

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Wpływ witaminy C na właściwości
fzykochemiczne dwuwarstwy lipidowej**

PAULINA DAŁEK

PROMOTOR

PROF. DR HAB. INŻ. MAREK LANGNER



Politechnika
Wroclawska

WYDZIAŁ PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI

KATEDRA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

WROCLAW 2022

Spis treści

Streszczenie w języku angielskim	4
Wykaz ważniejszych symboli i skrótów	6
Cel i motywacja prowadzonych badań	8
I Wprowadzenie	10
1 Witamina C w organizmie człowieka	11
1.1 Rola witaminy C w organizmie człowieka	12
1.2 Mechanizmy transportu witaminy C	13
2 Dwuwarstwa lipidowa	16
2.1 Budowa dwuwarstwy lipidowej	17
2.2 Właściwości lipidów budujących dwuwarstwę lipidową	18
2.2.1 Glicerofosfolipidy	19
2.2.2 Sfingolipidy	20
2.2.3 Sterole	20
3 Właściwości dwuwarstwy lipidowej	22
3.1 Współczynnik podziału	22
3.2 Współczynnik przepuszczalności	23
3.3 Temperatura przejścia fazowego	25
3.4 Płynność dwuwarstwy lipidowej	26
3.5 Ładunek powierzchniowy	27
4 Modele dwuwarstwy lipidowej	29
4.1 Modele na podłożu stałym	29
4.2 Modele komputerowe	30
4.3 Liposomy	30
5 Metody pomiarowe wybranych właściwości dwuwarstwy lipidowej	32
5.1 Współczynnik przepuszczalności	32
5.2 Współczynnik podziału	33

5.3	Temperatura przejścia fazowego	34
5.4	Płynność dwuwarstwy lipidowej	34
5.5	Ładunek powierzchniowy	35
II	Materiały i metody	36
6	Materiały	37
7	Formowanie liposomów	38
8	Izotermiczna kalorymetria miareczkująca	40
9	Dynamiczne rozpraszanie światła	44
9.1	Wyznaczenie średniego rozkładu wielkości oraz polidispersyjności	46
9.2	Wyznaczenie temperatury przejścia fazowego	46
10	Polaryzacyjna spektroskopia fluorescencyjna	48
11	Elektroforetyczne rozpraszanie światła	51
12	Analiza statystyczna	53
III	Wyniki	54
13	Oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą lipidową	55
13.1	Wpływ stężenia lipidu na mierzone oddziaływania	61
13.2	Wpływ składu dwuwarstwy lipidowej na mierzone oddziaływania	64
13.3	Wpływ uporządkowania dwuwarstwy lipidowej na mierzone oddziaływania	70
13.4	Wpływ pH środowiska wodnego na mierzone oddziaływania	72
13.5	Porównanie mierzonych oddziaływań z innymi molekułami	74
14	Właściwości termodynamiczne dwuwarstwy lipidowej w obecności witaminy C	79
14.1	Współczynnik podziału	79
14.2	Współczynnik przepuszczalności	82
14.3	Znaczenie wyznaczonych parametrów termodynamicznych w kontekście transportu witaminy C przez dwuwarstwą lipidową	86
15	Fizykochemiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej w obecności witaminy C	88
15.1	Temperatura przejścia fazowego	88
15.2	Płynność dwuwarstwy lipidowej	93
15.3	Ładunek powierzchniowy	96

IV Podsumowanie i wnioski	101
Bibliografia	106
Spis rysunków	121
Spis tabel	123
Spis wykresów	124
Wykaz dorobku naukowego	127

Streszczenie w języku angielskim

Vitamin C is an essential compound for a properly functioning organism. Knowledge of the processes responsible for the transport of this vitamin through the lipid bilayer allows the understanding of how local homeostasis is maintained. The influx of ascorbate is regulated by protein transporters (SVCT1, SVCT2 and GLUT) however, the mechanism of how ascorbate flows out to the extracellular matrix has not been explained yet. This is the motivation to study the possible interactions between vitamin C and lipid bilayer, including how these interactions could affect bilayer's physicochemical properties. The obtained results may relate to the transport of vitamin C through the lipid membrane and could underline the creation of a model which describes the bidirectional flux of this molecule in the cell. In the doctoral dissertation, the liposomal lipid bilayer model was used to carry out the research. The studies have been divided into three parts related to the research theses.

Firstly, to define the interactions between vitamin C and lipid bilayer, the isothermal titration calorimetry measurements were performed. The results confirmed the highly energetic interactions, depending on the lipid bilayer composition and the pH of the aqueous environment.

In the second part, the thermodynamic parameters from calorimetric data were used to quantitatively describe the transport of molecules through the lipid bilayer by passive diffusion. The obtained lipid bilayer/water partition coefficient of vitamin C indicates that this molecule has more affinity to lipid bilayer than to the aqueous environment, which has been shown for the first time and is opposite to the commonly referred octanol/water partition coefficient. The determined permeability coefficient is in good agreement with the literature data obtained with a different technique. That confirms that the created model, which was based on isothermal titration calorimetry data, could be used to determine this parameter.

In the last part, the influence of vitamin C on the physicochemical properties of lipid bilayer such as phase transition temperature, microviscosity and surface potential was verified. The obtained results demonstrated that this molecule changes the phase transition temperature and microviscosity of the lipid bilayer, which support the thesis of the possible interactions between vitamin C and lipid membrane.

The results of the research present that vitamin C interacts with the lipid bilayer and affects its physicochemical properties for the first time. The passive diffusion was not considered so far as the vital process of vitamin C efflux from the cell, due to the greater

affinity of this molecule to the polar environment, as the octanol/water partition coefficient indicates. However, the determination of lipid bilayer/water partition coefficient along with the effect of vitamin C on features of lipid membrane implies that this mechanism of transport through the plasma membrane might be of great importance and could lead to the creation of a complete model of vitamin C homeostasis in the human body.

Wykaz ważniejszych symboli i skrótów

ANS	kwasy 8-anilino-1-naftalenosulfonowy
AscH ₂	kwasy askorbinowy
AscH ⁻	jon askorbinowy
BLM	z ang. <i>Black Lipid Membrane</i>
CPP	krytyczny parametr upakowania
chol	cholesterol
DHA	kwasy dehydroaskorbinowy
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła
DMSO	dimetylosulfotlenek
DOPE	1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPC	1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DOPS	1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfoseryna
DPH	1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien
DPPC	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DSC	różnicowa kalorymetria skaningowa
ELS	elektroforetyczne rozpraszanie światła
EPR	spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
FTIR	spektroskopia furierowska w podczerwieni
GLUT	transporter glukozy
GUV	gigantyczne jednowarstwowe pęcherzyki
ILC	z ang. <i>Immobilized Liposome Chromatography</i>
ITC	izotermiczna kalorymetria miareczkująca
$K_{B/W}$	współczynnik podziału błona/woda
$K_{O/W}$	współczynnik podziału oktanol/woda
L_c	faza krystaliczna
L_β	faza żelowa
L_λ	faza ciekłokrystaliczna

LUV	duże jednowarstwowe pęcherzyki
MLV	duże wielowarstwowe pęcherzyki
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
P	współczynnik przepuszczalności
PAMPA	z ang. <i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>
PC	fosfatydylocholina
PDI	polidispersyjność
PS	fosfatydyloseryna
PE	fosfatydyloetanolamina
PI	fosfatydyloinozytol
P_{β}	faza pofałdowana z ang. <i>Ripple Phase</i>
ROS	reaktywne formy tlenu
SLB	z ang. <i>Supported Lipid Bilayer</i>
SUV	małe jednowarstwowe pęcherzyki
SVCT1	transporter witaminy C zależny od jonów sodu
SVCT2	transporter witaminy C zależny od jonów sodu
T_{α}	temperatura przejścia fazowego
T_{β}	temperatura przedprzejścia fazowego
TMA-DPH	1-4-trimetyloamonofenyl

Cel i motywacja prowadzonych badań

Badania nad oddziaływaniami występującymi pomiędzy molekułami czynnymi biologicznie a błoną lipidową, stanowią ważny aspekt współczesnej nauki, zarówno od strony badań podstawowych, jak i nanomedycyny będącej częścią inżynierii biomedycznej. Umożliwiają wytłumaczenie i opisanie nieznanych do tej pory procesów biofizycznych, które towarzyszą oddziaływaniom wybranych molekuł z błoną lipidową, jednocześnie ze względu na wykorzystany model dwuwarstwy lipidowej, pozwalają na zastosowanie uzyskanych rezultatów w projektowaniu kierowanych nośników leków.

Celem prowadzonych badań było określenie, czy pomiędzy wybraną molekułą — witaminą C a modelową błoną lipidową dochodzi do oddziaływań, i w jaki sposób wpływają one na właściwości dwuwarstwy lipidowej. Główną motywacją do badań dotyczących witaminy C jest jej istotna rola w prawidłowym przebiegu procesów fizjologicznych, oraz brak kompletnego modelu opisującego utrzymanie lokalnej homeostazy tej molekuły w komórce. Co więcej, na podstawie danych dostępnych w literaturze można stwierdzić, że mimo dużego zainteresowania witaminą C w kontekście jej terapeutycznych właściwości, brakuje informacji dotyczących jej oddziaływań z dwuwarstwą lipidową.

W ramach prowadzonych badań postawiono trzy tezy badawcze:

1. Pomiedzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową występują specyficzne oddziaływania, które różnią się w zależności od składu lipidowego dwuwarstwy lipidowej oraz warunków środowiskowych.
2. Parametry termodynamiczne powiązane z oddziaływaniami występującymi pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową, umożliwiają wyznaczenie wielkości charakteryzujących transport tej molekuły przez dwuwarstwę lipidową.
3. Oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową zmieniają właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej.

Pracę podzielono na trzy części, odpowiadające poszczególnym tezom badawczym. Celem pierwszej z nich było określenie, czy pomiędzy dwuwarstwą lipidową a witaminą C dochodzi do specyficznych oddziaływań w zależności od składu lipidowego, uporządkowania dwuwarstwy lipidowej, czy pH środowiska wodnego. W drugiej uzyskane rezultaty wykorzystano do wyznaczenia wielkości charakteryzujących witaminę C w kontekście jej oddziaływań z dwuwarstwą lipidową — współczynnika podziału błona/woda oraz współczynnika przepuszczalności. W ostatniej części zbadano, jak witamina C wpływa na

właściwości fizykochemiczne błony lipidowej, takie jak temperaturę przejścia fazowego, mikrolepkość czy ładunek powierzchniowy.

Badania prowadzono z wykorzystaniem jednego z modeli dwuwarstwy lipidowej — liposomów o jednorodnym rozkładzie rozmiarów. Główną techniką pomiarową była izotermiczna kalorymetria miareczkująca, pozwalająca na pomiar stanów energetycznych, która charakteryzuje się dużą czułością oraz umożliwia bezinwazyjny pomiar bez konieczności ingerencji w budowę lub modyfikację mierzonych struktur. Do określenia wpływu witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej wybrano takie techniki pomiarowe, jak dynamiczne rozpraszanie światła, czy spektroskopię fluorescencyjną.

Uzyskane rezultaty mogą zostać wykorzystane zarówno w kontekście badań podstawowych, dotyczących poznania mechanizmów dystrybucji witaminy C istotnych dla funkcjonowania komórki, jak i całego organizmu, oraz aplikacyjnych — związanych z optymalizacją oraz projektowaniem nowoczesnych liposomalnych nośników leków. Dodatkowo prowadzone badania mogą stanowić podstawę do tworzenia modeli opisujących wpływ witaminy C na funkcjonowanie komórki.

