczalność błony, tworzą się pory o średnicy większej niż 2 nm. Ponadto digitonina dodana do roztworu liposomów zawierających cholesterol początkowo powoduje zwiększenie średnicy liposomów, natomiast po pewnym czasie następuje stabilizacja lipidów w błonie i powstaje frakcja liposomów o mniejszej średnicy niż liposomy macierzyste. Jednocześnie digitonina nie oddziaływała z liposomami nie zawierającymi cholesterolu. Badacze wnioskują także, iż digitonina nie oddziałuje z fosfatydylocholiną, sfingomieliną, a także mitochondrialną kardiolipiną [78].

Badacze z Heidelberga rozpatrywali oddziaływanie digitoniny z cholesterolem w kontekście natywnej błony komórkowej. Według autorów digitonina zwiększa lepkość membrany i jest to efekt nieodwracalny, co sugeruje, że cząsteczki cholesterolu są usuwane z błony. Na skutek dodania saponiny zmienia się także mechanika błony. Nataliya Frenkel i współpracownicy odrzucają hipotezę Schulz, a tym samym wykluczają istnienie miceli powierzchniowych oraz układów tubularnych na powierzchni błony. Badania liposomowe pokazały, że w liposomach zbudowanych z SOPC i 5% lub 20% cholesterolu, cząsteczki sterolu są usuwane z liposomu przez cząsteczki saponiny. Reasumując digitonina penetruje błonę komórkową w miejscu występowania cholesterolu, następnie tworzy się kompleks digitonina - cholesterol, który jest usuwany z błony nie powodując wprost zerwania jej ciągłości ale zwiększając jej płynność i podatność na uszkodzenia [8].

Wraz z kolejnymi badaniami wiedza na temat oddziaływania digitoniny z cholesterolem staje się pełniejsza. Jednakże wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania digitoniny i cholesterolu na poziomie molekularnym nie jest rzeczą prostą. W niniejszej pracy zostanie podjęta próba pełniejszego wyjaśnienia oddziaływania między tymi związkami.

2.4.2 Diosgenina

Diosgenina naturalnie występuje w roślinach strączkowych (*Trigonella sp.*) oraz w pochrzynach (*Discorea sp.*). Saponina ta jest używana jako substrat w przemyśle farmaceutycznym do syntezy produktów steroidowych, jak na przykład kortyzonu lub progesteronu [101, 102]. Diosgenina jest steroidową saponiną, jej część hydrofobowa składa się z spirostanolu [(25R)-spirost-5-en-3 β -ol], natomiast część hydrofilową stanowi grupa hydroksylowa. Saponina ta jest strukturalnie podobna do cholesterolu. Wysoka aktywność biologiczna saponiny wynika z obecności wiązania podwójnego między piątym a szóstym atomem węgla w pierścieniu B, a także z obecności dwóch reszt cukrowych, furanozy i piranozy, dołączonych kolejno do steroidowej części saponiny [103]. Wzór strukturalny z zaznaczonymi niektórymi atomami został przedstawiony na rysunku 2.14.



Rysunek 2.14: Wzór strukturalny cząsteczki diosgeniny.

Diosgenina była intensywnie badana pod kątem oddziaływania z komórkami nowotworowymi. Działanie antynowotworowe diosgeniny wykazano w stosunku do komórek nowotworów: jelita grubego [104], piersi [105, 106], wątroby [107], kości [103], gardła oraz skóry [108]. W stosunku do komórek nowotworowych diosgenina najczęściej przyczynia się do wprowadzenia komórek na drogę apoptozy, a także blokuje cykl komórkowy między G_0/G_1 , gdzie G_0 oznacza fazę spoczynku, natomiast G_1 to faza wzrostu komórki [103, 105, 107, 108, 109, 110]. Ważną aktywnością biologiczną saponiny jest ograniczenie wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych [104, 106].

Udowodniono także, że diosgenina podnosi poziom limfocytów T regulacyjnych powodujących immunosupresję, a w rezultacie zmniejszenie stanu zapalnego w jelitach myszy z alergią pokarmową [102].

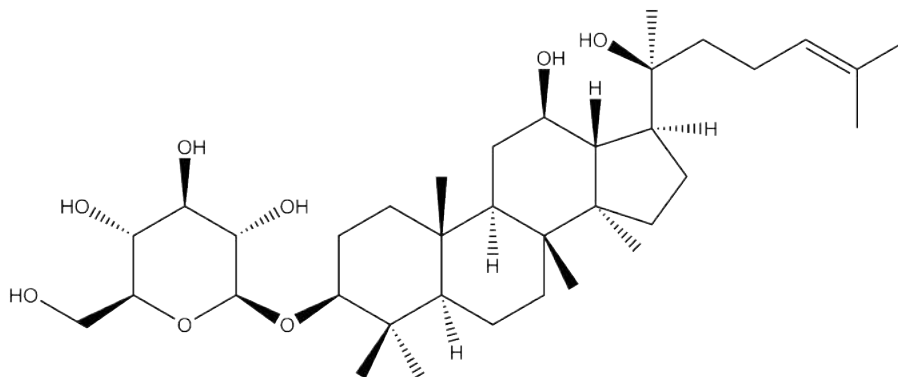
W Japonii został przeprowadzony eksperyment z wykorzystaniem grupy zdrowych Japończyków. Osobom z grupy badawczej podawano wyciąg z pochrzynu chińskiego (*Discorea batatas*) lub placebo. Eksperyment został zaplanowany jako podwójnie ślepy (double blind), badania były prowadzone naprzemiennie oraz kontrolowane poprzez użycie placebo. W wyniku przyjmowania ekstraktu z pochrzynu chińskiego bogatego w diosgeninę istotnie zwiększyły się zdolności poznawcze grupy dorosłych Japończyków [111].

Diosgenina została wybrana do badań powierzchniowych ponieważ tak samo jak cholesterol jest steroidem, ponadto tak samo jak cholesterol jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie. Jednocześnie tworzy stabilną monowarstwę na subfazie wodnej. Wyniki pomiarów izoterm diosgeniny pokazują, że cząsteczki w monowarstwie są sztywne i mają małą zdolność kompresji. Punkt załamania monowarstwy występuje przy ciśnieniu 41 mN/m [101].

2.4.3 Ginsenozyd Rh2

Żeń-szeń (*Panax ginseng*) został odkryty około pięć tysięcy lat temu i przez wieki był stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej do leczenia chorób serca. W XIX wieku został sprowadzony do Europy i był wykorzystywany do leczenia między innymi reumatyzmu, anemii i bezsenności. W 1981 roku pierwszy raz przeprowadzono badania nad działaniem żeń-szenia na komórki nowotworowe. Ważną częścią rośliny są saponiny występujące w korzeniach, liściach oraz organach generatywnych. Struktura glikozydów została określona przez grupę profesora Shibaty i nazwana Rx, gdzie indeks x zmieniał się od „a” do „h” wraz ze wzrostem hydrofobowości saponiny [112].

Ginsenozyd Rh2 jest steroidową saponiną, której aglikon jest zbudowany z dammaranu, posiadającego siedmiowęglowy łańcuch acylowy, w miejsce dwóch reszt cukrowych występujących w części acylowej digitoniny i diosgeniny. Rh2 jest monodesmosydyczną saponiną, z glikonem zbudowanym z β -D-glukopiranozydu, Rys 2.15. Ginsenozyd Rh2 charakteryzuje się



Rysunek 2.15: Wzór strukturalny cząsteczki ginsenozydu Rh2.

wysoką aktywnością biologiczną, jest używany w terapii nowotworów *in vitro*. Badania wykazały, że saponina zatrzymuje cykl komórkowy w fazie wzrostu komórki (tak zwana faza G1), przez co ogranicza wzrost i rozwój komórek nowotworowych [113]. W przypadku nowotworu skóry, saponina hamuje wzrost komórek oraz przyspiesza ich różnicowanie, a także powoduje zwiększenie wydzielania melaniny [112]. Doniesienia naukowe o ginsenozydzie Rh2 w terapii antynowotworowej najczęściej dotyczą kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy. Przykładami nowotworów wrażliwych na działanie saponiny są komórki nowotworu płuc [113], raka wątrobowokomórkowego [114], a także nowotworu piersi [115].

Ginsenozyd Rh2 ma działanie przeciwstawne do większości saponin. Saponina wbudowuje się w błonę komórki zwiększając upakowanie zarówno łańcuchów hydrofobowych jak i głów polarnych. Badania wykazały, że ginsenozyd Rh2 jest mniej cytotoksyczny względem komórek o mniejszej zawartości cholesterolu [11].

3.1 Materiały

W niniejszej pracy do badań laboratoryjnych zostały wykorzystane następujące lipidy błonowe:

- cholesterol (chol) o czystości > 99%, Sigma-Aldrich;
- 1-palmityno-2-oleinofosfatydylocholina (POPC) o czystości > 99%, Avanti Polar Lipids;
- fosfatydylocholina jaja kurzego (ePC) o czystości 95%, Avanti Polar Lipids;
- sfingomielin jaja kurzego (SM) o czystości > 99%, Avanti Polar Lipids;

Saponiny:

- digitonina (dig) o czystości 66%, Sigma-Aldrich;
- diosgenina (dios) o czystości 93%, Avanti Polar Lipids;
- Ginsenozyd Rh2 (Rh2) o czystości >97%, Sigma-Aldrich;

Barwniki fluorescencyjne:

- 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien (DPH) o czystości 98%, Sigma-Aldrich;
- 6-Dodekanoilo-N,N-dimetylo-2-aminonaftalen (Laurdan) o czystości > 97%, Invitrogen;
- kalceina o czystości $\geq$ 96%, Sigma-Aldrich;
- 1,2-dipalmitynofosfatydyloetanolamino-N-(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazol-4-yl) (NBD-PE) o czystości > 99%, Avanti Polar Lipids;
- rodamina-1,2-dioleoinofosfatydyloetanolamina (Rho-DOPE) o czystości > 99%, Avanti Polar Lipids;

Rozpuszczalniki organiczne:

- chloroform spektralnie czysty, o czystości >99,8%, Avanti Polar Lipids;

- metanol spektralnie czysty, o czystości $>99,9\%$, Sigma-Aldrich;
- chloroform cz.d.a o czystości $\geq 98,5\%$, Chempur;
- metanol cz.d.a o czystości $\geq 99,8\%$, POCh;
- etanol cz.d.a o czystości 96% , POCh;
- dimetylosulfotlenek (DMSO), Sigma-Aldrich;

Rozpuszczalniki nieorganiczne:

- woda o czystości MiliQ;

Pozostałe:

- Tris HCl, Sigma-Aldrich;
- NaCl, Sigma-Aldrich;
- Sephadex-G50, Sigma-Aldrich;

W preparatyce roztworów zostały użyte rozpuszczalniki organiczne o czystości spektralnej (chloroform, metanol). W roztworach wodnych wykorzystywano ultra czystą wodę (MiliQ). Natomiast w preparatyce liposomów został użyty bufor sporządzony z 10 mM roztworu wodnego Tris HCl o pH 7,4. Zadane pH otrzymano dodając do buforu roztwór NaOH. Sephadex-G50 został użyty do utworzenia kolumny chromatograficznej służącej do usunięcia kalceiny znajdującej się na zewnątrz liposomów. Odczynniki o czystości cz.d.a zostały użyte do czyszczenia wagi Langmuira.

3.2 Metody

3.2.1 Monowarstwy Langmuira

Szczegóły eksperymentalne

Do wykonania pomiarów monowarstw Langmuira została użyta waga Langmuira KSV model 2000 (KSV Instruments, Helsinki). Ciśnienie powierzchniowe zostało zmierzone z wykorzystaniem metody Wilhelmiego i płytki platynowej. Potencjał powierzchniowy zmierzono z wykorzystaniem techniki wibrującej elektrody wyprodukowanej przez KSV Spot 1 (KSV Instruments, Helsinki). Wanienska używana do pomiarów była wykonana z teflonu, natomiast hydrifilowe barierki zostały wykonane z derlinu. Kompresja była prowadzona symetrycznie z dwóch stron.

Przed każdym pomiarem korytko było czyszczone z wykorzystaniem chloroformu i metanolu.

Platynowa płytką była czyszczona etanolem i następnie wyprażana w płomieniu palnika. Po wypełnieniu wanny subfazą jej powierzchnia była czyszczona aż do uzyskania ciśnienia powierzchniowego mniejszego niż 0,2 mN/m. Pomiary były prowadzone w stałej temperaturze 20°C (termostat firmy Lauda, model Re 104) i pod ciśnieniem atmosferycznym. Po wyczyszczeniu powierzchni sygnał potencjału był stabilizowany i następnie zerowany. Zadana ilość substancji była odmierzana z wykorzystaniem strzykawki Hamiltona. Na wyczyszczoną powierzchnię nakładano związek rozpuszczony w chloroformie. Pomiar rozpoczynał się po 10 min od nałożenia roztworu. Bariere były ściskane z prędkością 2,5 mm/min lub 5 mm/min. Subfazę stanowiła ultra czysta woda (miliQ), lub wodny roztwór digitoniny o stężeniu 80 µg/ml. Pomiar ciśnienia powierzchniowego odbywał się z dokładnością $\pm 0,2$ mN/m, potencjału powierzchniowego $\pm 0,01$ V, zaś powierzchni przypadającej na cząsteczkę w filmie monomolekularnym z dokładnością $\pm 0,5$ Å². Temperaturę subfazy była wyznaczana z dokładnością 0,1°C

Izotermy adsorpcji

Pomiary izoterm adsorpcji były prowadzone w teflonowej zlewce, do której odmierzano 20 ml wody o czystości MiliQ. Na początku na powierzchnię subfazy nakładany był roztwór lipidu, następnie po odparowaniu rozpuszczalnika, spod filmu odciągany był 1 ml wody, i nastrzykiwany 1 ml roztworu digitoniny o stężeniu 1.6 mg/ml, w celu otrzymania stężenia końcowego 65 µM (80 µg/ml). Izotermę rejestrowano przez 5000 s.

3.2.2 Liposomy

Preparatyka dużych liposomów jednowarstwowych (LUV)

Do przygotowania LUV wykorzystano metodę ekstruzji liposomów wielowarstwowych (Multilamellar Vesicles, MLV) [118]. Odpowiednią ilość lipidów odmierzano z wykorzystaniem strzykawki Hamiltona i umieszczano w kolbie okrągłodennej. Następnie dodawano 60 µl mieszaniny chloroform-metanol (1:1). Rozpuszczalnik był odparowywany w wyparce obrotowej (model R Buchi Re-111, Buchi, Flawil, Szwajcaria) przez 10 min, a następnie kolbę umieszczano w eksykatorze i inkubowano przez noc. Do suchego filmu lipidowego dodawano 10 mM buforu Tris HCl zawierającego 150 mM NaCl, pH buforu wynosiło 7,4. Następnie prowadzono 5 cykli zamrażania roztworu w suchym lodzie, i następującego po nim ogrzewania do temperatury 37°C i wytrząsania. W rezultacie otrzymywano roztwór z liposomami wielowarstwowymi, który następnie przeciskano przez ekstruder (Avanti Mini Extruder) wyposażony w filtry o średnicy porów 100 nm (Nucleopore Track-Etch Membrane). Następnie aby zweryfikować średnicę wytworzonych liposomów wykonywano pomiar metodą DLS. Kontrolowano także stężenie fosfolipidów w roztworze z liposomami poprzez analizę ilości fosforu w próbce [119].

Preparatyka ogromnych liposomów jednowarstwowych (GUV)

GUV zostały wytworzone metodą elektroformacji [120, 121]. W elektroformacji wykorzy-

stuje się komorę składającą się z dwóch szkiełek pokrytych z jednej strony tlenkiem cyny indu (ITO), pomiędzy szkiełka jest wsadzona silikonowa uszczelka. Na wewnętrzną stronę szkiełka (pokrytą ITO) nakłada się film lipidowy zawierający sondy fluorescencyjne. W procesie tworzenia GUV wykorzystywano dwie sondy fluorescencyjne. Pierwsza, Rho-DOPE była dodawana w stosunku molowym 1:1000 (znacznik fluorescencyjny: próbka). Długość fali wzbudzenia Rho-DOPE wynosiła 560 nm, natomiast długość emitowanej fali wynosiła 589 nm. Drugim znacznikiem fluorescencyjnym był NBD-PE, dodawany w stosunku molowym 1:200 (znacznik fluorescencyjny : próbka). Długość fali wzbudzenia NBD-PE wynosiła 463 nm, natomiast emisja zachodziła przy długości fali równej 536 nm. Następnie po odparowaniu rozpuszczalnika komora wypełniana była 0,2 M roztworem sacharozy. Tak przygotowana szczelnie zamknięta komora umieszczana jest w temperaturze 60° i podpinana jest do prądu sinusoidalnie zmiennego o napięciu 1 V na dwie godziny.

Inkubacja z saponinami

Wpływ działania saponin na modelowe błony biologiczne został określony poprzez wykonanie różnorodnych eksperymentów na liposmach. Każdy z tych eksperymentów został poprzedzony inkubacją roztworu liposomów z wybraną saponiną o odpowiednim stężeniu.

W przypadku Rh2 dodawano dwa różne stężenia, aby końcowe stężenie ginsenozydu wynosiło: 5 μM lub 10 μM . Natomiast w przypadku digitoniny próbkę inkubowano w stężeniach 32.5 μM (40 $\mu\text{g/ml}$) i 65 μM (80 $\mu\text{g/ml}$).

DLS i spektroskopia

Pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS) na liposmach wykonywano na urządzeniu Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd, Worecestershire, Wielka Brytania) wyposażonego w laser helowo-neonowy. Detektor był umieszczony pod kątem 173° w stosunku do światła padającego. Dane były zbierane z wykorzystaniem modułu analizy rozkładu rozmiaru.

Do pomiaru upakowania lipidów w błonie wykorzystywano spektrofotometr luminescencyjny Perkin-Elmer LS55, który był połączony z termostatem. W pomiarach były używane próbki liposomów, w których stężenie lipidów wynosiło 5 μM . Jako pozytywna kontrola został wykorzystany 2% Triton X-100, natomiast negatywną kontrolę stanowiło DMSO.

Znaczniki fluorescencyjne: Laurdan, DPH

W zależności od potrzeb używane były znaczniki fluorescencyjne zestawione w tabeli 3.1.

3.2.3 Mikroskopia fluorescencyjna

Do badań fluorescencji GUV został użyty mikroskop konfokalny Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy), z obiektywem o powiększeniu 40x/0.75 (Zeiss EC Plan-Neofluar). Obraz był rejestrowany z wykorzystaniem kamery Nikon digital sight DS-5 M (Nikon, Tokio, Japonia).

Do roztworu GUV dodawano roztwór 0.2 M glukozy Tris HCl, a także saponiny, następnie inkubowano 5 min.

3.2.4 Statyczne obliczenia kwantowo-chemiczne

Obliczenia kwantowo-chemiczne były prowadzone w Akademickim Centrum Komputerowym CYFRONET AGH - na komputerach Zeus oraz Prometheus. Do obliczeń z użyciem formalizmu DFT wykorzystywano program Gaussian 09.D01 [67]. Badania *in silico* prowadzono z użyciem metod Hartree-Focka [124] i teorii funkcjonału gęstości. Obliczenia DFT wykonywano przy użyciu funkcjonału korelacyjno-wymennego B3LYP [125], z uwzględnieniem poprawki dyspersyjnej D3 [126]. Obliczenia były prowadzone w bazach 6-31G(d) [127] oraz 6-311G(d,p) [128]. Błąd superpozycji bazy (BSSE) został wyeliminowany przez użycie poprawki „Counterpoise” zaproponowanej przez Boys’a i Bernardiego [129].

Funkcja falowa otrzymana z obliczeń DFT/B3LYP/6-311G(d,p) w programie Gaussian została użyta do wyznaczenia międzycząsteczkowych punktów krytycznych. Do określenia BCP wykorzystano program AIMALL wersja 17.01.25 [130].

3.2.5 Klasyczna dynamika molekularna

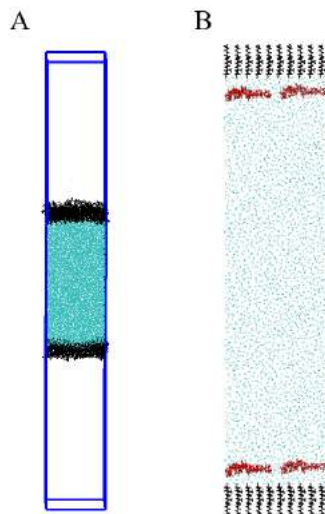
Przygotowanie układu

Układy do obliczeń MD zostały przygotowane według następującego schematu. Na początku optymalizowano geometrię cząsteczek (HF/6-31G(d)). Brakujące parametry pola siłowego obliczono za pomocą narzędzia „force field toolkit” (ffTK) [131] zaimplementowanego w programie VMD [132]. Następnie optymalne struktury zostały użyte do budowy układu składającego się z dwóch monowarstw oddzielonych od siebie taflą wody o wysokości przynajmniej 100 Å, por. rysunek 3.1. Saponiny zostały umieszczone około 3 Å pod powierzchnią monowarstwy. W symulacjach MD pod monowarstwą zostało umieszczone 8 cząsteczek digitoniny, rysunek 3.1 B. Monowarstwy cholesterolu zostały zbudowane ze 100 cząsteczek lipidu każda, warstwa wodna zawierała około 45 tysięcy cząsteczek wody. Natomiast monowarstwy wieloskładnikowe (POPC/SM i POPC/SM/CHOL) zostały zbudowane ze 106 cząsteczek i oddzielone ponad 32 tysiącami cząsteczek wody.

Szczegóły obliczeniowe

Obliczenia były prowadzone w Akademickim Centrum Komputerowym CYFRONET AGH - na komputerze Prometheus. Do obliczeń używano pakietu NAMD2 [133] wykorzystującego pole siłowe CHARMM36 [134]. Do symulacji cząsteczek wody wykorzystano model TIP3P [135]. W obliczeniach zostały użyte trójwymiarowe periodyczne warunki brzegowe. Aby uniknąć oddziaływania między sąsiednimi replikami na osi z, repliki oddzielono 170 Å próżni, rysunek 3.1 A.

Na początku przeprowadzono wstępną minimalizację energii układu, następnie przeprowadzono wstępne równowagowanie układu w zespole kanonicznym, po czym równowagowanie



Rysunek 3.1: **A:** Komórka symulacyjna, **B:** schematyczny rysunek monowarstwy z umieszczonymi w subfazie wodnej cząsteczkami digitoniny. Na czarno zaznaczono monowarstwy, na czerwono cząsteczki digitoniny, na niebiesko taflę wodną.

w docelowym zespole statystycznym i na końcu następował cykl produkcyjny obliczeń wynoszący 60 ns, prowadzony w dwóch różnych zespołach statystycznych:

- stała liczba cząstek (N), stała temperatura (T), stałe ciśnienie normalne (p_N) oraz stałe napięcie powierzchniowe (γ): $NTp_n\gamma$
- stała liczba cząstek (N), stała temperatura (T), stałe ciśnienie normalne (p_n) oraz stała powierzchnia (A): NTp_nA

Oddziaływania elektrostatyczne były uwzględnione stosując technikę Ewalda. Promień odcięcia oddziaływań van der Waalsa wynosił 12 Å. Zastosowano także funkcję wygładzania od odległości 10 Å. Temperatura była stała i wynosiła 293 K, ciśnienie wynosiło 1.01325 bar (1 atmosfera). W przypadku układów statystycznych $NTp_n\gamma$, γ wynosiło 35, 45 lub 55 mN/m. Natomiast układy modelowane w zależności od powierzchni przyjmowały wartości A równe 45 Å²/cząsteczkę. Dynamika Langevina została zastosowana do kontroli temperatury w układzie, z parametrem tłumienia ustawionym na 5 ps. Zastosowano także zmodyfikowany tłok Nose-Hoovera Langevina [136]

Wyniki były wizualizowane i analizowane w programie VMD [132].

Saponiny silnie oddziałują ze sterolami [7, 20, 78]. W celu dokładnego poznania mechanizmu oddziaływania digitoniny, a także ginsenozydu Rh2 ze sterolami wykonano obliczenia *in silico*, a także badania eksperymentalne.

Wyniki zostaną podzielone na trzy części. W pierwszej zostaną zaprezentowane wyniki dotyczące oddziaływania cholesterolu z digitoniną. W drugiej części zostaną zaprezentowane wyniki dotyczące oddziaływania digitoniny oraz ginsenozydu Rh2 z liposomami utworzonymi z równomolowych mieszanin lipidowych, a konkretnie:

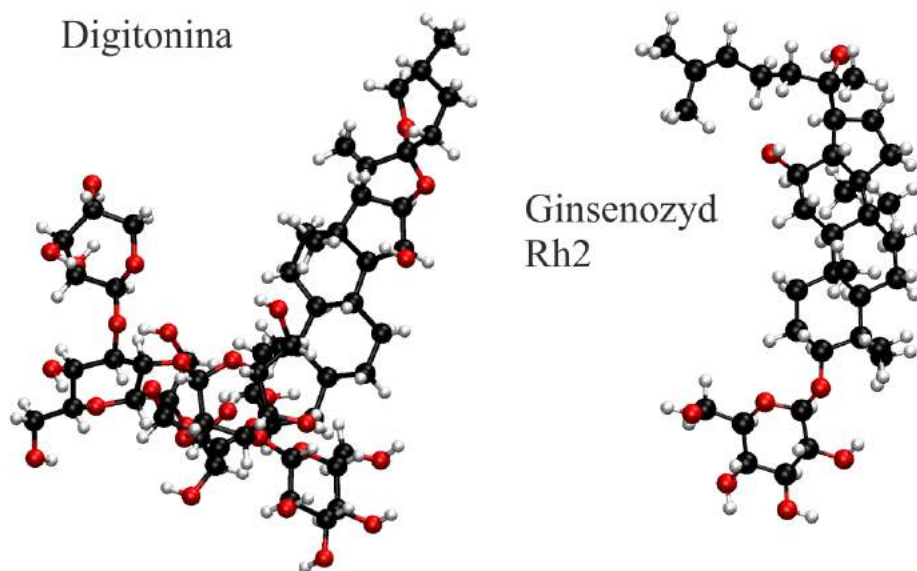
- ePC / SM
- ePC / SM / cholesterol

Na końcu zostanie omówione oddziaływanie digitoniny z monowarstwami zbudowanymi z POPC/SM oraz POPC/SM/chol.

4.1 Przygotowanie dynamiki

Oddziaływanie cząsteczek saponiny w szczególności digitoniny z cholesterolem jest przedmiotem badań wielu laboratoriów na świecie. Powstał cały szereg teorii dotyczących tego oddziaływania [7, 8, 99, 100], jednakże mechanizm oddziaływania tych dwóch cząsteczek nie został dobrze poznany. W niniejszej pracy oprócz badań nad oddziaływaniem digitoniny z modelowymi błonami biologicznymi wykonano także badania z wykorzystaniem drugiej saponiny: ginsenozydu Rh2.

Pracę nad obliczeniami z wykorzystaniem metod klasycznej dynamiki molekularnej rozpoczęto od zoptymalizowania geometrii saponin: digitoniny i ginsenozydu Rh2 używanych w badaniach ich oddziaływań z modelową błoną biologiczną. Obie saponiny zaliczane są do steroidowych saponin, jednakże mają różną zarówno część aglikonową, jak i glikonową. Część hydrofobową digitoniny stanowi spirostan, natomiast ginsenozydu Rh2 furostan. Digitonina w swojej części cukrowej posiada pięć reszt cukrowych, natomiast druga saponina tylko jedną resztę. Optymalizację przeprowadzono z użyciem programu Gaussian 09. Wykorzystano metodę Hatree-Focka w bazie 6-31G(d). Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane na rysunku 4.1.



Rysunek 4.1: Struktury digitoniny [20] oraz ginsenozydu Rh2 po optymalizacji metodą HF w bazie 6-31G(d).

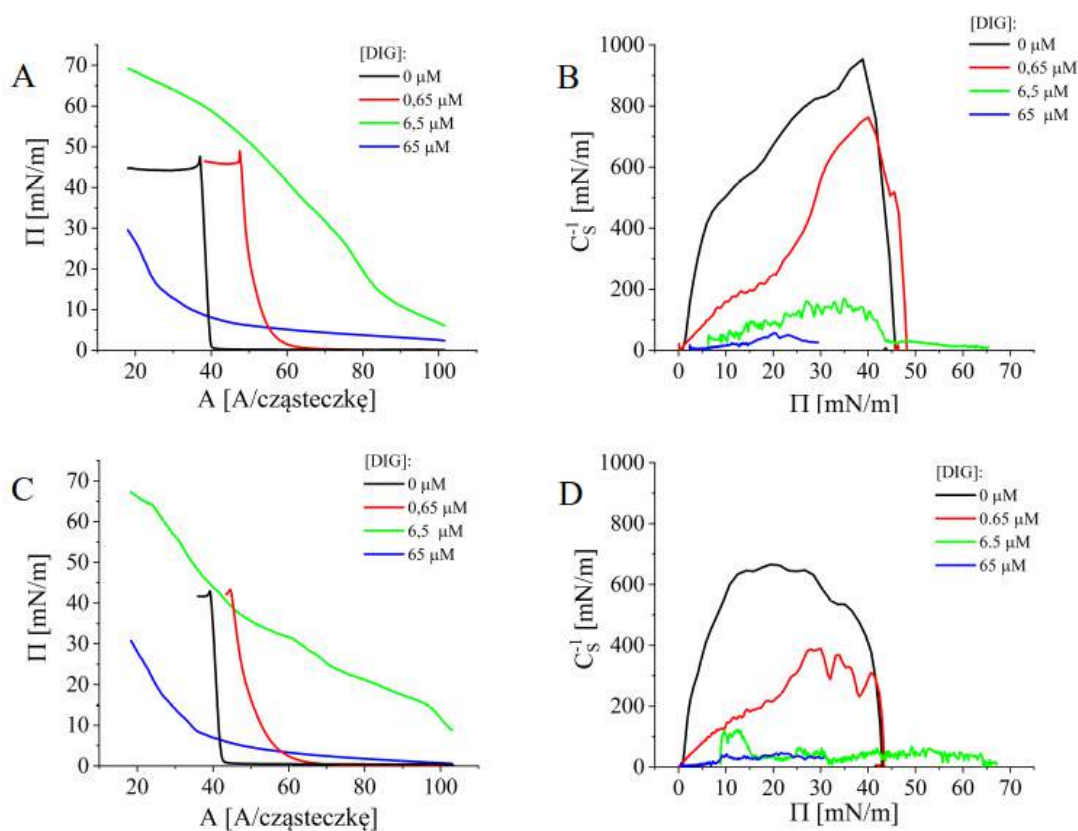
Na optymalnych geometriach zostały wyznaczone objętości cząsteczkowe zdefiniowane jako objętość zawarta w izopowierzchni o wartości 0.001 elektronu/Bohr³. Dla digitoniny wartość ta wynosiła 4435 Å³ [20], natomiast dla ginsenozydu Rh2 zaledwie 2695 Å³. Wyniki są zgodne z oczekiwaniami gdyż digitonina jest cząsteczką znacznie większą od ginsenozydu Rh2. Tak zoptymalizowane cząsteczki zostały użyte do badania ich oddziaływania z monowarstwami stanowiącymi modele błon komórkowych.

4.2 Oddziaływanie monowarstw cholesterolu i diosgeniny z digitoniną

W niniejszej części zostaną przedstawione wyniki badań nad oddziaływaniem digitoniny z monowarstwami cholesterolu i diosgeniny. Diosgenina jest strukturalnie bardzo podobna do cholesterolu, różni się jedynie występowaniem dwóch reszt cukrowych w miejsce łańcucha acylowego cholesterolu. Dzięki porównaniu wpływu digitoniny na monowarstwy składające się z tych dwóch związków będzie możliwe określenie roli łańcucha alifatycznego cholesterolu w oddziaływaniach z digitoniną. Zostaną zaprezentowane zarówno pomiary eksperymentalne - techniką nierozpuszczalnych monowarstw Langmuira, jak i modelowanie *in silico* metodą klasycznej dynamiki molekularnej. Ponadto zostaną scharakteryzowane oddziaływania między cząsteczkami digitoniny i cholesterolu, a także digitoniny i diosgeniny za pomocą metod chemii kwantowej.

4.2.1 Izotermy ciśnienia powierzchniowego Π – A

Zarówno cholesterol jak i diosgenina są związkami amfifilowymi, praktycznie nie rozpuszczalnymi w wodzie, dzięki temu cząsteczki na powierzchni wody tworzą nierozpuszczalne monowarstwy. W niniejszej pracy zostały zarejestrowane izotermy ciśnienia powierzchniowego monowarstw cholesterolu i diosgeniny na subfazie wodnej oraz wodnym roztworze digitoniny. Badania nad oddziaływaniem digitoniny z cholesterolom rozpoczęto od eksperymentalnego zbadania monowarstw cholesterolu na wodnym roztworze digitoniny o stężeniu: $65 \mu\text{M}$, $6,5 \mu\text{M}$, $0,65 \mu\text{M}$. Analogicznie badania wykonano dla diosgeniny. Na rysunku 4.2 zostały zaprezentowane izotermy Π – A zarejestrowane dla cholesterolu i diosgeniny na wodzie i na wodnym roztworze digitoniny, w 20°C i pod ciśnieniem atmosferycznym.



Rysunek 4.2: Izotermy Π – A i obliczone dla nich współczynniki ścisłości uzyskane dla cholesterolu (A i B) oraz diosgeniny (C i D).

Zarejestrowana izoterma Π - A monowarstwy cholesterolu na subfazie wodnej ukazuje, że cząsteczki cholesterolu tworzą na subfazie wodnej stabilną monowarstwę. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono charakterystyczne parametry w punkcie załamania monowarstwy: punkt załamania monowarstwy występował przy ciśnieniu powierzchniowym równym $45,5 \text{ mN/m}$ oraz powierzchni $37,4 \text{ \AA}^2/\text{cząsteczkę}$ (por. tabela 4.1). Wyznaczono współczynnik

ściśliwości monowarstwy wynoszący 953 mN/m, wartość ta sugeruje, że cząsteczki w monowarstwie znajdowały się między stanem ciekłym skondensowanym, a stanem stałym.

Izoterma cholesterolu zarejestrowana na subfazie zawierającej niskie stężenie digitoniny (0,65 μM) przesuwają się w kierunku wyższych powierzchni cząsteczkowych, co świadczy o oddziaływaniu cząsteczek digitoniny z subfazy z cząsteczkami cholesterolu tworzącymi film na powierzchni. Otrzymana w tym pomiarze monowarstwa charakteryzuje się występowaniem punktu załamania przy $\Pi = 44,0$ mN/m oraz powierzchni cząsteczkowej 48,2 $\text{\AA}^2$; parametry zostały zebrane w tabeli 4.1. Monowarstwa cholesterolu na subfazie zawierającej bardzo niskie stężenie digitoniny ma także charakter pośredni między stanem ciekłym skondensowanym a stanem stałym.