Część I

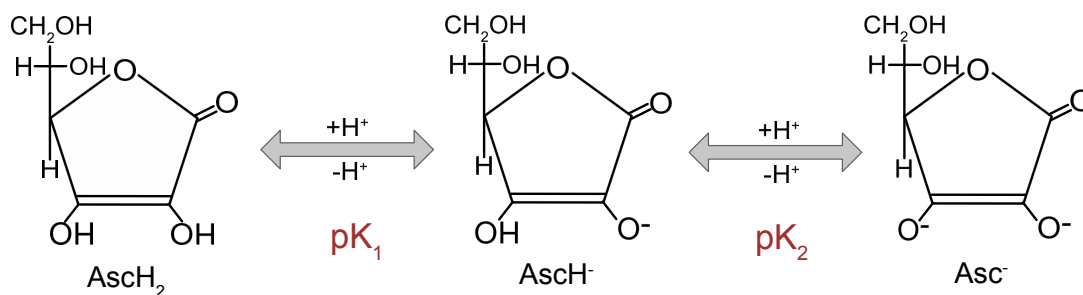
Wprowadzenie

Rozdział 1

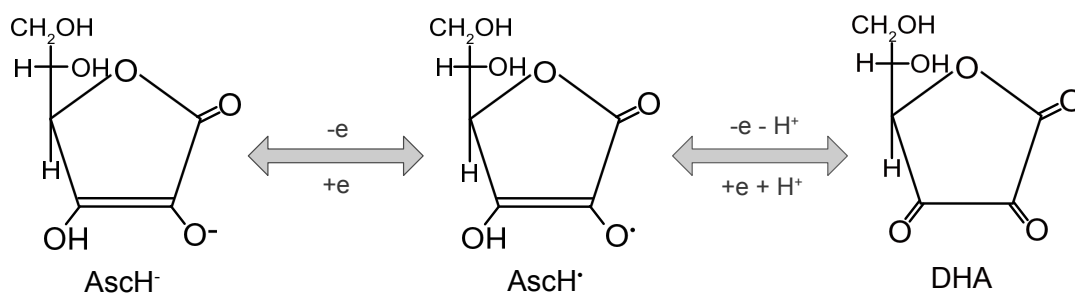
Witamina C w organizmie człowieka

Człowiek należy do grupy organizmów, które nie potrafią syntezować witaminy C. Wynika to z braku genu kodującego oksydazę l-gulonolaktonową, enzymu uczestniczącego w końcowym etapie syntezy kwasu askorbinowego [1]. Ze względu na zaangażowanie witaminy C w wiele procesów fizjologicznych prawidłowo działający organizm musi znaleźć jej źródło w środowisku zewnętrznym, w przeciwnym razie dochodzi do jej niedoboru, który prowadzi do dysfunkcji organizmu, a w ostateczności może przekształcić się w ogólnoustrojową chorobę, jaką jest szkorbut [3]. Prowadzone od lat badania nad witaminą C uzupełniają coraz dokładniej wiedzę dotyczącą jej właściwości fizykochemicznych, jak i mechanizmów działania w organizmie człowieka, szczególnie w kontekście utrzymania homeostazy tej molekuly w organizmie, jak i lokalnie w komórce.

Witamina C, inaczej kwas askorbinowy (AscH_2), to hydrofilowa molekula, należąca do grupy ketolaktonów, charakteryzująca się obecnością dwóch grup hydroksylowych [1]. Jest słabym kwasem posiadającym dwa punkty $\text{pK}_{a1} = 4.2$ oraz $\text{pK}_{a2} = 11.6$. W zależności od pH środowiska przyjmuje różne formy, jak przedstawiono na Rys. 1.1. W warunkach fizjologicznych (pH 7.35–7.45) dominującą formą jest jon askorbinowy (AscH^-), stanowiący około 99% wszystkich form witaminy C [1]. Z tego względu w dalszej części pracy określenie *jon askorbinowy* oraz *witamina C* będą stosowane wymiennie, chyba że zostanie wskazane inaczej. Dodatkowo w całej pracy, zarówno podczas przedstawienia danych



Rysunek 1.1: Schemat przedstawiający formy kwasu askorbinowego w zależności od pH środowiska. Wartości pK_a wynoszą $\text{pK}_{a1} = 4.2$ oraz $\text{pK}_{a2} = 11.6$. Schemat przygotowany na podstawie [1, 2].



Rysunek 1.2: Schemat przedstawiający przejście jonu askorbinowego do formy rodnika askorbinowego i DHA. Schemat przygotowany na podstawie [1, 2].

literaturowych, jak i wyników własnych, przyjęto separator dziesiętny w formie kropki. Wraz z lokalnym obniżeniem pH w jelicie cienkim (pH 5.0) oraz w żołądku (pH 1.0) zwiększa się udział formy uprotonowanej (AscH₂) odpowiednio do wartości wynoszących około 15% oraz 99% [4]. Ze względu na swoje właściwości utleniające jon askorbinowy może być donorem elektronów, co przedstawiono na schemacie (Rys. 1.2). Po utracie jednego elektronu powstaje rodnik askorbinowy, charakteryzujący się znaczną stabilnością, z czasem życia od kilkunastu milisekund do kilku minut, w zależności od warunków środowiska i obecności akceptorów elektronów, szczególnie żelaza [2]. Po utracie drugiego elektronu powstaje kwas dehydroaskorbinowy (DHA), który jest bardziej stabilny. Obydwa procesy są odwracalne na drodze redukcji, zarówno rodnik askorbinowy, jak i DHA mogą wrócić do swoich wcześniejszych form. Proces ten jest możliwy, dopóki nie dojdzie do trwałego uszkodzenia pierścienia γ -laktanowego w DHA prowadzącego do powstania kwasu 2,3-diketogulonowego [1, 2].

1.1 Rola witaminy C w organizmie człowieka

Witamina C uważana jest za jeden z kluczowych przeciwutleniaczy biorących udział w neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS). Pojawiające się nowe wyniki eksperymentalne wskazują, że jest ona ważną molekułą w organizmie człowieka niezbędną do normalnego funkcjonowania oraz metabolizmu komórek [5]. Witamina C stanowi istotny kofaktor dla kilkunastu enzymów m.in. należących do grupy oksygenaz, które odpowiadają za syntezę kolagenu oraz karnityny, czy niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego — norepinefryny [6]. Jony askorbinowe regulują demetylację DNA, będąc kluczowym kofaktorem TET dioksygenazy, oraz demetylację histonów jako kofaktor białek domeny Jumonji [7]. Współpracują z witaminą E, zapobiegają oksydacji lipidów oraz biorą udział w procesie tzw. recyklingu witaminy E [6]. Witamina C uczestniczy również w gospodarce żelaza w organizmie, zwiększając jego wchłanianie w jelicie, poprzez redukcję jonów żelaza Fe³⁺ do jonów żelaza Fe²⁺ [8]. Pomimo swoich antyoksydacyjnych właściwości witamina C w wysokim stężeniu pełni funkcję utleniacza, redukując metale z grup przejściowych, takie jak m.in. żelazo czy miedź. Te metale, na niższym poziomie

utleniania, są substratami w reakcji Fentona, w wyniku której powstaje szkodliwy dla organizmu rodnik hydroksylowy [5]. Pomimo różnorodności procesów, w jakich uczestniczy witamina C, zarówno tych korzystnych, jak i mających negatywny wpływ na organizm człowieka, główną rolę odgrywa jej zdolność do oddawania elektronów [1]. Ze względu na to, że właściwości redukcyjne są również niezbędne we wnętrzu komórki, istotne stają się transportery błonowe, jak i mechanizmy pozwalające na przechodzenie witaminy C przez błonę komórkową [9].

1.2 Mechanizmy transportu witaminy C

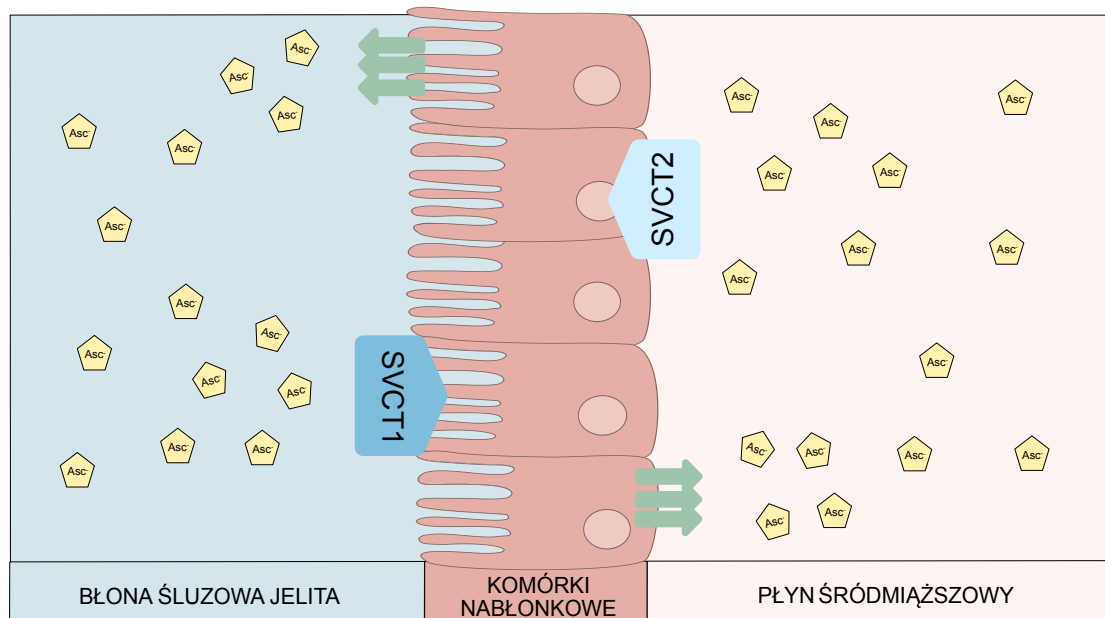
Stężenie witaminy C w organizmie człowieka zależy od lokalizacji. Jego wartość waha się od 50 μM (osocze) do 10 mM (neurony) [2]. Tak zróżnicowana dystrybucja tej molekuly wymaga poznania mechanizmów, odpowiadających za jej dwukierunkowy przepływ na poziomie komórkowym. Poniżej omówiono poszczególne rodzaje transportu witaminy C oraz jej dystrybucje na przykładzie absorpcji w jelicie cienkim.

Za transport aktywny witaminy C odpowiedzialne są hydrofobowe białka błonowe, zależne od jonów sodu transportery witaminy C — SVCT1 oraz SVCT2, których rolą jest transport tej cząsteczki do macierzy wewnątrzkomórkowej. SVCT1 jest transporterem znajdującym się głównie w komórkach nabłonkowych, jelicie cienkim oraz kanalikach nerkowych [2]. Uczestniczy w absorpcji witaminy C w jelicie, oraz umożliwia resorpcję tej cząsteczki w nerkach. Natomiast SVCT2 znajduje się w większości komórek m.in. tkance nerwowej, tkance mięśniowej oraz kostnej, nadnerczach, mózgu, płucach, czy układzie limfatycznym [2, 10]. Kontrola nad działaniem tych transporterów odbywa się poprzez białka kinazę A oraz C, których ekspresja jest zmniejszana/zwiększana w zależności od ilości jonów askorbinowych wewnątrz komórki [11]. Funkcjonowanie tych transporterów, zależnie od poziomu zawartości jonów askorbinowych, pokazano w badaniach z wykorzystaniem płytek krwi oraz komórek Caco-2TC7 [12]. Transportery te są jednokierunkowe, pozwalają na wejście jonów askorbinowych do wnętrza komórki, jednak kinetyka ich działania nie tłumaczy procesu wypływu tych jonów na zewnątrz, co sugeruje, że może za to odpowiadać nieodkryte do tej pory białko błonowe lub nieznany mechanizm odpowiedzialny za przechodzenie witaminy C przez błonę komórkową [2].