Gdy stężenie digitoniny w subfazie zostało zwiększone do 6,5 μM następowała gwałtowna adsorpcja digitoniny do monowarstwy cholesterolu, o czym świadczy wysokie ciśnienie powierzchniowe zarejestrowane na początku pomiaru. W przypadku gdy stężenie digitoniny w układzie wynosiło 6,5 μM obserwowano ciągły wzrost ciśnienia powierzchniowego podczas ściskania monowarstwy. Jednocześnie brak punktu załamania monowarstwy jak również bardzo niska średnia powierzchnia przypadająca na cząsteczkę może sugerować, że digitonina adsorbując i penetrując monowarstwę bardzo zaburza uporządkowanie cząsteczek w monowarstwie. Wyznaczony maksymalny współczynnik ściśliwości wynoszący 167,8 mN/m świadczy o tym, że monowarstwa miała charakter stanu ciekłego skondensowanego. Ponadto gdy ciśnienie powierzchniowe było wyższe niż 44 mN/m wartość współczynnika ściśliwości wynosiła zaledwie 25,8 mN/m co charakteryzuje monowarstwę znajdującą się w stanie ciekłym rozprężonym. Spadek współczynnika ściśliwości od wartości 167,8 mN/m do 25,8 mN/m oznacza, że podczas ściskania zmienił się stan fizyczny monowarstwy cząsteczki na początku pomiaru były mocno upakowane i monowarstwa znajdowała się w stanie ciekłym skondensowanym. Natomiast podczas ściskania cząsteczki w filmie były mocno destabilizowane przez obecną w subfazie digitoninę co w konsekwencji doprowadziło do rozluźnienia oddziaływań międzycząsteczkowych w monowarstwie i zmianę charakteru warstwy monomolekularnej do stanu ciekłego rozprężonego.

Tablica 4.1: Parametry charakterystyczne monowarstw.

[DIG]	Cholesterol				Diosgenina			
	0 μM	0,65 μM	6,5 μM	65 μM	0 μM	0,65 μM	6,5 μM	65 μM
C_{Smax}^{-1} [mN/m]	953,0	762,3	167,8	57,4	675,2	389,6	116,3	35,9
Π_{coll} [mN/m]	45,5	44,0	-	-	40,2	40,6	-	-
A_{coll} [$\text{\AA}^2/\text{cz}$]	37,4	48,2	-	-	40,1	45,3	-	-

Izoterma Π -A uzyskana dla monowarstwy na subfazie zawierającej digitoninę o stężeniu 65 μM została zarejestrowana w inny sposób niż pozostałe. Na początku wykonano dwa cykle histerezy do ciśnienia 30 mN/m, a następnie zarejestrowano zamieszczoną na rysunku 4.2

izotermę. Postąpiono tak dlatego, że izotermy rejestrowane zaraz po nałożeniu próbki charakteryzowały się brakiem powtarzalności, a także adsorpcja digitoniny do monowarstwy była bardzo nagła i chaotyczna. Natomiast gdy cząsteczki zostały wstępnie uporządkowane otrzymane izotermy stawały się bardziej powtarzalne. We wszystkich zbadanych filmach lipidowych znajdujących się na powierzchni subfazy roztworu digitoniny nie występował punkt załamania monowarstwy, także ciśnienie powierzchniowe monowarstwy wzrastało do wartości nieznacznie przekraczającej 30 mN/m przy bardzo niskich powierzchniach cząsteczkowych. Takie zachowanie układu świadczy o destabilizującym działaniu digitoniny na cząsteczki cholesterolu. Również bardzo niski współczynnik ściśliwości wynoszący zaledwie 57,4 mN/m pokazuje, że badana monowarstwa znajdowała się w stanie między ciekłym rozprężonym, a ciekłym skondensowanym.

Izotermy zarejestrowane dla monowarstwy diosgeniny na subfazie wodnej oraz wodnym roztworze digitoniny są bardzo podobne do izoterm uzyskanych dla cholesterolu. Diosgenina jest związkiem bardzo słabo rozpuszczalnym w wodzie. Podobnie jak cholesterol tworzy na powierzchni wody stabilną monowarstwę, dla której zostały wyznaczone parametry charakterystyczne: punkt załamania monowarstwy występował przy ciśnieniu powierzchniowym równym 40,2 mN/m co odpowiadało powierzchni 40,1 Å²/cząsteczkę. Wyznaczony współczynnik ściśliwości wynosił 675,2 mN/m, co wskazywało, że monowarstwa ta podobnie jak cholesterol miała charakter pośredni między stanem ciekłym skondensowanym, a stanem stałym. Otrzymane wyniki uzyskane na subfazie wodnej są analogiczne do wyników Hao i współpracowników [101].

Diosgenina tworzy także stabilną monowarstwę na subfazie o bardzo niskim stężeniu digitoniny (0,65 μM). Izoterma II-A jest przesunięta względem izoterm diosgeniny na subfazie wodnej w stronę wyższych powierzchni cząsteczkowych. Monowarstwa charakteryzuje się występowaniem punktu załamania przy ciśnieniu powierzchniowym 40,6 mN/m oraz odpowiadającej mu powierzchni 45,3 Å²/cząsteczkę. Wyznaczony maksymalny współczynnik ściśliwości dla monowarstwy wynosił 389,6 mN/m co odpowiadało stanowi pośredniemu między ciekłym skondensowanym, a stanem stałym. Izoterma diosgeniny na wodnym roztworze digitoniny o stężeniu równym 0,65 μM charakteryzuje się mniejszym przesunięciem w stronę większych powierzchni cząsteczkowych i jednocześnie przebieg izoterm diosgeniny jest inny niż analogicznej izoterm cholesterolu.

Podobnie jak cholesterol, diosgenina nie tworzy stabilnych monowarstw na subfazach zawierających wyższe stężenia digitoniny. W przypadku stężenia 6,5 μM obserwuje się natychmiastowy wzrost ciśnienia powierzchniowego, nie występuje punkt załamania monowarstwy oraz ciśnienie wzrasta podczas całego pomiaru. Takie zachowanie monowarstwy może świadczyć o dużym powinowactwie cząsteczek digitoniny do cząsteczek budujących monowarstwę. Prawdopodobnie cząsteczki digitoniny adsorbują i penetrują do membrany. Ciekawe jest zachowanie monowarstwy podczas ściskania, gdyż na początku pomiaru (obszary dużych powierzchni cząsteczkowych) jak wynika z wyliczonego współczynnika ściśliwości monowar-

stwa ma charakter stanu ciekłego skondensowanego ($C_{Smax}=116,3$ mN/m), następnie podczas dalszej kompresji monowarstwy współczynnik ściśliwości maleje do wartości zaledwie 55,0 mN/m, który odpowiada stanowi pośredniemu między stanem ciekłym rozprężonym, a ciekłym skondensowanym. Takie zachowanie monowarstwy świadczy o niezwykle silnym oddziaływaniu digitoniny z cząsteczkami diosgeniny w monowarstwie, oraz o zmniejszeniu uporządkowania cząsteczek podczas ściskania monowarstwy. Jest to zachowanie analogiczne do tego obserwowanego w przypadku monowarstwy cholesterolu.

Podobnie jak w przypadku monowarstwy cholesterolu, monowarstwa diosgeniny na subfazie wodnego roztworu digitoniny o stężeniu $65 \mu\text{M}$ również została poddana na początku dwóm cyklom histerezy wymuszającej wstępne uporządkowanie cząsteczek w monowarstwie, a następnie została zarejestrowana izoterma przedstawiona na rysunku 4.2. Takie postępowanie sprawiło, że izotermy Π -A zarejestrowane na subfazie o stężeniu digitoniny $65 \mu\text{M}$ były bardziej powtarzalne. W przypadku monowarstwy diosgeniny ciśnienie powierzchniowe nie wzrasta bezpośrednio na początku pomiaru, ale dopiero przy powierzchni cząsteczkowej wynoszącej około $96 \text{ \AA}^2$. Wzrost Π jest powolny i monowarstwa osiąga ciśnienie powierzchniowe równe 32 mN/m. Monowarstwa jest mocno destabilizowana przez obecne w subfazie cząsteczki digitoniny o czym świadczy brak punktu załamania monowarstwy oraz bardzo niski współczynnik ściśliwości wynoszący jedynie 35,9 mN/m, co jest charakterystyczne dla monowarstwy znajdującej się w stanie ciekłym rozprężonym.

Mimo podobnej budowy cząsteczek cholesterolu i diosgeniny, monowarstwa cholesterolu na subfazie wodnej oraz na wodnym roztworze digitoniny charakteryzuje się wyższymi parametrami współczynnika ściśliwości oraz wartości ciśnienia powierzchniowego przy którym następuje załamanie monowarstwy. Jednocześnie załamanie monowarstwy cholesterolu występuje przy niższych powierzchniach cząsteczkowych niż analogicznych monowarstw diosgeniny. Takie zachowanie świadczy o większej zdolności upakowania cząsteczek cholesterolu niż diosgeniny w monowarstwie. Ponadto cholesterol mocniej oddziałuje z digitoniną występującą w niskim stężeniu niż diosgeniną, o czym świadczy większe względne przesunięcie izotermy w stronę wyższych wartości powierzchni cząsteczkowej w stosunku do izoterm rejestrowanych na subfazie wodnej. W przypadku gdy subfazę stanowił roztwór o wyższym stężeniu digitoniny obie monowarstwy, cholesterolu i diosgeniny, były bardzo mocno destabilizowane przez obecną w subfazie digitoninę.

4.2.2 Modelowanie MD

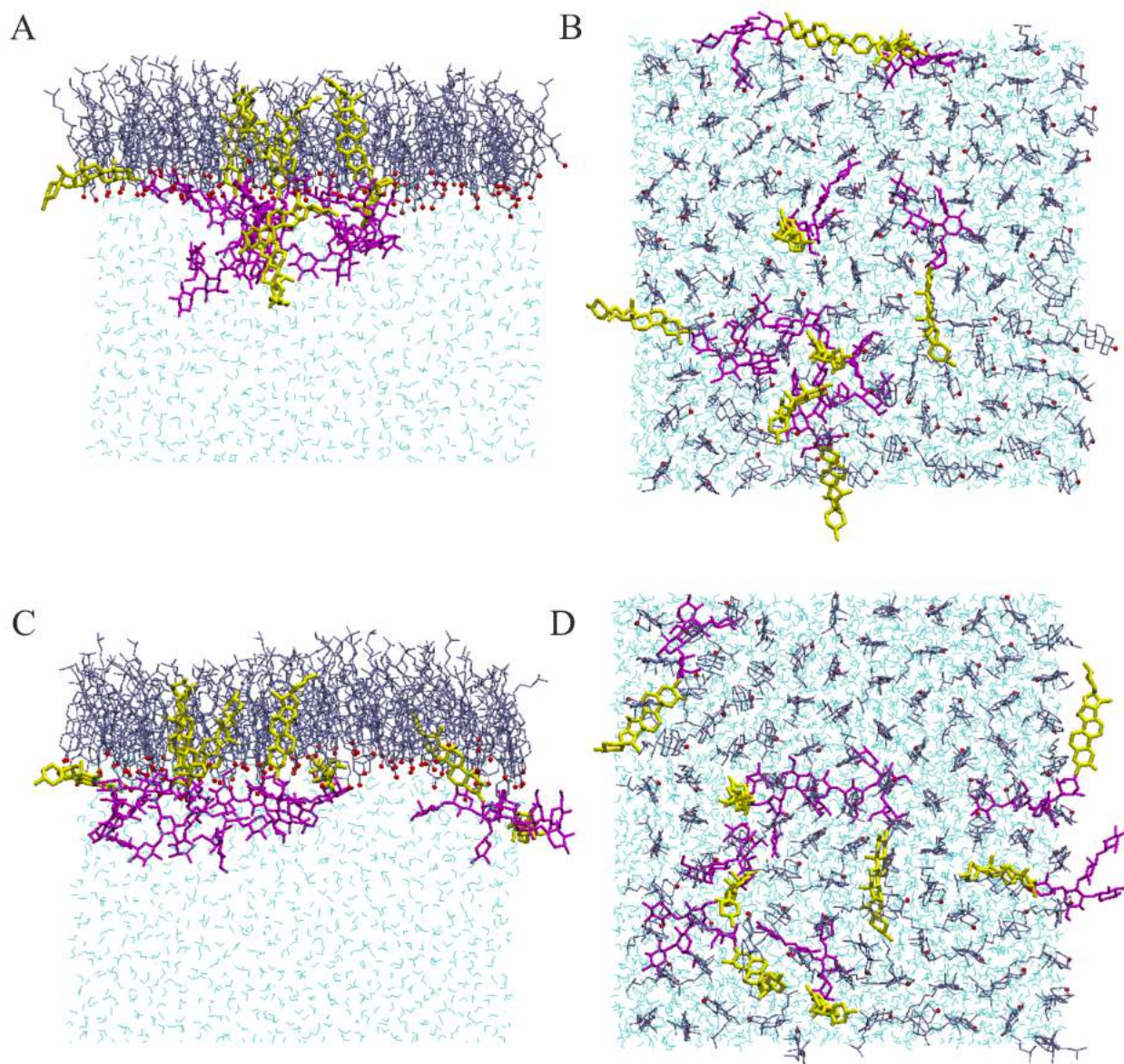
Następnie wykonano modelowanie *in silico* metodami klasycznej dynamiki molekularnej. Sporządzono układ składający się z dwóch monowarstw umieszczonych po przeciwnych stronach pudełka z wodą. Pod każdą z monowarstw umieszczono cząsteczki digitoniny (prostopadle do normlanej monowarstwy), w odległości około $3 \text{ \AA}$. Każda monowarstwa składała się ze 100 cząsteczek cholesterolu lub diosgeniny, natomiast pod monowarstwą znajdowało się 8

cząsteczek digitoniny. Sporządzono także układ referencyjny nie zawierający digitoniny. Celem modelowania było jak najlepsze odtworzenie warunków eksperymentalnych dlatego na początku symulacja była prowadzona przy dużej powierzchni cząsteczkowej - $55 \text{ \AA}^2$ przez około 35 ns. Taka powierzchnia została wybrana gdyż izotermy eksperymentalne cholesterolu i diosgeniny zarówno na subfazie wodnej, jak i na wodnym roztworze digitoniny o stężeniu $65 \mu\text{M}$ mają w tym miejscu podobne wartości ciśnienia powierzchniowego. Ponadto jest to także powierzchnia cząsteczkowa znacznie większa niż punkt załamania monowarstwy dla poszczególnych izoterm rejestrowanych na subfazie wodnej. Następnie układ był kompresowany do zadanego ciśnienia powierzchniowego: 15 mN/m , 25 mN/m i 35 mN/m i dla tak dobranego ciśnienia były prowadzone obliczenia klasyczną dynamiką molekularną przez kolejne 60 ns, ostatnie 10 ns symulacji zostało użyte do analizy.

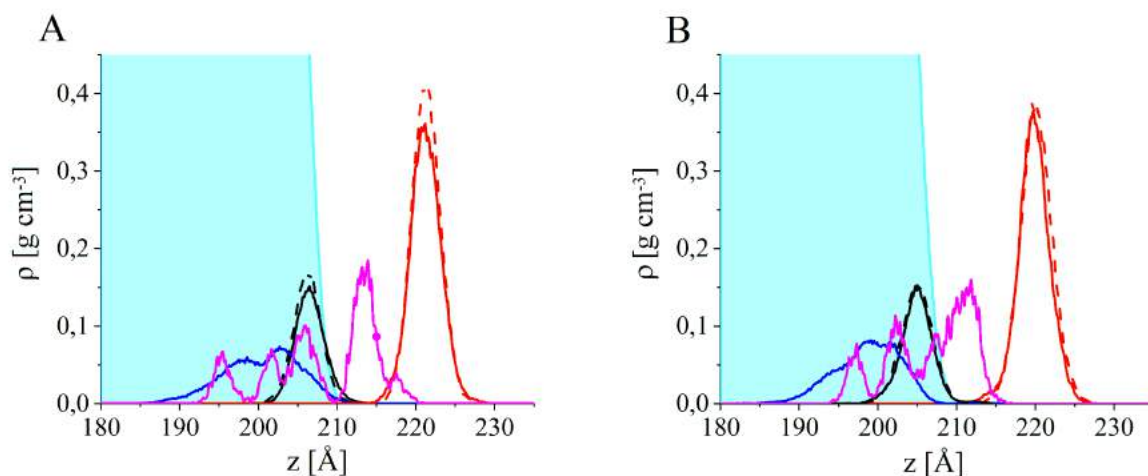
Oddziaływanie monowarstwy cholesterolu z digitoniną

Na rysunku 4.3 został przedstawiony układ zawierający monowarstwę cholesterolu z digitoniną ściśniętą do ciśnienia 25 mN/m (A i B) oraz 35 mN/m (C i D). Wyniki z analizy monowarstwy cholesterolu przy ciśnieniu powierzchniowym 15 mN/m nie zostały przedstawione, gdyż w monowarstwie stworzył się olbrzymi stabilny por, zajmujący około jednej trzeciej powierzchni. Przyczyną powstawania porów w monowarstwie mógł być zastosowany w obliczeniach model wody powodujący zaniżenie napięcia powierzchniowego względem układu rzeczywistego. Ponadto duże zagęszczenie cząsteczek w monowarstwie sugeruje, że oddziaływania międzycząsteczkowe części hydrofobowych cholesterolu i dążenie do unikania kontaktu z wodą jest bardzo silne. Monowarstwy skompresowane do wyższych ciśnień powierzchniowych zostały przedstawione na rysunku 4.3. Rzuty monowarstw z góry i z boku przedstawiają ułożenie cząsteczek w monowarstwie. Monowarstwy skompresowane do obu badanych ciśnień powierzchniowych wyglądają bardzo podobnie. Widać wyraźnie, że cząsteczki cholesterolu są mocno zorganizowane i zajmują całą dostępną powierzchnię. Natomiast cząsteczki digitoniny penetrują monowarstwę swoimi częściami aglikonowymi lub są zaadsorbowane pod powierzchnią monowarstwy. Część glikonowa digitoniny zawsze znajduje się w subfazie wodnej. Wszystkie cząsteczki digitoniny znajdują się w pobliżu monowarstwy i z nią oddziałują, co świadczy o dużym powinowactwie cząsteczek digitoniny do monowarstwy cholesterolu. W celu dokładniejszego poznania lokalizacji cząsteczek w monowarstwie zostały sporządzone profile gęstości charakterystycznych punktów w cząsteczkach. Profil gęstości jest to histogram położeń na osi z zdefiniowanych grup funkcyjnych obliczony po wszystkich cząsteczkach w układzie oraz po zadanej ilości klatek trajektorii.

Na rysunku 4.4 przedstawiono profile gęstości grup funkcyjnych oraz środka masy części aglikonowej digitoniny. W przypadku monowarstwy skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m widoczna jest różnica między sygnałami pochodzącymi od badanej monowarstwy cholesterolu z digitoniną (sygnał od grupy izopropylowej i hydroksylowej cholesterolu) i jej referencji (monowarstwy na subfazie wodnej). Cząsteczki w układzie referencyjnym są



Rysunek 4.3: Model monowarstwy cholesterolu z digitoniną. **A,B** - monowarstwa przy ciśnieniu powierzchniowym 25 mN/m. **C,D** - monowarstwastwa skompresowana do $\Pi = 35\text{mN/m}$. Dla większej przejrzystości rysunku z cholesterolu zostały usunięte atomy wodoru. Kolory użyte na rysunku: cholesterol - szary, grupa hydroksylowa cholesterolu- czerwony, część hydrofobowa digitoniny - żółty, reszty cukrowe digitoniny - różowy, woda - cyjan.

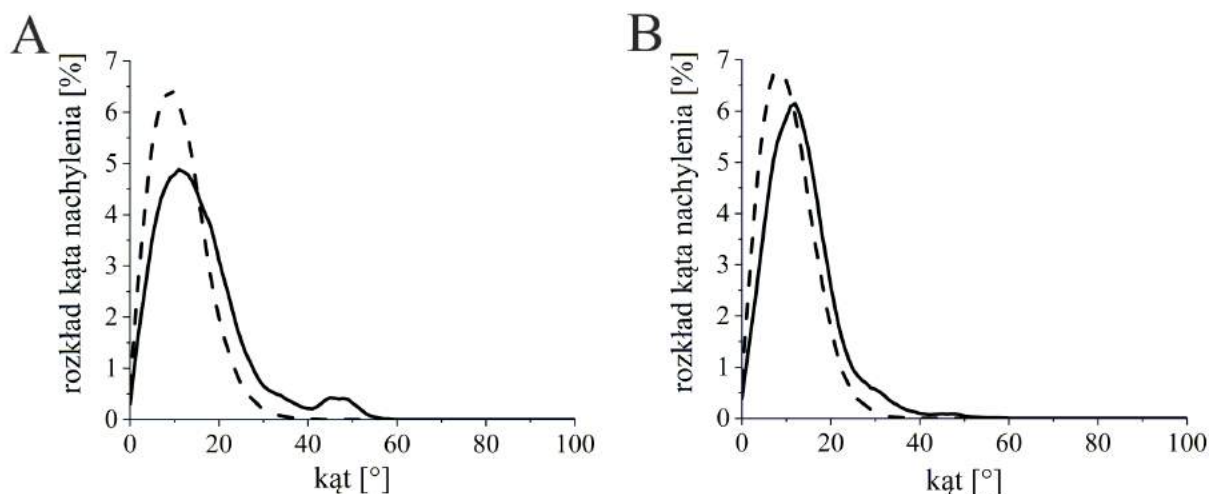


Rysunek 4.4: Profile gęstości monowarstw skompresowanych do 25 mN/m (A) i 35 mN/m (B). Pomiar wykonany tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny. Kolory: czerwony - grupa izopropylowa cholesterolu, czarny -OH cholesterolu, magenta -środek masy części hydrofobowej digitoniny, niebieski -OH z reszt cukrowych digitoniny, jasnoniebieski -woda.

bardziej uporządkowane, niż te w układzie z digitoniną o czym świadczy większa gęstość grup funkcyjnych pochodzących od cholesterolu odpowiadająca danemu położeniu na osi x. Sygnały pochodzące z układu referencyjnego mają mniejszą szerokość połówkową a także są wyższe niż w układzie zawierającym cząsteczki digitoniny. Część hydrofobowa digitoniny albo penetruje wewnątrz błony, albo znajduje się tuż pod jej powierzchnią. Interesujące jest to, że nie obserwuje się etapu częściowej penetracji - środek masy części hydrofobowej digitoniny znajduje się albo w okolicach środka monowarstwy cholesterolu albo w okolicy grup hydroksylowych cholesterolu. Grupy hydroksylowe pochodzące od cukrów są zanurzone w wodzie i albo oddziałują z grupami hydroksylowymi cholesterolu albo z otaczającymi cząsteczkami wody.

Miedzy monowarstwami cholesterolu przy ciśnieniu powierzchniowym wynoszącym 35 mN/m nie występuje różnica w wysokościach i szerokościach sygnałów od grup funkcyjnych cholesterolu, co może sugerować, że przy tak wysokim ciśnieniu digitonina nie ma wpływu na uporządkowanie cząsteczek cholesterolu w monowarstwie. Środki masy części hydrofobowej digitoniny znajdują się we wnętrzu monowarstwy, co wskazuje na penetrację części hydrofobowej digitoniny w monowarstwę cholesterolu, a także w okolicach grup hydroksylowych cholesterolu co pokazuje, że niektóre cząsteczki digitoniny adsorbują się do monowarstwy od strony subfazy wodnej. Część glikonowa tak samo jak w przypadku niższego ciśnienia znajduje się pod powierzchnią wody.

W następnym kroku rozważano uporządkowanie cholesterolu w monowarstwie. Do tego celu został wyznaczony wektor cząsteczki cholesterolu między atomem węgla C3 a C17 (rys 2.4). Następnie zbadano rozkład nachylenia wyżej wspomnianego wektora do normalnej monowarstwy. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.5.



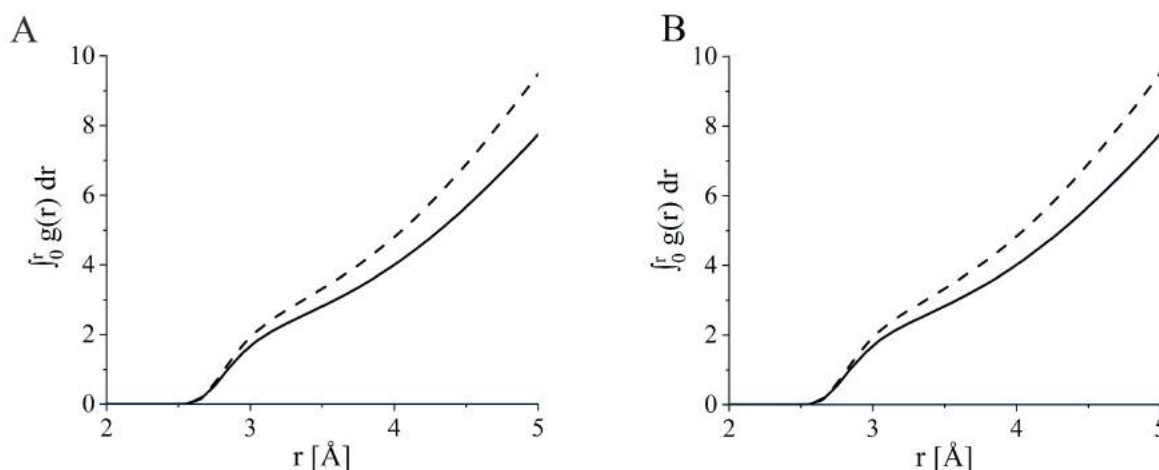
Rysunek 4.5: Rozkład kąta nachylenia wektora cholesterolu w stosunku do normalnej. Rysunek **A:** $\Pi = 25$ mN/m, rysunek **B:** $\Pi = 35$ mN/m. Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

Rozkład kąta nachylenia cholesterolu do normalnej monowarstwy jest inny w układzie zawierającym cząsteczki digitoniny niż w przypadku monowarstwy referencyjnej. Przy ciśnieniu powierzchniowym 25 mN/m sygnał pochodzący od cząsteczek cholesterolu w układzie referencyjnym jest wyższy i węższy, niż analogiczny sygnał z układu zawierającego digitoninę. Ponadto w obecności digitoniny w monowarstwie można zaobserwować cząsteczki cholesterolu nachylone pod kątami około 48° , ustawienie cząsteczek w układzie referencyjnym jest znacznie bardziej homogeniczne.

Monowarstwy ściśnięte do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m charakteryzowały się podobnym ustawieniem cząsteczek w monowarstwie. Sygnał pochodzący od układu referencyjnego posiadał maksimum nieznacznie przesunięte w stronę niższych kątów względem układu z digitoniną. Cząsteczki cholesterolu były nachylone średnio około 9° do normalnej monowarstwy w układzie odniesienia, natomiast w układzie z digitoniną o 12° do normalnej. Gdy w układzie występowała digitonina rozkład kąta nachylenia cholesterolu nie był symetryczny, więcej cząsteczek było nachylonych pod większymi kątami do normalnej monowarstwy niż w analogicznym układzie odniesienia.

W następnym kroku analizy oddziaływań między monowarstwą cholesterolu i cząsteczkami digitoniny zbadano wpływ digitoniny na uwodnienie grup hydroksylowych sterolu. Wyniki zostały zestawione na rysunku 4.6.

W obu badanych ciśnieniach wpływ digitoniny na monowarstwę cholesterolu jest praktycznie identyczny, dlatego oba rysunki zostaną omówione łącznie. Z rysunku 4.6 widać że, obecność digitoniny bardzo nieznacznie obniżała liczbę cząsteczek wody występujących w pierwszej sferze hydratacyjnej w stosunku do układu odniesienia. Więcej cząsteczek wody znajdowało się w kolejnych sferach hydratacyjnych grupy hydroksylowej cholesterolu gdy w układzie nie



Rysunek 4.6: Całka z radialnej funkcji rozkładu par między grupą hydroksylową cholesterolu, a cząsteczkami wody. Rysunek lewy: $\Pi = 25$ mN/m, rysunek prawy: $\Pi = 35$ mN/m. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

było digitoniny, niż gdy saponina była obecna.

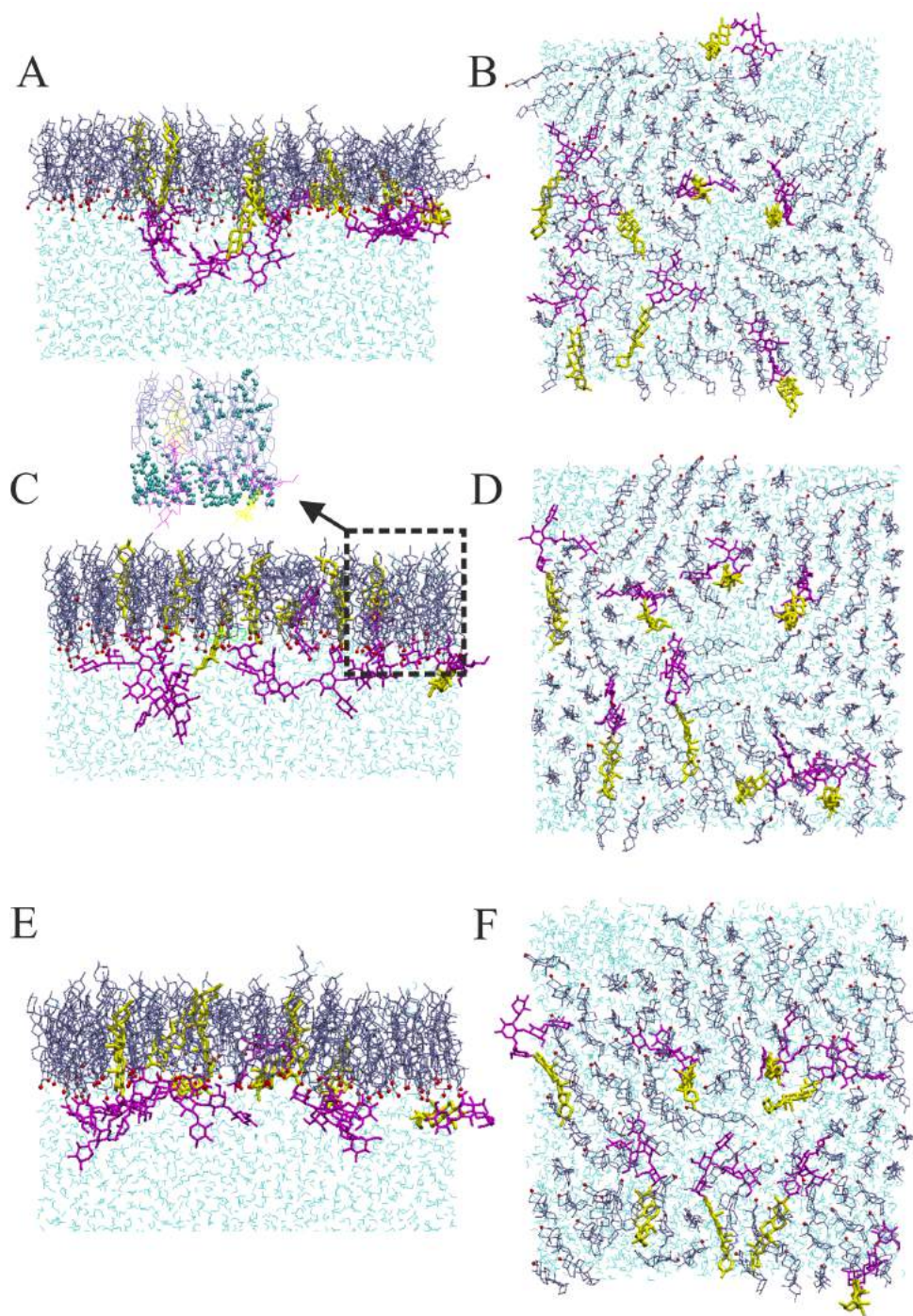
Kolejnym etapem badań będzie stworzenie układu porównawczego, gdzie monowarstwę będą tworzyły cząsteczki diosgeniny. Taki model pozwoli na określenie znaczenia łańcucha alifatycznego cholesterolu na oddziaływanie sterolu z digitoniną.

Oddziaływanie monowarstwy diosgeniny z digitoniną

Po zanalizowaniu układu zawierającego cholesterol przystąpiono do modelowania układu porównawczego. W układzie tym monowarstwa była zbudowana z cząsteczek diosgeniny, natomiast cząsteczki digitoniny były umieszczone w subfazie wodnej. Symulacja była prowadzona analogicznie do poprzedniego układu.

Na rysunku 4.7 zostały przedstawione projekcje monowarstw z góry i z boku. Monowarstwa diosgeniny charakteryzuje się większym nieuporządkowaniem niż monowarstwa cholesterolu. Na projekcji z góry na monowarstwy jest widoczne, że cząsteczki diosgeniny bardzo często są odchylone w stosunku do normalnej. W przeciwieństwie do monowarstwy cholesterolu cząsteczki diosgeniny zajmują całą dostępną powierzchnię w każdym ze zbadanych ciśnień powierzchniowych. Ponadto między cząsteczkami tworzącymi membranę zaobserwowano nie-liczne molekuly wody (Rysunek 4.7 C). Wynika to z obecności atomów tlenu w pierścieniach cząsteczki diosgeniny.

Cząsteczki digitoniny adsorbują i penetrują do monowarstwy skompresowanej do trzech badanych ciśnień powierzchniowych. W przypadku najniższego Π cząsteczki digitoniny zaczynają penetrować membranę swoimi częściami hydrofobowymi, jednakże z rzutu bocznego widać, że część aglikonowa digitoniny nie penetruje monowarstwy w pełni, ale niektóre cząsteczki wchodzi do monowarstwy jedynie do połowy długości części hydrofobowej. Część hydrofilowa cząsteczek digitoniny jest zanurzona w wodzie, a także oddziałuje z grupami hydroksylowymi



Rysunek 4.7: Model monowarstwy diosgeniny z digitoniną. **A,B** - monowarstwa przy ciśnieniu powierzchniowym 15 mN/m; **C,D**: $\Pi = 25\text{mN/m}$; **E,F**: $\Pi = 35\text{mN/m}$. Częsteczki wody penetrujące monowarstwę przy ciśnieniu powierzchniowym 25 mN/m zostały przedstawione na powiększeniu rysunku **C**. Dla większej przejrzystości rysunku z diosgeniny zostały usunięte atomy wodoru. Kolory użyte na rysunku: diosgenina - szary, grupa hydroksylowa diosgeniny- czerwony, część hydrofobowa digitoniny - żółty, reszty cukrowe digitoniny - różowy, woda - cyjan.

diosgeniny.