Transportery z rodziny transporterów glukozy (GLUT) to drugi rodzaj mechanizmu odpowiedzialnego za transport witaminy C przez błonę komórkową. Ich sposób działania różni się od transporterów SVCT, ponieważ nie przenoszą one bezpośrednio jonów askorbinowych, a produkt ich utleniania — DHA (powinowactwo do DHA wykazują transportery GLUT1, 2, 3, 4 oraz 8) [3]. Transportowane jest DHA, znajdujące się w osoczu, lub jony askorbinowe na drodze procesu nazywanego recyklingiem askorbinianu (z ang. *ascorbate recycling*) [2, 13]. W drugim przypadku znajdujące się w osoczu jony askorbinowe są najpierw zredukowane do DHA, następnie transportowane przez transportery GLUT do macierzy wewnątrzkomórkowej, w której na drodze reakcji enzymatycznych lub z wykorzystaniem m.in. glutationu są z powrotem zredukowane do jonów askorbinowych [2, 13].

Ze względu na to, że są to jednocześnie transportery glukozy, znajdują się w większości komórek organizmu człowieka, podobnie jak transportery SVCT2. Czerwone krwinki są jedynymi komórkami, u których potwierdzono obecność tylko transporterów GLUT [8]. Przeprowadzone do tej pory badania nie tłumaczą dokładnie roli transporterów GLUT oraz DHA w gospodarce witaminy C w organizmie człowieka [2]. Jednak opierając się na dostępnych danych literaturowych, można stwierdzić, że te transportery nie są główną metodą transportu witaminy C przez błonę komórkową. Wynika to z niskiego poziomu DHA w osoczu człowieka (stężenie $< 2 \mu\text{M}$), podczas gdy stężenie jonów askorbinowych w komórkach jest kilka rzędów większe (1–10 mM) [8]. Dodatkowym aspektem jest konkurencja z cząsteczkami glukozy, do których większość rodzajów transporterów GLUT wykazuje większe powinowactwo, oraz których lokalne stężenie w organizmie przewyższa stężenie DHA [1].

Ostatni mechanizm transportu witaminy C, który zostanie opisany to dyfuzja prosta. Proces ten w przypadku słabych kwasów, takich jak witamina C, jest zależny od gradientu stężeń, pH oraz gradientu elektrochemicznego błony lipidowej [14]. Ze względu na większe powinowactwo witaminy C do środowiska polarnego oraz formę, jaką przyjmuje w warunkach fizjologicznych (anionu), dyfuzja prosta tej molekule przez błonę lipidową jest powolna w porównaniu do cząsteczek hydrofobowych albo niejonowych, hydrofilowych molekuł o mniejszej masie cząsteczkowej [4, 12]. Wzrost znaczenia tego rodzaju transportu może mieć miejsce w żołądku lub jelicie cienkim ze względu na niższą wartość pH, równoznaczną z występowaniem witaminy C w formie niejonowej [4].



Rysunek 1.3: Schemat przedstawiający transport witaminy C w jelicie cienkim. Kolorem niebieskim oznaczono transportery SVCT1 oraz SVCT2, które odpowiadają za napływ jonów askorbinowych do wnętrza komórki. Kolorem zielonym oznaczono nieznany do tej pory mechanizm transportu jonów askorbinowych z komórki do wnętrza jelita oraz płynu śródmiąższowego. Schemat przygotowano na podstawie informacji zawartych w [2, 14].

Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem modelu zwierzęcego badające rolę poszczególnych transporterów witaminy C pokazały, że wyłączenie ekspresji białka kontrolującego działanie transporterów SVCT2 jest letalne. Dodatkowo wyznaczone eksperymentalnie stężenie witaminy C nie osiągnęło poziomu, który odpowiadałby wartościom fizjologicznym w poszczególnych tkankach [8]. Pozwala to założyć, że inne transportery tej cząsteczki — SVCT1 oraz GLUT nie odgrywają kluczowej roli w dostarczaniu jonów askorbinowych do poszczególnych komórek organizmu [14]. Co więcej, analogiczne badania, w których hamowano ekspresję białka kontrolującego działanie transporterów SVCT1, nie dały podobnych rezultatów. Pokazano, że brak funkcjonowania tych transporterów prowadzi do zwiększonej zawartości witaminy C w moczu, co wynika z lokalizacji transporterów SVCT1 w kanalikach nerkowych i ich udziału w resorpcji tej molekuly.

Brak spójnego modelu opisującego przepływ witaminy C na poziomie komórkowym, pokazuje droga absorpcji tej cząsteczki w jelicie cienkim (Rys. 1.3). Napływ witaminy C do wnętrza komórek nabłonkowych jelita cienkiego odbywa się przez transportery SVCT1 od strony wnętrza jelita, oraz transportery SVCT2 z płynu śródmiąższowego. Brakuje jednak mechanizmu, który tłumaczyłby wypływ tej molekuly z komórek nabłonkowych. Poznane do tej pory rodzaje transportu witaminy C — przez kanały białkowe (SVCT1, SVCT2) oraz na drodze transportu pośredniego przez kanały z rodziny transporterów glukozy (GLUT) nie tłumaczą mechanizmów utrzymania lokalnej homeostazy tej cząsteczki w komórce, jak i jej przestrzennej dystrybucji w organizmie człowieka [15]. Dodatkowo z wyjątkiem mitochondrium nie zbadano procesu dystrybucji tej cząsteczki pomiędzy różnymi organellami wewnątrz komórki [16]. Prowadzi to do pytania, czy możliwe jest, aby transport witaminy C na drodze dyfuzji prostej odgrywał istotniejszą rolę, niż wskazywałyby na to dostępne do tej pory dane literaturowe [12, 17]. Pełne zrozumienie tego zagadnienia oraz uzyskanych wyników badań może uzupełnić brakujące elementy modelu dystrybucji tej cząsteczki w organizmie człowieka.

Rozdział 2

Dwuwarstwa lipidowa

Błona komórkowa, stanowiąca granicę fizyczną pomiędzy macierzą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową, to ważny pod względem funkcjonowania element budulcowy komórki. Model płynnej mozaiki, zaproponowany przez Singera i Nicolsona w latach 70., trafnie i uniwersalnie opisywał błonę komórkową, przedstawiając ją jako strukturę, której rdzeń stanowi płynna i dynamiczna dwuwarstwa lipidowa z wbudowanymi białkami [18]. Model opierał się na dostępnych danych eksperymentalnych, opisujących termodynamiczne właściwości lipidów i białek, oraz dowodach świadczących o asymetrii i mobilności błon biologicznych [19]. W późniejszych latach wraz ze wzrostem zainteresowania tematyką związaną z funkcjonowaniem błony komórkowej i rozwojem nowych technik eksperymentalnych odkryto kolejne specyficzne cechy tej struktury, takie jak zdolność do formowania mikrodomen lipidowych [20], czy też dokładniejszą dynamikę lipidów [21, 22].

Dwuwarstwa lipidowa stanowi rdzeń błony komórkowej, w który wbudowane są białka błonowe, integralne lub powierzchniowe, oraz glikolipidy i glikoproteiny [23, 24]. Skład błony komórkowej lub ogólniej błon biologicznych (czyli również tych oddzielających poszczególne organelle od cytoplazmy [25]) różni się w zależności od rodzaju komórki/organeli. Przyjmuje się, że lipidy stanowią masowo około 50% zawartości błony komórkowej, pozostałą część w większości zajmują białka [23].

Błona komórkowa jako całość tworzy złożony i dynamiczny układ, stanowiący selektywną barierę odpowiedzialną za wymianę cząsteczek pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wnętrzem komórki, jednocześnie pośredniczący w oddziaływaniach pomiędzy komórkami, jak i elementami macierzy zewnątrzkomórkowej [23]. Dodatkowo błona komórkowa zapewnia odpowiednie środowisko wewnątrz komórki, co umożliwia jej prawidłowe funkcjonowanie. Białka błonowe oprócz uczestniczenia w transporcie jonów i niewielkich, hydrofilowych cząsteczek pełnią funkcję specyficznych receptorów i enzymów, umożliwiając przesyłanie sygnałów [23]. Ze względu na charakter prowadzonych badań w dalszej części pracy główną uwagę skupiono na dwuwarstwie lipidowej, jej budowie oraz roli, jaką odgrywają poszczególne lipidy ją tworzące.

2.1 Budowa dwuwarstwy lipidowej

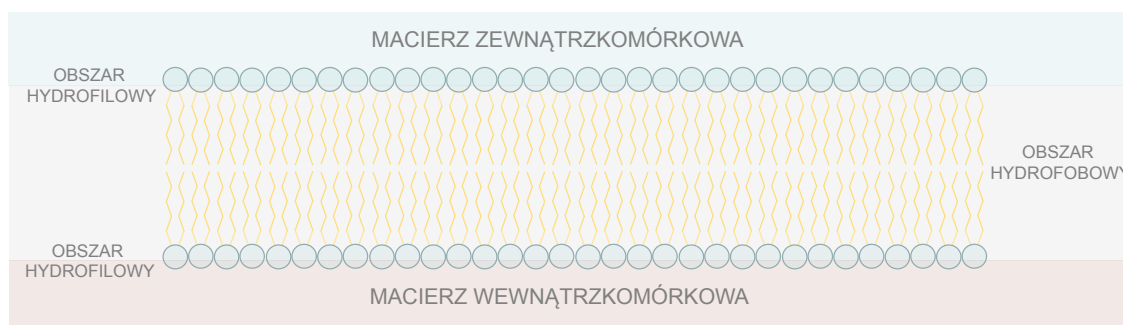
Tworzenie dwuwarstwy lipidowej w środowisku wodnym jest możliwe dzięki efektowi hydrofobowemu, który jest procesem polegającym na minimalizacji energii układu poprzez samoorganizację fosfolipidów w strukturę dwuwarstwy lipidowej. Amfifilowość fosfolipidów sprawia, że korzystnym stanem energetycznym jest ten, w którym hydrofobowe łańcuchy alkilowe zwrócone są w swoją stronę z grupami polarnymi odwróconymi w stronę cząsteczek wody, jak przedstawiono na Rys. 2.1 [26].

Samoorganizacja cząsteczek amfifilowych w struktury przestrzenne jest ściśle zależna od ich geometrii, co opisuje krytyczny parametr upakowania (*CPP*), przyjmujący różną wartość dla cząsteczek lipidowych o określonym kształcie (Rys. 2.2). Parametr ten jest definiowany jako:

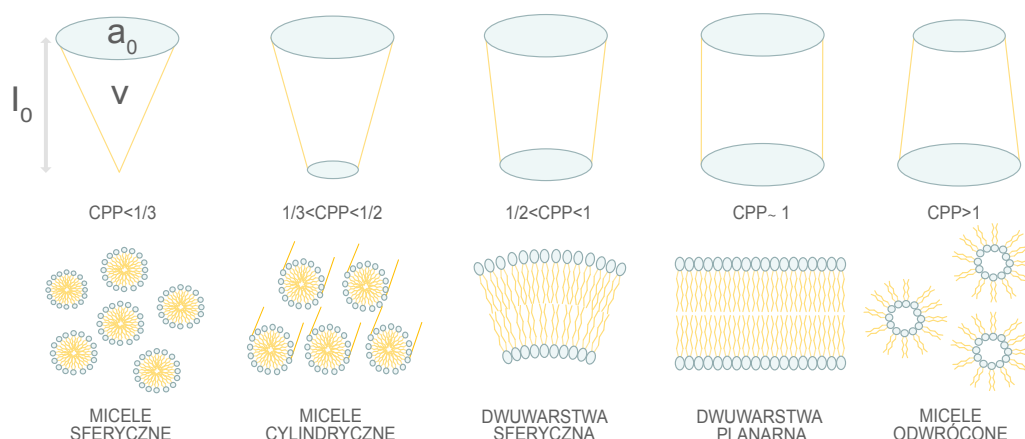
$$CPP = \frac{v}{a_0 l_0}, \quad (2.1)$$

gdzie v — objętość łańcucha hydrofobowego, a_0 — powierzchnia efektywna grupy polarnej, l_0 — długość łańcucha hydrofobowego. Jak zaprezentowano na Rys. 2.2 predysponowane do tworzenia dwuwarstwy fosfolipidowej w formie sferycznej są cząsteczki o budowie walcowatej ($1/2 < CPP < 1$), w przeciwieństwie do tych o budowie stożkowej ($CPP < 1/2$), które tworzą micelle [27].

Rdzeń dwuwarstwy lipidowej stanowią hydrofobowe łańcuchy alkilowe o różnej długości oraz stopniu nasycenia, natomiast kontakt ze środowiskiem wodnym mają grupy polarne, co schematycznie przedstawiono na Rys. 2.1 [30]. Grupy polarne definiują to do jakiej klasy glicerofosfolipidów należy cząsteczka, oraz wpływają na ładunek, rozmiar, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, oddziaływanie z określonymi jonami, czy enzymami [31]. Hydrofobowa część dwuwarstwy lipidowej tworzy barierę dla polarnych i naładowanych cząsteczek, uniemożliwiając ich transport pomiędzy macierzą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową [32], a rodzaj łańcuchów alkilowych ją budujących wpływa na właściwości termodynamiczne [32]. Pomimo statycznej i jednorodnej prezentacji dwuwarstwy lipidowej na Rys. 2.1 warto podkreślić, że jest to struktura niezwykle skomplikowana pod



Rysunek 2.1: Schemat przedstawiający budowę dwuwarstwy lipidowej przygotowany na podstawie informacji zawartych w [26, 28].



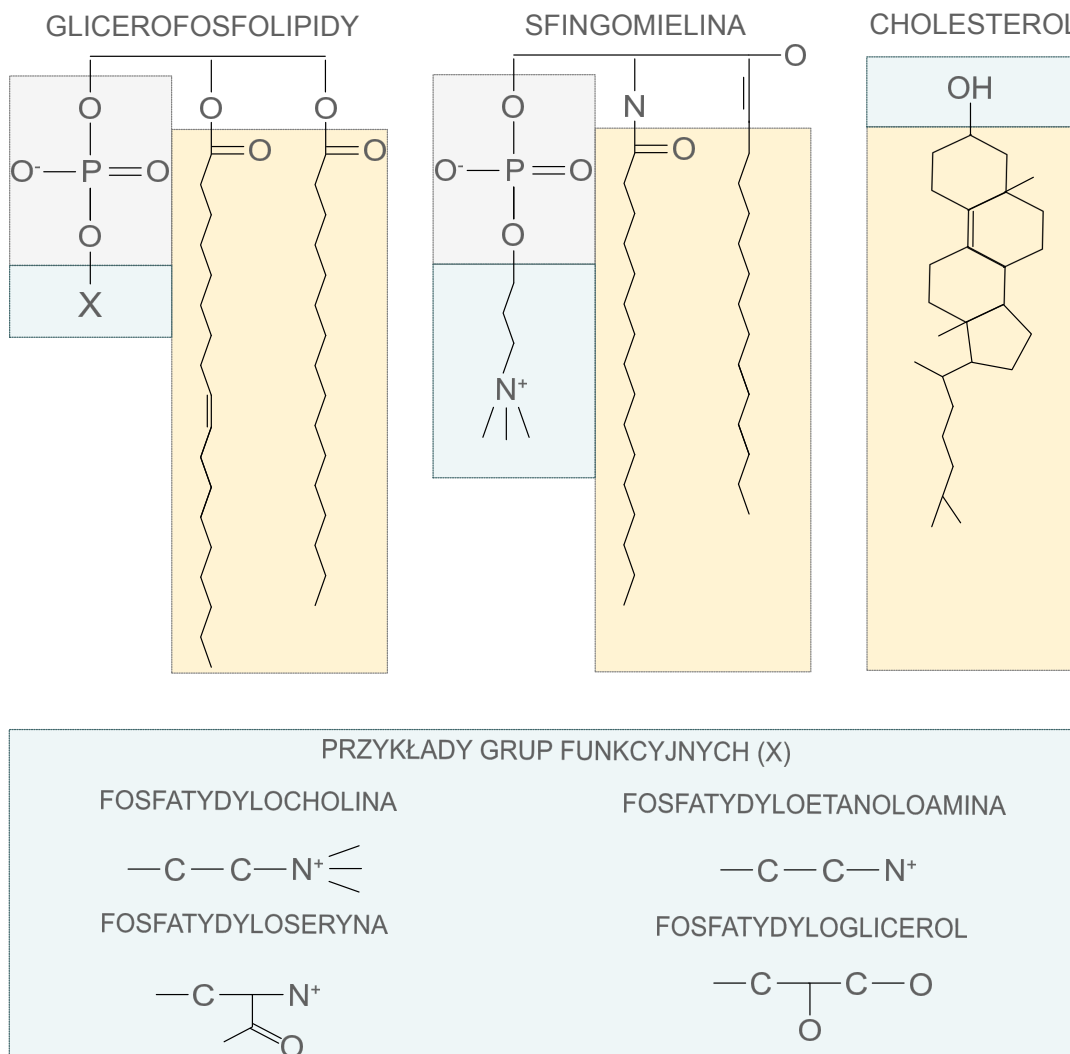
Rysunek 2.2: Schemat przedstawiający zależność pomiędzy kształtem cząsteczki amfilowej a parametrem CPP oraz strukturami, jakie tworzą w środowisku wodnym. Schemat przygotowany na podstawie [29].

względem dynamiki, heterogenna i reagująca na zmiany w otaczającym ją środowisku [28]. Z tego względu zarówno w części polarnej, jak i niepolarniej dochodzi do nieustannych fluktuacji, które wynikają m.in. z oddziaływania z cząsteczkami wody [28]. Grupy polarne tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody [33], a obszar, w którym występuje zarówno hydrofilowa część dwuwarstwy lipidowej, jak i cząsteczki wody nazywany jest interfazą. Z tego względu charakteryzuje się on innymi właściwościami oraz rolą biologiczną od środowiska wodnego, otaczającego błonę lipidową, jak i od hydrofobowego rdzenia [34]. Jedną z takich właściwości jest stała dielektryczna, która przyjmuje różną wartość w interfazie, obszarze hydrofobowym, jak i środowisku wodnym [28].

2.2 Właściwości lipidów budujących dwuwarstwę lipidową

Lipidy stanowią różnorodną grupę cząsteczek, z których trzy główne klasy budujące błonę lipidową to glicerofosfolipidy, sfingolipidy oraz sterole [32]. Skład błony biologicznej pod względem rodzaju oraz procentowej zawartości poszczególnych klas lipidów nie jest uniwersalny i ściśle zależy od tego, jaką funkcję pełni dana komórka, czy organella [32]. Ich zawartość w błonie lipidowej jest zależna od rodzaju komórki/organeli, przy czym glicerofosfolipidy stanowią w przybliżeniu 50–85% całkowitej ilości lipidów, sterole 8–35%, a sfingolipidy 2–15% [24, 35]. Rozkład lipidów w poszczególnych warstwach błon biologicznych jest asymetryczny, zazwyczaj w zewnętrznej warstwie znajduje się fosfatydylocholina (PC) oraz sfingomielin, natomiast w wewnętrznej fosfatydyloseryna (PS), fosfatydyloetanoloamina (PE) oraz fosfatydyloinozytol (PI) [23].

Rola lipidów w funkcjonowaniu błon biologicznych, jak i całej komórki obejmuje takie procesy jak modulowanie właściwości fizykochemicznych, między innymi dynamiki błony



Rysunek 2.3: Schemat przedstawiający budowę głównych lipidów, wchodzących w skład błony komórkowej. Kolorem niebieski oznaczono obszar hydrofilowy cząsteczek lipidu, kolorem żółtym — hydrofobowy. Schemat przygotowany na podstawie [36].

komórkowej, wpływ na elektrostatykę powierzchni błony, czy stany termodynamiczne, w jakich się ona znajduje [31]. Dzięki rozwojowi spektroskopii masowej oraz bioinformatyki możliwe stało się tworzenie lipidowych map komórkowych, pokazujących dokładne składy lipidowe błon biologicznych w komórce. Pozwala to na tworzenie lepszych modeli błony komórkowej, a tym samym poznanie nowych lub wytłumaczenie niezrozumiałych do tej pory procesów zachodzących w obszarze dwuwarstwy lipidowej, jak i w całej komórce [24].

2.2.1 Glicerofosfolipidy

Należące do tej grupy lipidy wykazują amfifilowe właściwości, co wynika z ich charakterystycznej budowy. Ich podstawę stanowi glicerol, do którego za pomocą wiązania estrowego z jednej strony przyłączone są reszty kwasów tłuszczowych nadające czą-

stezce hydrofobowe właściwości, a z drugiej reszty fosforanowe odpowiadające za jej hydrofilowy charakter. Do reszt fosforanowych wiązaniem fosfoestrowym przyłączone są aminoalkohole m.in. cholina, etyloamina lub hydroksyaminokwasy — seryna, co prowadzi do powstania różnorodnych glicerofosfolipidów (najczęściej występujące grupy hydrofilowe pokazano na Rys. 2.3) [36]. Amfifilowy charakter tej klasy lipidów jest kluczowy, ponieważ umożliwia ich samoorganizację w strukturę dwuwarstwy lipidowej. Fosfatydylocholina to najczęściej występujący glicerofosfolipid w błonach biologicznych (w większości komórek/organelli powyżej 50%), inne główne glicerofosfolipidy to fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol oraz kwas fosfatydowy [37]. Każdy z nich charakteryzuje się innymi właściwościami, włączając w to geometrię cząsteczki. PC jest lipidem o budowie walcowatej, natomiast PE o budowie stożkowej. PE ze względu na znacznie mniejszą grupę polarną samodzielnie nie tworzy dwuwarstwy lipidowej [37]. W większości przypadków PC znajdujące się w błonach biologicznych posiada jeden nasycony i jeden nienasycony łańcuch alkilowy, natomiast PE oraz PS są fosfolipidami bardziej nienasyconymi od innych, co wpływa na ich niższą temperaturę przejścia fazowego [38].