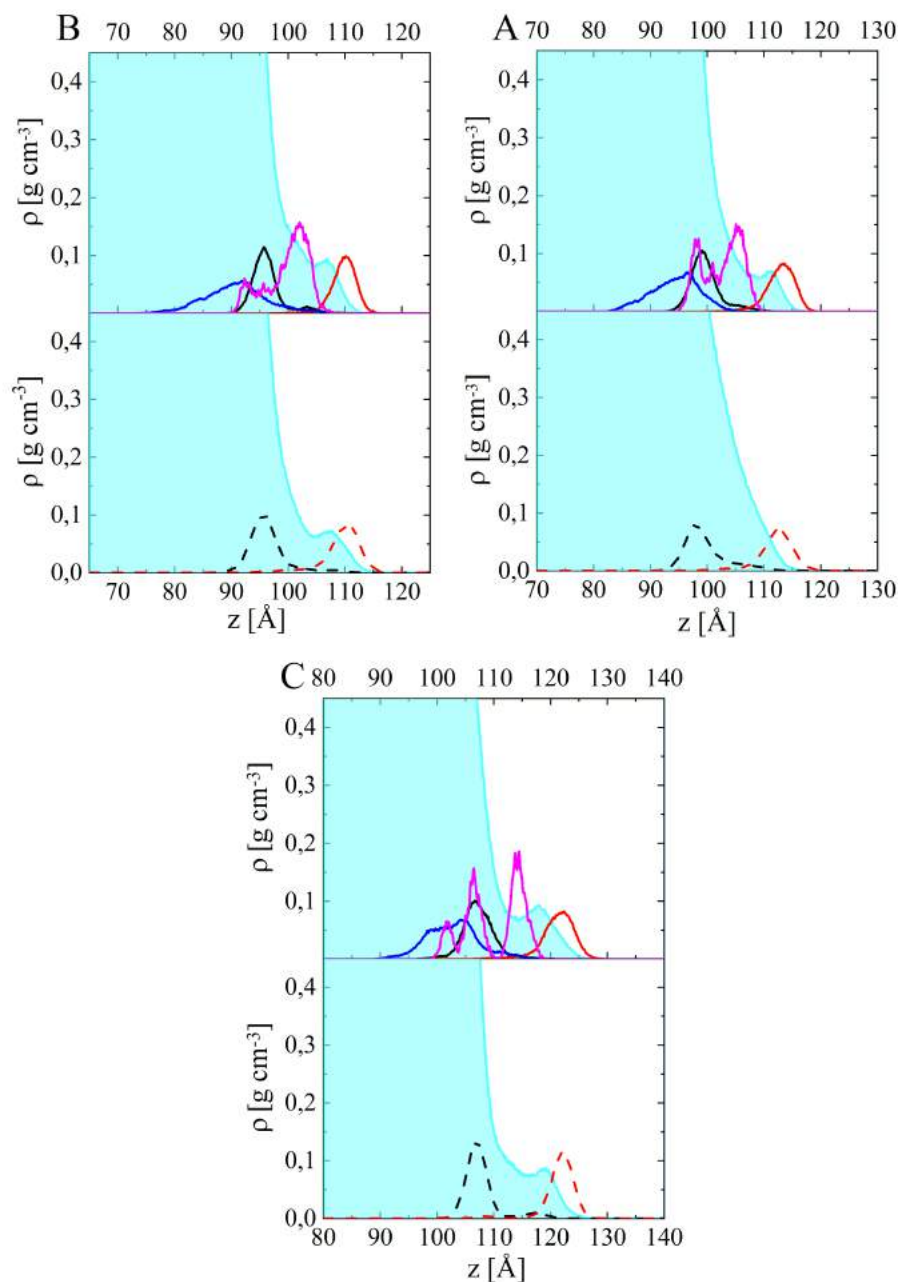
W przypadku gdy monowarstwa była ściśnięta do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m cząsteczki digitoniny penetrują monowarstwę swoimi częściami aglikonowymi, części cukrowe są zanurzone w subfazie wodnej. Jednakże, wydaje się, że dzięki słabemu uporządkowaniu w monowarstwie niektóre reszty cukrowe mogą przesuwac się w kierunku monowarstwy i penetrować ją w niewielkim stopniu.

Zachowanie monowarstwy przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m jest analogiczne do monowarstwy ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m. Cząsteczki digitoniny penetrują monowarstwę diosgeniny swoimi częściami hydrofobowymi, ugrupowania glikonowe są zanurzone w subfazie wodnej. Cząsteczki w monowarstwie wydają się bardziej upakowane niż w przypadku II równego 15 mN/m.

W celu głębszego zrozumienia organizacji cząsteczek w monowarstwie, w następnym kroku analizy zostaną przedstawione profile gęstości wybranych grup funkcyjnych cząsteczek diosgeniny i digitoniny oraz cząsteczek wody, obliczenia wykonano dla układu zawierającego digitoninę oraz w układzie referencyjnym dla wszystkich trzech badanych ciśnień: 15 mN/m, 25 mN/m, 35 mN/m, rysunek 4.8. Jak już wspomniano wcześniej cząsteczki wody penetrowały monowarstwę diosgeniny. Jest to pierwsza z różnic w zachowaniu układu zbudowanego z diosgeniny względem układu cholesterolowego. Monowarstwa diosgeniny jest także bardziej zanurzona w subfazie wodnej w stosunku do membrany cholesterolowej, o czym świadczy występowanie profilu gęstości grupy hydroksylowej diosgeniny kilka angstromów poniżej granicy międzyfazowej układu.

W monowarstwie ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m penetracja cząsteczek wody w monowarstwę jest największa. W przypadku monowarstwy referencyjnej woda penetruje praktycznie w całej grubości monowarstwy. Natomiast w układzie zawierającym cząsteczki digitoniny więcej cząsteczek wody znajduje się w okolicach reszt cukrowych diosgeniny niż w najbardziej hydrofobowej części cząsteczki (między atomem węgla C3 a C17). Profile gęstości wyznaczają granice monowarstwy: profil gęstości od grupy hydroksylowej (kolor czarny) i terminalnej grupy metylowej (kolor czerwony) cząsteczki diosgeniny. Część aglikonowa (różowy) i grupy hydroksylowe z ugrupowań glikonowych (niebieski) znajdują się w pobliżu monowarstwy. Na otrzymanym profilu gęstości widać, że różowy sygnał znajduje się zarówno we wnętrzu monowarstwy, jak i tuż pod jej powierzchnią na granicy międzyfazowej układu. Sugeruje to, że część aglikonowa digitoniny penetruje w monowarstwę diosgeniny, występują także cząsteczki digitoniny całkowicie zanurzone w subfazie wodnej ale znajdujące się bardzo blisko monowarstwy. Reszty cukrowe znajdują się w subfazie wodnej.

Profile gęstości otrzymane dla monowarstwy ściśniętej do ciśnienia 25 mN/m (rysunek 4.8 B) pokazały, że cząsteczki diosgeniny w monowarstwie są bardziej uporządkowane - sygnały pochodzące zarówno od grupy hydroksylowej jak i terminalnej grupy metylowej diosgeniny są węższe i wyższe, w stosunku do sygnałów pochodzących z monowarstwy przy ciśnieniu powierzchniowym równym 15 mN/m. Ponadto większość cząsteczek, a konkretnie ich części



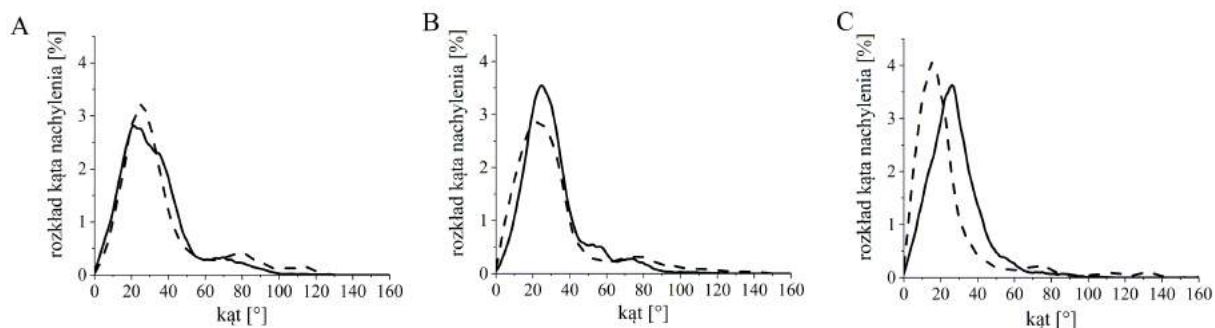
Rysunek 4.8: Model monowarstwy diosgeniny z digitoniną. **A** - monowarstwa skompresowana do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m. **B** - monowarstwa skompresowana do $\Pi = 25$ mN/m, **C** : $\Pi = 35$ mN/m. Kolory użyte na rysunku: -OH diosgeniny - czarny, terminalna grupa metylowa diosgeniny - czerwony, środek masy części hydrofobowa digitoniny - magenta, -OH reszt cukrowych digitoniny - niebieski, woda - cyan.

aglikonowych penetruje do monowarstwy, tylko nieznaczna frakcja pozostaje w całości zanurzona w subfazie wodnej. Tak samo jak w poprzedniej omówionej symulacji reszty cukrowe znajdują się w subfazie wodnej.

Cząsteczki monowarstwy ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego równego 35 mN/m (rysunek 4.8 C) są mniej uporządkowane niż w przypadku niższego ciśnienia i swojego układu

referencyjnego. Profile gęstości środka masy części hydrofobowej digitoniny rozdziela się na kilka niezależnych maksimów, maksimum o największej powierzchni znajduje się w środku monowarstwy sugerując, że część cząsteczek digitoniny, a konkretnie jej części aglikonowej penetruje monowarstwę. Występują także dwa mniejsze sygnały znajdujące się w pobliżu grup hydroksylowych diosgeniny oraz pod powierzchnią monowarstwy co świadczy, że niektóre cząsteczki są w całości zanurzone w subfazie. Wyniki otrzymane dla trzech rejestrowanych ciśnień powierzchniowych sugerują, że części aglikonowe cząsteczek digitoniny na początku są wciągane do monowarstwy: powierzchnie sygnałów dla części aglikonowej digitoniny są podobne we wnętrzu monowarstwy jak i pod jej powierzchnią przy ciśnieniu powierzchniowym 15 mN/m, następnie przy ciśnieniu 25 mN/m większość cząsteczek digitoniny, a konkretnie jej części aglikonowej jest wciągane do wnętrza monowarstwy. Na granicy międzyfazowej układu występuje tylko nieliczna frakcja cząsteczek digitoniny. Natomiast przy ciśnieniu 35 mN/m następuje wypychanie niektórych cząsteczek digitoniny z monowarstwy: obserwuje się podział, połowa cząsteczek digitoniny penetruje monowarstwę częściami aglikonowymi, natomiast druga połowa znajduje się pod powierzchnią monowarstwy. Taki wynik jest zgodny z wynikami eksperymentalnymi wykazującymi, że cząsteczki są wypychane z monowarstwy do subfazy wodnej.

W celu lepszego zrozumienia uporządkowania cząsteczek w monowarstwie zbadano rozkład kątów nachylenia wektorów diosgeniny wyznaczonych między atomem węgla C3 a C17, do normalnej monowarstwy. Wyniki zaprezentowano na rysunku 4.9.

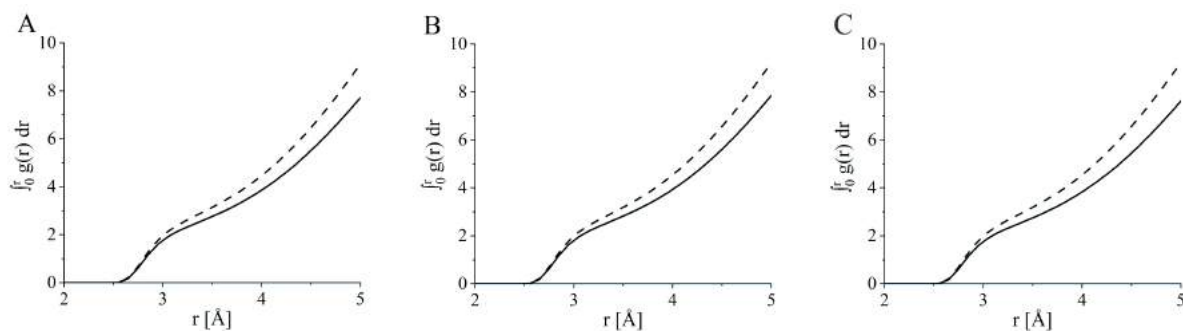


Rysunek 4.9: Rozkład kąta nachylenia wektora diosgeniny w stosunku do normalnej. Rysunek **A:** $\Pi = 15$ mN/m, **B:** $\Pi = 25$ mN/m **C:** $\Pi = 35$ mN/m. Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

Pomiary rozkładu kąta nachylenia cząsteczek w monowarstwie przy ciśnieniu 15 mN/m wykazały niewielką różnicę w nachyleniu cząsteczek diosgeniny w układzie zawierającego digitoninę względem układu referencyjnego. Cząsteczki diosgeniny w układzie zawierającym drugą saponinę najczęściej były nachylone do normalnej monowarstwy pod kątami 22° i 40°. Natomiast w układzie referencyjnym cząsteczki były nachylone głównie pod kątem 25°. Co ciekawe w obu układach obserwuje się niewielką populację cząsteczek nachylonych między 60° a 90°, w układzie referencyjnym jest ona liczniejsza niż w układzie z digitoniną.

W przypadku monowarstw ściśniętych do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m zaobserwowano, że obecność digitoniny wpływa stabilizująco na układ. Częsteczki w monowarstwie były nachylone pod kątem 24° do normalnej. Występowała także niewielka populacja cząsteczek nachylona pod kątem między 50° a 60° . W przypadku monowarstwy referencyjnej większość cząsteczek jest nachylona pod kątem około 22° . Tak samo jak w przypadku niższego ciśnienia występują w układzie cząsteczki nachylone między 50° a 90° .

Cząsteczki w monowarstwie skompresowanej do 35 mN/m były najbardziej upakowane i uporządkowane w monowarstwie, ich kąty nachylenia względem normalnej monowarstwy wynosiły 18° dla układu referencyjnego, oraz 24° dla układu z digitoniną. W obu układach widoczne było występowanie populacji cząsteczek nachylonych między 50° a 90° do normalnej. Jednakże liczba takich cząsteczek była mniejsza niż w układach o niższym ciśnieniu powierzchniowym.



Rysunek 4.10: Całki z radialnej funkcji gęstości par. Rysunek **A**: $\Pi = 15$ mN/m, **B**: $\Pi = 25$ mN/m **C**: $\Pi = 35$ mN/m. Linią ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

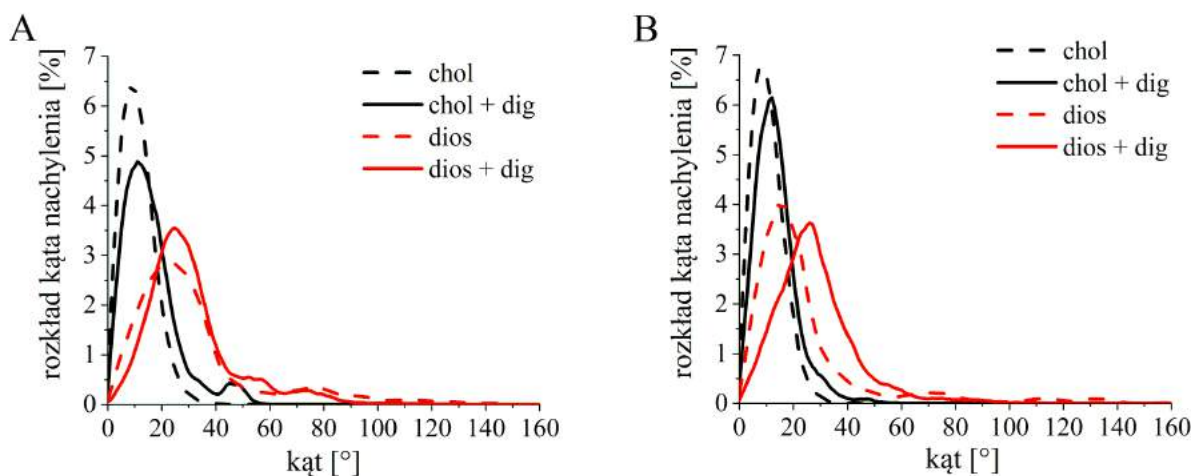
Następnie wyliczono całkę po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między atomami tlenu z grupy hydroksylowej diosgeniny i cząsteczkami wody, rysunek 4.10. W każdym z rozważanych ciśnień powierzchniowych uwodnienie grupy -OH diosgeniny jest takie samo dla układów zawierających digitoninę, układy referencyjne w trzech różnych ciśnieniach powierzchniowych również zachowują się bardzo podobnie. We wszystkich układach uwodnienie grup hydroksylowych diosgeniny jest większe w przypadku układów referencyjnych niż w układach zawierających digitoninę. Ilość tworzonych wiązań wodorowych między grupami -OH a wodą jest nieznacznie mniejsza w układach zawierających digitoninę niż w układach referencyjnych. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że digitonina adsorbując się do powierzchni monowarstwy oddziałuje z grupami -OH cholesterolu, przez co zmniejsza ich dostępność dla cząsteczek wody.

4.2.3 Porównanie oddziaływania digitoniny z monowarstwami cholesterolu i monowarstwami diosgeniny

W badaniach eksperymentalnych zostały zbadane monowarstwy cholesterolu i diosgeniny na subfazie wodnej i wodnym roztworze digitoniny o stężeniach: 0,65 μM , 6,5 μM oraz 65 μM . Oba układy zachowują się bardzo podobnie. Stabilne monowarstwy są tworzone jedynie na subfazie wodnej i wodnym roztworze digitoniny o stężeniu 0,65 μM . Monowarstwa cholesterolu jest bardziej przesunięta w stronę wyższych powierzchni cząsteczkowych względem analogicznej monowarstwy zbudowanej z diosgeniny. Jednocześnie jest bardziej skondensowana, o czym świadczy prawie dwukrotnie wyższy współczynnik ściśliwości. Obie monowarstwy nie tworzą stabilnych izoterm na wyższych stężeniach digitoniny. Przy stężeniu 6,5 μM w obu układach widać gwałtowną adsorpcję i penetrację digitoniny do badanej monowarstwy, tak, że ciśnienie powierzchniowe wzrasta do prawie 70 mN/m. W przypadku najwyższego badanego stężenia saponiny, cząsteczki monowarstwy musiały być wstępnie porządkowane przez dwa cykle histerezy zanim otrzymano powtarzalne wyniki. Jednocześnie monowarstwy nie tworzyły stabilnych izoterm II-A, co wskazywało na destrukcyjne działanie digitoniny na film powierzchniowy.

Badania eksperymentalne zostały uzupełnione o modelowanie *in silico*. Uzyskano następujące wyniki. Digitonina penetruje monowarstwy swoją częścią hydrofobową, może to być penetracja całą częścią aglikonową do wnętrza monowarstwy, jak również penetracja gdy tylko część aglikonu znajdowała się w membranie. Poza cząsteczkami digitoniny penetrującymi błonę, występowały także cząsteczki adsorbujące pod powierzchnią membrany. N.Frenkel i współpracownicy [8] wykazali że cząsteczki digitoniny adsorbują do błony liposomów z SOPC (stearynooleinofosfatydylocholina) i cholesterolu. Cząsteczki digitoniny tworzyły pod powierzchnią błony dodatkową warstwę oddziałującą z błoną. Taki wynik dobrze koreluje z wykonanymi przeze mnie symulacjami, w którym można zaobserwować, że zarówno całe cząsteczki, jak również jedynie ugrupowania glikonowe lokują się pod powierzchnią błony oddziałując z nią.

Monowarstwa cholesterolu jest bardziej uporządkowana niż monowarstwa diosgeniny. Cząsteczki cholesterolu ściśnięte nawet do niskiego ciśnienia powierzchniowe są mocno upakowane w monowarstwie, ograniczając jak najbardziej swój kontakt z wodą, jedynie grupa hydroksylowa cholesterolu jest zanurzona w subfazie wodnej. Natomiast cząsteczki w monowarstwie diosgeniny są znacznie mniej uporządkowane, zawsze zajmują całą dostępną powierzchnię, również dwie reszty cukrowe występujące w miejscu, gdzie cholesterol posiada łańcuch acylowy, mają kontakt z cząsteczkami wody. Nachylenie cząsteczek budujących monowarstwy zostało zaprezentowane na rysunku 4.11, natomiast wartości rozkładu kąta nachylenia cząsteczek do normalnej zostały zebrane w tabeli 4.2. Digitonina ma wpływ na uporządkowanie i kąt nachylenia cząsteczek w monowarstwie, destabilizuje cząsteczki w monowarstwie zwiększając ich kąt nachylenia względem normalnej, co jest zgodne z wynikami eksperymentalnymi.



Rysunek 4.11: Rozkład kąta nachylenia wektora cholesterolu (czarny) i diosgeniny (czerwony) w stosunku do normalnej. **A:** $\Pi = 25$ mN/m, **B:** $\Pi = 35$ mN/m. Linią ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

W literaturze zostało pokazane, że modelowe błony biologiczne zawierające w swoim składzie cząsteczki cholesterolu są destabilizowane w obecności saponin [8, 7].

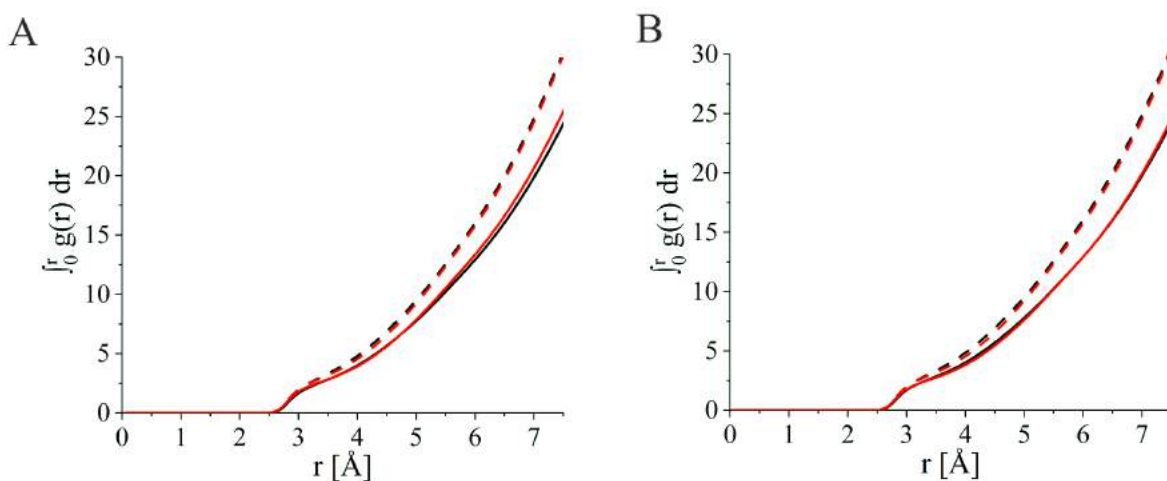
Tablica 4.2: Porównanie kątów nachylenia cząsteczek w monowarstwie.

	Cholesterol		Diosgenina	
	referencja	z digitoniną	referencja	z digitoniną
$\Pi = 25$ mN/m	9°	11°	23°	25°
$\Pi = 35$ mN/m	8°	11,5°	15°	25

Następnie w celu analizy uwodnienia grup hydroksylowych cząsteczek budujących monowarstwy wykonano całki po trzech wymiarach z radialnej funkcji dystrybucji par, rysunek 4.12. Wyniki pokazały, że liczba cząsteczek wody w pierwszej sferze hydratacyjnej grup -OH cholesterolu i diosgeniny nie zmienia się w obecności digitoniny. Natomiast zmienia się liczba cząsteczek wody znajdujących się w kolejnych sferach hydratacyjnych badanej grupy funkcyjnej. W przypadku gdy digitonina jest obecna, mniej cząsteczek wody znajduje się w okolicy badanej grupy hydroksylowej. Świadczy to o adsorpcji digitoniny do powierzchni monowarstwy i prawdopodobnym oddziaływaniu grup hydroksylowych reszt cukrowych digitoniny z grupą hydroksylową cząsteczek budujących monowarstwę.

Uwodnienie cząsteczek w monowarstwach cholesterolu i diosgeniny przy obecności digitoniny w układzie jest prawie identyczne. Taki sam wynik otrzymano dla obu monowarstw referencyjnych. Jednakże widać wyraźnie, że występuje różnica w uwodnieniu między układem nie zawierającym digitoniny, a tym gdzie saponina jest obecna.

Z wykonanych badań można wyciągnąć następujące wnioski. Wyniki otrzymane z eksperymentu jak i z symulacji teoretycznych są ze sobą zgodne i pokazują, że digitonina adsorbuje do monowarstwy i penetruje zarówno monowarstwę cholesterolu jak i diosgeniny. Świadczy



Rysunek 4.12: Całka z radialnej funkcji rozkładu par między grupą hydroksylową cholesterolu (czarny) i diosgeniny (czerwony), a cząsteczkami wody. **A:** $\Pi = 25$ mN/m, **B:** $\Pi = 35$ mN/m. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

to o dużym wpływie pierścieni steroidowych połączonych z grupą hydroksylową przy atomie węgla w pozycji C3 na oddziaływanie z digitoniną.

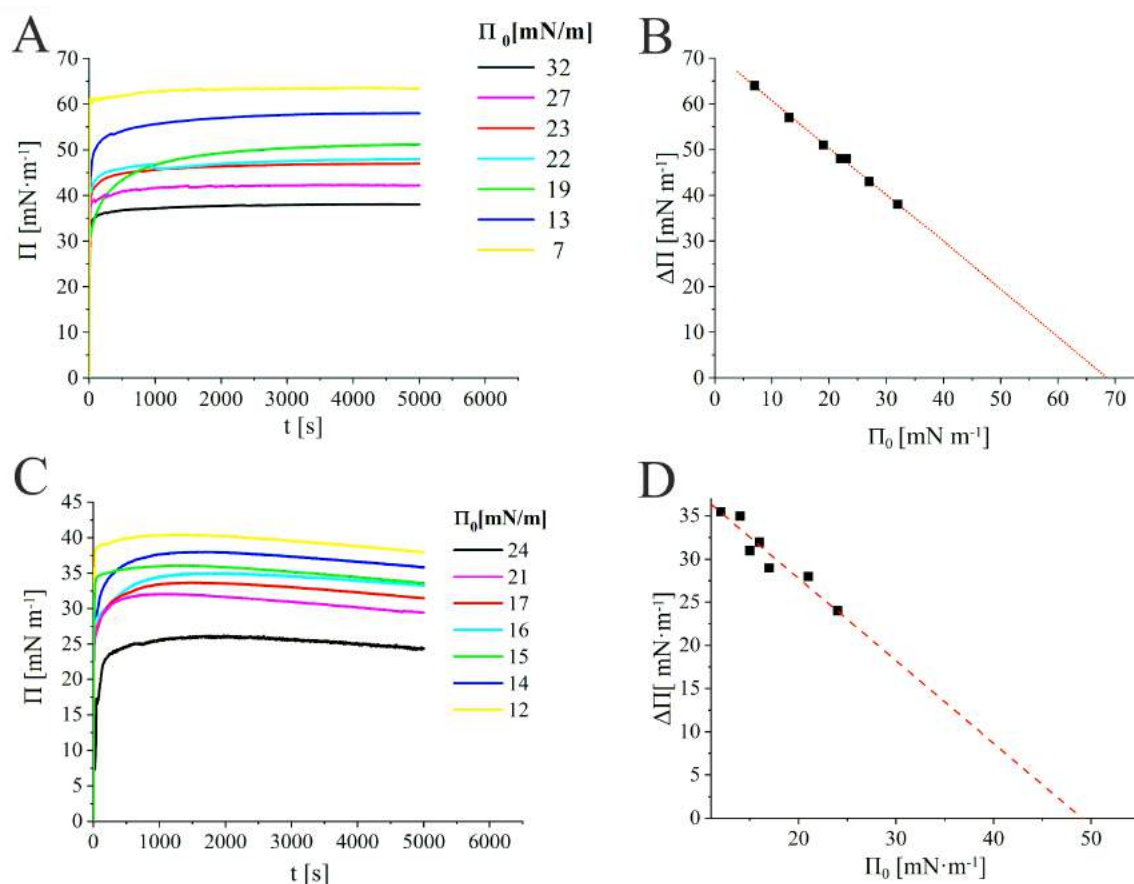
Wniosek ten jest w zgodzie z pracą profesora Takagi i współpracowników, w której zostało pokazane, że pierścienie steroidowe występujące w cholesterolu oraz ich oddziaływanie z digitoniną jest przyczyną powstawania kompleksu między tymi dwoma cząsteczkami. [100]. Ponadto obecność łańcucha alifatycznego cholesterolu stabilizuje cząsteczki digitoniny zakotwiczone w błonie, co jest efektem przeciwnym do badanej monowarstwy diosgeniny gdzie cząsteczki digitoniny są wypychane z monowarstwy wraz ze wzrastającym ciśnieniem powierzchniowym.

4.3 Pomiary przy stałej powierzchni

W kolejnym kroku badań nad oddziaływaniem digitoniny z cholesterolami wykonano izotermy adsorpcji digitoniny do monowarstw cholesterolu oraz diosgeniny. W analogii do badań eksperymentalnych wykonano symulacje metodami *in silico*. Obliczenia dla monowarstw cholesterolu i diosgeniny prowadzono w warunkach stałej powierzchni wynoszącej $45 \text{ Å}^2/\text{cząsteczkę}$. Powierzchnia ta została wybrana ponieważ monowarstwy cholesterolu jak i diosgeniny znajdują się w fazie ciekłej skondensowanej. Cząsteczki w monowarstwie oddziałują ze sobą, a także są już dobrze uporządkowane. Tak samo jak w poprzednim modelu wykonano symulacje dla układów zawierających cząsteczki digitoniny oraz układów referencyjnych. Symulacje prowadzono przez 60 ns, ostatnie 10 ns zostało wzięte do analizy.

4.3.1 Izotermy adsorpcji

Modelowe błony biologiczne mogą zostać poprawnie odtworzone w badaniach z wykorzystaniem izoterm adsorpcji. Są to badania nad monowarstwami ściśniętymi do zadanego ciśnienia powierzchniowego, w badaniach biologicznych jest to zwykle ciśnienie powierzchniowe odpowiadające temu występującemu w natywnych błonach komórkowych, czyli między 27 a 35 mN/m [11]. Pod tak uformowaną błonę wstrzykiwana jest substancja oddziałująca z membraną. Rysunki 4.13 A i C przedstawiają izotermy adsorpcji digitoniny do monowarstw cholesterolu (A) i diosgeniny (C), ciśnienia początkowe monowarstw zostały znormalizowane do 0, na wykresie przedstawiono jedynie efekt działania digitoniny na badane monowarstwy. Natomiast rysunki 4.13 B i D przedstawiają wyznaczone ciśnienia wysycenia monowarstwy czyli $\Delta\Pi$ przy której nie następuje dalsze oddziaływanie badanej substancji z monowarstwą, bądź nie występuje dalsza penetracja badanej substancji do monowarstwy. Ciśnienie wysycenia jest wyznaczane poprzez ekstrapolację dopasowanej prostej do zależności zmiany ciśnienia powierzchniowego ($\Delta\Pi$) w funkcji ciśnienia początkowego (Π_0) [139].



Rysunek 4.13: Izotermy adsorpcji digitoniny do monowarstwy cholesterolu (A), oraz diosgeniny (C). Zależność $\Delta\Pi$ od ciśnienia początkowego (Π_0): efekt adsorpcji digitoniny do monowarstwy cholesterolu (B), diosgeniny (D).

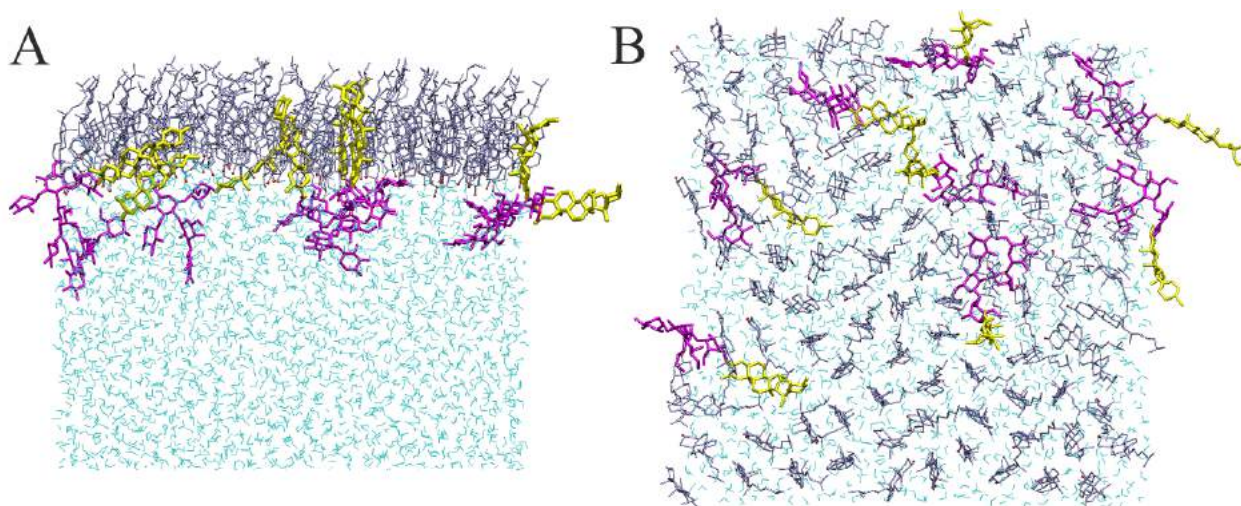
W obu układach, cholesterolu i diosgeniny zbadano oddziaływanie digitoniny z monowarstwami dla siedmiu różnych ciśnień początkowych. W przypadku cholesterolu zakres Π_0 wynosił od 7 mN/m do 32 mN/m, natomiast w przypadku diosgeniny od 12 mN/m do 24 mN/m. Pomiary w różnych warunkach ciśnienia powierzchniowego służyły do wyznaczenia ciśnienia wysycenia monowarstwy, rysunek 4.13 B i D. Po ustabilizowaniu ciśnienia początkowego monowarstwy do subfazy została wprowadzona digitonina. W tym momencie ciśnienie powierzchniowe znacząco wzrosło i po kilkudziesięciu sekundach osiągnęło maksymalną wartość, która była stała dla monowarstw cholesterolu, lub zaczynała powoli spadać w przypadku monowarstw utworzonych z diosgeniny. Monowarstwy cholesterolu charakteryzują się większym wzrostem ciśnienia powierzchniowego w obecności digitoniny, niż odpowiadające im monowarstwy diosgeniny. Ponadto digitonina oddziałuje gwałtownie z cząsteczkami cholesterolu, następnie ustala się stan równowagi zobrazowany jako plateau na wykresie izoterm adsorpcji. Jedynie w przypadku początkowego ciśnienia powierzchniowego wynoszącego 19 mN/m obserwowany jest wolniejszy proces adsorpcji digitoniny do membrany cholesterolowej. Ciśnienie wysycenia monowarstwy zostało wyznaczone poprzez ekstrapolację prostej regresji do osi odciętych i wynosiło 68,4 mN/m.

Digitonina oddziałuje z monowarstwami diosgeniny o różnych początkowych ciśnieniach powierzchniowych, oddziaływanie to jest bardzo szybkie ale wolniejsze niż oddziaływanie digitoniny z monowarstwą cholesterolu. Następnie monowarstwy diosgeniny osiągają stan wysycenia. Jednakże w przypadku monowarstw diosgeniny po wysyceniu monowarstwy nie jest obserwowany stan równowagi jak w przypadku monowarstw cholesterolu ale następuje powolna desorpcja cząsteczek z monowarstwy do fazy objętościowej czego dowodem jest spadek wartości ciśnienia powierzchniowego w czasie. Również ciśnienie wysycenia monowarstwy jest niższe niż w przypadku cholesterolu i wynosi jedynie 49,0 mN/m, co sugeruje, że mniej cząsteczek digitoniny może penetrować monowarstwę diosgeniny niż cholesterolu. Wynika to prawdopodobnie z różnic w budowie cząsteczek cholesterolu i diosgeniny.