2.2.2 Sfingolipidy

Sfingolipidami występującymi najczęściej w błonach biologicznych są sfingomieliny, ceramidy oraz glikosfingolipidy. Podstawą tej grupy lipidów zazwyczaj jest sfingozyna, do której w zależności od rodzaju sfingolipidu, przyłączone są odpowiednie grupy funkcyjne. Sfingomielina dzięki swojej budowie, zbliżonej do budowy glicerofosfolipidów, zaliczana jest do fosfolipidów. Przyłączone do sfingozyny wiązaniem amidowym nasycone łańcuchy kwasów tłuszczowych, oraz wiązaniem estrowym fosforan choliny, nadają cząsteczce amfifilowy charakter [23, 37]. Ze względu na bardziej walcowaty kształt niż fosfatydylocholina, sfingomielina tworzy gęściej upakowane obszary w błonie komórkowej. Wraz z cholesterolem odpowiada za tworzenie w błonie mikrodomen lipidowych tzw. tratw lipidowych [39].

2.2.3 Sterole

W przypadku komórek eukariotycznych głównym sterolem budującym błonę biologiczną jest cholesterol [36]. Lipid ten ma niewielkie właściwości amfifilowe ze względu na występującą w nim pojedynczą grupę hydroksylową, która orientuje jego pozycję w strukturze błony lipidowej [36, 38]. W zależności od organizacji błony wpływa na płynność dwuwarstwy lipidowej. W fazie ciekłokrystalicznej (istotniejszej pod względem warunków fizjologicznych) zwiększa uporządkowanie błony lipidowej, zmniejszając ruchliwość łańcuchów alkilowych. Wpływa to na zwiększone właściwości mechaniczne oraz zmniejszoną przepuszczalność cząsteczek przez błonę lipidową [38, 40]. Co więcej, w przypadku oddziaływania z nasyconymi fosfolipidami oraz sfingolipidami upłynnia te fragmenty błony, prowadząc do powstania w błonie mikrodomen lipidowych oraz tratw

lipidowych [41]. Z tego względu, czyli możliwości wpływu na organizację dwuwarstwy fosfolipidowej oraz wysoką mobilność w błonie (szybkość poruszania od milisekund do sekund), lipid ten jest uważany za modulatora dynamiki w błonie lipidowej [24].

Rozdział 3

Właściwości dwuwarstwy lipidowej

Błona lipidowa jest strukturą polimorficzną, tworzącą dynamiczne środowisko, w którym dochodzi do szeregu reakcji biochemicznych oraz pozostałych mechanizmów, takich jak dyfuzja lateralna, czy proces flip-flop [32]. Różnica w składzie i właściwościach determinuje zestaw specyficznych cech błony lipidowej, które wpływają na pełnione przez nią funkcje w organizmie. To jak poszczególne cząsteczki z nią oddziałują, jest ściśle zależne od jej właściwości, takich jak przepuszczalność, stan uporządkowania w określonych warunkach środowiska definiowany, jako płynność błony komórkowej, właściwości mechanicznych, czy też jej asymetrycznej budowy [23]. Asymetria rozlokowania lipidów w dwóch monowarstwach budujących błonę wynika z kilku czynników, do których można zaliczyć spontaniczne przechodzenie lipidów w obrębie dwuwarstwy lipidowej, trwałe mechanizmy, które utrzymują określone lipidy w miejscu, oraz obecność transporterów wspomagających translokację lipidów, których przykładem są białka — flipazy [42]. Na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej może wpływać również obecność cząsteczek aktywnych biologicznie [43–45]. Wybranie określonych parametrów ilościowych powiązanych z właściwościami fizykochemicznymi błony lipidowej, pozwala określić stopień tych zmian.

3.1 Współczynnik podziału

Lipofilowość to właściwość molekuly opisująca jej zdolność do przechodzenia przez błonę lipidową. Stanowi jeden z pięciu krytycznych parametrów określających biodostępność leków, który opisuje reguła Lipińskiego [46]. Definiowana jest jako powinowactwo cząsteczki do środowiska niepolarnego, co można ilościowo opisać z wykorzystaniem współczynnika podziału. Współczynnik ten określa stosunek stężenia molekuł w środowisku niepolarnym do stężenia molekuł w środowisku wodnym. Środowisko niepolarne mogą stanowić różne rozpuszczalniki organiczne nierozpuszczające się w wodzie, w badaniach w tej tematyce głównie wykorzystywany jest oktanol. Pozwala to na zdefiniowanie współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$):

$$K_{O/W} = \frac{N_N}{N_P}, \quad (3.1)$$

gdzie N_N — liczba molekuł w fazie niepolarniej, N_P — liczba molekuł w fazie polarnej [47]. Współczynnik ten jest zazwyczaj przedstawiany w formie logarytmicznej. Przyjmuje się, że molekuły, dla których wartość $\log(K_{O/W})$ jest mniejsza od zera, są hydrofilowe, natomiast gdy wielkość ta przyjmuje wartość większą od zera, to mówi się o cząsteczkach hydrofobowych.

Do wyznaczenia współczynnika podziału oktanol/woda wykorzystywany jest oktanol, który symuluje homogenną błonę lipidową. Postuluje się, że interfeza wody i oktanolu nie jest całkowicie izotropowa, a tworzą się w niej klastry wodne otoczone przez 16 cząsteczek oktanolu, co naśladuje uśrednione oddziaływania błony lipidowej z nienaładowanymi cząsteczkami [48].

Rozwój nowych technik pomiarowych umożliwił precyzyjniejsze określenie lipofilowości cząsteczki w odniesieniu do błony lipidowej, i wyznaczenie współczynnika podziału błona/woda ($K_{B/W}$) przy pomocy modelowych błon lipidowych m.in. liposomów [48]. $K_{B/W}$ w bardziej rzeczywisty sposób charakteryzuje zachowanie cząsteczek w obecności błony lipidowej niż $K_{O/W}$ [49]. Zgodnie z danymi dostępnymi w literaturze, różnica pomiędzy $K_{O/W}$ a $K_{B/W}$ nie występuje dla nienaładowanych cząsteczek hydrofilowych, jednak $K_{O/W}$ jest niewystarczającym parametrem opisującym cząsteczki wysokohydrofobowe ($\log(K_{O/W}) > 5-6$), surfaktanty, czy niektóre leki [50]. Ze względu na to, że $K_{B/W}$ został wyznaczony dla niewielkiej ilości molekuł (do 2019 wyznaczono ten parametr dla około 400 cząsteczek [49]), w większości przypadków stosuje się $K_{O/W}$. Istotne jest, aby zarówno metodami eksperymentalnymi, jak i przy pomocy symulacji komputerowych poszerzać tę bazę danych, w celu lepszej charakterystyki molekuł, co pozwoli na bardziej precyzyjne poznanie fizjologii organizmu człowieka oraz zwiększy możliwości projektowania kierowanych nośników leków.

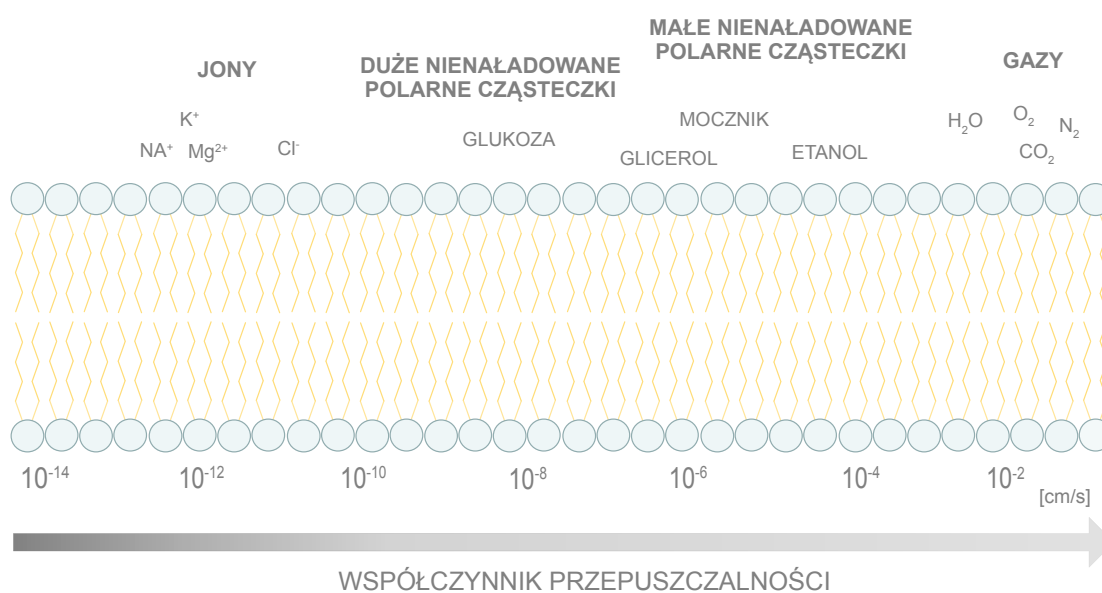
3.2 Współczynnik przepuszczalności

Badania nad przepuszczalnością molekuł aktywnych biologicznie przyczyniają się do lepszego poznania ich funkcjonowania w całym organizmie, jak i pozytywnie wpływają na proces projektowania leków. Z punktu widzenia celu molekularnego, istotny staje się mechanizm, jaki dana molekula wykorzystuje w celu przedostania się do wnętrza komórki. Transport cząsteczek przez błonę komórkową odbywa się na drodze określonych procesów, w tym dyfuzji prostej, transportu aktywnego, czy endocytozy [32]. Dyfuzja prosta jest najbardziej efektywnym rodzajem transportu przez błonę komórkową, dlatego stanowi pożądany mechanizm dostarczania leków do wnętrza komórki [51]. Jak pokazują dane literaturowe, około 80–95% dostępnych komercyjnie leków pokonuje barierę błony lipidowej na drodze dyfuzji prostej [52]. W przypadku cząsteczek hydrofilowych transport odbywa się przez transportery białkowe (kwas foliowy [53], cholina [54]), czy

z wykorzystaniem specjalnych receptorów (jony cynku [55]). Małe cząsteczki hydrofilowe są również transportowane pomiędzy komórkami przez połączenia szczelinowe [56]. Badania z wykorzystaniem modeli błony lipidowej pokazały, że pomimo hydrofilowego charakteru niektórych cząsteczek możliwe jest wyznaczenie współczynnika przepuszczalności (P) m.in. dla mocznika, glicerolu, czy amoniaku (Rys. 3.1), a tym samym jednym z mechanizmów ich transportu przez błonę lipidową jest dyfuzja prosta [57–59].

Jedną z pierwszych teorii, przedstawiającą transport cząsteczek przez błonę komórkową na drodze dyfuzji prostej, była zasada Overtona. Opisuje ona korelację pomiędzy dwoma parametrami istotnymi z punktu widzenia przepuszczalności błony — współczynnikiem podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$) oraz współczynnikiem przepuszczalności. Zgodnie z zasadą Overtona wraz ze wzrostem hydrofilowości zmniejsza się wartość współczynnika przepuszczalności (P) danej cząsteczki, co oznacza, że molekuly hydrofobowe są bardziej predysponowane do transportu przez błonę komórkową na drodze dyfuzji prostej [60]. Później pokazano, że zasada ta nie jest uniwersalna, ponieważ niektóre małe cząsteczki, takie jak m.in. kwas mrówkowy, czy formamid są transportowane przez błonę lipidową szybciej, niż wskazywałaby na to zasada Overtona [58].