4.3.2 Modelowanie MD - układ cholesterol - digitonina

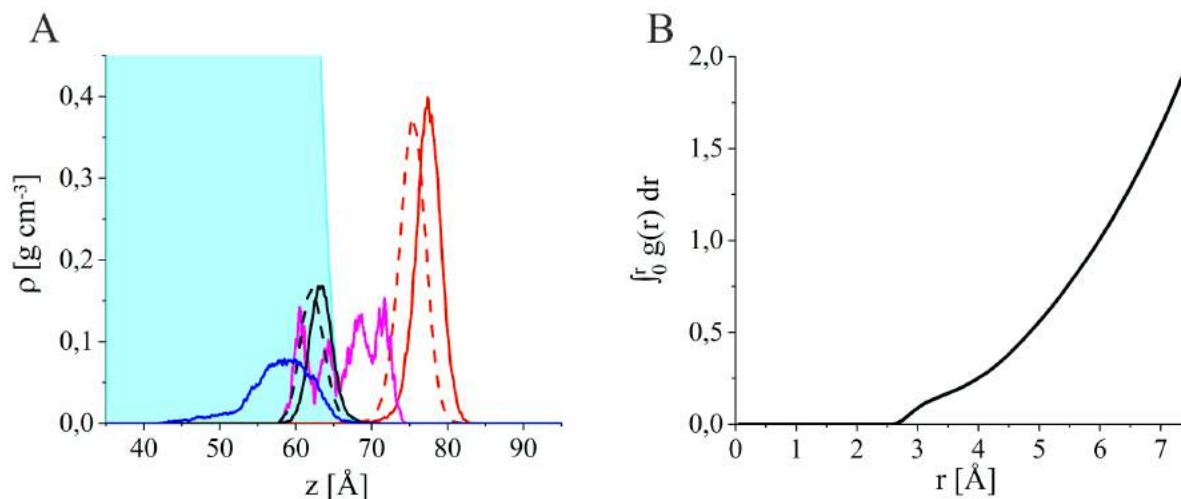
W celu lepszego zrozumienia interakcji digitoniny i cholesterolu wykonano modele teoretyczne monowarstw. W niniejszej symulacji monowarstwa na początku została skompresowana do powierzchni cząsteczkowej $45 \text{ \AA}^2$, następnie pod monowarstwą zostały umieszczone cząsteczki digitoniny. Obliczenia z wykorzystaniem klasycznej dynamiki molekularnej były prowadzone przy stałej powierzchni przez 60 ns, ostatnie 10 ns zostało wzięte do analizy.

Na rysunku 4.14 została przedstawiona monowarstwa cholesterolu, projekcja z góry (4.14 A) i z boku (4.14 B). Na rysunkach 4.14 A i B widać, że cząsteczki są ściśle upakowane w monowarstwie. Tak samo jak w poprzednim modelu cząsteczki cholesterolu orientują się na powierzchni wody, unikając z nią kontaktu. Jedynie grupa hydroksylowa jest zanurzona w subfazie wodnej. Digitonina tak jak w poprzednim modelu posiada duże powinowactwo do



Rysunek 4.14: Model monowarstwy cholesterolu z digitoniną. Dla większej przejrzystości rysunku z cholesterolu zostały usunięte atomy wodoru. Kolory użyte na rysunku: cholesterol - szary, grupa hydroksylowa cholesterolu- czerwony, część hydrofobowa digitoniny - żółty, reszty cukrowe digitoniny -różowy, woda - cyjan.

cząsteczek cholesterolu w monowarstwie i znajduje się albo bezpośrednio pod powierzchnią membrany albo penetruje ją częścią aglikonową, część glikonowa zanurzona jest w subfazie wodnej.

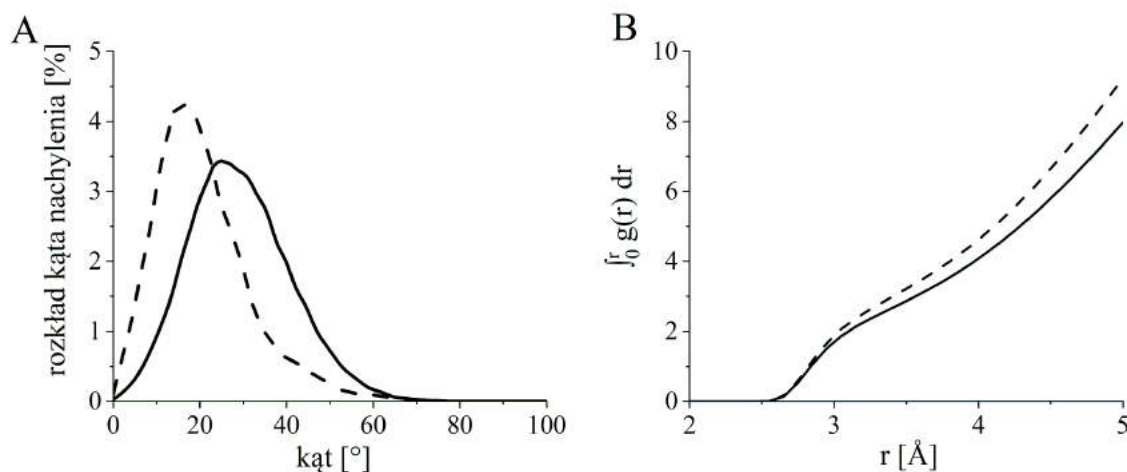


Rysunek 4.15: **A:** Profil gęstości monowarstwy cholesterolu skompresowanej do powierzchni cząsteczkowej 45 Å. Na rysunku został przedstawiony tylko pomiar dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny. Kolory: czerwony - grupa izopropylowa cholesterolu, czarna -OH cholesterolu, magenta -środek masy części hydrofobowej digitoniny, niebieski -OH z reszt cukrowych digitoniny, jasnoniebieski -woda. **B:** Całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między grupą -OH cholesterolu a grupami -OH z reszt cukrowych digitoniny.

Następnie w celu dokładniejszego poznania lokalizacji cząsteczek w monowarstwie wyznaczono profile gęstości charakterystycznych grup funkcyjnych w cząsteczkach układu. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.15.

Profile gęstości grup funkcyjnych w cząsteczkach układu wykazały, że sygnały pochodzące od cząsteczek cholesterolu w układzie zawierającym digitoninę są przesunięte w stronę subfazy wodnej względem analogicznych sygnałów pochodzących od układu referencyjnego. Takie wyniki oznaczają, że cząsteczki cholesterolu są nieznacznie bardziej zanurzone w subfazie wodnej w przypadku monowarstwy referencyjnej niż w układzie zawierającym digitoninę. Sygnały otrzymane dla terminalnego izopropylu oraz grupy hydroksylowej cholesterolu dla układu zawierającego saponinę są odrobinę wyższe i węższe w stosunku do odpowiadających im sygnałów z monowarstwy referencyjnej. Środki masy części hydrofobowej digitoniny zarówno penetrują monowarstwę, jak i adsorbują pod jej powierzchnią. Sygnały pochodzące od grup hydroksylowych reszt cukrowych digitoniny występują jedynie w subfazie wodnej. Sugeruje to, że część glikonowa saponiny zanurzona jest w wodzie i oddziałuje zarówno z cząsteczkami subfazy jak i z grupami hydroksylowymi cholesterolu.

Następnie w celu jednoznacznego potwierdzenia oddziaływania między grupami hydroksylowymi cholesterolu i grupami hydroksylowymi reszt cukrowych digitoniny wyliczono całkę po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par. Wyniki zaprezentowane na rysunku 4.15 B, dowodzą, że wspomniane wyżej grupy funkcyjne sterolu i saponiny znajdują się w odległości około 3 Å, co potwierdza możliwość tworzenia wiązań wodorowych między badanymi grupami funkcyjnymi.



Rysunek 4.16: **A:** Rozkład kąta nachylenia wektora cholesterolu w stosunku do normalnej. Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. **B:** Całka z radialnej funkcji rozkładu par między grupą hydroksylową cholesterolu a cząsteczkami wody. Na obu rysunkach linią ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

Następnie zbadano uporządkowanie cząsteczek cholesterolu w monowarstwie, w tym celu wykonano pomiar rozkładu kąta nachylenia molekuł budujących membranę, a także obliczono całkę po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między grupami hydroksylowymi

cholesterolu a cząsteczkami wody. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.16.

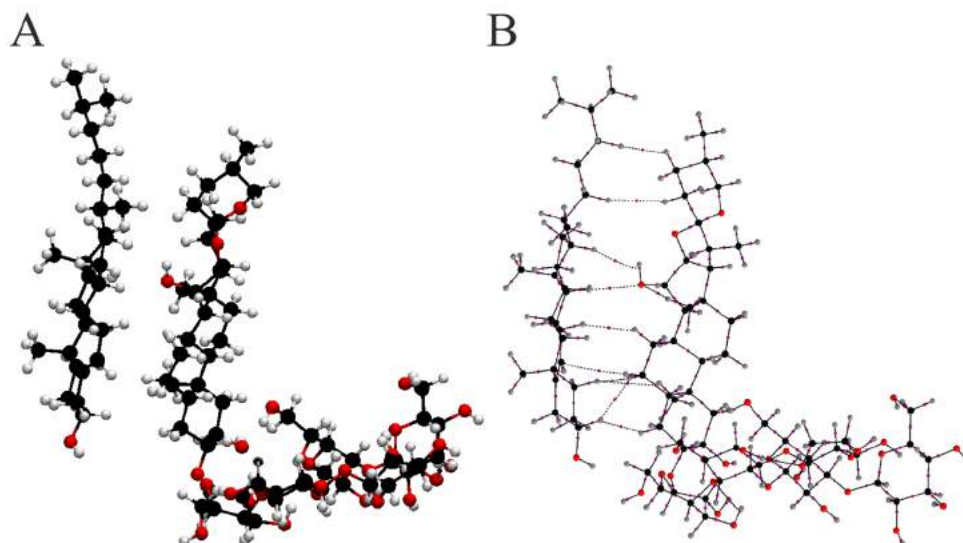
Rozkład kąta nachylenia wektora cholesterolu zdefiniowanego pomiędzy atomami węgla C3 i C17 wykazał, iż cząsteczki cholesterolu w monowarstwie referencyjnej są nachylone pod mniejszym kątem w stosunku do normalnej monowarstwy. W przypadku układu zawierającego digitoninę cząsteczki sterolu są nachylone pod kątem 22° do normalnej monowarstwy. Natomiast w układzie referencyjnym cząsteczki budujące monowarstwę są odchyłone o 17° od normalnej. Dla układu zawierającego digitoninę otrzymano szerszy rozkład kąta nachylenia cholesterolu do normalnej, co wskazuje na słabszą organizację cząsteczek w monowarstwie. Natomiast cząsteczki w monowarstwie referencyjnej są bardziej zorganizowane i mniej odchyłone od normalnej.

Całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między grupami hydroksylowymi cholesterolu, a cząsteczkami wody opisuje stopień uwodnienia grup -OH cholesterolu. Z zamieszczonego wykresu (rysunek 4.16 B) wynika, że cząsteczki cholesterolu w badanej monowarstwie były mniej uwodnione w stosunku do monowarstwy referencyjnej. Jednakże ilość cząsteczek wody występujących w pierwszej sferze hydratacyjnej dla obu układów jest podobna, o czym świadczą takie same wartości wyliczonej całki w odległości między cząsteczkami około 3 Å. W dalszych sferach hydratacyjnych znajduje się mniej cząsteczek wody w układzie zawierającym digitoninę niż w układzie odniesienia. Mniejsze uwodnienie badanego układu potwierdza powinowactwo digitoniny do monowarstwy i jej występowanie w pobliżu cząsteczek cholesterolu, a także może świadczyć o oddziaływaniach reszt cukrowych digitoniny z grupą hydroksylową cholesterolu.

Obliczenia kwantowo-chemiczne dimeru cholesterol - digitonina

W kolejnym etapie badań wykonano obliczenia kwantowo - chemiczne dimerów: cholesterolu i digitoniny. Obliczenia miały na celu zbadanie oddziaływań między hydrofobowymi częściami cząsteczek sterolu i saponiny. Geometrie dimerów zostały wycięte z trajektorii, a konkretnie została wycięta co dziesiąta klatka z ostatniej nanosekundy symulacji, jedna z klatek została zaprezentowana na rysunku 4.17 A. Następnie obliczono energię oddziaływania cząsteczek (bez ich optymalizowania), która wynosiła $-11,9 (\pm 2,1)$ kcal/mol. Dla jednej losowej klatki została wygenerowana funkcja falowa, a następnie z wykorzystaniem metod QTAIM zostały wyznaczone punkty krytyczne wiązań między cząsteczkami w dimerze, rysunek 4.17 B.

Przeprowadzone obliczenia QTAIM wykazały istnienie 9 punktów krytycznych wiązania między hydrofobowymi częściami cząsteczek cholesterolu i digitoniny. Większość z nich stanowiły oddziaływania wodorów - wódór (7), pozostałe BCP występowały między atomem węgla i wodoru (1) a także atomem węgla i tlenu (1). Gęstości elektronowe w powyższych punktach krytycznych wynosiły od 0,00259 a.u. (oddziaływania $H \cdots H$) do 0,00911 a.u. (oddziaływania $H \cdots O$). Powyższe wartości gęstości elektronowych między badanymi cząsteczkami wskazują na istnienie oddziaływań van der Waalsa [69].



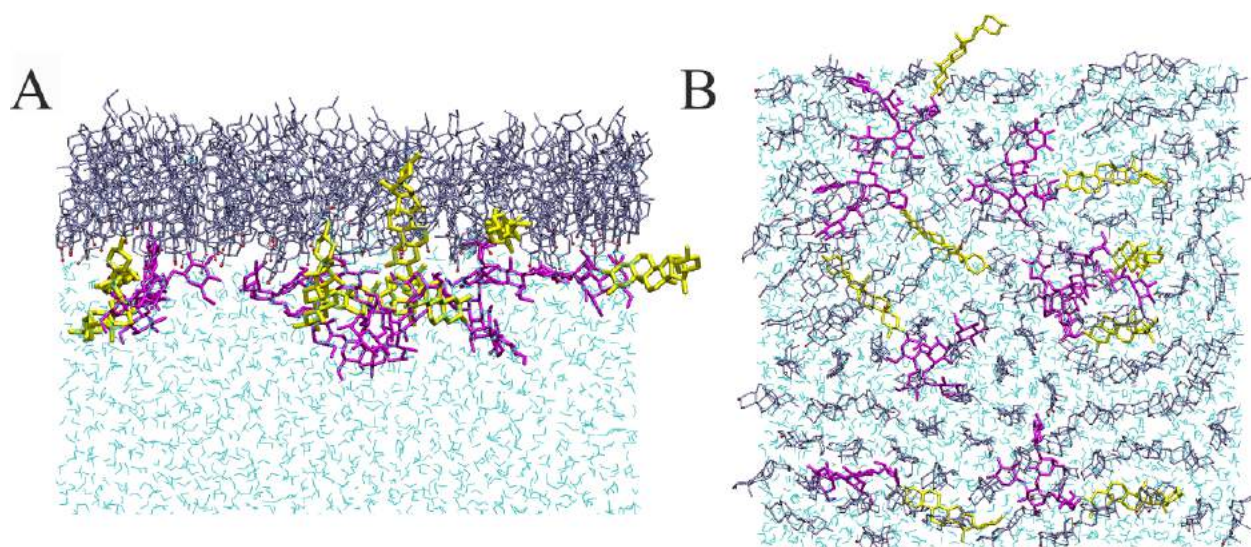
Rysunek 4.17: **A:** Dimer cholesterol - digtonina. **B:** Wyznaczone punkty krytyczne między cząsteczkami cholesterolu i digtoniny.

Oddziaływanie digtoniny z monowarstwą diosgeniny

Na rysunku 4.18 zostały zaprezentowane końcowe klatki trajektorii, projekcja z góry (A) i z boku (B). Cząsteczki w monowarstwie zajmują całą dostępną powierzchnię. Cząsteczki digtoniny adsorbują się do powierzchni monowarstwy. W przypadku skompresowanego układu diosgeniny tylko nieliczne cząsteczki digtoniny penetrują monowarstwę swoimi częściami aglikonowymi, większość z nich jest ułożona prostopadle do normalnej monowarstwy pod jej powierzchnią.

W celu lepszego poznania umiejscowienia cząsteczek w monowarstwie zostały wyznaczone profile gęstości charakterystycznych grup funkcyjnych cząsteczek układu, rysunek 4.19 A. Profile gęstości zostały umieszczone na dwóch wykresach, górny przedstawia układ zawierający cząsteczki digtoniny, natomiast dolny odpowiada układowi referencyjnemu. Taki podział był konieczny ze względu na penetrację cząsteczek wody do monowarstwy. Widać, że w przypadku obu układów, z digtoniną i referencyjnego cząsteczki wody penetrują w głąb monowarstwy lokalizując się na wysokości reszt cukrowych diosgeniny - gęstość wody to około $0,05 \text{ g cm}^{-3}$. Natomiast część steroidowa diosgeniny jest znacznie mniej uwodniona - gęstość wody w tym rejonie cząsteczki to jedynie $0,015 \text{ g cm}^{-3}$. Ponadto cząsteczki wody penetrują głębiej do monowarstwy gdy w układzie obecna jest digtonina.

Cząsteczki diosgeniny w obecności digtoniny są głębiej zanurzone do subfazy wodnej w stosunku do monowarstwy referencyjnej, co może świadczyć o przesunięciu cząsteczek diosgeniny w stronę subfazy wodnej. Digtonina częściej umiejscawia się tuż pod powierzchnią monowarstwy niż w samej membranie. Ponadto tak samo jak w przypadku monowarstw ściśniętych do zadanego ciśnienia powierzchniowego tylko część aglikonowa penetruje do monowarswy,

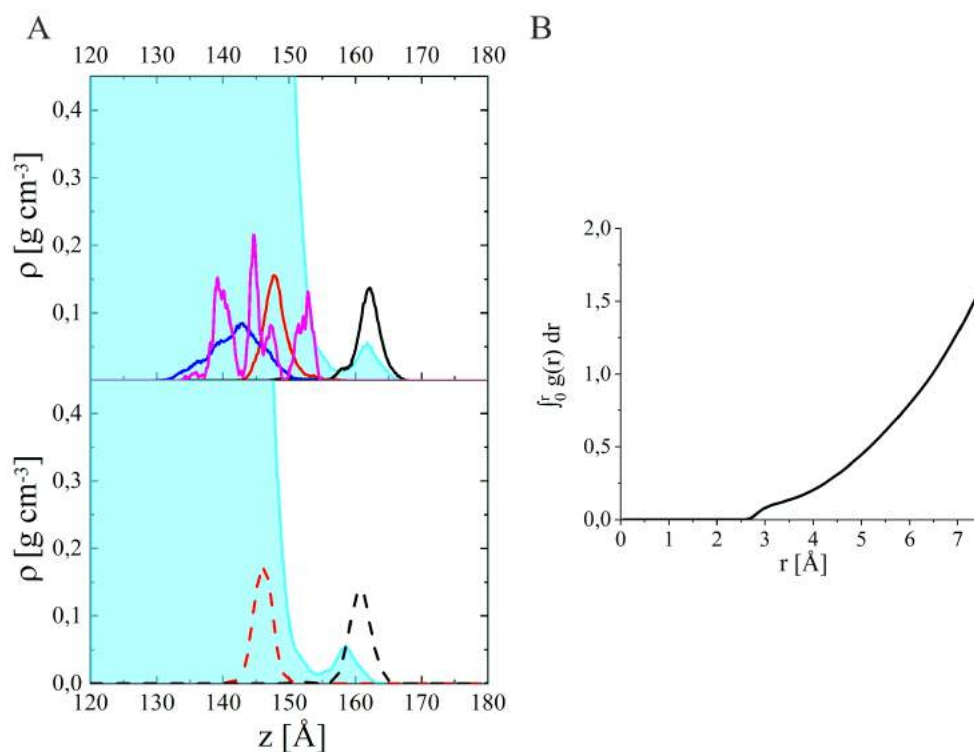


Rysunek 4.18: Model monowarstwy diosgeniny z digitoniną rysunek **A** projekcja z góry, rysunek **B** widok z boku. Dla większej przejrzystości rysunku z diosgeniny zostały usunięte atomy wodoru. Kolory użyte na rysunku: diosgenina - szary, grupa hydroksylowa diosgeniny- czerwony, część hydrofobowa digitoniny - żółty, reszty cukrowe digitoniny -różowy, woda - cyjan.

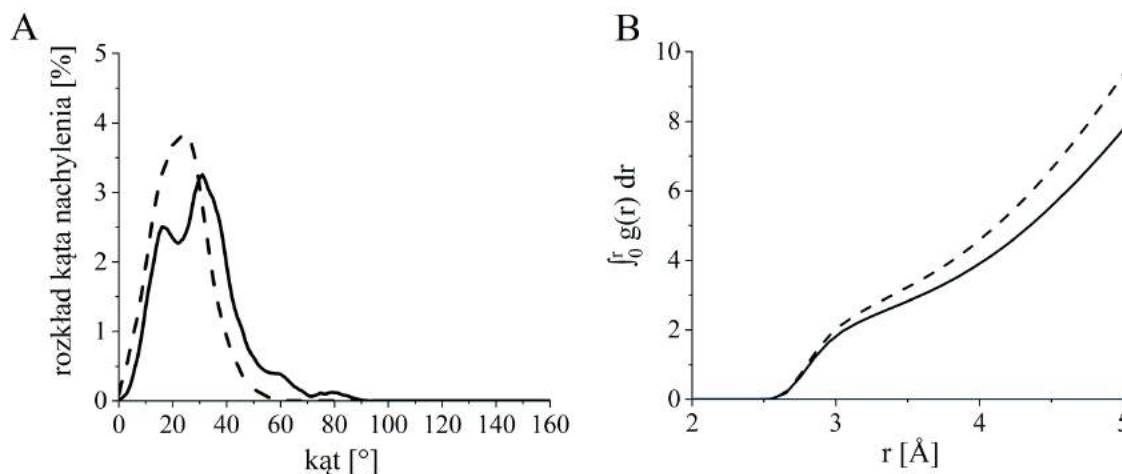
części cukrowe zlokalizowane są pod powierzchnią monowarstwy i mogą oddziaływać z otaczającymi cząsteczkami wody, a także grupami hydroksylowymi diosgeniny. Oddziaływanie grupy hydroksylowej diosgeniny z grupami hydroksylowymi części glikonowej digitoniny, zostało zaprezentowane na rysunku 4.19 B. Obliczona całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par w odległości 3 Å potwierdziła, że grupy -OH diosgeniny i grup -OH ugrupowań glikonowych digitoniny znajdują się wystarczająco blisko siebie żeby możliwe było wytworzenie wiązań wodorowych między tymi atomami.

Na rysunku 4.20 A został zaprezentowany rozkład kąta nachylenia wektora diosgeniny zdefiniowanego między atomami węgla C3 i C17. W przypadku monowarstwy referencyjnej cząsteczki są nachylone najczęściej o 23° w stosunku do normalnej podczas gdy cząsteczki diosgeniny w układzie z digitoniną charakteryzują się dwoma preferowanymi nachyleniami pod kątem 17° oraz 33°. W układzie z digitoniną występuje także sygnał od cząsteczek nachylonych pod kątem 60° i niewielki sygnał od cząsteczek nachylonych pod kątem 80°. Nachylenie cząsteczek pod dużymi kątami może świadczyć o dużym nieuporządkowaniu cząsteczek w błonie, a także pośrednio o możliwości przesunięcia cząsteczek diosgeniny w stronę subfazy wodnej co jest zgodne z izotermami adsorpcji zmierzonymi eksperymentalnie.

W kolejnym kroku analizy obliczono całkę po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między grupą hydroksylową diosgeniny, a cząsteczkami wody. Wyniki potwierdzają duże powinowactwo digitoniny do monowarstwy diosgeniny. Uwodnienie monowarstwy diosgeniny jest mniejsze gdy w układzie obecna jest digitonina. Również liczba cząsteczek wody w pierwszej sferze hydratacyjnej grupy hydroksylowej diosgeniny może się nieznacznie zmniejszać w układzie badanym względem układu referencyjnego.



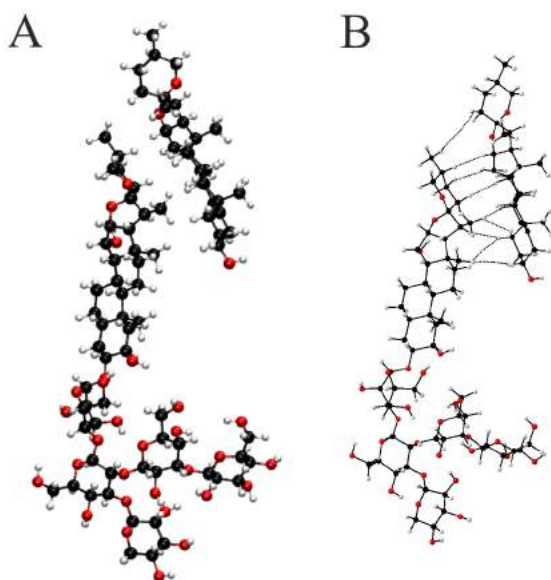
Rysunek 4.19: **A:** Profile gęstości monowarstwy diosgeniny skompresowanej do powierzchni cząsteczkowej 45 $\text{\AA}$. Na rysunku został przedstawiony tylko pomiar dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny. Kolory: czerwony - terminalna grupa metylowa diosgeniny, czarny -OH diosgeniny, magenta -środek masy części hydrofobowej digitoniny, niebieski -OH z reszt cukrowych digitoniny, jasnoniebieski -woda. **B:** Całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między grupą -OH diosgeniny a grupami -OH z reszt cukrowych digitoniny.



Rysunek 4.20: **A:** Rozkład kąta nachylenia wektora diosgeniny w stosunku do normalnej. Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. **B:** Całka z radialnej funkcji rozkładu par między grupą hydroksylową diosgeniny a cząsteczkami wody. Na obu rysunkach linią ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

Obliczenia kwantowo - chemiczne dimeru diosgenina - digitonina

W kolejnym etapie badań wykonano obliczenia kwantowo - chemiczne dla dimeru diosgenina - digitonina. Celem obliczeń była dokładna analiza oddziaływań między diosgeniną a digitoniną. W tym celu z symulacji MD została wybrana cząsteczka diosgeniny i oddziałująca z nią cząsteczka digitoniny. Ich geometrie zostały wycięte z co dziesiątej klatki ostatniej nanosekundy symulacji. Dla otrzymanych geometrii została obliczona energia oddziaływania międzycząsteczkowego, która wynosiła $-8,6 (\pm 1,1)$ kcal/mol, co wskazuje na oddziaływania stabilizujące między cząsteczkami w dimerze. Z losowej klatki trajektorii została wygenerowana funkcja falowa, z której wyznaczono punkty krytyczne wiązania metodami QTAIM dla części aglikonowych obu badanych cząsteczek.

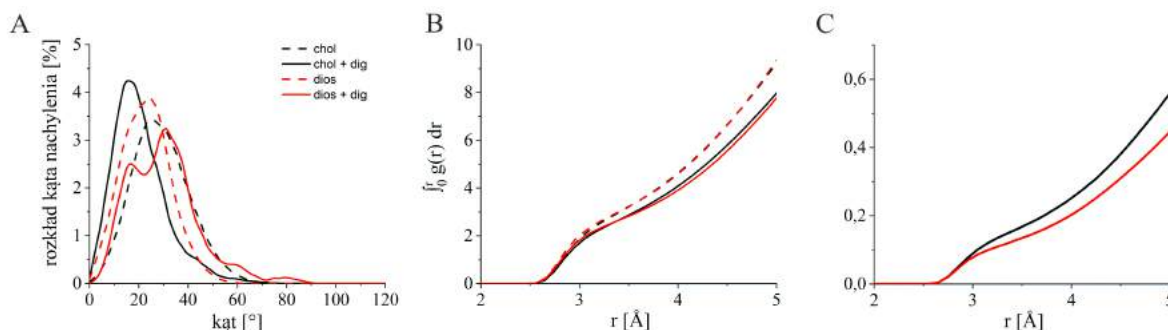


Rysunek 4.21: A: Dimer diosgenina - digitonina. B: Wyznaczone punkty krytyczne między cząsteczkami diosgeniny i digitoniny.

Na rysunku 4.21 A została przedstawiona przykładowa geometria wycięta z trajektorii, cząsteczki oddalone są od siebie o około 3 Å, części hydrofobowe obu cząsteczek są ustawione równolegle do siebie, jednakże cząsteczka digitoniny jest przesunięta w stosunku do cząsteczki diosgeniny. Jest to spowodowane niecałkowitą penetracją digitoniny do błony (por. rysunki: 4.18 i 4.19). Następnie na rysunku 4.21 B zostały przedstawione wyznaczone punkty krytyczne wiązania między częściami hydrofobowymi cząsteczek diosgeniny i digitoniny. Analiza Badera wykazała istnienie dziewięciu punktów krytycznych wiązania między cząsteczkami w dimerze, wszystkie to BCP wodór - wodór. Gęstości elektronowe w wyznaczonych punktach krytycznych wynosiły od 0,00161 a.u do 0,00689 a.u. Otrzymane gęstości odpowiadają oddziaływaniom van der Waalsa między badanymi cząsteczkami [69].

4.3.3 Porównanie parametrów monowarstw cholesterolu i diosgeniny, dyskusja

Porównanie parametrów monowarstw cholesterolu i diosgeniny zostało przedstawione na rysunku 4.22.



Rysunek 4.22: Porównanie parametrów monowarstw cholesterolu i diosgeniny. Rysunek **A**: rozkład kąta nachylenia; **B**: całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji rozkładu par między grupami -OH cholesterolu (czarny) lub -OH diosgeniny (czerwony) a cząsteczkami wody; **C**: całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji rozkładu par między grupami -OH cholesterolu (czarny) lub -OH diosgeniny (czerwony) a grupami -OH reszt cukrowych digitoniny. Linia ciągłą oznaczono układ zawierający digitoninę, linią przerywaną układ referencyjny.

Skompresowana monowarstwa cholesterolu jest bardziej zorganizowana niż monowarstwa diosgeniny w tych samych warunkach (rysunek 4.22 A). W monowarstwie diosgeniny w obecności cząsteczek digitoniny tworzą się dwa preferowane nachylenia cząsteczek: 17° i 33°, podczas gdy w monowarstwie cholesterolu cząsteczki najczęściej ustawiają się pod kątem 22°. Cząsteczki diosgeniny są przesuwane z monowarstwy w kierunku subfazy o czym świadczy występowanie sygnałów przy kątach większych niż 60° i 80°.

W przypadku uwodnienia grup hydroksylowych cząsteczek budujących monowarstwę nie ma różnicy w uwodnieniu cholesterolu i diosgeniny. W obu przypadkach digitonina umieszcza się blisko monowarstwy separując grupy -OH od cząsteczek wody. W obu przypadkach możliwa liczba cząsteczek wody znajdujących się w pierwszej strefie hydratacyjnej grup hydroksylowych nieznacznie spada gdy w układzie obecna jest digitonina.

Grupy hydroksylowe cząsteczek budujących monowarstwę znajdują się wystarczająco blisko ugrupowań glikonowych digitoniny by mogły się między nimi tworzyć wiązania wodorowe. Grupy hydroksylowe cholesterolu oddziałują nieco częściej z digitoniną niż analogiczne grupy -OH diosgeniny.

Digitonina adsorbuje do monowarstwy i penetruje zarówno monowarstwę cholesterolu jak i diosgeniny. W eksperymencie wyznaczono tak zwane ciśnienie wysycenia monowarstwy, które dla monowarstwy cholesterolu wynosiło 68,4 mN/m [137], taki wynik jest zbliżony do wyniku uzyskanego przez Schulmana i Rideala [9]. Natomiast dla monowarstwy diosgeniny ciśnienie wysycenia było równe 49,0 mN/m. Różnica w otrzymanych wartościach sugeruje, że więcej

cząsteczek digitoniny może penetrować do monowarstwy cholesterolu niż do membrany zbudowanej z diosgeniny. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą klasycznej dynamiki molekularnej.

Doświadczenia *in silico* wykazały, że więcej cząsteczek digitoniny penetruje monowarstwę cholesterolu, oraz że cząsteczki zaadsorbowane pozostają w monowarstwie. Wniosek ten jest tożsamy z wnioskami wynikającymi z sekcji 4.2, gdzie niezależnie od ciśnienia powierzchniowego membrany, digitonina penetrowała monowarstwę w podobnym stopniu, co zostało także pokazane w pracy Korchowiec i współpracowników [20]. Podobne wyniki uzyskali Wojciechowski i współpracownicy badający monowarstwy zbudowane z mieszanin lipidowych zawierających w swoim składzie cholesterol [7] oraz Frenkel i współpracownicy badający liposomy zbudowane z SOPC i cholesterolu [8].

Natomiast w przypadku monowarstwy zbudowanej z diosgeniny digitonina w większości adsorbuje się do monowarstwy ale tylko nieliczne cząsteczki penetrują monowarstwę swoimi częściami hydrofobowymi. Izotermy adsorpcji digitoniny do monowarstw diosgeniny pokazały, że po początkowej adsorpcji digitoniny do monowarstwy następuje powolna desorpcja cząsteczek monowarstwy do subfazy wodnej, taki wynik został także otrzymany w symulacji w sekcji 4.2, gdzie digitonina penetrowała układ tylko do ciśnienia powierzchniowego wynoszącego 25 mN/m, następnie przy $\Pi = 35$ mN/m następowało wypychanie cząsteczek digitoniny z monowarstwy.

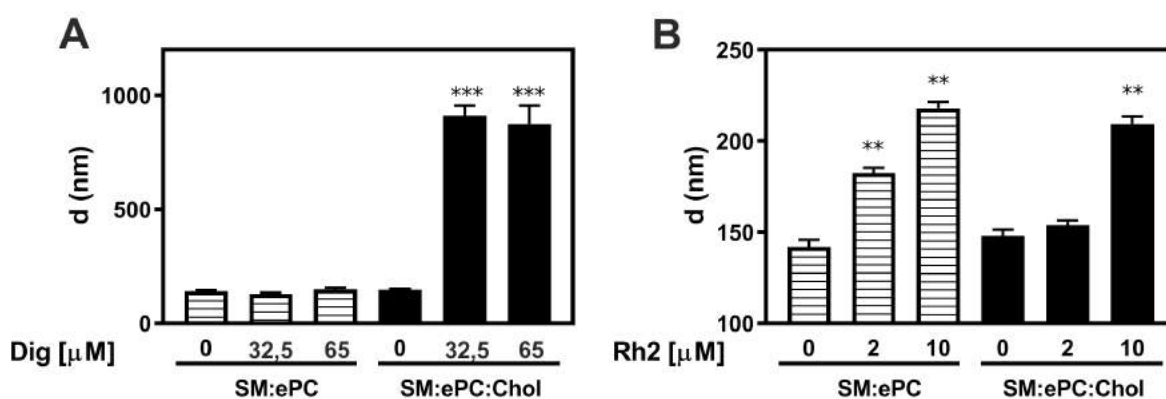
W niniejszej pracy po raz pierwszy zaprezentowano analizę oddziaływań międzycząsteczkowych w dimerach cholesterol-digitonina i diosgenina-digitonina. Obliczono energię oddziaływania między dimerami wynoszącą odpowiednio: $-11,9 (\pm 2,1)$ kcal/mol i $-8,6 (\pm 1,1)$ kcal/mol. Obie energie wskazują na występowanie oddziaływania stabilizującego między cząsteczkami w dimerach, różnice między nimi nie są istotne statystycznie. Między cząsteczkami w dimerach zostały wyznaczone punkty krytyczne wiązania, zarówno w dimerze cholesterol-digitonina jak również diosgenina-digitonina występowało dziewięć BCP. W przypadku obu dimerów większość punktów krytycznych wiązania stanowiły oddziaływania wodor-wodór, występowały również BCP węgiel-wodór, oraz tlen-wodór.

4.4 Liposomy LUV

W niniejszej pracy wykonano także pomiary dla dużych liposomów jednowarstwowych (LUV) stanowiących modelowe błony biologiczne. Błony zostały zbudowane w taki sposób aby jak najlepiej odtwarzać rzeczywiste błony komórkowe. Lipid ePC stanowi fazę nieuporządkowaną (L_d), natomiast SM oraz cholesterol stanowią fazę uporządkowaną (L_o) błon komórkowych i są ważnymi składnikami raft lipidowych [12]. W środowisku naukowym panuje przekonanie, że saponiny oddziałując z błoną komórkową wiążą się z występującym w niej cholesterol. Aby zweryfikować tę tezę wykonano liposomy składające się z ePC:SM w stosunku równomolowym, a także ePC:SM:chol także w stosunku 1:1:1. Liposomy zostały wykonane poprzez

ekstruzję liposomów wielowarstwowych. Średnica liposomów wynosiła około 150 nm. Celem eksperymentu było zbadanie wpływu dwóch saponin digitoniny, a także ginsenozydu Rh2 na modele membran biologicznych, a także określenie roli cholesterolu w tym oddziaływaniu.

Na początku zbadano wpływ saponin na wielkość liposomu. W tym celu do przygotowanych roztworów liposomów zostały dodane albo digitonina albo ginsenozyd Rh2 i całość inkubowano przez 5 min w 25°C. Eksperyment został powtórzony trzy razy po trzy próbki w każdym powtórzeniu. Wyniki zostały poddane analizie za pomocą testu statystycznego - jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.23.



Rysunek 4.23: Rozkład wielkości LUV inkubowanych przez 5 min z digitoniną (A) oraz z ginsenozydem Rh2 (B). Wyniki zostały poddane jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. **, $p = 0,01$.

Na rysunku 4.23 A zostały przedstawione liposomy inkubowane z digitoniną. Stężenie digitoniny zostało tak dobrane aby odpowiadało stężeniu digitoniny stosowanej w badaniach monowarstw Langmuira, drugie niższe stężenie to połowa stężenia stosowanego w badaniach powierzchniowych. Liposomy referencyjne, zaznaczone przerywaną linią, posiadają homogeniczny rozkład wielkości wynoszący około 150 nm. Digitonina wywiera ogromny wpływ na liposomy zawierające cholesterol ich średnica zwiększa się prawie dziesięciokrotnie, jest to różnica istotna statystycznie na poziomie $p = 0,001$. Natomiast w przypadku liposomów dwuskładnikowych (ePC: SM, 1:1) digitonina nie powoduje zmiany wielkości pęcherzyków. Wpływ digitoniny na liposomy jest porównywalny w obu stężeniach.

Rysunek 4.23 B przedstawia wpływ ginsenozydu Rh2 na liposomy dwu i trój składnikowe (ePC:SM:eChol, 1:1:0 lub 1:1:1). W badaniach zastosowano trzy stężenia saponiny 2 μM, 5 μM i 10 μM. Stężenia te zostały wybrane gdyż były to minimalne stężenia dla których widoczny był wpływ zarówno na błonę cytoplazmatyczną komórek nowotworowych nowotworu piersi [11] jaki i błony modelowe. Tak jak w poprzednim wypadku widać, że wielkości liposomów referencyjnych są homogeniczne i wynoszą około 150 nm. Ginsenozyd Rh2 wywiera

efekt na oba rodzaje pęcherzyków. Inkubacja z saponiną jest przyczyną powiększenia się średnicy liposomów. Średnica liposomów dwuskładnikowych zostaje powiększona zarówno gdy pęcherzyki były inkubowane z ginsenozydem Rh2 o stężeniu $5\mu\text{M}$ i $10\mu\text{M}$, są to różnice o poziomie istotności na poziomie $p = 0,01$. Natomiast średnica liposomów zawierających cholesterol zostaje powiększona tylko w przypadku zastosowania wyższego stężenia saponiny, jest to także różnica istotna statystycznie na poziomie $p = 0,01$.

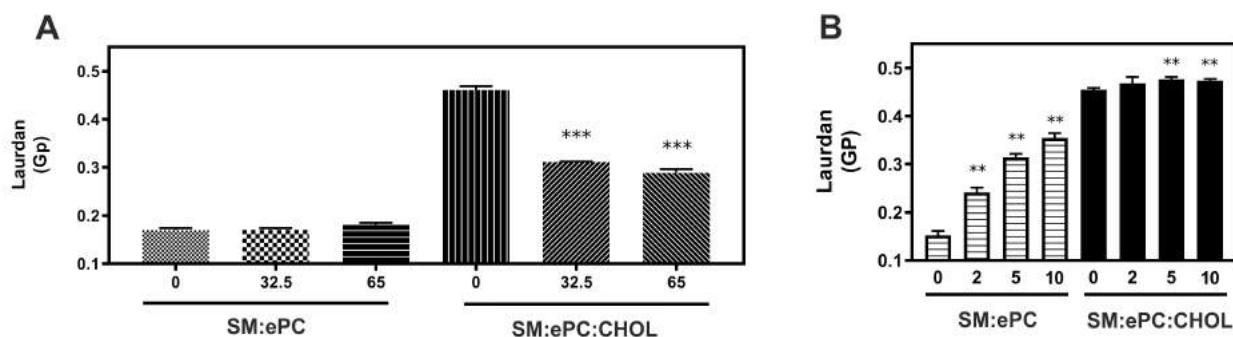
Uporządkowanie lipidów w błonie liposomu

Następnie zbadano uporządkowanie lipidów w błonie liposomów. W tym celu zastosowano dwa znaczniki fluorescencyjne umiejscawiające się w różnych częściach błony, pierwszym z nich był Laurdan, który posiada niewielką część hydrofilową dzięki, której preferencyjnie umiejscawia się na poziomie glicerolu w błonie [140]. W doświadczeniu badano uogólnioną polaryzację (GP) sondy Laurdan wyrażonej wzorem:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (4.1)$$

gdzie I oznacza intensywność fluorescencji sondy Laurdan przy długościach fali 440 nm lub 490 nm. GP określa stopień uporządkowania dwuwarstwy lipidowej, a konkretnie gdy cząsteczka Laurdanu znajduje się w błonie w stanie stałym (żel krystaliczny), wtedy emituje promieniowanie o długości fali 440 nm. Natomiast gdy chromofor znajduje się w błonie w fazie ciekłego kryształu, sonda Laurdan emituje promieniowanie o długości fali 490 nm. Im wyższa wartość parametru GP sondy Laurdan tym błona jest bardziej uporządkowana [22, 141].

Tak jak poprzednio badano cztery układy, liposomy dwuskładnikowe równomolowe składające się z ePC oraz SM, oraz trójskładnikowe składające się z równomolowej mieszaniny ePC, SM oraz cholesterolu. Liposomy były inkubowane z dwoma różnymi saponinami albo digitoniną albo ginsenozydem Rh2. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.24.



Rysunek 4.24: Pomiar uporządkowania w rejonie głów hydrofilowych z wykorzystaniem metody uogólnionej polaryzacji sondy Laurdan. Liposomy inkubowane z digitoniną (**A**) oraz z ginsenozydem Rh2 (**B**). Wyniki zostały poddane jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta.***, $p=0,001$; **, $p = 0,01$.

W przypadku liposomów dwuskładnikowych (ePC:SM, 1:1) digitonina nie wywierała żadnego efektu na błonę liposomową, o czym świadczy podobna wartość parametru GP otrzymana

dla liposomów kontrolnych i inkubowanych z digitoniną, rysunek 4.24 A. Obliczony parametr GP dla liposomów dwuskładnikowych wynosił od 0,17 do 0,19 która charakteryzowała się wysokim nieuporządkowaniem w rejonie głów lipidowych. Obecność digitoniny w roztworze liposomów trójskładnikowych powodowała zmniejszenie wartości parametru GP sondy Laurdan, co oznaczało że digitonina zmniejszała organizację w błonie liposomów składających się z ePC:SM:chol (1:1:1). Otrzymany wynik jest istotny statystycznie na poziomie $p = 0,001$ dla obu badanych stężeń. Ponadto dobrze koreluje z wynikami uzyskanymi w badaniach eksperymentalnych i teoretycznych monowarstw, gdzie zostało pokazane, że obecność digitoniny destabilizuje badane monowarstwy POPC/SM/CHOL.

W przypadku oddziaływania ginsenozydu Rh2 z liposomami, otrzymano wyniki przeciwne do tych otrzymanych dla liposomów inkubowanych z digitoniną. Ginsenozyd Rh2 usztywnia błonę zarówno liposomów dwu- i trójskładnikowych i jest to wynik istotny statystycznie na poziomie $p = 0,01$ w przypadku zastosowania roztworu Rh2 o stężeniu $5 \mu\text{M}$ i $10 \mu\text{M}$. Wartość współczynnika uogólnionej polaryzacji sondy Laurdan wzrastała dla wszystkich badanych stężeń ginsenozydu Rh2, jest to wynik istotny statystycznie na poziomie $p = 0,01$. Taki wynik sugeruje, że części hydrofilowe lipidów ePC i SM oddziałują z ginsenozydem znacznie lepiej nawet przy niskich stężeniach saponiny, niż gdy w błonie liposomowej obecny jest cholesterol.

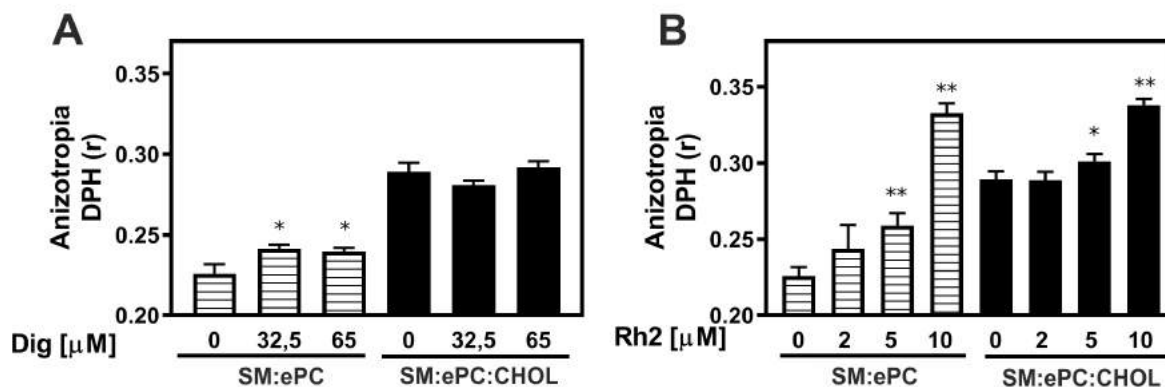
Otrzymane wyniki pokazują przeciwstawne działanie dwóch badanych saponin. Digitonina destabilizuje błonę liposomu zawierającego cholesterol. Natomiast ginsenozyd Rh2 wykazuje efekt analogiczny do cholesterolu poprzez usztywnianie i stabilizowanie błony liposomu.

Drugim znacznikiem fluorescencyjnym było DPH, które jest cząsteczką niepolarną lokalizującą się w pobliżu łańcuchów lipidowych w błonie. Metoda pomiaru anizotropii fluorescencji DPH (r), opisana w sekcji 2.3.2, pozwala na badanie uporządkowania hydrofobowych części błon biologicznych, im wyższa anizotropia fluorescencji DPH tym rejon hydrofobowy błony jest bardziej zorganizowany.

W kolejnym eksperymencie zbadano uporządkowanie łańcuchów lipidowych w błonie liposomów wykorzystując sondę DPH, wyniki zostały zestawione na rysunku 4.25.

Obecność digitoniny w roztworze zawierającym liposomy dwuskładnikowe powoduje wzrost anizotropii fluorescencji DPH w stosunku do liposomów kontrolnych. Świadczy to o działaniu stabilizującym digitoniny na liposomy nie zawierające cholesterolu i zmniejszeniu płynności błony, jest to efekt istotny statystycznie na poziomie $p = 0,05$. Natomiast nie zmienia się płynność części hydrofobowej liposomów trójskładnikowych, gdyż wartości r nie zmieniają się istotnie statystycznie w obecności digitoniny względem próbki kontrolnej.

Wyniki otrzymane dla liposomów inkubowanych z digitoniną porównano z wynikami otrzymanymi z analogicznego eksperymentu z ginsenozydem Rh2. Zarówno liposomy inkubowane z ginsenozydem Rh2 o stężeniu $5 \mu\text{M}$ jak i $10 \mu\text{M}$ zwiększają wartość parametru r , co oznacza wzrost sztywności błony liposomów zbudowanych z ePC:SM (1:1). Jest to wynik istotny statystycznie na poziomie $p = 0,01$. W liposomach zbudowanych z trójskładnikowej miesza-



Rysunek 4.25: Pomiar uporządkowania w rejonie hydrofobowym błony z wykorzystaniem sondy DPH. Liposomy inkubowane przez 5 min z digitoniną (A) oraz z ginsenozydem Rh2 (B). Wyniki zostały poddane jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. **, $p = 0,01$; *, $p = 0,05$.

niny lipidów również obserwowalny jest wzrost sztywności błony, jednakże efekt jest znacznie mniejszy niż w przypadku liposomów dwuskładnikowych.

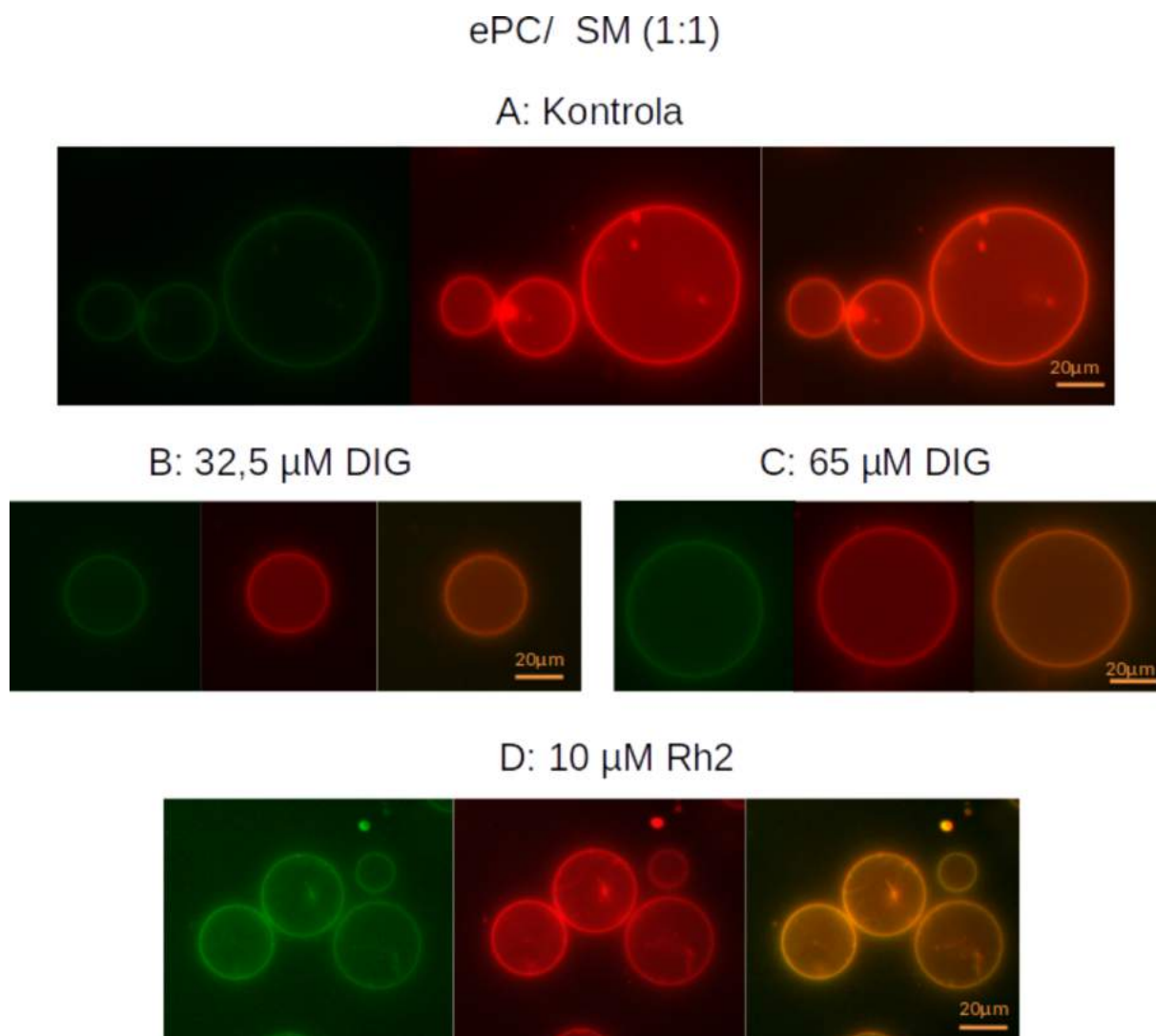
Przedstawione wyniki sugerują, że obie saponiny oddziałują z liposomami, digitonina oddziałuje silniej z liposomami, w których skład wchodzi cholesterol, natomiast ginsenozyd Rh2 oddziałuje preferencyjnie z liposomami dwuskładnikowymi. Najprawdopodobniej wynika to z różnicy w budowie cząsteczek saponin.

Ponadto w publikacji grupy profesor Mingeot-Leclercq [143] zostało wykazane, iż ginsenozyd Rh2 charakteryzuje się podobnym działaniem jak cholesterol w błonie, to znaczy preferencyjnie oddziałuje ze sfingomieliną, a także stabilizuje i usztywnia błonę.

4.5 Badania mikroskopowe - olbrzymie liposomy jednowarstwowe (GUV)

W ostatnim etapie badań nad dwuwarstwami zbadano oddziaływanie saponin, digitoniny i ginsenozydu Rh2 z błoną GUV. W tym celu utworzono olbrzymie liposomy zawierające barwniki fluorescencyjne. Wykorzystano Rho-DOPE, które preferencyjnie umiejscawia się w fazie ciekłej nieuporządkowanej (l_d)- wykazuje ono emisję przy długości fali odpowiadającej światłu czerwonemu, a także NBD-DHPE, który ma powinowactwo do lipidów występujących w stanie ciekłym uporządkowanym (l_o)- emisja światła o długości fali odpowiadającej barwie zielonej.

Tak jak w poprzednim eksperymencie liposomy składały się albo ePC:SM (1:1) albo ePC:SM:chol (1:1:1). Następnie GUVy były inkubowane z saponiną: digitoniną lub ginsenozydem Rh2 przez 5 min i obserwowane pod mikroskopem konfokalnym. Następnie próbka była kontrolowana co 10 min przez 2 h. Faza lipidów l_d była widoczna po oświetleniu próbki lampą emitującą



Rysunek 4.26: Liposomy dwuskładnikowe (ePC:SM - 1:1) obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym. Liposomy znakowane Rho-DOPE lokujące się w fazie l_d (emisja - światło czerwone) oraz NBD-DHPE lokujące się w fazie l_o (emisja - światło zielone).

promieniowanie 560 nm, natomiast do wizualizacji fazy l_o użyto lampy z długością fali równą 463 nm.

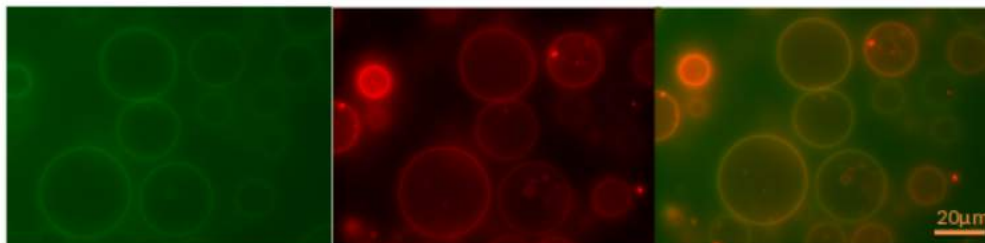
Wyniki obserwacji liposomów dwuskładnikowych zostały przedstawione na rysunku 4.26. W próbce kontrolnej inkubowanej przez 5 min z DMSO zostało zaobserwowane wiele liposomów o różnych wielkościach, w liposomach nie obserwowano separacji faz co oznaczało, że lipidy w dwuwarstwie były wymieszane i nie tworzyły większych skupisk jednolipidowych. Interesujące jest to, że w próbce kontrolnej obserwowano odpączkowanie i tworzenie się wtórnych liposomów we wnętrzu liposomów pierwotnych, co mogło świadczyć o niestabilności liposomów [143].

Inkubacja liposomów z digitoniną w obu badanych stężeniach prowadziła do zmniejszenia liczby pęcherzyków występujących w próbce, jednakże liposomy wciąż były widoczne, na ich powierzchni nie obserwowano separacji faz. Ponadto z pęcherzyków nie wypączkowały

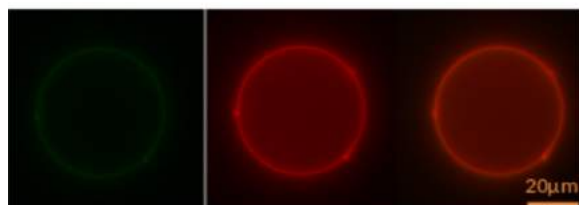
liposomy wtórne, a wnętrza liposomów nie zawierały rozerwanych fragmentów błon.

SM:ePC:CHOL (1:1:1)

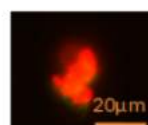
A: Kontrola, 5min



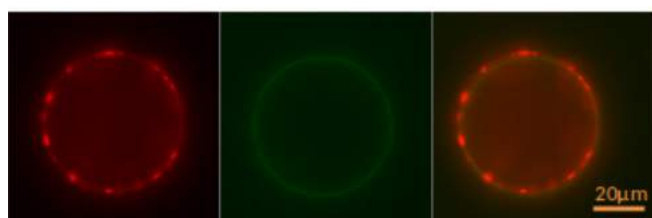
B: 32,5 μM DIG, 5min



C: 65 μM DIG, 5min



D: 10 μM Rh2, 5min



E: 10 μM Rh2, 120 min



Rysunek 4.27: Liposomy trójskładnikowe (ePC:SM:CHOL - 1:1:1) obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym. Liposomy znakowane Rho-DOPE lokujące się w fazie l_d (emisja - światło czerwone) oraz NBD-DHPE lokujące się w fazie l_o (emisja - światło zielone).

Po pięciominutowej inkubacji z ginsenozydem Rh2 w badanej próbce wciąż były widoczne liposomy. Ich liczba była większa niż w przypadku próbki kontrolnej, natomiast ich średnica była mniejsza, co mogło świadczyć o intensywnym podziale. Dodatkowo we wnętrzach liposomów były widoczne fragmenty błon, powierzchnia liposomów była jednorodna i nie występowała separacja faz.

Następnie zostały zbadane liposomy trójskładnikowe składające się z ePC:SM:CHOL (1:1:1). Liposomy inkubowano 5 min z saponiną, jako kontrola został użyty DMSO. W próbce kontrolnej zaobserwowano wiele liposomów, o różnych rozmiarach. We wszystkich liposomach nie zaobserwowano separacji faz, innymi słowy faza l_d i l_o znajdowała się w obrębie całej powierzchni liposomu. W liposomach inkubowanych przez 5 min z digitoniną o stężeniu 32,5 μM zaobserwowano liposomy z niewielkimi skupiskami lipidów w fazie l_d , natomiast lipidy fazy l_o charakteryzowały się jednorodnym rozkładem na powierzchni liposomu, dłuższa inkubacja

proceedziła do zaniku liposomów i przekształceniu ich w „grudki” lipidowe. Kolejnym eksperymentem była inkubacja liposomów z digitoniną o stężeniu $65\ \mu\text{M}$ po 5 minutach inkubacji nie zaobserwowano żadnych liposomów, jedynie skupiska lipidów, które były pozostałością po liposomach, rysunek 4.27 (C).

Drugą badaną saponiną był ginsenozyd Rh2, w liposomach inkubowanych z tą saponiną występowała separacja faz, która była niewielka po 5 minutach inkubacji, natomiast po 120 minutach lipidy w liposomie rozdzielały się na dwie fazy: l_o i l_d . W miejscu gdzie występowały lipidy znajdujące się w fazie l_d tworzył się pęcherzyk i następowało powolne wypęszczowywanie wtórnego liposomu z liposomu macierzystego.

Badania mikroskopowe morfologii ogromnych liposomów jednowarstwowych pozwoliły na określenie wpływu badanych saponin na modelowe błony biologiczne. Cholesterol pełni kluczową rolę w oddziaływaniu digitoniny z błoną biologiczną co jest zgodne z badaniami opisanymi w literaturze [78]. Co ciekawe także w przypadku liposomów dwuskładnikowych (ePC:SM, 1:1) obecność digitoniny wpływa na zmniejszenie liczby liposomów występujących w próbce, co może świadczyć o oddziaływaniu digitoniny z lipidami ePC i SM. Oddziaływanie digitoniny z innymi lipidami niż cholesterol zostało pokazane także w pracach Korchowiec i współpracowników [20], oraz pracy Orczyk i współpracowników [142].

Ginsenozyd Rh2 wywołuje separację faz w liposomach trójskładnikowych, której konsekwencją jest wypęszczowywanie liposomów wtórnych z liposomów macierzystych. Natomiast w liposomach dwuskładnikowych powoduje niszczenie liposomów co jest widoczne w mikroskopie jako fragmenty błon, oraz podział liposomów przez co w polu widzenia znajduje się więcej liposomów o mniejszych średnicach niż przed inkubacją z saponiną.

W publikacji grupy profesor Mingeot-Leclercq zostało pokazane, że ginsenozyd Rh2 powoduje wypęszczowywanie nowych liposomów tylko wtedy gdy w błonie modelowej obecna jest sfingomielina. Natomiast gdy liposomy składają się tylko z ePC oraz cholesterolu obserwuje się pęszczowanie nowych liposomów do środka liposomu macierzystego [143].

4.6 Oddziaływanie digitoniny z lipidami

W publikacji grupy profesor Mingeot-Leclercq zostało pokazane, że ginsenozyd Rh2, steroidowa saponina, oddziałuje mocniej z komórkami z mniejszą ilością cholesterolu w komórkach nowotworu piersi niż z komórkami z prawidłową ilością sterolu [11]. Ponadto badania fizykochemiczne układu modelowego - liposomów, wykazały że ginsenozyd Rh2 oddziałuje najsilniej ze sfingomieliną obecną w błonie badanych pęcherzyków [143].

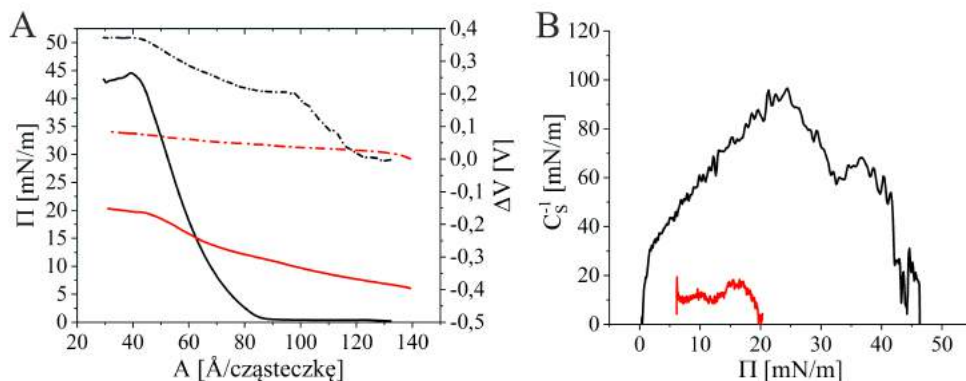
Digitonina jest saponiną znaną z jej oddziaływania z cholesterolem błonowym, jednakże nie ma badań poświęconych ewentualnemu oddziaływaniu saponiny ze sfingomieliną. Ponadto digitonina jest saponiną wykorzystywaną w badaniach neurobiologicznych. Zgodnie z literaturą błony komórek nerwowych są bogate w sfingomielinę oraz rafty lipidowe zbudowane głównie ze sfingomieliny i cholesterolu [144, 145, 146]. Digitonina zwiększa przepuszczalność

błon komórkowych komórek nerwowych.

W celu zbadania oddziaływań digitoniny ze sfingomieliną, a także z raftami lipidowymi wykonano szereg pomiarów monowarstw Langmuira zbudowanych z następujących lipidów: POPC/SM (1:1), POPC/SM/CHOL (1:1:1). Badania obejmowały pomiary izoterm Π -A, potencjału, izoterm adsorpcji, a także modelowanie z wykorzystaniem metod klasycznej dynamiki molekularnej.

4.6.1 Oddziaływanie digitoniny z monowarstwą POPC/SM

Wykonano model błony komórkowej nie zawierający w swoim składzie cholesterolu. Model zawierał lipidy z fazy l_d - POPC oraz l_o - SM w mieszaninie równomolowej. Dla powyższej mieszaniny wykonano pomiary izoterm $\Pi - A$ oraz $\Delta V - A$ na subfazie wodnej oraz wodnym roztworze digitoniny, rysunek 4.28. W przypadku monowarstwy POPC/SM nałożonej na subfazę wodną zarejestrowano izotermę, która charakteryzowała monowarstwę jednorodną, bez widocznych przejść fazowych, rysunek 4.28 A. Potencjał powierzchniowy wzrasta na początku gwałtownie o 0,2 V sugerując następowanie reorganizacji cząsteczek w monowarstwie, bezpośrednio po nagłym wzroście potencjału, zaczyna także wzrastać ciśnienie powierzchniowe. Następnie po niewielkim plateau potencjał powierzchniowy powoli wzrasta aby osiągnąć swoje maksimum (0,37 V) w punkcie załamania monowarstwy. Natomiast z izoterm $\Pi - A$ można odczytać, że monowarstwa załamywała się przy ciśnieniu powierzchniowym 42,5 mN/m oraz powierzchni cząsteczkowej równej 51 mN/m. Dla zmierzonej monowarstwy został obliczony współczynnik ściśliwości równy 101,9 mN/m co według klasyfikacji Rideala & Daviesa odpowiada stanowi ciekłemu skondensowanemu.

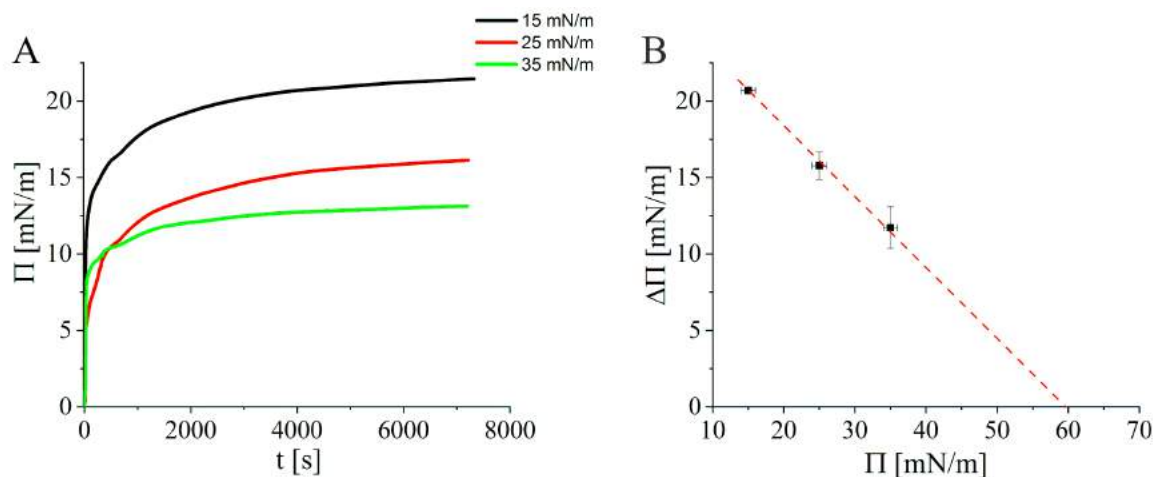


Rysunek 4.28: Izoterm Π -A i ΔV -A monowarstw utworzonych z równomolowej mieszaniny POPC/SM (A). Wyliczona zależność współczynnika ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego (B).

Następnie nałożono film lipidowy na powierzchnię subfazy wodnego roztworu digitoniny, również w przypadku tego układu zaobserwowano nagły wzrost ciśnienia powierzchniowego wskazującego na adsorpcję i penetrację digitoniny do filmu, rysunek 4.28 A. Pomiar potencjału

powierzchniowego wskazuje na niewielkie zmiany w organizacji cząsteczek w monowarstwie podczas kompresji filmu. Punkt załamania monowarstwy występował przy A_{coll} równym $53 \text{ \AA}^2/\text{cząsteczkę}$, oraz ciśnieniu powierzchniowym wynoszącym $17,8 \text{ mN/m}$. Nachylenie monowarstwy jest niewielkie co oznacza, że cząsteczki digitoniny mocno destabilizują układ. Współczynnik ściśliwości monowarstwy obliczony dla tego układu odpowiada fazie ciekłej rozprężonej i wynosi zaledwie 23 mN/m .

Następnie wykonano pomiary izoterm adsorpcji dla trzech wybranych ciśnień powierzchniowych, rysunek 4.29. Digitonina adsorbowała i penetrowała do monowarstwy gwałtownie podwyższając ciśnienie powierzchniowe. Największą zmianę ciśnienia powierzchniowego zaobserwowano dla monowarstwy ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m , gdzie $\Delta\Pi$ była równa $20,7 \text{ mN/m}$, następnie przy wyższym Π początkowym (25 mN/m) $\Delta\Pi$ wynosiła 16 mN/m , a w przypadku monowarstwy ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m wynosiła jedynie 11 mN/m . Z otrzymanych wyników obliczono ciśnienie wysycenia monowarstwy wynoszące $59,6(\pm 0,3) \text{ mN/m}$.

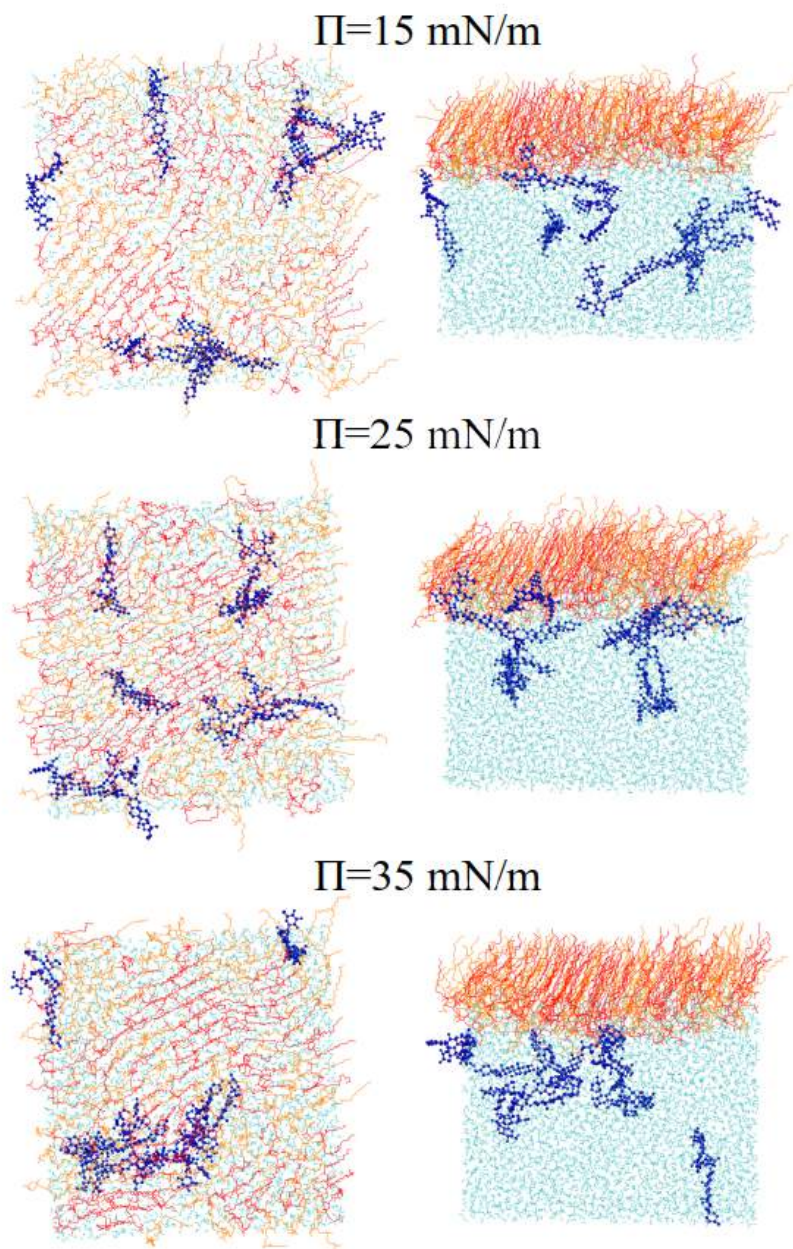


Rysunek 4.29: Izoterm adsorpcji digitoniny do monowarstwy utworzonej z równomolowej mieszaniny POPC/SM (A). Zależność $\Delta\Pi$ od ciśnienia początkowego (Π_0): efekt adsorpcji digitoniny do monowarstwy POPC/SM (B).