Teoria ta doprowadziła do rozwinięcia modeli opisujących kinetykę przechodzenia cząsteczek przez błonę lipidową — modelu dyfuzji przez rozpuszczalność (z ang. *diffusion-solubility model*), czy alternatywnego modelu flip-flop [61]. W każdym z tych modeli możliwe jest wyodrębnienie trzech etapów opisujących transport molekuly przez dwuwarstwę lipidową. W pierwszym kroku dochodzi do przejścia z fazy wodnej do błony lipidowej. W kolejnym, w zależności od przyjętego modelu, następuje dyfuzja cząsteczki przez dwuwarstwę lipidową albo przeskoczenia molekuly na drodze procesu flip-flop pomiędzy dwoma monowarstwami. Ostatni etap to przejście z dwuwarstwy lipidowej do



Rysunek 3.1: Schemat przedstawiający zmianę współczynnika przepuszczalności w zależności od rodzaju cząsteczki. Schemat przygotowano na podstawie informacji zawartych w [32, 57].

fazy wodnej [61]. Dokładna kinetyka przechodzenia przez błonę komórkową dla modelu dyfuzyjnego jest oparta o prawo Ficka. Błona lipidowa, w tym modelu, określana jest jako jednorodna, hydrofobowa płynna struktura, która oddziela od siebie dwie fazy wodne [57]. Proces przechodzenia cząsteczki przez błonę lipidową, zgodnie z I prawem Ficka, można opisać poprzez strumień dyfuzji:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dm}{dt}, \quad (3.2)$$

gdzie J — strumień dyfuzji, m — masa, t — czas, A — powierzchnia błony lipidowej. Strumień można powiązać ze współczynnikiem podziału poprzez:

$$J = \frac{D K_{O/W}}{h} C_1 - C_2, \quad (3.3)$$

gdzie D — współczynnik dyfuzji, h — grubość błony, C_1 — stężenie cząsteczki w fazie wodnej w części zewnątrzkomórkowej, C_2 — stężenie cząsteczki w fazie wodnej w części wewnątrzkomórkowej. Równanie to można zapisać w ostatecznej formie:

$$J = P(C_1 - C_2), \quad (3.4)$$

gdzie współczynnik przepuszczalności P określono jako:

$$P = \frac{D K_{O/W}}{h}. \quad (3.5)$$

Współczynnik przepuszczalności, określający szybkość z jaką dana cząsteczka przemieszcza się przez dwuwarstwę lipidową, został wyznaczony dla wielu molekuł, co przedstawiono na Rys. 3.1. Pokazano, że wartość współczynnika przepuszczalności dla małych, niepolarnych cząsteczek, takich jak tlen, dwutlenek węgla oraz małych, polarnych cząsteczek wody, czy etanolu, przyjmuje wartość od $P = 10^{-3}$ cm/s dla etanolu, do $P = 10^{-1}$ cm/s dla cząsteczek tlenu. Natomiast dla większych polarnych cząsteczek, takich jak glukoza, jony, czy naładowane polarne cząsteczki w postaci m.in. aminokwasów parametr ten przyjmuje wartości od $P = 10^{-14}$ cm/s do $P = 10^{-9}$ cm/s [32].

3.3 Temperatura przejścia fazowego

Dwuwarstwa lipidowa to struktura charakteryzująca się różnym stopniem uporządkowania, co jest determinowane przez jej skład lipidowy, jak i warunki środowiskowe, takie jak temperatura, pH, czy siła jonowa [62]. Wyróżnia się cztery podstawowe stany uporządko-

wania dwuwarstwy lipidowej — fazę krystaliczną (L_c), fazę żelową (L_β), fazę pofałdowaną, określaną z ang. *ripple phase* (P_β) oraz fazę ciekłokrystaliczną (L_α), z którymi związane są określone przejścia fazowe [33]. Ze względu na to, że do zmiany uporządkowania dwuwarstwy lipidowej dochodzi wraz ze wzrostem temperatury, mowa będzie o termotropowym przejściu fazowym [63].

Dwuwarstwa lipidowa znajdująca się w fazie krystalicznej charakteryzuje się dużym uporządkowaniem oraz małą ruchliwością, co wynika ze ścisłego upakowania łańcuchów alkilowych, które znajdują się w konfiguracji *trans* oraz są przechylone pod niewielkim kątem względem płaszczyzny błony. Wraz ze wzrostem temperatury kąt nachylenia zwiększa się, jak i wzrasta ruchliwość lipidów, które po przekroczeniu temperatury subprzejścia zaczynają w umiarkowanym stopniu ulegać niewielkim ruchom rotacyjnym. W fazie żelowej zmniejsza się również upakowanie lipidów budujących dwuwarstwę oraz wzrasta ich powinowactwo do cząsteczek wody. Po osiągnięciu temperatury przedprzejścia niektóre cząsteczki lipidów przechodzą zmiany konformacyjne, tworząc konformację *gauche*, co w dalszym stopniu zmniejsza uporządkowanie dwuwarstwy oraz zwiększa ruchliwość cząsteczek. Przejście z fazy pofałdowanej do fazy ciekłokrystalicznej wymaga osiągnięcia temperatury przejścia fazowego, w której dochodzi do topnienia łańcuchów alkilowych, znacznego wzrostu nieuporządkowania oraz ruchliwości dwuwarstwy fosfolipidowej. Faza ciekłokrystaliczna charakteryzuje się również największą przepuszczalnością dla innych cząsteczek [37].

Błona komórkowa ze względu na określone warunki fizjologiczne znajduje się w stanie największego nieuporządkowania, czyli fazy ciekłokrystalicznej. Lokalne zmiany składu błony lipidowej, takie jak obecność steroli, mogą prowadzić do powstania tzw. tratw lipidowych charakteryzujących się innym stopniem uporządkowania [41]. W zależności od uporządkowania dwuwarstwy lipidowej oddziaływanie z określonymi molekułami może mieć różny charakter i wpływać na przepuszczalność błony lipidowej, procesy fuzji w niej zachodzącej, tworzenie się por błonowych, przewodzenie impulsów nerwowych, czy liżę komórkową [64].

3.4 Płynność dwuwarstwy lipidowej

Płynność dwuwarstwy lipidowej stanowi jeden z istotnych parametrów ją charakteryzujących, pozwalający określić dyfuzję lateralną lipidów oraz białek w błonach biologicznych. Opisywana jest przez współczynnik dyfuzji lateralnej, który jest odwrotnie proporcjonalny do mikrolepkości błony lipidowej (η) — powiązanej z płynnością błony lipidowej [33, 65]. Płynność określa dynamiczny charakter błony lipidowej, który wpływa na dyfuzję swobodną cząsteczek, ich rotację, reorientację do określonej konformacji, jak i zachodzenie wielu procesów biochemicznych, takich jak ruch i wzrost komórki, jej podział oraz procesy związane z wydzielaniem [23, 30]. Wielkość ta może być modulowana składem błony lipidowej, jak i temperaturą [23].

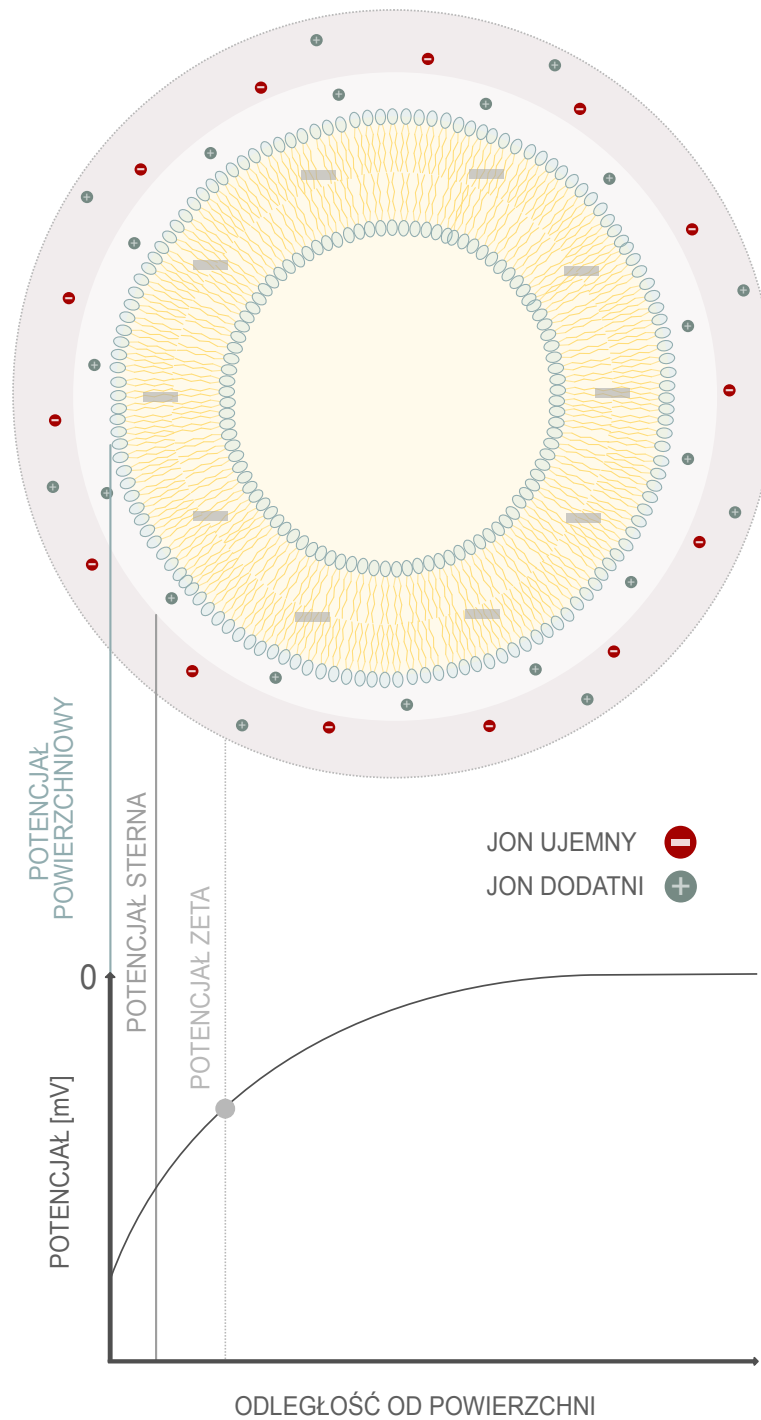
Częścią lipidów budujących dwuwarstwę lipidową, która wpływa na płynność błony lipidowej, są łańcuchy alkilowe. W zależności od ich długości oraz ilości wiązań podwójnych dwuwarstwa lipidowa jest bardziej lub mniej płynna. W przypadku krótszych łańcuchów alkilowych (standardowo lipidy budujące błonę mają od 14 do 24 atomów węgla w łańcuchu) cząsteczki lipidów mają mniejszą tendencję do oddziaływania ze sobą, co wraz z występowaniem nienasyconych łańcuchów alkilowych zwiększa płynność błony lipidowej [23]. Każdy nienasycony łańcuch alkilowy ze względu na swoją strukturę przestrzenną, zajmuje dodatkowe miejsce, uniemożliwiając ścisłe przyleganie do siebie cząsteczek [23]. W warunkach fizjologicznych lipidy z łańcuchami nienasyconymi upłynniają błonę lipidową, natomiast te z łańcuchami nasyconym zwiększają jej upakowanie [65].