Równoległe z badaniami eksperymentalnymi zostały przeprowadzone symulacje monowarstw metodami klasycznej dynamiki molekularnej. Została sporządzona monowarstwa składająca się z cząsteczek POPC i SM rozrzuconych losowo w membranie, liczba cząsteczek obu lipidów była równa. Monowarstwa została zanurzona w wodzie (model TIP3P) - układ referencyjny. Ponadto pod monowarstwą umieszczono 8 cząsteczek digitoniny. Symulacje prowadzono 60 ns, z których ostatnie 10 ns zostało użyte do analizy. Na rysunku 4.30 zostały zestawione projekcje z góry i z boku na monowarstwy ściśnięte do trzech różnych ciśnień: 15 mN/m , 25 mN/m i 35 mN/m . Lipidy w monowarstwie zajmują całą dostępną powierzchnię, nie tworzą się stabilne pory. Digitonina adsorbuje pod powierzchnią monowarstw, lub znajduje się poniżej w fazie objętościowej. Widać wyraźną różnicę w adsorpcji digitoniny do monowarstwy składającej się z mieszaniny lipidów POPC/SM, a czystą monowarstwą cholesterolu. W przy-

padku mieszaniny część cząsteczek adsorbuje do monowarstwy, ale też cząsteczki znajdują się w fazie objętościowej w pewnym oddaleniu od błony.

W celu dokładniejszego poznania umiejscowienia digitoniny w układzie, wyznaczono profile gęstości charakterystycznych grup funkcyjnych cząsteczek występujących w układzie.



Rysunek 4.30: Model monowarstwy równomolowej mieszaniny POPC/SM z digitoniną, projekcja z góry (**A**) oraz z boku (**B**). Rysunki przedstawiają monowarstwy skompresowane do trzech różnych ciśnień powierzchniowych: 15 mN/m, 25 mN/m i 35 mN/m. Dla większej przejrzystości z cząsteczek lipidów zostały usunięte atomy wodoru. Kolory: POPC - pomarańczowy, SM - czerwony, digitonina - niebieski, woda - cyjan.

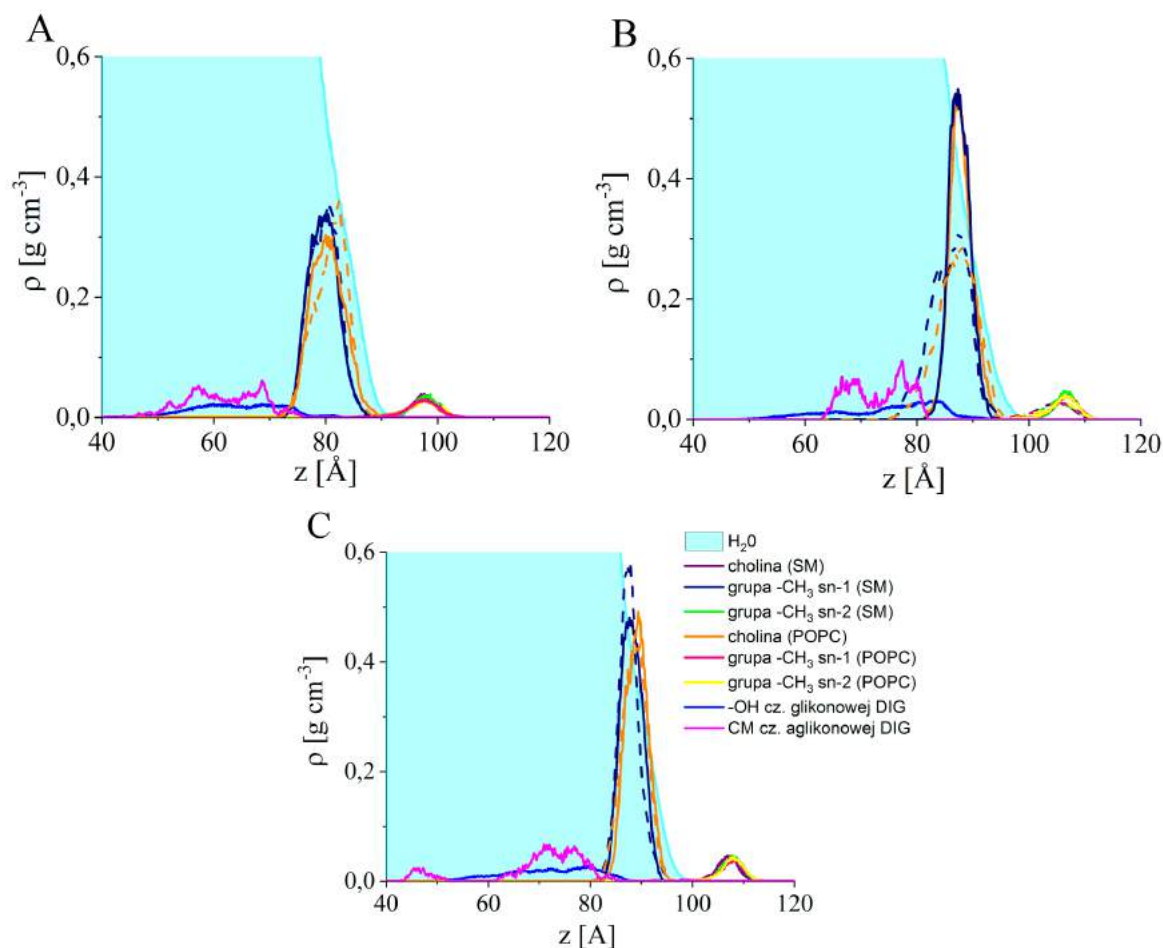
Na rysunku 4.31 zostały zestawione profile gęstości otrzymane przy trzech ciśnieniach powierzchniowych: 15 mN/m, 25 mN/m i 35 mN/m. Układ ściśnięty do ciśnienia powierzch-

niowego 15 mN/m charakteryzuje się najszerszymi profilami gęstości głów hydrofilowych, co oznacza najmniejsze uporządkowanie części hydrofilowych lipidów. Obecność digitoniny powoduje nieznaczne poszerzenie profili gęstości grupy cholinowej POPC i przesunięcie jej w stronę subfazy wodnej. Jednocześnie profil gęstości zarejestrowany dla głów SM nie ulega zmianie w obecności cząsteczek saponiny względem układu referencyjnego. Zarówno część hydrofobowa, jak i glikonowa digitoniny znajduje się pod powierzchnią monowarstwy przy ciśnieniu powierzchniowym równym 15 mN/m. Sygnał otrzymany od ugrupowań glikonowych digitoniny nakłada się z sygnałem od głów hydrofilowych, co oznacza, że część glikonowa może oddziaływać z głowami lipidowymi. Nie obserwuje się penetracji monowarstwy przez część aglikonową digitoniny, co może świadczyć o mniejszym powinowactwie saponiny do cząsteczek lipidów w błonie. Terminalne grupy metylowe obu lipidów nie zmieniają znacząco swojego położenia w obecności digitoniny w stosunku do układu referencyjnego.

Co ciekawe digitonina obecna w układzie gdzie monowarstwa została ściśnięta do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m zwiększa orientację głów hydrofilowych obu lipidów monowarstwy. W przypadku układu referencyjnego sygnał otrzymany od choliny jest znacznie szerszy, a średnia gęstość tej grupy funkcyjnej wynosi około $0,29 \text{ g cm}^{-3}$ (POPC) i $0,31 \text{ g cm}^{-3}$ (SPH). Natomiast w układzie z digitoniną gęstość ta wynosi około $0,53 \text{ g cm}^{-3}$ dla każdego z lipidów. Tak jak w przypadku ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m, digitonina umiejscawia się pod powierzchnią monowarstwy. Część aglikonowa nie penetruje wnętrza membrany, natomiast reszty cukrowe oddziałują z głowami hydrofilowymi lipidów. Profile gęstości części hydrofilowej i hydrofobowej lipidów są przesunięte w stronę subfazy wodnej w układzie odniesienia względem układu z digitoniną. Taki wynik sugeruje, iż digitonina nieznacznie wypycha lipidy z subfazy wodnej, oraz zwiększa organizację ogonów lipidowych.

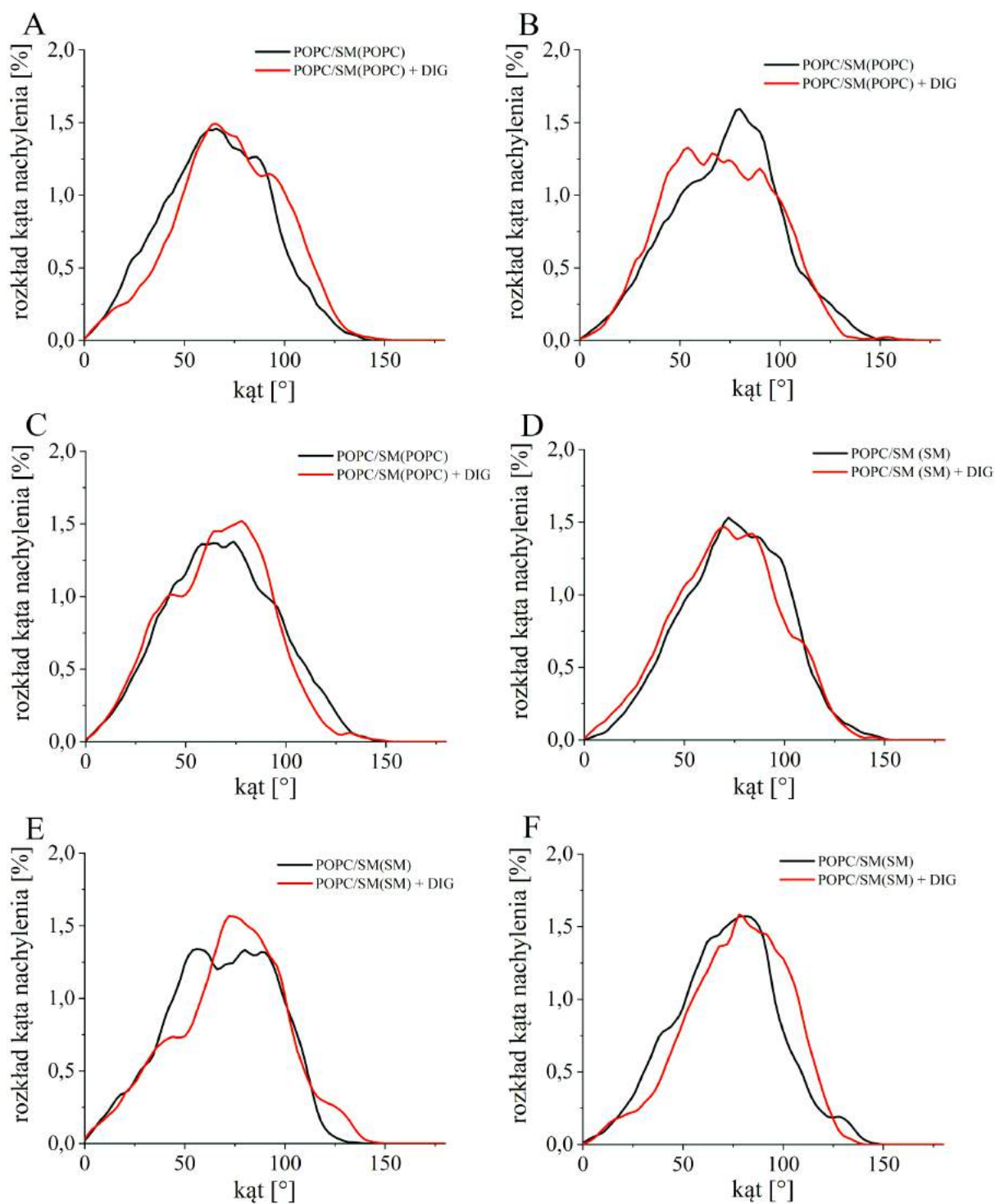
Ostatni badany układ przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m zgodnie z oczekiwaniami jest najbardziej uporządkowany, o czym świadczą wysokie wartości gęstości. Digitonina obecna w układzie nieznacznie destabilizuje głowę hydrofilową sfingomieliny - otrzymany sygnał ma mniejszą intensywność oraz jest szerszy. Tak samo jak w poprzednich układach digitonina nie penetruje monowarstwy, znajduje się pod jej powierzchnią. Ugrupowania glikonowe digitoniny oddziałują z głowami hydrofilowymi lipidów. Położenie terminalnych grup metylowych ogonów lipidowych nie zmienia się w obecności digitoniny, sugerując, że przy tak wysokim ciśnieniu monowarstwy digitonina nie ma wpływu na ułożenie łańcuchów acylowych w monowarstwie.

W następnym kroku analizy obliczono rozkład kąta nachylenia głów lipidowych względem normalnej monowarstwy. Wyniki zostały zebrane na rysunku 4.32, rysunki A-C odpowiadają pomiarom kątów nachylenia głów POPC względem normalnej monowarstwy w trzech badanych wartościach Π , natomiast rysunki od D-F obrazują kąty nachylenia głów sfingomieliny. We wszystkich układach kąty nachylenia głów lipidowych nie układają się w idealny rozkład normalny. Zaburzenia mogą świadczyć o występowaniu oddziaływań między głowami lipidowymi, a także między głowami lipidowymi a cząsteczkami digitoniny.



Rysunek 4.31: Profile gęstości grup funkcyjnych monowarstwy równomolowej mieszaniny POPC/SM z digitoniną. Rysunki przedstawiają monowarstwy przy trzech badanych ciśnieniach powierzchniowych: 15 mN/m (**A**), 25 mN/m (**B**) i 35 mN/m (**C**). Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Legenda zawiera tylko opisy tylko do układu zawierającego digitoninę, kolory dla układu bez digitoniny są analogiczne, zaznaczono je przerywaną linią. Oznaczenie „CM cz. aglikonowej DIG” odnosi się do środka masy części aglikonowej digitoniny.

W przypadku głów hydrofilowych POPC w monowarstwie ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m (rysunek 4.32 A) widoczne jest niewielkie przesunięcie średniego kąta odchylenia od normalnej w stronę wyższych wartości, jednakże maksimum dla układu referencyjnego i badanego występuje w tym samym miejscu i średni kąt nachylenia wynosi 53°. Następnie przy ciśnieniu 25 mN/m (rysunek 4.32 B), sygnał otrzymany od głów hydrofilowych układu zawierającego digitoninę znacznie się poszerzył względem układu referencyjnego. Można wyodrębnić kilka równocennych maksimów, natomiast dla układu referencyjnego występuje jeden dominujący sygnał występujący przy 77°. Głowy hydrofilowe w monowarstwie przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m charakteryzują się podobnym histogramem bez względu na obecność digitoniny, rysunek 4.32 C. W obecności saponiny maksimum sygnału występuje dla odchylenia o 78° od normalnej monowarstwy, natomiast



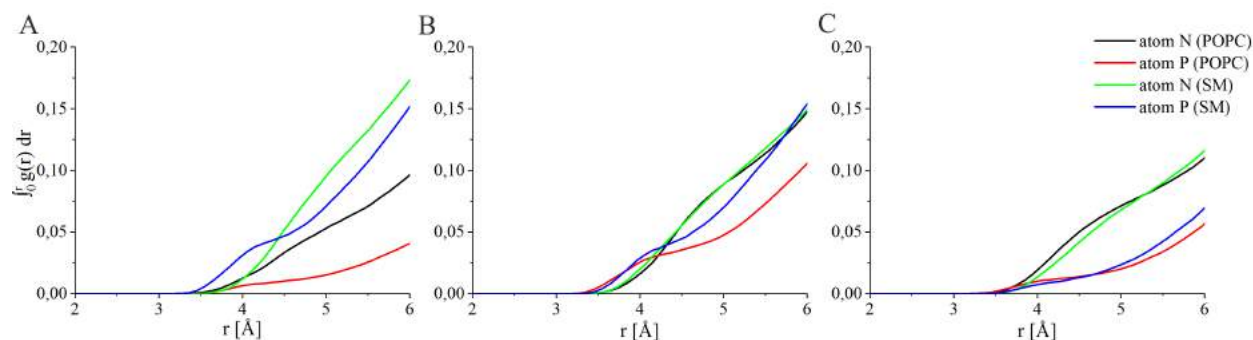
Rysunek 4.32: Rozkład kąta nachylenia głów hydrofilowych lipidów: POPC (A-C) oraz sfingomieliny (D-F) w stosunku do normalnej monowarstwy. Ciśnienia powierzchniowe monowarstw: 15 mN/m (A i D), 25 mN/m (B i E) oraz 35 mN/m (C i F). Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne.

dla układu referencyjnego cząsteczki są średnio odchylone o 76° do normalnej.

Monowarstwa przy ciśnieniu powierzchniowym 15 mN/m nie wykazuje różnic w nachyleniu

głów hydrofilowych SM w obecności i przy braku digitoniny, rysunek 4.32 D. W układzie referencyjnym badane grupy funkcyjne są nachylone pod kątem 73° , natomiast gdy digitonina znajdowała się w układzie powstają dwa maksima przy 70° i 79° . Ścisnięcie monowarstwy do ciśnienia powierzchniowego 25 mN/m powoduje zwiększenie nieuporządkowania w rejonie głów lipidowych sfingomieliny, rysunek 4.32 E. W układzie referencyjnym otrzymany histogram jest bardzo szeroki i posiada liczne maksima. Natomiast obecność digitoniny w układzie zdaje się stabilizować układ, występuje tu jedno maksimum główne (73°) i dwa mniejsze (47° i 127°). Monowarstwa skompresowana do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m charakteryzuje się podobnym rozkładem kąta nachylenia głów lipidowych w obecności jak i przy braku digitoniny, rysunek 4.32 F. W układzie z digitoniną cząsteczki są nachylone pod kątem 76° do normalnej monowarstwy, natomiast w układzie referencyjnym o 80° .

W celu dokładniejszego poznania oddziaływania digitoniny z membraną obliczono całkę po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między atomami azotu i fosforu pochodzących z cholin, a grupami hydroksylowymi ugrupowań glikonowych digitoniny. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.33.



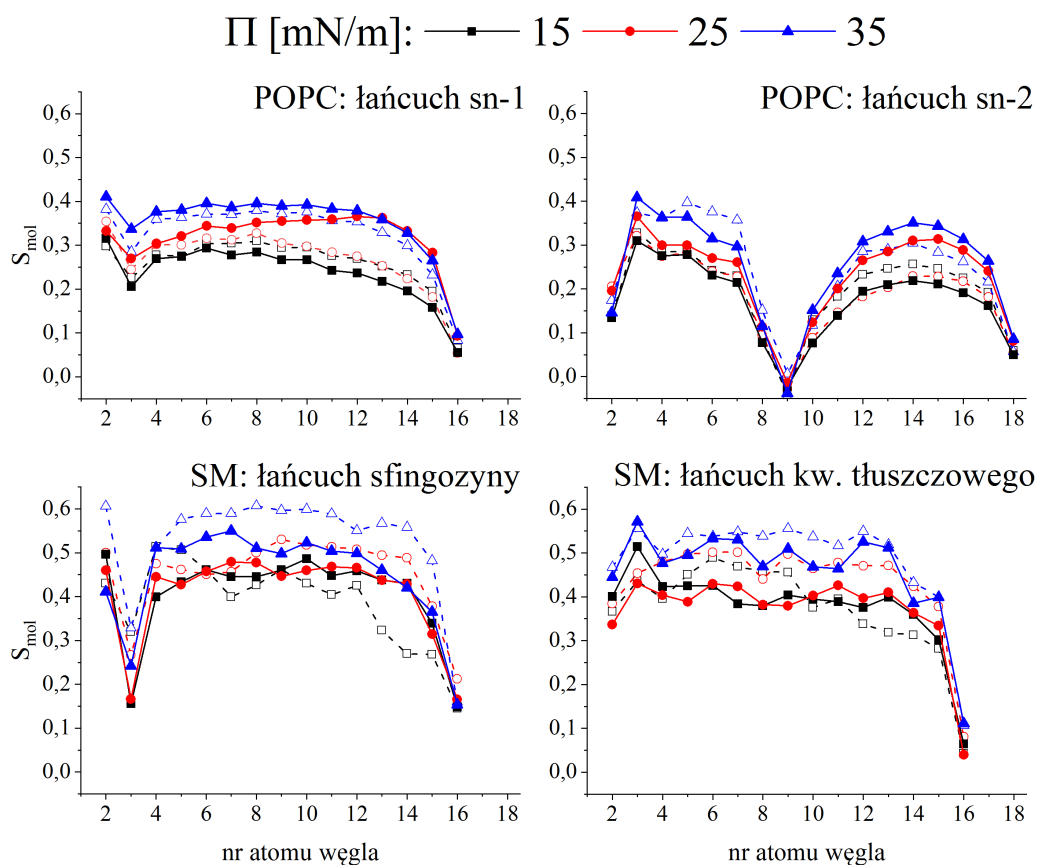
Rysunek 4.33: Całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między atomami pochodzącymi z reszt cholinowych lipidów (POPC i SM) a grupami hydroksylowymi z części glikonowej digitoniny. Ciśnienia powierzchniowe monowarstw: 15 mN/m (A), 25 mN/m (B) oraz 35 mN/m (C).

Otrzymane wyniki pokazują, że oddziaływanie digitoniny z monowarstwą dwuskładnikową niezawierającą cholesterolu zależy bardzo mocno od stopnia uporządkowania monowarstwy. Digitonina oddziałuje silniej ze sfingomieliną niż z POPC gdy monowarstwa jest luźno upakowana ($\Pi=15 \text{ mN/m}$), natomiast w przypadku ciśnienia powierzchniowego równego 25 mN/m liczba cząsteczek znajdujących się w pobliżu SM spada na rzecz głowy hydrofilowej POPC. Liczba grup hydroksylowych digitoniny otaczająca grupę aminową choliny jest prawie identyczna dla obu lipidów, natomiast grupa fosforanowa sfingomieliny oddziałuje częściej z digitoniną, niż analogiczna grupa funkcyjna POPC. Cząsteczki znajdujące się w monowarstwie przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m są bardzo mocno zorganizowane i prawdopodobieństwo wystąpienia digitoniny szczególnie w okolicach grupy fosforanowej znacznie spada. Ponadto, nie ma różnicy w liczbie cząsteczek digitoniny znajdujących się w pobliżu obu bada-

nych lipidów.

Obliczono także hydratację głów lipidowych w pobliżu atomów fosforu i azotu. Liczba cząsteczek wody otaczających cholinę jest praktycznie stała i nie zależy ani od ciśnienia powierzchniowego monowarstwy, ani od obecności digitoniny w układzie. Głowa hydrofilowa sfingomieliny jest otoczona średnio przez 24-25 cząsteczek wody, natomiast głowa POPC przez 23-24 cząsteczki.

W kolejnym etapie badań zanalizowano zachowanie łańcuchów hydrofobowych w błonie, w tym celu wyliczono parametr porządku w obu łańcuchach POPC, $sn - 1$ i $sn - 2$, oraz w obu łańcuchach sfingomieliny, sfingozyny i kwasu tłuszczowego. Dane zostały pokazane na rysunku 4.34. Wartość parametru porządku bliska zero wskazuje na występowanie wielu konformacji typu gauche, natomiast wartość zbliżająca się do jedności świadczy o obecności konformacji all-trans, a tym samym wysokim uporządkowaniu w łańcuchach. Sfingomielina stanowiąca fazę uporządkowaną w błonie charakteryzuje się wyższym parametrem porządku (S_{mol}) wahającym się między 0,4 a 0,6, niż POPC, które stanowi fazę nieuporządkowaną w membranie, dla którego wartość S_{mol} wynosi jedynie 0,2-0,4.



Rysunek 4.34: Parametr porządku dla łańcuchów alifatycznych lipidów: POPC sn-1, sn-2; SM łańcuch sfingozyny i kwasu tłuszczowego. Symbole wypełnione odpowiadają układowi zawierającemu digitoninę, natomiast symbole puste w środku układowi referencyjnemu.

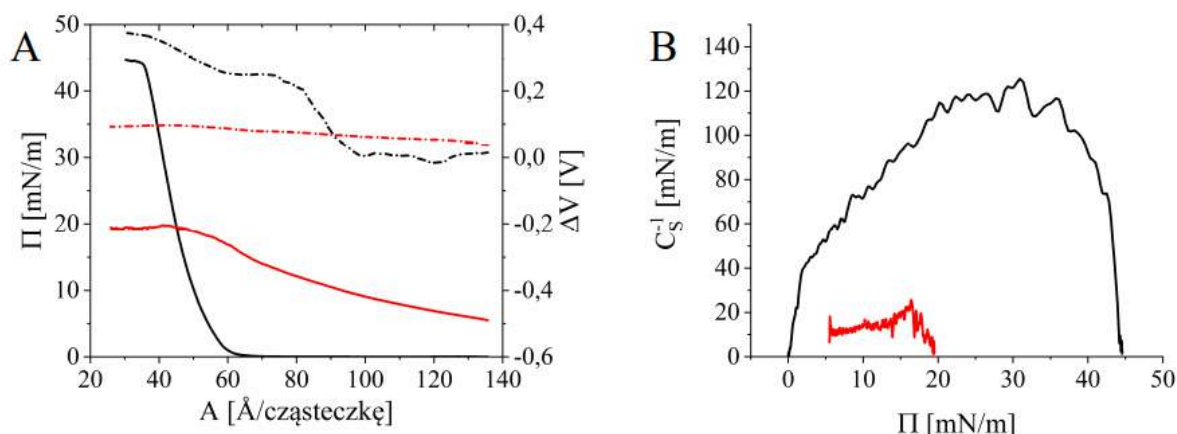
Parametry porządku obliczone dla POPC wskazują na wzrost uporządkowania łańcuchów acylowych wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego monowarstwy, rysunek 4.34. Digitonina ma wpływ na uporządkowanie w łańcuchach $sn - 1$. W układach ściśniętych do 25 mN/m i 35 mN/m obecność digitoniny zwiększa wartość parametru porządku w łańcuchu. Odwrotny efekt obserwowany jest dla monowarstwy skompresowanej ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m. Na kolejnym wykresie został przedstawiony parametr porządku dla łańcucha $sn - 2$. Obserwowalny jest nagły spadek wartości przy dziewiątym atomie węgla wynikający z obecności wiązania podwójnego. Digitonina ma niewielki wpływ na uporządkowanie łańcucha $sn - 2$ POPC. Obserwowany jest niewielki wzrost parametru uporządkowania w monowarstwie ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m, a konkretnie między atomami węgla od piątego do ósmego, oraz w monowarstwie skompresowanej do Π równego 15 mN/m, między atomami węgla od dziesiątego do siedemnastego. Natomiast niewielki spadek uporządkowania łańcucha $sn - 2$ w układzie zawierającym digitoninę obserwowany był przy ciśnieniu powierzchniowym równym 35 mN/m.

Parametry porządku obliczone dla obu łańcuchów sfingomieliny wykazały, że najbardziej uporządkowane są łańcuchy lipidowe w monowarstwie skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 35 mN/m, natomiast nie widać znaczącej różnicy między łańcuchami lipidowymi znajdującymi się w monowarstwach przy niższych wartościach ciśnienia powierzchniowego. Digitonina destabilizuje łańcuchy sfingozyny we wszystkich badanych układach, jedynie w monowarstwie ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m następuje wzrost organizacji łańcuchów między dwunastym a piętnastym atomem węgla. Natomiast w przypadku łańcucha kwasu tłuszczowego digitonina wywiera największy destabilizujący efekt w monowarstwie skompresowanej do Π równego 25 mN/m. Digitonina zmniejsza również uporządkowanie w łańcuchach występujących w układzie skompresowanym do 15 mN/m, a także w niewielkim stopniu w układzie przy ciśnieniu 35 mN/m. Tak samo jak w przypadku łańcucha sfingozyny digitonina stabilizuje łańcuch kwasu tłuszczowego między atomami węgla dwanaście a piętnaście.

4.6.2 Oddziaływanie digitoniny z monowarstwą POPC/SM/CHOL

Sporządzono także monowarstwę zbudowaną z trzech składników: POPC, SM i cholesterolu w proporcji równomolowej. Następnie wykonano pomiary izoterm $\Pi - A$ oraz $\Delta V - A$. Pomiary tak samo jak w poprzednim modelu wykonano na dwóch subfazach: wodnej i wodnym roztworze digitoniny.

Monowarstwa mieszaniny POPC/SM/CHOL na subfazie wodnej charakteryzuje się brakiem widocznych przejść fazowych, jest jednorodna i homogeniczna, rysunek 4.35 A. Potencjał powierzchniowy zaczyna wzrastać przy powierzchni cząsteczkowej równej $92 \text{ \AA}^2$ i jego wartość zmienia się o 0,25 V. Następnie podczas dalszej kompresji filmu następuje niewielkie plateau po którym następuje nieznaczny wzrost potencjału powierzchniowego. W punkcie załama-

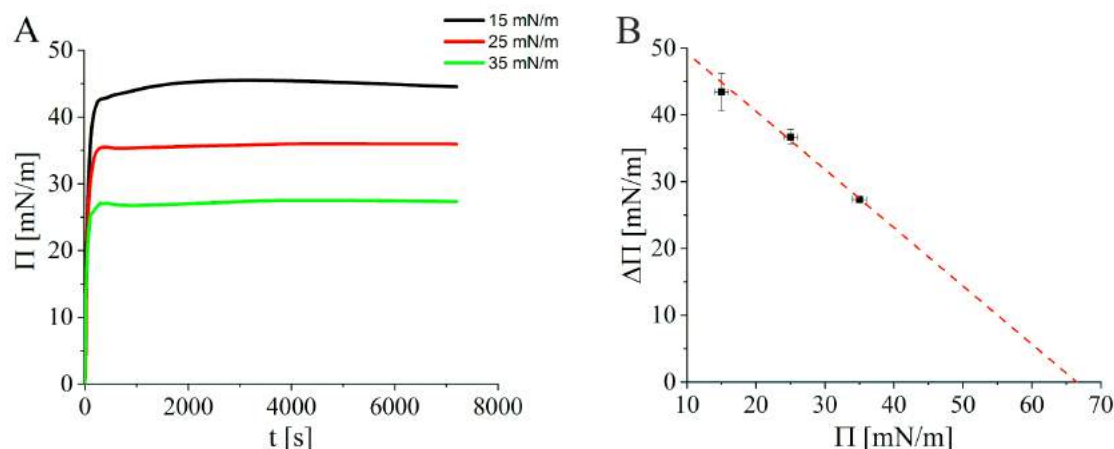


Rysunek 4.35: Izotermy Π - A i V - A monowarstw utworzonych z równomolowej mieszaniny POPC/SM/CHOL (A). Wyliczona zależność współczynnika ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego (B).

nia monowarstwy potencjał osiąga wartość 0,38 V. Z pomiaru izotermy można odczytać, że monowarstwa załamuje się przy Π równym 43 mN/m i powierzchni cząsteczkowej 46 $\text{\AA}^2$. Dla otrzymanej izotermy wyznaczono współczynnik ściśliwości wynoszący 167 mN/m, taka wartość charakteryzuje monowarstwę w fazie ciekłej skondensowanej, rysunek 4.35 B.

Mieszanina trójskładnikowa nałożona na powierzchnię subfazy, wodnego roztworu digitoniny, charakteryzowała się natychmiastowym wzrostem ciśnienia powierzchniowego do wartości 5 mN/m. Następnie podczas ściskania monowarstwa załamywała się przy ciśnieniu powierzchniowym 20 mN/m oraz przy powierzchni cząsteczkowej równej 51 $\text{\AA}^2$. Wyznaczony współczynnik ściśliwości dla badanej monowarstwy wynosił zaledwie 22 mN/m, co wskazywało, że cząsteczki w monowarstwie znajdują się w fazie ciekłej rozprężonej. Obecność digitoniny w subfazie działała na monowarstwę destabilizująco, przesuwając jej punkt załamania w stronę wyższych powierzchni cząsteczkowych i niższego Π . Potencjał powierzchniowy pozostawał praktycznie stały podczas całego pomiaru co oznacza, że nie następowała reorganizacja cząsteczek w monowarstwie.

Aby lepiej poznać mechanizm oddziaływania digitoniny z monowarstwą składającą się z mieszaniny trójskładnikowej wykonano pomiary izoterm adsorpcji dla trzech wybranych ciśnień powierzchniowych, rysunek 4.36 A. Digitonina adsorbowała do monowarstwy i penetrowała ją w każdym badanym ciśnieniu powierzchniowym. Ponadto w przypadku dwóch niższych ciśnień powierzchniowych, 15 mN/m i 25 mN/m, obserwowalny był ciągły wzrost wartości ciśnienia powierzchniowego. Oddziaływanie digitoniny z monowarstwą było najsilniejsze przy najniższym Π początkowym, w pomiarach tych zanotowano wzrost ciśnienia powierzchniowego o 43,5 mN/m. Monowarstwa skompresowana do Π równego 25 mN/m charakteryzowała się mniejszym wzrostem ciśnienia powierzchniowego po dodaniu saponiny jego wartość wzrosła o 36 mN/m. Najniższy wzrost Π , a konkretnie o 27,3 mN/m, zaobserwowano dla



Rysunek 4.36: Izotermi adsorpcji digitoniny do monowarstwy utworzonej z równomolowej mieszaniny POPC/SM/CHOL (A). Zależność $\Delta\Pi$ od ciśnienia początkowego (Π_0): efekt adsorpcji digitoniny do monowarstwy POPC/SM/CHOL (B).