Jak wspomniano w Podrozdziale 2.2 modulatorem płynności błony lipidowych, w przypadku komórek eukariotycznych, jest cholesterol. Ze względu na swoją strukturę może on wbudowywać się w przestrzeń, którą tworzą nienasycone łańcuchy alkilowe, a tym samym zmniejszać płynność błony lipidowej oraz wpływać na takie parametry, jak sztywność oraz przepuszczalność tej struktury [23].

3.5 Ładunek powierzchniowy

Powierzchnię błony lipidowej tworzą w większości grupy polarne lipidów. Ze względu na ich polarny charakter stanowią interfejs do oddziaływania ze środowiskiem wodnym, w szczególności z cząsteczkami wody, tworząc wiązania wodorowe [33]. W zależności od rodzaju grup polarnych, nadają one powierzchni błony odpowiedni ładunek. Ze względu na asymetryczną budowę dwuwarstwy lipidowej warstwa zewnętrzna różni się pod tym względem od wewnętrznej. W większości komórek dominującym rodzajem fosfolipidów budujących wewnętrzną warstwę błony lipidowej są PE oraz ujemnie naładowane PI i PS, których obecność wpływa na ładunek powierzchniowy [42].

Ze względu na trudność pomiaru ładunku powierzchniowego niewielkich cząsteczek w środowisku wodnym wykonuje się pomiaru tej wartości w warstwie dyfuzyjnej, a dokładniej na granicy poślizgu [67]. Wielkość określająca wartość tego potencjału to potencjał zeta (ζ) [68, 69]. Molekułę znajdującą się w roztworze wodnym otacza podwójna warstwa elektryczna, która składa się z warstwy Sterna oraz warstwy dyfuzyjnej [66]. W warstwie Sterna znajdują się silnie związane jony o ładunku przeciwnym do ładunku powierzchni molekuly. W przeciwieństwie do warstwy dyfuzyjnej, gdzie występują słabiej związane jony o ładunku przeciwnym, jak i zgodnym z ładunkiem powierzchni badanej cząsteczki. Z wspomnianymi warstwami oraz samą cząsteczką związane są trzy potencjały — potencjał powierzchniowy, potencjał Sterna oraz potencjał zeta, co przedstawiono na Rys. 3.2. Potencjał zeta definiuje się, jako wartość potencjału na granicy warstwy dyfuzyjnej z rozpuszczalnikiem tzw. granicy poślizgu [68].



Rysunek 3.2: Schemat przedstawiający zależność pomiędzy potencjałem powierzchniowym a potencjałem zeta struktur w środowisku wodnym. Schemat przygotowano na podstawie rysunku zamieszczonego w [66].

Rozdział 4

Modele dwuwarstwy lipidowej

Prowadzenie badań dotyczących właściwości dwuwarstwy lipidowej wymaga wybrania odpowiedniego rodzaju modelu tej struktury. Dokonuje się różnych klasyfikacji — ze względu na matrycę, w jakiej się znajduje, technikę wytworzenia, czy też ich pochodzenie. Żaden z powstałych modeli nie jest uniwersalny, a wybór jest zależny od tego, jakie właściwości dwuwarstwy lipidowej lub też jej oddziaływania ze środowiskiem zewnętrznym mają zostać określone. Model błony lipidowej jest uproszczonym układem, który jest kontrolowany pod względem właściwości fizykochemicznych. Zazwyczaj zbudowany jest z samych fosfolipidów lub też z domieszką innych lipidów, czy białek błonowych [70].

4.1 Modele na podłożu stałym

Jednym z rodzajów modeli dwuwarstwy lipidowej jest szeroka grupa wykorzystująca pojedyncze warstwy lipidowe (monowarstwy Langmuira–Blodgetta) lub dwuwarstwy lipidowe (z ang. *Supported Lipid Bilayer*, w skrócie SLB) tworzone na określonej matrycy albo w formie błony rozdzielającej dwie komory (z ang. *Black Lipid Membrane*, w skrócie BLM) [70, 71]. Wytworzenie SLB jest możliwe dzięki technikom Langmuir–Blodgett, Langmuir–Schaefer lub poprzez fuzję pęcherzyków [70]. Modele te są głównie wykorzystywane do badań powierzchniowych [70], oddziaływań z innymi cząsteczkami [72], samoorganizacji lipidów w mikrodomeny [73], czy przepuszczalności badanych cząsteczek przez błonę lipidową [74].

Monowarstwy Lagmuira–Blodgetta są rodzajem jednowarstwowej struktury fosfolipidowej, tworzącej się na powierzchni wody po osadzeniu roztworu lipidów w rozpuszczalniku organicznym. Umożliwiają, podobnie jak SLB, pomiar właściwości powierzchniowych monowarstwy lipidowej oraz takich parametrów, jak upakowanie lipidów, czy jej elastyczności [70].

Zaletą badań z wykorzystaniem modeli planarnych jest szeroka możliwość modyfikacji dwuwarstwy fosfolipidowej umożliwiająca tworzenie asymetrycznych błon o różnorodnym składzie lipidowym. Dodatkowo wykorzystywane techniki pomiarowe pozwalają na

zbieranie nie tylko danych jakościowych, ale również ilościowych. Głównym problemem staje się planarny kształt błony lipidowej nieodzwierciedlający jej naturalnej krzywizny.

4.2 Modele komputerowe

Zastosowanie modeli in-silico w badaniach nad właściwościami fizykochemicznymi dwuwarstwy lipidowej niesie za sobą ogromny potencjał ze względu na skalę, w jakiej można symulować określone procesy. W przypadku technik eksperymentalnych możliwe jest badanie procesów zachodzących w błonie lipidowej na poziomie dziesiątek nanometrów do kilkunastu mikrometrów, podczas gdy tworzenie modeli komputerowych otwiera możliwości badania tych procesów w rozdzielczości od kilkunastu angstromów do kilkuset nanometrów [70].

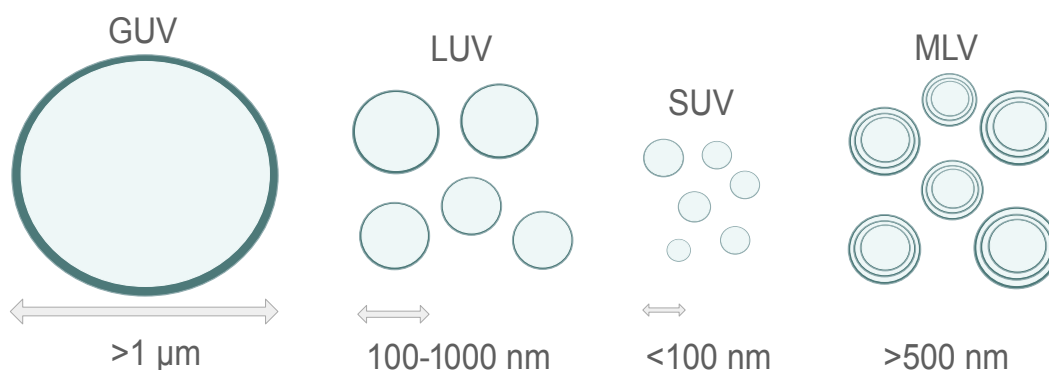
Wykorzystanie dynamiki molekularnej do wyznaczenia właściwości dwuwarstwy lipidowej oraz badania jej oddziaływania z różnymi strukturami jest oparte na równaniach Newtona, i umożliwia badanie procesów zachodzących w setkach nanosekund. Jedną z alternatywnych metod są symulacje Monte Carlo, które to pozwalają m.in. na badanie oddziaływań pomiędzy nanocząsteczkami a błoną lipidową [75], czy uporządkowania dwuwarstwy lipidowej [38, 76, 77].

Metody komputerowe mogą być komplementarne w stosunku do metod eksperymentalnych, pozwalają na porównanie oraz potwierdzenie rezultatów uzyskanych doświadczalnie. Główną wadą modeli in-silico są ograniczenia sprzętowe. Konieczne jest dobranie odpowiedniego modelu, tak aby symulacje były jak najmniej czasochłonne i spełniały możliwości obliczeniowe komputerów.

4.3 Liposomy

Liposomy to sferyczne pęcherzyki, opisane po raz pierwszy w latach 70. przez Banghama [78], które powstają na skutek samoorganizacji fosfolipidów znajdujących się w środowisku wodnym. Dochodzi do powstania dwuwarstwy lipidowej, która oddziela wewnętrzną fazę wodną od zewnętrznej. Rozmiar liposomów różni się w zależności od techniki ich przygotowania, i może osiągnąć od kilkudziesięciu nanometrów do kilkunastu mikrometrów, jak pokazano na Rys. 4.1 [79].

Największe liposomy (GUV) to pęcherzyki o średnicy od kilku do kilkunastu mikrometrów, wykorzystywane do badań właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej oraz takich procesów, jak dyfuzji lateralnej lipidów, zdolności do tworzenia niejednorodności w obrębie błony lipidowej, procesów związanych z przejściami fazowymi [71]. Tworzone zazwyczaj techniką elektroformacji ze względu na możliwość wbudowania białek błonowych w strukturę dwuwarstwy lipidowej, stanowią dobry model do badania oddziaływań lipidy – białka oraz wpływu tych molekuł na zachowanie dwuwarstwy fosfolipidowej [80]. Ze względu na swój rozmiar są jedynym rodzajem liposomów, których błonę lipidową można obrazować z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej [81].



Rysunek 4.1: Schemat przedstawiający różne rodzaje liposomów w zależności od rozmiaru — GUV, LUV, SUV — oraz liczby warstw budujących pęcherzyki (MLV). Schemat przygotowany na podstawie informacji zawartych w [82].

Preparatyka mniejszych pęcherzyków odbywa się z wykorzystaniem kilku metod, do których należą m.in. hydratacja suchego filmu, wstrzykiwanie eteru/etanolu, odparowywanie techniką faz odwróconych [82]. W rezultacie otrzymywane są wielowarstwowe pęcherzyki (MLV), które w następnym kroku są kalibrowane z wykorzystaniem ekstrudera lub w procesie sonikacji. Krok ten pozwala uzyskać jednorodną populację jednowarstwowych liposomów o określonym rozkładzie rozmiarów — od 100 nm do 1000 nm (LUV) oraz mniejsze do 100 nm (SUV) [82]. Ten rodzaj liposomów stosowany jest w badaniach dotyczących oddziaływań z cząsteczkami, jak i właściwości fizykochemicznych błony lipidowej, z wykorzystaniem różnorodnych technik m.in. spektroskopii fluorescencyjnej [83], technik kalorymetrycznych [84], ultrafiltracji [85]. Warto również zwrócić uwagę na aplikację tego rodzaju liposomów, jako kierowanych nośników leków, co umożliwia podaż substancji aktywnych w bardziej efektywny sposób, często ograniczając skutki uboczne w organizmie człowieka. Wykorzystywane techniki badające właściwości tych struktur oprócz odniesienia ich do właściwości błony lipidowej, stanowią ważną składową w charakteryzacji tych nośników [29, 70, 79].

Podstawowe zalety tego rodzaju modelu błony lipidowej to pomiary w warunkach, jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych, łatwość i różnorodność metod ich przygotowania oraz możliwość wyboru wielu technik, pozwalających scharakteryzować zarówno dwuwarstwę lipidową, jak i jej oddziaływanie z cząsteczkami [70]. Główną wadą jest fakt, że wytwarzane błony są zazwyczaj symetryczne, co nie oddaje rzeczywistej asymetrii błony komórkowej. Dopiero niedawno powstały protokoły umożliwiające tworzenie błon niesymetrycznych [36]. Dodatkowo podczas pomiarów badających oddziaływanie liposomów z różnymi cząsteczkami, trudnością jest wyznaczenie ilościowej miary tych oddziaływań z pojedynczym liposomem [70].