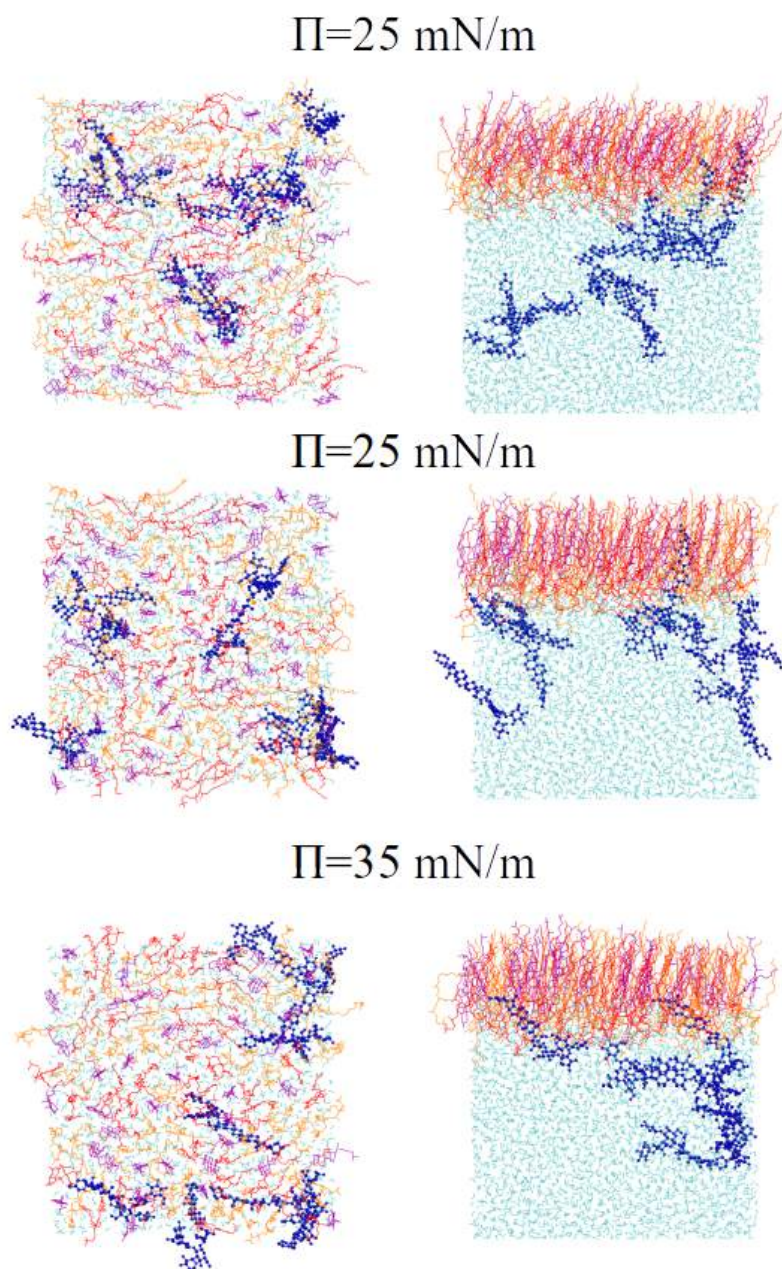
monowarstwy o początkowym ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m. Z otrzymanych wyników wyznaczono ciśnienie wysycenia monowarstwy wynoszące w tym przypadku $66,4 (\pm 2,2)$ mN/m, rysunek 4.36 B.

Oprócz badań eksperymentalnych zostały przeprowadzone badania *in silico* metodami klasycznej dynamiki molekularnej. Sporządzono monowarstwę trójskładnikową, składającą się z POPC, sfingomieliny i cholesterolu w proporcjach równomolowych. Tak jak w poprzednich badaniach wykonano dwa układy jeden zawierający cząsteczki digitoniny usytuowane pod monowarstwą w subfazie wodnej oraz drugi bez digitoniny (układ referencyjny).

Rysunek 4.37 przedstawia projekcję układu z góry i z boku w ostatniej klatce symulacji. Na rysunkach przedstawiających projekcję z góry widać, że cząsteczki filmu powierzchniowego zajmują całą dostępną przestrzeń, na powierzchni nie tworzą się pory. Ponadto cząsteczki lipidów nie tworzą domen ale są rozłożone losowo w monowarstwie. Cząsteczki cholesterolu są zakotwiczone w monowarstwie, nie obserwuje się cząsteczek cholesterolu w subfazie wodnej. Natomiast widok z boku przedstawia oddziałującą z błoną digitoninę, widać, że przy dwóch niższych ciśnieniach powierzchniowych digitonina penetruje monowarstwę, a także adsorbuje się pod jej powierzchnią. Grupy cukrowe digitoniny prawdopodobnie oddziałują z głowami hydrofilowymi lipidów.

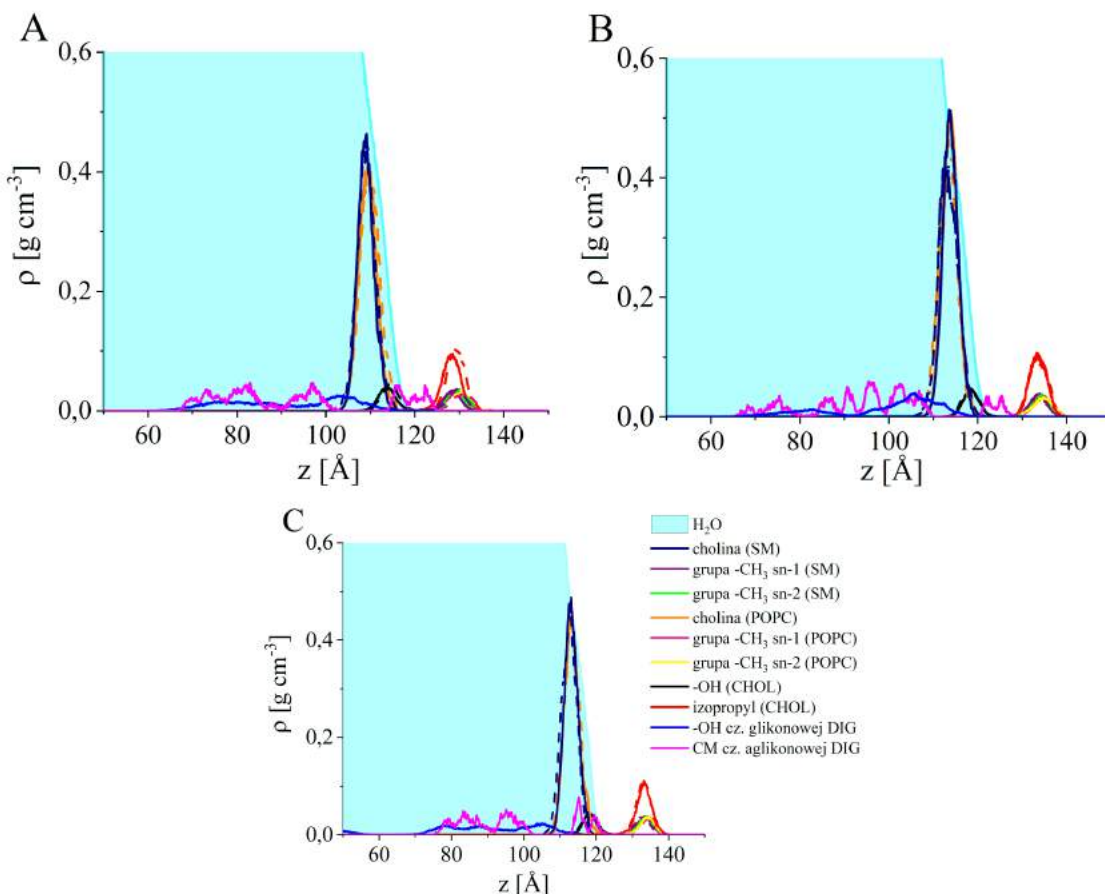
W celu głębszego zrozumienia ułożenia cząsteczek w układzie, jak również ich wzajemnego oddziaływania obliczono profile gęstości dla charakterystycznych grup funkcyjnych cząsteczek w monowarstwach skompresowanych do trzech różnych ciśnień powierzchniowych, wyniki zostały zestawione na rysunku 4.38.

Z otrzymanych profili gęstości widać, że obecność digitoniny nie wpływa na ułożenie cząsteczek w monowarstwie na osi wzdłuż normalnej monowarstwy. Jedynie w układzie ściśniętym do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m, cholesterol jest bardzo nieznacznie przesunięty w stronę subfazy wodnej gdy w układzie występuje digitonina. Pozostałe sygnały od grup



Rysunek 4.37: Model monowarstwy równomolowej mieszaniny POPC/SM/CHOL z digitoniną, rzuty z góry (rysunek z lewej) oraz z boku (rysunek z prawej). Rysunki przedstawiają monowarstwy skompresowane do trzech różnych ciśnień powierzchniowych: 15 mN/m, 25mN/m i 35 mN/m. Dla większej przejrzystości z cząsteczek lipidów zostały usunięte atomy wodoru. Kolory: POPC - pomarańczowy, SM - czerwony, chol - fioletowy, digitonina - niebieski, woda - cyan.

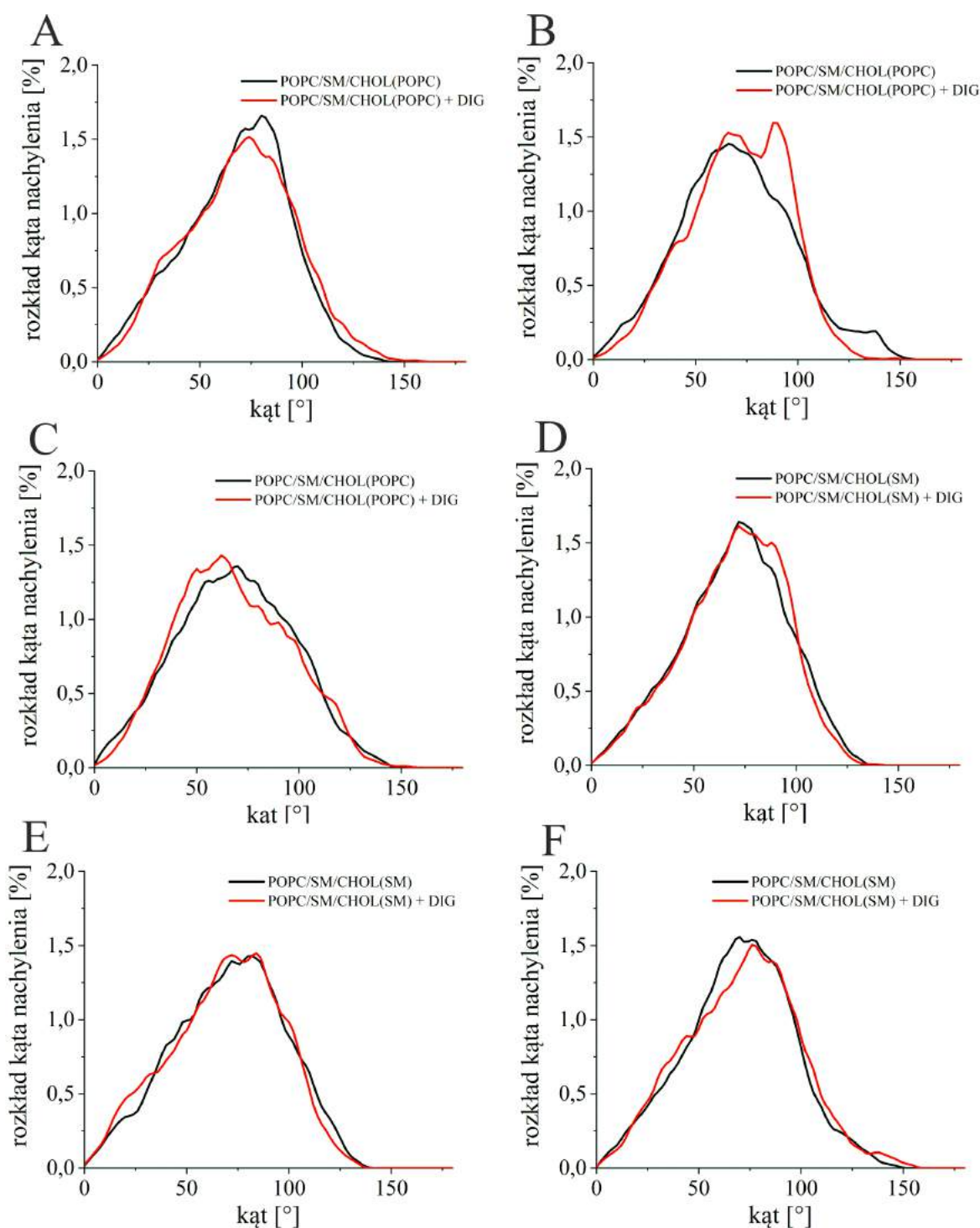
funkcyjnych nie ulegają przesunięciu na osi z w obecności saponiny. Digitonina oddziałuje z monowarstwą układając się pod jej powierzchnią lub penetrując monowarstwę swoją częścią hydrofobową. Taka penetracja ma miejsce tylko przy dwóch niższych ciśnieniach powierzchniowych. Przy $\Pi = 35 \text{ mN/m}$, część hydrofobowa digitoniny oddziałuje z głowami polarnymi lipidów. Reszty cukrowe digitony lokują się pod powierzchnią monowarstwy lub w rejonie



Rysunek 4.38: Profile gęstości monowarstwy równomolowej mieszaniny POPC/SM/CHOL z digitoniną. Rysunki przedstawiają monowarstwy przy trzech badanych ciśnieniach powierzchniowych: 15 mN/m (A), 25 mN/m (B) i 35 mN/m (C). Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne. Legenda zawiera tylko opisy tylko do układu zawierającego digitoninę, kolory dla układu bez digitoniny są analogiczne, zaznaczono je przerywaną linią. Oznaczenie CM cz. aglikonowej DIG odnosi się do środka masy części aglikonowej digitoniny.

głów hydrofilowych lipidów, co może sugerować iż występuje oddziaływanie między tymi grupami.

W kolejnym kroku analizy obliczono rozkład kąta nachylenia głów hydrofilowych lipidów. Wyniki zostały zestawione na rysunku 4.39. Tak jak w przypadku mieszaniny dwuskładnikowej otrzymane histogramy rozkładu kąta nachylenia nie mają rozkładu normalnego. W monowarstwie skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 15 mN/m (rysunek 4.39 A i D) głowy hydrofilowe w układzie referencyjnym są najczęściej odchylone o 80° względem normalnej monowarstwy. Natomiast gdy w układzie pojawia się digitonina, maksimum jest przesunięte w stronę mniejszych kątów i wynosi 74° . W przypadku monowarstwy skompresowanej do środkowego badanego ciśnienia powierzchniowego (rysunek 4.39 B i E) w układzie referencyjnym głowy cholinowe są ustawione pod kątem 68° , a także między kątami 120° – 140° tworzy się charakterystyczne plateau oznaczające, że w układzie występują także cząsteczki o dużym nachyleniu w stosunku do normalnej monowarstwy. Natomiast w układzie



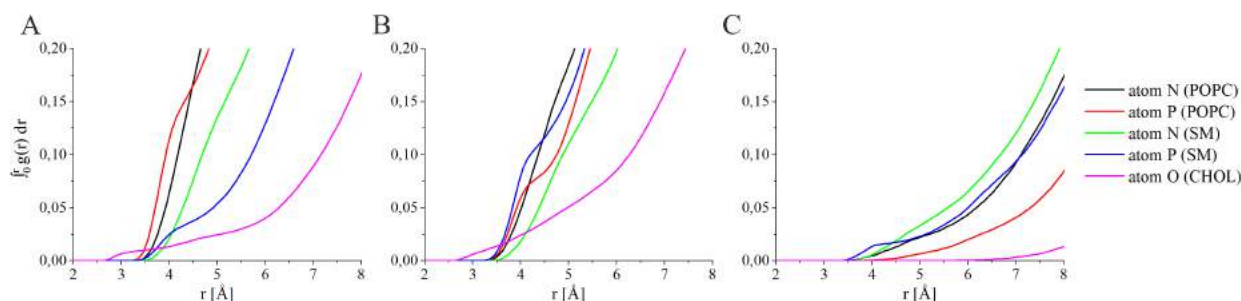
Rysunek 4.39: Rozkład kąta nachylenia głów hydrofilowych lipidów: POPC (A-C) oraz sfingomieliny (D-F) w stosunku do normalnej monowarstwy. Ciśnienia powierzchniowe monowarstw: 15 mN/m (A i D), 25 mN/m (B i E) oraz 35 mN/m (C i F). Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne.

zawierającym cząsteczki digitoniny pojawiają się dwa maksima przy 68° i 90°. W układzie ściśniętym do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m (rysunek 4.39 C i F), układ referencyjny charakteryzuje się wygięciem głów cholinowych POPC względem normalnej o 72°, natomiast

gdy w układzie obecna jest digitonina maksimum sygnału przesuwają się nieznacznie w stronę niższych kątów i wynosi 63° .

Reszty cholinowe występujące w cząsteczkach sfingomieliny także wykazują bardzo niewielką zmianę gdy w układzie występuje digitonina. Saponina największy wpływ wywiera na monowarstwy przy ciśnieniu powierzchniowym 15 mN/m i 35 mN/m, rysunek 4.39 D i F. W przypadku niższego ciśnienia w układzie z digitoniną pojawia się dodatkowe maksimum występujące przy kącie 95° . Natomiast przy wysokim ciśnieniu powierzchniowym główne maksimum kąta nachylenia przesuwają się nieznacznie w stronę wyższych wartości kątów i wynosi 79° podczas gdy układ referencyjny charakteryzuje się występowaniem największej liczby cząsteczek nachylonych pod kątami 70° i 75° .

Tak samo jak w przypadku układu dwuskładnikowego obliczono całki po trzech wymiarach z radialnej funkcji rozkładu par między atomami azotu i fosforu pochodzącymi z lipidów, a grupami hydroksylowymi pochodzącymi z części glikonowej digitoniny, oraz między atomami tlenu z cząsteczki cholesterolu, a grupami -OH z części hydrofilowej digitoniny (rysunek 4.40).

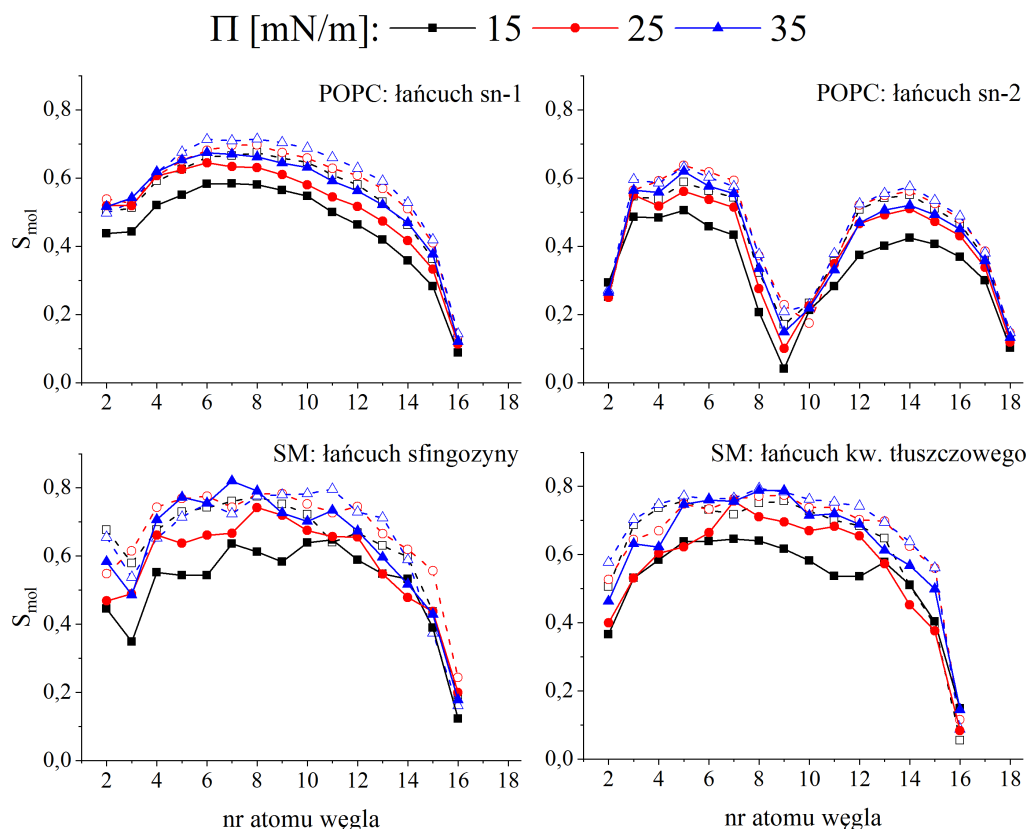


Rysunek 4.40: Całka po trzech wymiarach z radialnej funkcji gęstości par między atomami pochodzącymi z reszt cholinowych lipidów (POPC i SM) a grupami hydroksylowymi z części glikonowej digitoniny, oraz między atomami tlenu z cholesterolu a grupami -OH części hydrofilowej digitoniny. Ciśnienia powierzchniowe monowarstw: 15 mN/m (A), 25 mN/m (B) oraz 35 mN/m (C).

Otrzymane wyniki są bardzo interesujące, wynika z nich, że gdy monowarstwa jest skompresowana do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m i 25 mN/m, cholesterol i reszty cukrowe digitoniny znajdują się w odległości wystarczająco małej aby mogły tworzyć się między nimi wiązania wodorowe. Natomiast gdy monowarstwa jest mocno skompresowana i jej ciśnienie powierzchniowe odpowiada temu występującemu w natywnej komórce to cholesterol praktycznie nie oddziałuje z grupami -OH glikonowej części digitoniny. W przypadku monowarstwy skompresowanej do najniższego badanego ciśnienia powierzchniowego grupy hydroksylowe glikonu digitoniny znajdują się z większym prawdopodobieństwem bliżej reszt cholinowych POPC niż analogicznych grup sfingomieliny. Natomiast odwrotne zachowanie obserwuje się u monowarstw ściśniętych do 25 mN/m i 35 mN/m.

Zbadano także uwodnienie głów hydrofilowych lipidów i grupy hydroksylowej cholesterolu, tak samo jak w przypadku układu dwuskładnikowego także i w tym układzie hydratacja badanych residuów nie zależała od ciśnienia powierzchniowego monowarstwy, a także obecności digitoniny w układzie. Atomy N i P pochodzące z choliny POPC były otoczone przez 24-25

cząsteczek wody, natomiast analogiczne atomy ze sfingomieliny były hydratowane przez 25 cząsteczek wody.



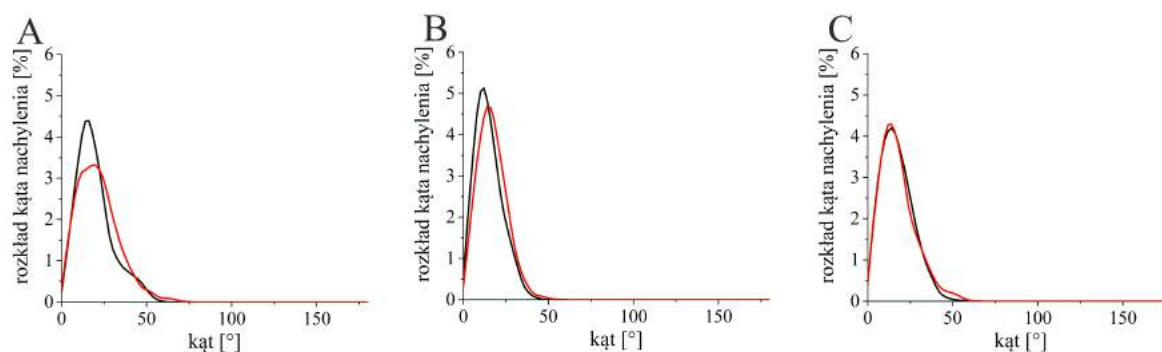
Rysunek 4.41: Parametr porządku dla łańcuchów alifatycznych lipidów: POPC $sn - 1$, $sn - 2$; SM łańcuch sfingozyny i kwasu tłuszczowego. Symbole wypełnione odpowiadają układowi zawierającemu digitoninę, natomiast symbole puste w środku układowi referencyjnemu.

Następnie zanalizowano wpływ digitoniny na część hydrofobową błony, w tym celu wyliczono parametry porządku dla każdego łańcucha acylowego lipidów błonowych, wyniki zostały zaprezentowane na rysunku 4.41. W obecności cholesterolu lipidy w monowarstwach są bardziej uporządkowane. Parametry porządku obliczone dla łańcuchów są wyższe średnio o 0,2 w stosunku do monowarstwy POPC/SM. Ponadto uporządkowanie atomów węgla występujących bliżej głowy hydrofilowej jest znacznie wyższe niż uporządkowanie końcowych grup alkilowych. Obecność digitoniny w układzie destabilizuje układ i obniża uporządkowanie łańcuchów lipidowych o czym świadczy spadek wartości parametru porządku. Największy wpływ na łańcuchy lipidowe digitonina wywiera w najniższym badanym ciśnieniu powierzchniowym. Wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego łańcuchy POPC $sn - 1$ w układzie referencyjnym charakteryzują się nieznacznym wzrostem parametru porządku. Natomiast w obecności digitoniny wartość parametru spada, największy spadek jest obserwowany w monowarstwie przy ciśnieniu powierzchniowym równym 15 mN/m, następnie przy 25 mN/m a najmniejszy

efekt przy 35 mN/m. W przypadku nienasyconego łańcucha POPC $sn - 2$, obserwowany jest spadek parametru uporządkowania w miejscu występowania wiązania podwójnego. Tak samo jak w przypadku łańcucha nasyconego, największy efekt digitonina wywiera na łańcuchy w monowarstwie ściśniętej do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m, natomiast uporządkowanie łańcuchów przy wyższych ciśnieniach powierzchniowych było podobne.

W przypadku łańcuchów sfingomieliny średnie wartości parametru są wyższe niż dla łańcuchów POPC. Ponadto, digitonina obniża uporządkowanie w łańcuchach alifatycznych SM, a także powoduje występowanie fluktuacji w wartościach parametru porządku otrzymanych dla poszczególnych atomów węgla w łańcuchach, prawdopodobnie jest to związane z penetracją aglikonowej części digitoniny do monowarstwy. Efekt jest tym większy im mniejsze ciśnienie powierzchniowe panujące w monowarstwie.

W łańcuchu sfingozyny występuje wiązanie podwójne między pierwszym a drugim atomem węgla w cząsteczce, co tłumaczy spadek wartości parametru uporządkowania o około 0,1. Natomiast w łańcuchu kwasu tłuszczowego nie obserwowane są znaczne spadki uporządkowania między atomami węgla. Następnie analogicznie do badań z wykorzystaniem monowarstwy zbudowanej z cząsteczek cholesterolu wyznaczono wektor cząsteczki cholesterolu między atomami węgla C3 i C17, wyznaczony wektor został użyty do wyliczenia kąta nachylenia sterolu w monowarstwie mieszanej. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 4.42.



Rysunek 4.42: Rozkład kąta nachylenia cząsteczek cholesterolu w stosunku do normalnej monowarstwy. Ciśnienia powierzchniowe monowarstw: 15 mN/m (A), 25 mN/m (B) oraz 35 mN/m (C). Pomiar prowadzony był tylko dla górnej monowarstwy, wyniki dla dolnej są analogiczne.

Cząsteczki cholesterolu były ustawione niemalże pionowo w monowarstwach mieszanych. Jedynie gdy monowarstwa była ściśnięta do ciśnienia powierzchniowego 15 mN/m otrzymany rozkład kątów jest szerszy niż dla pozostałych II, a także występują cząsteczki cholesterolu nachylone między 40° a 60° do normalnej monowarstwy. W każdej badanej monowarstwie cząsteczki cholesterolu w większości nachylone są między 14° a 21° do normalnej. Wpływ digitoniny na nachylenie cząsteczek sterolu jest nieznaczny, największą różnicę można zaobserwować w monowarstwie skompresowanej do II równego 25 mN/m, gdzie cholesterol w monowarstwie referencyjnej nachylony jest pod kątem 14° , natomiast gdy w układzie obecna jest digitonina to średni kąt nachylenia wynosi 19° , co sugeruje, że cząsteczki cholesterolu są

nieznacznie destabilizowane przez saponinę.

4.6.3 Porównanie parametrów monowarstw mieszanych i dyskusja

W ostatniej części badań wykonano pomiary eksperymentalne oraz modelowanie *in silico* dwóch układów reprezentujących modelową błonę biologiczną. Pierwszy, dwuskładnikowy, składał się z POPC (faza l_d) oraz SM (faza l_o) w stosunku molowym 1:1; oraz drugi, trójskładnikowy zbudowany z POPC, SM oraz cholesterolu w stosunku molowym 1:1:1. Celem badań było opisanie oddziaływania cholesterolu z błoną przypominającą naturalną błonę komórkową, a także zbadanie interakcji saponiny z innymi składnikami błony biologicznej.

W badaniach eksperymentalnych na początku wykonano pomiary izoterm Π -A oraz V-A. Oba układy tworzą stabilne monowarstwy na subfazie wodnej i przy maksymalnym skompresowaniu znajdują się w fazie ciekłej skondensowanej. Ponadto gdy w roztworze obecna jest digitonina obie mieszaniny zachowują się bardzo podobnie. Tworzone monowarstwy nie są stabilne, digitonina gwałtownie adsorbuje do monowarstw w momencie nałożenia filmu na powierzchnię. W czasie maksymalnego skondensowania monowarstwy znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym.

W kolejnym kroku wykonano pomiary izoterm adsorpcji digitoniny do monowarstwy POPC/SM lub POPC/SM/CHOL. Badano oddziaływanie digitoniny z monowarstwami przy trzech ciśnieniach powierzchniowych 15 mN/m, 25 mN/m oraz 35 mN/m. W obu układach następowało gwałtowne podniesienie ciśnienia powierzchniowego po dodaniu digitoniny. W mieszaninie dwuskładnikowej $\Delta\Pi$ wynosiła między 10 mN/m a 20 mN/m w zależności od ciśnienia początkowego, im wyższe ciśnienie początkowe tym mniejsza zmiana Π po dodaniu digitoniny. Ciśnienie wysycenia monowarstwy wynosiło 59,6 ($\pm 0,3$) mN/m. Natomiast w układzie trójskładnikowym zawierającym cholesterol $\Delta\Pi$ wahała się między 25 mN/m a 45 mN/m, a ciśnienie wysycenia było równe 66,4 ($\pm 2,2$) mN/m. Wyższe wartości $\Delta\Pi$ otrzymane dla układu POPC/SM/CHOL świadczą o dużej roli cholesterolu w oddziaływaniu błony z digitoniną, co jest także zgodne z literaturą [22, 1, 6]. W celu lepszego zrozumienia oddziaływania digitoniny z monowarstwami mieszanymi zostały wykonane komputerowe modele błon. Otrzymane wyniki pokazały, że digitonina adsorbuje do obu badanych mieszanin, natomiast tylko w obecności cholesterolu penetruje do monowarstwy swoją częścią aglikonową. Otrzymane wyniki dobrze korelują z badaniami liposomowymi wykonanymi przez Sudji i współpracowników [78].

Głowy hydrofilowe lipidów w obu układach są nachylone pod kątem 63° do 95°. Niższe wartości występują zwykle gdy w układzie nie było digitoniny, natomiast w układzie z digitoniną obserwuje się niewielkie przesunięcie maksimów otrzymanych rozkładów w stronę wyższych kątów w stosunku do normalnej monowarstwy. Grupy hydroksylowe glikonowej części digitoniny mają wyższe powinowactwo do sfingomieliny w układzie dwuskładnikowym przy niższych ciśnieniach powierzchniowych, natomiast gdy układ był ściśnięty do ciśnienia po-

wierzchniowego 35 mN/m nie było różnicy w otrzymanych wartościach RDF dla obu lipidów. W układzie POPC/SM/CHOL, jedynie grupa hydroksylowa cholesterolu znajdowała się w odpowiedniej odległości do wytworzenia wiązania wodorowego z grupami -OH części glikonowej digitoniny. Natomiast w przypadku niższego ciśnienia saponina miała wyższe powinowactwo do reszty cholinowej POPC niż do sfingomieliny. Gdy ciśnienie powierzchniowe było wyższe to wyniki były odwrotne - digitonina miała większe powinowactwo do reszty cholinowej SM niż do POPC. Ponadto przy ciśnieniu powierzchniowym 35 mN/m cholesterol nie oddziaływał z grupami hydroksylowymi glikonowej części digitoniny. Taki wynik sugeruje, że cząsteczki cholesterolu zakotwiczą się głęboko w błonie, digitonina penetrując membranę swoją częścią hydrofobową może oddziaływać z cholesterolem. Jednakże z wyników otrzymanych metodami klasycznej dynamiki molekularnej nie można wnioskować, że digitonina wyciąga cholesterol z monowarstwy. Biologowie pracujący z tkanką nerwową pokazali, że digitonina wnikając do błony komórkowej zwiększa jej przepuszczalność, skład błony powiększa się o penetrujące cząsteczki digitoniny, jednakże pozostałe składniki błony, jak na przykład cholesterol nie są usuwane z błony [10, 144, 147]. Natomiast naukowcy badający modelowe błony biologiczne, posiadające w swoim składzie cholesterol, a także najczęściej fosfolipidy pokazali, że digitonina po zaadsorbowaniu się do błony wyciąga z niej cholesterol do środowiska zewnętrznego [7, 8, 78]. Możliwe, że takie rozbieżności są związane ze składem błony i jej otoczeniem. Komórki nerwowe są bogate w sfingolipidy, których powinowactwo do cholesterolu jest bardzo wysokie i opisywane w literaturze jako podstawa raft lipidowych. Natomiast gdy takich raft nie ma w układzie badanym, cholesterol jest za słabo związany ze składnikami błony i może być z niej usuwany jak wskazuje Wojciechowski i wsp [7]. Łańcuchy lipidowe były mniej uporządkowane w układzie dwuskładnikowym, niż w układzie trójskładnikowym, co jest zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi usztywniania błony przez występujący w niej cholesterol [12]. Ponadto digitonina obniża uporządkowanie łańcuchów lipidowych w monowarstwie, z wyjątkiem łańcuchów POPC w układzie POPC/SM, tam działanie saponiny jest przeciwne.

Wykonane badania eksperymentalne i teoretyczne umożliwiły wypełnienie założonych celów pracy doktorskiej oraz pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- Obecność digitoniny wpływa destabilizująco na monowarstwę zarówno cholesterolu jak i diosgeniny.
- Digitonina adsorbuje i penetruje do monowarstw cholesterolu i diosgeniny. Do monowarstwy penetruje tylko część hydrofobowa (aglikon) digitoniny, natomiast część cukrowa (glikon) pozostaje w subfazie wodnej i oddziałuje z cząsteczkami wody jak również z grupami hydroksylowymi cholesterolu i diosgeniny.
- Łańcuch alifatyczny cholesterolu oddziałuje silnie z digitoniną, oraz utrzymuje ją w badanej monowarstwie. Natomiast digitonina znacznie słabiej penetruje monowarstwę diosgeniny swoją częścią aglikonową, może to być spowodowane obecnością cząsteczek wody we wnętrzu monowarstwy.
- Oddziaływanie między cząsteczkami w dimerach cholesterol-digitonina i diosgenina-digitonina jest stabilizujące. Wykazano istnienie punktów krytycznych wiązania między oddziałującymi częściami hydrofobowymi cząsteczek, o gęstości odpowiadającej oddziaływaniom van der Waalsowskim. Natomiast wyznaczone radialne funkcje gęstości par (RDF) między grupami hydroksylowymi cukrów digitoniny i grupy -OH cholesterolu wskazywały, że badane grupy znajdują się wystarczająco blisko siebie aby mogły tworzyć wiązania wodorowe. Oddziaływania między cząsteczkami cholesterolu i digitoniny nigdy wcześniej nie zostały zbadane za pomocą metod chemii kwantowej, a także klasycznej dynamiki molekularnej.
- Digitonina i ginsenozyd Rh2 oddziałują z liposomami. Digitonina oddziałuje silniej z liposomami, w których skład wchodzi cholesterol. Natomiast ginsenozyd Rh2 oddziałuje preferencyjnie z liposomami, w których skład wchodzi ePC i SM, wykazuje podobny wpływ na błonę jak cząsteczki cholesterolu [143].
- Inkubacja olbrzymich liposomów z digitoniną prowadzi do zmniejszenia liczby liposomów. Podczas inkubacji z digitoniną liposomy posiadające w błonie cholesterol kurczą

się tworząc agregaty lipidowe, wynik jest analogiczny do tego otrzymanego przez Sudji i wsp [78].

- Inkubacja dwuskładnikowych GUV z ginsenozydem Rh2 prowadzi do powstania separacji faz w liposomie, w miejscu gdzie występuje faza nieuporządkowana lipidów czyli ePC powstaje pęcherzyk, który następnie odpączkowuje od liposomu macierzystego co zostało opublikowane w naszej pracy [143].
- Ginsenozyd Rh2 działa podobnie jak cholesterol na błony liposomów dwuskładnikowych, po inkubacji próbki z saponiną dochodzi do usztywnienia błony komórkowej [11, 143].
- Digitonina adsorbuje się zarówno do monowarstwy POPC/SM jak i POPC/SM/CHOL oddziałując z nią. Jednakże penetracja części aglikonowej saponiny następuje tylko w obecności cholesterolu.
- W niższych ciśnieniach powierzchniowych grupy -OH cząsteczek cholesterolu znajdują się na tyle blisko grup hydroksylowych glikonowej części digitoniny aby móc tworzyć z nimi wiązania wodorowe, natomiast przy wyższych ciśnieniach powierzchniowych nie obserwowano takiego efektu. Takie zachowanie może być spowodowane obecnością sfingomieliny w badanej membranie, z którą cholesterol współtworzy tak zwane rafty lipidowe [12, 19].
- Cząsteczki cholesterolu w monowarstwie zbudowanej z POPC/SM/CHOL nie są przesuwane do subfazy wodnej w obecności digitoniny.
- W liposomach dwuskładnikowych reszta cholinowa sfingomieliny oddziałuje silniej z resztami cukrowymi digitoniny. Natomiast gdy w układzie obecny jest cholesterol digitonina ma większe powinowactwo do POPC niż do sfingomieliny.

Wyniki otrzymane podczas studiów doktoranckich rozszerzają wiedzę na temat oddziaływania digitoniny z cholesterolem. Uzyskane wyniki mają charakter poznawczy i mogą posłużyć naukowcom zajmującym się badaniami biologicznymi wykorzystującymi saponiny, w głębszym zrozumieniu oddziaływania błony komórkowej z glikozydami roślinnymi. Zastosowane metody mają ogromny potencjał do wyjaśniania niezrozumiałych oddziaływań międzycząsteczkowych występujących w błonach biologicznych.

Bibliografia

- [1] Francis G., Kerem Z., Makkar H.P., Becker K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* **88**, 587-605.
- [2] Simoes C.M., Amoros M., Gierre R.L, 1999. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytother. Res.* **13**, 323-328.
- [3] Lee Y., Jung J.C., Ali Z., Khan I.A., Oh S., 2012. Anti-inflammatory effect of triterpene saponins isolated from Blue Cohosh *Caulophyllum thalictroides*. *Evid. Based Bmplement Alternat. Med.* **2012**, 798192.
- [4] Podolak, I., Galanty, A., Sobolewska, D., 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* **9**(3), 425 – 474.
- [5] Langmuir I., Schaefer V.J., Sobotka H, 1937. Multilayers of sterols and the adsorption of digitonin by deposited monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1751-1759.
- [6] de Groot C., Muller-Goymann C.C., 2016. Saponin interactions with model membrane systems - Langmuir monolayer studies, hemolysis and formation of ISCOMs. *Planta Med.* **82**, 1496-1512.
- [7] Wojciechowski K., Orczyk M., Gutberlet T., Brezesinski G., Geue T., Fontaine P., 2016. On the interaction between digitonin and cholesterol in Langmuir monolayers. *Langmuir* **32**, 9064-9073.
- [8] Frenkel N., Makky A., Sudji I.R., Wink M., Tanaka M., 2014. Mechanistic investigation of interactions between steroidal saponin digitonin and cell membrane models. *J. Phys. Chem. B* **118**, 14632-14639.
- [9] Schulman J.H., Rideal E.K., 1936. Molecular Interaction in Monolayers: I - Complexes between large Molecules. *Proc. Roy. Soc. B* **122**, 29-45.
- [10] Paila Y.D., Pucadyil T.J., Chattopadhyay A., 2005. The cholesterol-complexing agent digitonin modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin_{1A} receptor. *Mol. Membr. Biol.* **22**(3), 241-249.
- [11] Verstraeten S.L., Albert M., Paquot A., Muccioli G.G., Tyteca D., Mingeot-Leclercq M.P., 2018. Membrane cholesterol delays cellular apoptosis induced by ginsenoside Rh2, a steroid saponin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **352**, 59-67.
- [12] Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Podstawy biologii komórki. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, 2007.

- [13] Dołowy K., Szewczyk A., Pikula S. Błony biologiczne. *Wydawnictwo Śląsk*, Katowice, 2003.
- [14] Pike L.J., 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667.
- [15] Schumann-Gillett A., O'Mara M.L., 2019. The effects of oxidised phospholipids and cholesterol on the biophysical properties of POPC bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1**, 210-219.
- [16] Gironi B., Paolantoni M., Morresi A., Foggi P., Sassi P., 2018. The Influence of Dimethyl Sulfoxide on the Low - Temperature Behavior of Cholesterol-Loaded Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholine Membranes. *J. Phys. Chem. B* **122**(24), 6396-6402.
- [17] Milhas D., Clarke C.J., Hannun Y.A., 2010, Sphingomyelin Metabolism at the Plasma Membrane: Implications for Bioactive Sphingolipids. *FEBS lett.* **584**(9), 1887-1894.
- [18] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124.
- [19] Lokar, M., Kabaso, D., Resnik, N., Sepčić, K., Kralj-Iglič, V., Veranič, P., Zorec R., Iglič, A., 2012. The role of cholesterol-sphingomyelin membrane nanodomains in the stability of intercellular membrane nanotubes. *Int. J. Nanomed.* **7**, 1891–1902.
- [20] Korchowiec, B., Gorczyca, M., Wojszko, K., Janikowska, M., Henry, M., Rogalska, E., 2015. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1848**(10), 1963–1973.
- [21] Krause M.R., Regen S.L., 2014. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3512-3521.
- [22] Lorent J., Le Duff C.S., Quetin-Leclercq J., Mingeot-Leclercq M.P., 2013. Induction of highly curved structures in relation to membrane permeabilization and budding by the triterpenoid saponins α - and δ -hederin. *J. Biol. Chem.* **288**(20), 1400-1417.
- [23] Oliveira O.N., 1992. Langmuir-Blodgett films - properties and possible applications. *Braz. J. Phys.* **22**, 60-69.
- [24] Gaines G.L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. *A division of John Wiley Sons, INC*, Nowy Jork, 1966.
- [25] Czapla, K., Korchowiec, B., Rogalska, E., 2010. Differentiating oxicam nonsteroidal anti-inflammatory drugs in phosphoglyceride monolayers. *Langmuir* **26**(5), 3485-3492.
- [26] Czapla, K., Korchowiec, B., Orlof, M., Magnieto, J.R., Rogalska, E., 2011. Enzymatic probing of model lipid membranes: Phospholipase A2 activity toward monolayers modified by oxicam nsoids. *J. Phys. Chem. B* **115**(29), 9290-9298.
- [27] 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.

- [28] Pigoń K., Ruziewicz Z. *Chemia fizyczna 1. Wydawnictwo naukowe PWN*, Warszawa, 2009.
- [29] Langmuir I., 1933. Oil Lenses on Water and the Nature of Monomolecular Expanded Films, *J.Chem. Phys.* **1**, 756 - 776.
- [30] Harkins W.D. The physical chemistry of surface films, *Reinhold Publishing Co.*, Nowy Jork, 1954.
- [31] Ni S., Lee W., Li B., Esker A.R., 2006. Thermodynamics of the liquid expanded to condensed phase transition of Poly(L-lactic acid) in Langmuir monolayers. *Langmuir* **22**, 3672-3677.
- [32] Chou T.H., Chang C.H., 2000. Thermodynamic characteristics of mixed DPPC/DHDP monolayers on water and phosphate buffer subphases. *Langmuir* **16**, 3385-3390
- [33] Gopal A., Lee K.Y.C., 2001., Morphology and collapse transitions in binary phospholipid monolayers. *J. Phys. Chem. B* **105**, 10348–10354.
- [34] Taylor D.M., 2000. Developments in the theoretical modelling and experimental measurement of the surface potential of condensed monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **87**, 183-203.
- [35] Vogel V., Mobius D., 1988. Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers: Contributions of the water/lipid and the lipid/air interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **126**, 408 - 420.
- [36] Demchak R.J., Fort T.J., 1974. Surface dipole moments of close-packed nonionized monolayers at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **46**, 191-202.
- [37] Gorczyca M., Korchowiec B., Korchowiec J., Trojan S., Rubio-Magnieto J., Luis S.V., Rogalska E., 2015. A study of the interaction between a family of gemini amphiphilic pseudopeptides and model monomolecular film membranes formed with a cardiolipin. *J. Phys. Chem.* **119**, 6668 - 6679.
- [38] Feng, S. S.; Gong, K.; Chew, 2002. Molecular Interactions between a Lipid and an Antineoplastic Drug Paclitaxel (Taxol) within the Lipid Monolayer at the Air/Water Interface. *Langmuir* **18**, 4061 - 4070.
- [39] Nunes C., Brezesinski G., Pereira-Leite C., Lima J.L., Reis S., Lucio M., 2011. NSAIDs Interactions with Membranes: A Biophysical Approach. *Langmuir* **27**, 10847 – 10858.
- [40] Dervichian D. G., 1939. Changes of Phase and Transformations of Higher Order in Monolayers, *J. Chem. Phys.* **7**, 931 - 948.
- [41] Wang Z., Yang S., 2009. Effects of Fullerenes on Phospholipid Membranes: A Langmuir Monolayer Study. *Chem. Phys. Chem.* **10**, 2284 – 2289.
- [42] Lorent J., Lins L., Domenech O., Quetin-Leclercq J., Brasseur R., Mingeot-Leclercq M.P., 2013. Domain formation and permeabilization induced by the saponin α -hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer. *Langmuir* **30**, 4556-4569.

- [43] Balazs D.A., Godbey W.T., 2010. Liposomes for use in gene delivery. *J. Drug Del.* **2011**, Article ID 326497.
- [44] Riaz M.K., Riaz M.A., Zhang X., Lin C., Wong K.H., Chen X., Zhang G., Lu A., Yang Z., 2018. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: a review. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 195-222.
- [45] Bangham A.D., 1993. Liposomes: the Babraham Connection. *Chem Phys Lipids* **64**, 275-285.
- [46] Bangham A.D., 1972. Model Membranes. *Chem Phys Lipids* **8**, 386-392.
- [47] Kimelberg H.K., 1976. Differential Distribution of Liposome-Entrapped [³H]methotrexate and Labelled Lipids After Intravenous Injection in a Primate. *Biochim Biophys Acta* **448**, 531-550.
- [48] Seltzer S.E. 1988. Contrast-Carrying Liposomes. Current Status. *Invest. Radiol.* **23**, S122-S125.
- [49] Adzamli I.K., Seltzer S.E., Slifkin M., Blau M., Adams D.F., 1990. Production and Characterization of Improved Liposomes Containing Radiographic Contrast Media, *Invest. Radiol.* **25**, 1217-1223.
- [50] Lasch J., Wohlrab W., 1986. Liposome-Bound Cortisol: A New Approach to Cutaneous Therapy. *Biomed Biochim Acta* **45**, 1295-1299.
- [51] Li L., Hoffman R.M., 1995. Model of Selective Gene Therapy of Hair Growth: Liposome Targeting of the Active Lac-Z Gene to Hair Follicles of Histocultured Skin. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **31**, 11-13.
- [52] Ranson M.R., Carmichael J., O'Byrne K., Stewart S., Smith D., Howell A., 1997. Treatment of Advanced Breast Cancer with Sterically Stabilized Liposomal Doxorubicin: Results of a Multicenter Phase II Trial, *J. Clin. Oncol.* **15**, 3185-3191.
- [53] Northfelt D.W., Dezube B.J., Thommes J.A., Levine R., Von Roenn J.H., Dosik G.M., Rios A., Krown S.E., DuMond C., Mamelok R.D., 1997. Efficacy of Pegylated-Liposomal Doxorubicin in the Treatment of AIDS-Related Kaposi's Sarcoma After Failure of Standard Chemotherapy. *J Clin Oncol* **15**, 653-659.
- [54] Sandeep K., Sunikumar K.T., Sudheer B., Mohanvarma M., 2013. Liposomal drug delivery system - a comprehensive review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **5**(4), 62-75.
- [55] Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nano. Res. Lett.* **8**, 102-111.
- [56] Wesolowska O., Michalak K., Maniewska J., Hendrich A.B., 2009. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim. Pol.* **1**, 33-39.

- [57] Smoluchowski M., 1908. Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im kritischen Zustande, sowie einiger verwandter Erscheinungen. *Annalen der Physik* **330**, 205–226.
- [58] Stefeld J., McKenna S.A., Patel T.R., 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409-427.
- [59] Barron A.R. Physical Methods in Chemistry and Nano Science. *Rice University*, Houston, 2012.
- [60] National Research Council. Controlling the Quantum World: The Science of Atoms, Molecules, and Photons. *The National Academies Press*, Washington, 2007.
- [61] Weber G., 1950. Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* **47**(1), 114-121.
- [62] Shinitzky M., Barenholz Y., 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367-394.
- [63] Morales-Pennington N.F., Wu J., Farkas E.R., Goh S.L., Konyakhina T.M., Zheng J.Y., Webb W.W. Feigenson G.W., 2010. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**(7), 1324-1332.
- [64] Hohenberg P., Kohn W., 1964. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136**, B864-B871.
- [65] Piela L. Idee chemii kwantowej. *Wydawnictwo naukowe PWN*, Warszawa, 2006.
- [66] Davidson E.R., Feller D., 1986. Basis set selection for molecular calculations. *Chem. Rev.* **86**, 661-696.
- [67] Gaussian 09, Revision A.02, Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V.G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery J.A., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Millam J.M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J.B., Fox D.J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [68] Jensen F. Introduction to computational chemistry. *Wiley*, Wielka Brytania, 2017.
- [69] Matta C.F., Boyd R.J., 2007. rozdział: An introduction to the quantum theory of atoms in molecule, tytuł książki: The quantum theory of atoms in molecules. Redaktorzy: Matta C.F., Boyd R.J., *Wiley*, Wielka Brytania, 2007.
- [70] Mark P., Nilsson L., 2001. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **105** (43), 9954–9960.

- [71] Harrach M.F., Drossel B., 2014. Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P, and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity. *J. Chem. Phys.* **140**, 174501.
- [72] Leach A.R. Molecular modelling: principles and applications. *Prentice Hall*, Edynburg, 2001.
- [73] Stachowicz-Kuśnierz A., Trojan S., Ćwiklik Ł., Korchowiec B., Korchowiec J., 2017. Modeling lung surfactant interactions with benzo[a]pyrene. *Chem. Eur. J.* **23**, 5307-5316.
- [74] Huynh L., Perrot N., Beswick V., Rosilio V., Curmi P.A., Sanson A., ge Jamin N., 2013. Structural properties of POPC monolayers under lateral compression: computer simulations analysis. *Langmuir* **30**(2), 564-573.
- [75] Baoukina S., Mendez-Villuendas E., Tieleman D.P., Molecular View of Phase Coexistence in Lipid Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17543-17553.
- [76] Orczyk M., Wojciechowski K., 2015. Comparision of the effect of two *Quillaja* bark saponin extracts on DPPC and DPPC/cholesterol Langmuir monolayers. *Coll. Surf. B* **136**, 291-299.
- [77] Nakamura T., Inoue K., Nojima S., Sankawa U., Shoji J., Kawasaki T., Shibata S., 1979. Interaction of saponins with red blood cells as well as with the phosphatidylcholine liposomal membranes. *J Pharmacobio-Dynam.* **2**, 374-382.
- [78] Sudji I.R., Subburaj Y., Frenkel N., Garacia-Saez A.J., Wink M., 2015. Membrane disintegration caused by the steroid saponin digitonin is related to the presence of cholesterol. *Molecules* **20**, 20146-20160.
- [79] Eid S.Y., El-Readi M.Z., Wink M., 2012. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* **19**, 1307-1314.
- [80] Sucharzewska D., Stochmal A., Oleszek W., 2003. The effect of *Yucca schidigera* extract on the physical structure and on the oxidative stability of sugar-candy foam products. *Lebensm. Wiss. Technol* **36**, 347-351.
- [81] Tao W., Duan J., Zhao R., Li X., Yan H., Li J., Guo S., Yang N., Tang Y., 2013. Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of *Glycyrrhiza* based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis. *Food Chem.* **141**(3), 1681-1689.
- [82] Patent WO 2003/055514 A1 Compositions comprising immunoreactive reagents and saponins, and methods of use thereof. *WIPO*, <https://lens.org/187-909-864-733-970>.
- [83] Moses T., Papadopoulou K.K., Osbourn A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**(6), 439-462.

- [84] Kregiel D., Berłowska J., Witonska I., Antolak H., Proestos C., Babic M., Babic L., Zhang B. rozdział: Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants. tytuł książki: Application and Characterization of Surfactants. redaktor: Reza Najjar, *IntechOpen*, Rijeka, 2017.
- [85] Kim Y.S., Cho I.H., Jeong M.J., Jeong S.J., Nah S.Y., Cho Y.S., Kim S.H., Go A., Kim S.E., Kang S.S., Moon C.J., Kim J.C., Kim S.H., Bae C.S., 2011. Therapeutic effect of total ginseng saponin on skin wound healing. *J. Ginseng Res.* **35**, 360-367.
- [86] Auyeung K.K., Law P.C., Ko J.K., Astargalus saponins induce apoptosis via an ERK-independent NF-kappaB signaling pathway in the human hepatocellular HepG2 cell line. *Int. J. Mol. Med.* **23**(2), 189-196.
- [87] Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C., 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti cancer agents. *Fitoterapia* **81**, 703-714.
- [88] Haridas V., Higuchi M., Jayatilake G.S., Bailey D., Mujoo K., Blake M.E., Arntzen C.J., Gutterman J.U., 2001. Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(10), 5821-5826.
- [89] Xu Z.X., Liang J., Haridas V., Gaikwad A., Connolly F.P., Mills G.B., Gutterman J.U., 2007. A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase. *Cell Death Differ.* **14**, 1948-1957.
- [90] Lemeshko V.V., Haridas V., Quijano Perez J.C., Gutterman J.U., 2006. Avicins natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **454**, 114-122.
- [91] Edwards C.H., Edwards G.A., Gadsden E.L., 1964. Tomatine and digitonin as precipitating agents in the estimation of cholesterol. *Anal. Chem.* **36**, 420-421.
- [92] Goodman J.R., Jarnagin L.P., Meier R.M., Shonley I.A., Determination of free and esterified cholesterol by a modified digitonin-anthrone method. *Anal. Chem.* **35**, 760-763.
- [93] Eid S.Y., El-Readi M.Z., Eldin E.E., Fatani S., Wink M., 2013. Influence of combinations of digitonin with selected phenolics terpenoids, and alkaloids on the expression and activity of P-glycoprotein in leukemia and colon cancer cells. *Phytomedicine* **21**, 47-61.
- [94] Akiyama T., Takagi S., Sankawa U., Inari S., Saito H., 1980. Saponin-cholesterol interaction in the multibilayers of egg yolk lecithin as studied by deuterium nuclear magnetic resonance: digitonin and its analogs. *Biochemistry* **19**, 1904-1911.
- [95] Yu B.S., Choi H.O., 1986. The effects of digitonin and glycyrrhizin on liposomes. *Arch. Pharma. Res.* **9**, 119-125.
- [96] Mitra S., Dungan S.R., 2001. Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 384-394.
- [97] Fan H.Y., Heerklotz H., 2017. Digitonin does not flip across cholesterol-poor membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **504**, 283-293.

- [98] Schulz I., 1990. Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol.* **192**,280-300.
- [99] Golemanov K., Tcholakova S., Denkov N., Pelan, E., Stoyanov S.D, Remarkably high surface visco-elasticity of adsorption layers of triterpenoid Saponins. *Soft Matter* **9**, 5738-5752.
- [100] Takagi S., Otsuka H., Akiyama T., Sankawa U., 1982. Digitonin-cholesterol complex formation: Effect of varying the length of the side-chain. *Chem. Pharm. Bull.* **30**(10), 3485-3492.
- [101] Hao C., Zhang L., Sun R., Yang J., He G., 2014. Interaction Between Ganglioside GM1 and Diosgenin in Langmuir Monolayers at the Air/Water Interface. *SCANNING* **36**, 218-223.
- [102] Huang C.H., Liu D.Z., Jan T.R., 2010. Diosgenin, a Plant-Derived Sapogenin, Enhances Regulatory T-Cell Immunity in the Intestine of Mice with Food Allergy. *J. Nat. Prod.* **73**, 1033-1037.
- [103] Trouillas P., Corbiere C., Liagre B., Duroux J.C., Beneytout J.C, 2004. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1141-1149.
- [104] Lepage C., Liagre B, Cook-Moreau J., Pinon A., Beneytout J.L. 2010. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin- induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells. *Int J Oncol.* **36**(5), 1183-1191.
- [105] Chiang C.T., Way T.D., Tsai S.J., Lin J.K., 2007. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells, through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Lett.* **581**, 5735-5742.
- [106] Srinivasan S., Koduru S., Kumar R., Venguswamy G., Kyprianou N., Damodaran C., 2009. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* **125**(4), 961-967.
- [107] Li F., Fernandez P.P., Rajendran P., Hui K.M., Stthi G., 2010. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* **292**, 197-207.
- [108] Corbiere C., Liagre B., Terro F., Beneytout J.L., 2004. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Research* **14**(3), 188-196.
- [109] Raju J. Rao C.V. chapter: Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine; tytuł książki: Bioactive compounds in Phytomedicine; edytor Iraj Rasooli, *IntechOpen*, 2012.

- [110] Moalic S., Liagre B., Corviere C., Bianchi A., Dauca M., Bordji K., Beneytout J.L., 2001. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Letters* **506**, 225-230.
- [111] Tohda C., Yang X., Matsui M., Inada Y., Kadomoto E., Nakada S., Watari H., Shibahara N., 2017. Diosgenin-Rich Yam Extract Enhances Cognitive Function: A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind, Crossover Study of Healthy Adults. *Nutrients* **9**, 1160-1173.
- [112] Nag S.A., Qin J.J., Wang W., Wang M.H., Wang H., Zhang R., 2012. Ginsenosides as anticancer agents: *invitro* and *invivo* activities, structure - activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Front. Pharmacol.* **3**, 25.
- [113] Cheng C.C., Yang S.M., Huang C.Y., Chang W.M., Hsu S.L., 2005. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh2 - mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 531-540.
- [114] Park J.A., Kwang Y.L., Oh Y.J., Kim K.W., Lee S.K., Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* **121**, 73-81.
- [115] Kim A.D., Kang K.A., Zhang R., Lim C.M., Kim H.S., Kim D.H., Jeon Y.J., Lee C.H., Park J., Chang W.Y., Hyun J.W., 2010. Ginseng saponin metabolite induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMP - activated protein kinase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 134-140.
- [116] 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.
- [117] Deleu M., Lorent J., Lins L., Brasseur R., Braun R., Braun N., Kirat K. E., Nylander T., Dufrene Y. F., Mingeot-Leclercq M.P., 2013. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 801-815.
- [118] Montenez J.P., Van Bambeke F., Pieret J., Brasseur R., Tulkens P.M., Mingeot-Leclercq M.P., 1999. Interactions of macrolide antibiotics (Erythromycin A, roxithromycin, erythromycylamine [Dirithromycin], and azithromycin) with phospholipids: computer-aided conformational analysis and studies on acellular and cell culture models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **156**, 129-140.
- [119] Barlett G.R., 1959. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **234**, 469-471.
- [120] Angelova M.I. rozdział: Liposome Electroformation; tytuł książki: Perspectives in Supramolecular Chemistry. Edytor P. L. Luisi and P. Walde. Wiley, 1999.
- [121] Angelowa M.I., Soleau S., Meleard P., Faucon J.F., Bothorel P., 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Prog. Colloid Polymer Sci.* **89**, 127-131.

- [122] Parasassi T., De Stasio G., d’Ubaldo A., Gratton E., 1990. Phase fluctation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**, 1179-1186.
- [123] Ayuyan A.G., Cohen F.S., 2006. Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.* **91**, 2172-2183.
- [124] Roothaan C.C., 1951. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* **23**, 69-89.
- [125] [5] Becke A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, **98**, 5648-5652.
- [126] Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H., 2010. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **132** (15), 154104.
- [127] Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A., 1971. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 9. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* **54** 724-728.
- [128] McLean A.D., Chandler G.S., 1980. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18. *J. Chem. Phys.* **72**, 5639-5648.
- [129] Boys S.F. Bernardi F., 1970. Calculation of Small Molecular Interactions by Differences of Separate Total Energies – Some Procedures with Reduced Errors. *Mol. Phys.* **19**, 553-566.
- [130] AIMAll (Version 13.11.04), Todd A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, 2013 (aim.tkgristmill.com) *Mol. Phys.*, **19**, 553-566.
- [131] Mayne, C. G., Saam, J., Schulten, K., Tajkhorshid, E., Gumbart, J. C., 2013. Rapid parameterization of small molecules using the Force Field Toolkit. *J. Comp. Chem.* **34**(32), 2757-2770.
- [132] Humphrey W., Dalke A., Schulten K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38.
- [133] Kale L., Skeel R., Bhandarkar M., Brunner R., Gursoy A., Krawetz N., Phillips J., Shinozaki A., Varadarajan K., Schulten K., 1999. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys.* **151**, 283-312.
- [134] Brooks B.R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J. , Swaminathan S., Karplus M., 1983. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput Chem.* **4**(2), 187-217.
- [135] Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L., 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935.
- [136] Feller S.E., Zhang Y.H., Pastor R.W., Brooks B.R., 1995. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **103**, 4613-4621.

- [137] Kwiecinska K. Powinowactwo wybranych monodesmosydycznych saponin do monowarstw cholesterolu. Praca magisterska. Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2015.
- [138] Davies J.T., Rideal E.K., Interfacial phenomena. *Academic Press*. Nowy Jork, 1963.
- [139] Bhakoo M., Brickbeck T.H., Freer J.H., 1982. Interaction of *Staphylococcus Aureus* δ -lysin with phospholipid monolayers. *Biochemistry* **21**, 6879-6883.
- [140] Bojarska-Kujawa D., Cyboran D., Oszmiański J., Kleszczyńska H., 2015. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów. *ŻNTJ* **3**(100), 148-149.
- [141] Chong P.L., Wong P.T., 1993. Interaction of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 260-266.
- [142] Orczyk M., Wojciechowski K., Brezesinski G., 2017. Disordering effects of digitonin on phospholipid monolayers. *Langmuir* **33**, 3871-3881.
- [143] Verstraeten S., Deleu M., Janikowska-Sagan M., Claereboudt E., Lins L., Tyteca D., Mingeot-Leclercq M.P., 2019. The activity of the saponin ginsenoside Rh2 is enhanced by the interaction with membrane sphingomyelin but depressed by cholesterol. *Sci. Rep.* **9**, numer artykułu: 7285.
- [144] Matsubayashi Y., Iwai L., Toda T., Lu Q.R., Kawasaki H., 2009. Immunostaining for oligodendrocyte-specific galactosphingolipids in fixed brain sections using the cholesterol-selective detergent digitonin. *J. Neurosci. Methods* **178**, 87-98.
- [145] Simons K., Ikonen E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- [146] Lingwood D., Kaiser H.J., Levental I., Simons K., 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 955-960.
- [147] Elias P.M., Goerke J., Friend D.S., Brown B.E., 1978. Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. *J. Cell Biol* **78**, 577-596.
- [148] Nishikawa M., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U., Inoue K., 1984. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol. *J. Biochem.* **96**, 1231-1239.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie oddziaływań fizykochemicznych między cząsteczkami digitoniny i cholesterolu błonowego. W prowadzonych badaniach tworzono modelowe membrany biologiczne, które następnie poddawano działaniu saponiny, digitoniny lub ginsenozydu Rh2. Do badań wykorzystywano metody eksperymentalne i teoretyczne. Eksperymenty wykonywano przy użyciu metody monowarstw Langmuira oraz metod spektroskopowych i fluorescencyjnych z wykorzystaniem dużych i ogromnych jednowarstwowych liposomów, symulację komputerowe prowadzono z wykorzystaniem metod klasycznej dynamiki molekularnej i metod chemii kwantowej.

Praca doktorska została podzielona na trzy zasadnicze części. Pierwszą z nich stanowił przegląd literatury naukowej dotyczącej badanego zagadnienia. Na początku została opisana budowa, funkcje i skład błony komórkowej. Szczególną uwagę poświęcono wykorzystywanym w nauce modelom błon biologicznych. Przegląd literaturowy został zakończony podrozdziałem poświęconym saponinom, ich występowaniu, znaczeniu biologicznym oraz wykorzystywaniu w naukach biomedycznych.

W drugiej części pracy opisano materiał badawczy oraz szczegóły eksperymentalne metod wykorzystanych w badaniach. Materiał badawczy stanowiły: cholesterol (CHOL) i diosgenina będące sterolami; POPC stanowiący fazę nieuporządkowaną modelowej błony; oraz sfingomielina (SM), która wraz z cholesterolem wchodzi w skład raft lipidowych. W badaniach zostały zastosowane filmy powierzchniowe o czterech różnych kompozycjach: cholesterol, diosgenina, mieszaniny: POPC/SM oraz POPC/SM/CHOL. Tak utworzone filmy powierzchniowe były poddawane działaniu digitoniny. W badaniach zastosowano dwa rodzaje subfaz: wodną oraz wodny roztwór digitoniny. W badaniach liposomowych wykorzystywano duże i olbrzymie jednowarstwowe liposomy składające się następujących mieszanin równomolowych: ePC/SM oraz ePC/SM/CHOL. Liposomy były inkubowane z saponinami: digitoniną i ginsenozydem Rh2.

W ostatniej zasadniczej części pracy przedstawiono uzyskane wyniki pomiarów oraz ich dyskusję. Otrzymane wyniki zostały podzielone na trzy części, z których pierwsza dotyczyła czystych monowarstw cholesterolu bądź diosgeniny. Uzyskane wyniki pokazały, że digitonina destabilizowała zarówno monowarstwę cholesterolu jak i diosgeniny. Symulacja *in silico* pokazała, że w przypadku gdy błona została ściśnięta do ciśnienia powierzchniowego przy-

pominającego to panujące w natywnych membranach biologicznych digitonina oddziaływała znacznie silniej z cholesterolem, niż z diosgeniną, co świadczyło o dużej roli łańcucha alifatycznego sterolu w oddziaływaniu z badaną saponiną. Ponadto obliczenia kwantowo-chemiczne wykazały, że oddziaływania między cząsteczkami cholesterol - digitonina, a także diosgenina - digitonina były stabilizujące, a między oddziałującymi cząsteczkami występowały punkty krytyczne wiązania odpowiadające oddziaływaniom Van der Waalsowskim.

W drugiej części zostały zaprezentowane wyniki otrzymane z badań nad liposomami zbudowanymi z mieszanin ePC/SM (1:1) oraz ePC/SM/cholesterol (1:1:1). Zarówno digitonina jak i ginsenozyd Rh2 oddziaływały z liposomami. Digitonina oddziaływała silniej z liposomami, w których skład wchodził cholesterol. Natomiast ginsenozyd Rh2 miał większy wpływ na liposomy dwuskładnikowe. Ponadto jego funkcja w błonie była podobna do roli cholesterolu, to znaczy następowało usztywnienie błony w czasie gdy liposomy były inkubowane z ginsenozydem Rh2.

Trzecią część wyników stanowiły badania nad oddziaływaniem digitoniny z monowarstwami utworzonymi z POPC/SM (1:1), a także POPC/SM/CHOL (1:1:1). Wykazano, że saponina oddziaływała z obiema monowarstwami. Jednakże penetracja części aglikonowej digitoniny do wnętrza membrany następowała tylko w przypadku gdy monowarstwa zawierała cholesterol.

Praca została zakończona zestawieniem najważniejszych wniosków płynących z wykonanych badań. Następnie została podana bibliografia, z której korzystano podczas tworzenia części literaturowej pracy oraz dyskusji wyników.

8

Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały zamieszczone w następujących artykułach:

1. Korchowiec B., Gorczyca M., Wojszko K., **Janikowska M.**, Henry M., Rogalska E., 2015. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1848**(10), 1963–1973.
2. Verstraeten S., Deleu M., **Janikowska-Sagan M.**, Claereboudt E., Lins L., Tyteca D., Mingeot-Leclercq M.P., 2019. The activity of the saponin ginsenoside Rh2 is enhanced by the interaction with membrane sphingomyelin but depressed by cholesterol. *Sci. Rep.* **9**, 7285.

Pozostały dorobek naukowy:

1. Wnętrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A., **Janikowska-Sagan M.**, Rodriguez J.L., Conde J.M., Dynarowicz-Łątka P., 2019. Crucial role of the hydroxyl group orientation in Langmuir monolayers organization—The case of 7-hydroxycholesterol epimers. *Colloids Surf., B* **563**, 330-339.
2. Wnętrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A., **Janikowska-Sagan M.**, Dynarowicz-Łątka P., 2019. Influence of 7-hydroxycholesterol on sphingomyelin and sphingomyelin/phosphatidylcholine films - The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **4**, 861-870.

Prezentacje na konferencjach naukowych:

1. 15th European Student Colloid, 8 - 11 lipca 2015, Kraków:
Janikowska M., Korchowiec B., Gorczyca M., Wojszko K., Trojan S., Max H., Korchowiec J. Poster: „Action of selected saponins on biological model membranes”
2. 15th European Student Colloid, 8 - 11 lipca 2015, Kraków:
Trojan S., Eustarbowska M., Korchowiec B., **Janikowska M.**, Jean-Pierre J., Korchowiec J. Poster: „The role of chain unsaturation in the formation of organized molecular films of crown ether - modified phospholipid monolayers”.

3. 16th International Conference on Organized Molecular Films, 25 - 29 lipca 2016, Helsinki, Finlandia:
Janikowska M., Kwiecińska K., Trojan S., Korchowiec B., Korchowiec J. Poster: „The affinity of selected monodesmosidic saponins to the monolayer of cholesterol”.
4. 16th International Conference on Organized Molecular Films, 25 - 29 lipca 2016, Helsinki, Finlandia:
Trojan S., Stachowicz-Kuśnierz A., **Janikowska M.**, Korchowiec B., Korchowiec J. Poster: ”The influence of benzo[a]pyrene on model pulmonary surfactant monolayers composed of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol”.
5. Current Trends in Theoretical Chemistry VII 4 - 8 września 2016, Kraków:
Janikowska M., Kwiecińska K., Korchowiec B., Korchowiec J. Poster: „Modeling the adsorption of digitonin to cholesterol and diosgenin monolayers”.
6. PhD day at the LDRI, 23 maja 2017, Bruksela, Belgia:
Verstraeten S., **Janikowska M.**, Albert M., Leonard C., Tyteca D., Mingeot Leclercq M.P. Poster: „Role of membrane cholesterol in the apoptosis induced by ginsenoside Rh2, a steroid saponin”.