Rozdział 5

Metody pomiarowe wybranych właściwości dwuwarstwy lipidowej

5.1 Współczynnik przepuszczalności

Techniki pomiarowe pozwalające wyznaczyć współczynnik przepuszczalności są zależne od wybranego modelu dwuwarstwy lipidowej. Jedną z najczęściej wykorzystywanych techniki jest metoda PAMPA (z ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Technika ta wykorzystuje układ złożony z dwóch komór, które rozdzielone są filtrem pokrytym mieszaniną rozpuszczalnika organicznego oraz lipidów. W jednej z komór umieszczony jest roztwór badanej substancji, a następnie mierzone jest stężenie w drugiej komorze, po przejściu cząsteczek przez membranę rozdzielającą komorę [86, 87].

W podobny sposób działa technika in-vitro, która wykorzystuje do wyznaczenia przepuszczalności cząsteczek hodowle komórkowe, najczęściej Caco-2 — komórki pochodzące z ludzkiego nabłonkowego gruczołka jelita grubego, które charakteryzują się podobieństwem do enterocytów. W przypadku tych badań to komórki są umiejscowione na filtrze oddzielającym dwie komory [88]. Powstały również nowe metody, działające podobnie do tej techniki, wykorzystujące filtr, na którym osadzone są liposomy, co z jednej strony zmniejsza podobieństwo do rzeczywistej błony lipidowej, a z drugiej jest łatwiejsze w wykonaniu oraz charakteryzuje się większą powtarzalnością od badań in-vitro [88]. Ze względu na tematykę pracy poniżej zwrócono uwagę na techniki pomiarowe z wykorzystaniem liposomów, jako modelu błony lipidowej. Jedną z takich metod, pozwalającą na wyznaczenie współczynnika przepuszczalności, jest ILC (z ang. *Immobilized Liposome Chromatography*) zaliczana do wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w której mierzona jest różnica czasu retencji dla różnych cząsteczek przepływających przez kolumnę, do której związane są liposomy [89].

Wykorzystując liposomy, jako model dwuwarstwy lipidowej, możliwe jest zastosowanie wielu technik, które pozwalają wyznaczyć współczynnik przepuszczalności, a również oddziaływanie wybranych cząsteczek z modelową błoną. Jedną z klasycznych jest technika zatrzymanego przepływu (z ang. *stopped-flow*) [90, 91]. Poprzez pomiar zmian właściwości

optycznych dwuwarstwy lipidowej indukowanych wygenerowanym ciśnieniem osmotycznym, możliwe jest wyznaczenie współczynnika przepuszczalności błony. Pomiar odbywa się w dwóch trybach — rozproszeniowym albo fluorescencyjnym [92]. Z wykorzystaniem klasycznej spektroskopii fluorescencyjnej możliwe jest wyznaczenie współczynnika przepuszczalności, stosując sondę fluorescencyjną — kalceinę. W tej metodzie jest ona zamykana w liposomach, a badany jest sygnał towarzyszący jej wyciekowi do środowiska wodnego [93].

Techniki obrazowania mikroskopowego wymagają wykorzystania liposomów o średnicy 1–10 μm (GUV) ze względu na rozdzielczość wykorzystywanej w tym celu mikroskopii konfokalnej [94]. Liposomy są znakowane sondą fluorescencyjną czułą na zmianę pH, której właściwości optyczne zmieniają się w obecności badanych cząsteczek. Metoda ta została wykorzystana do wyznaczenia współczynnika przepuszczalności kwasów karboksylowych [81].

Określenie oddziaływań pomiędzy molekułami a błoną lipidową jest również możliwe z wykorzystaniem izotermicznej kalorymetrii miareczkującej (ITC), która została szerzej opisana w Rozdziale 8. Technika ta charakteryzuje się tym, że jest bezinwazyjna i pozwala wyznaczyć ciepło, które zostaje wytworzone lub pochłonięte podczas oddziaływania danej molekuly z błoną lipidową.

Zarówno w przypadku współczynnika przepuszczalności, jak i współczynnika podziału warto wspomnieć o metodach *in-silico*, czyli wykorzystujących modelowanie komputerowe, głównie dynamikę molekularną. Biorąc pod uwagę dla jak wielu cząsteczek brakuje informacji o tych parametrach, prawdopodobnie te techniki staną się kluczowe w uzupełnianiu baz danych, co wpłynie na bardziej efektywne projektowanie oraz tworzenie nowych leków [49, 59, 75, 95].

5.2 Współczynnik podziału

Wyznaczenie współczynnika podziału błona/woda ($K_{B/W}$) zazwyczaj jest możliwe z wykorzystaniem tych samych metod, które są stosowane do pomiaru oddziaływań oraz przepuszczalności błony lipidowej, przykładem może być ITC [96, 97] lub techniki chromatograficzne, w tym ILC [98]. Charakterystyczne dla wybranego modelu błony lipidowej są techniki dializujące, których idea jest inkubowanie liposomów w roztworze badanych cząsteczek, a następnie rozdzielenie fazy wodnej z cząsteczkami niezwiązanymi z błoną lipidową przy pomocy technik ultrawirówkowych [87], czy też z zastosowaniem worków dializacyjnych [99].

Spektroskopię UV-VIS wykorzystano do wyznaczenia $K_{B/W}$ m.in. dla cytostatyków: doksorubicyny [100] oraz paklitakselu [45]. Technika polega na inkubacji liposomów z wybranymi cząsteczkami, następnie mierzone jest widmo absorpcyjne, które poddawane jest przekształceniom polegającym na obliczeniu drugiej pochodnej z absorbancji. Na podstawie tej wartości, z zastosowaniem odpowiedniego modelu matematycznego, wyznaczany jest współczynnik podziału. Metoda, mimo łatwości wykonania, jest zależna od

występowania maksimum absorpcyjnego dla wybranej cząsteczki w zakresie UV-VIS, oraz doboru odpowiedniego stosunku stężeń pomiędzy lipidem a badaną cząsteczką [101]. Miarczkowanie pH-metryczne [102] oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [103] również są metodami wykorzystywanymi do wyznaczenia współczynnika podziału.

5.3 Temperatura przejścia fazowego

Techniki pomiarowe umożliwiające wyznaczenie temperatury przejścia fazowego dwuwarstwy lipidowej w większości wykorzystują złożoną aparaturę pomiarową oraz wymagają specjalnego przygotowania próbki. Jedną z klasycznych metod jest różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), która umożliwia wyznaczenie zależności zmiany ciepła w układzie w funkcji temperatury [97]. Podczas przejścia fazowego z uporządkowanej fazy żelowej do fazy ciekłokrystalicznej dochodzi do zmiany ciepła, która jest rejestrowana przez odpowiednią aparaturę w postaci termogramu. Punkt, w którym występuje maksymalny przepływ ciepła, określa się, jako temperaturę przejścia fazowego. W metodzie tej, w celu otrzymania powtarzalnych rezultatów, konieczne jest wykorzystanie liposomów wielowarstwowych (MLV).

Grupę innych technik pomiarowych stanowią metody spektroskopowe, takie jak spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FTIR) [62], spektroskopia fluorescencyjna [104], czy skomplikowany pod względem aparatury NMR [105]. Pojawiają się również bardziej nowatorskie metody, które cechują się mniej skomplikowaną aparaturą oraz sposobem przygotowania próbek — dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) [106], czy techniki wykorzystujące wykrywanie nanoplazmone [107].

5.4 Płynność dwuwarstwy lipidowej

Jedną z głównych technik pomiarowych pozwalającą na pomiar płynności dwuwarstwy lipidowej jest należąca do metod spektroskopowych fluorescencja polaryzacyjna [83, 108]. Wykorzystanie sond fluorescencyjnych m.in. DPH, TMA-DPH, czy ANS wbudowujących się w określony fragment dwuwarstwy lipidowej, pozwala na pomiar jej właściwości zarówno w części hydrofilowej, jak i hydrofobowej, co umożliwia wyznaczenie parametrów związanych z uporządkowaniem tej struktury [109].

Wykorzystanie fluorescencyjnych lipidów pozwala na wbudowanie ich w błonę liposomów, a następnie stosując technikę lokalnego fotowysielania rejestrowanie obrazu przy pomocy mikroskopii konfokalnej. Umożliwia to wyznaczenie ruchliwości lateralnej lipidów, która wpływa na płynność dwuwarstwy lipidowej [70]. Inne techniki spektroskopowe to spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FTIR), która pozwala na określenie nieuporządkowania łańcuchów alkilowych [110, 111], spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) mierząca dynamikę molekularną błon lipidowych, zmiany konformacyjne w niej zachodzące oraz jej ruchliwość [112]. W celu wyznaczenia płynności

dwuwarstwy lipidowej wykorzystuje się również dynamikę molekularną, która umożliwia również określenie upakowania, czy lokalnej gęstości błony [65].

5.5 Ładunek powierzchniowy

Wyznaczenie eksperymentalnie potencjału zeta jest skomplikowane ze względu na ilość czynników zewnętrznych, które mogą zaburzyć wynik pomiaru, takich jak zmienne pH, siła jonowa, obecność jonów w roztworze, czy też sposób rozcieńczenia próbki do pomiaru [67]. Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod, ze względu na swoją czułość oraz dokładność, jest elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS) [66, 67]. Technika ta opiera się na pomiarze zmian właściwości optycznych struktur, występujących pod wpływem ruchu cząsteczek, wywołanego przez zewnętrzne pole elektryczne [66]. Ograniczeniem w jej stosowaniu są próbki, charakteryzujące się znacznym zmętnieniem, co wpływa na oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z mierzonymi strukturami [67].

Alternatywną techniką, umożliwiającą pomiar potencjału zeta, jest spektroskopia elektroakustyczna [113]. Wykorzystuje ona zmianę właściwości fali dźwiękowych, które przechodzą przez środowisko wodne, co pozwala na określenie takich parametrów struktur, jak średniego rozkład rozmiarów, czy właściwości powierzchniowe, w tym potencjału zeta. W przypadku spektroskopii elektroakustycznej dochodzi do oddziaływania pola akustycznego z polem elektrycznym, i w zależności od wariantu pomiarowego, otrzymywana jest wartość koloidalnego potencjału wibracyjnego lub elektryczna amplituda soniczna, które następnie z wykorzystaniem odpowiednich modeli fizycznych umożliwiają wyznaczenie potencjału zeta [113]. Technika ta charakteryzuje się mniejszą czułością w porównaniu do ELS, oraz jest trudniejsza w interpretacji [113].

Część II

Materiały i metody

Rozdział 6

Materiały

Poniżej zestawiono odczynniki chemiczne, które zostały wykorzystane w prowadzonych badaniach. 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholina (DPPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoseryna (DOPS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), cholesterol (Chol) zakupiono w Avanti Polar Lipids (Alabama, Stany Zjednoczone). Askorbinian sodu, glicerol, glikol propylenowy, mocznik, glukozę, wodorotlenek sodu, octan sodu otrzymano od P.P.H.U. Stanlab (Lublin, Polska), d-sorbitol od Pol-Aura (Olsztyn, Polska). Kwas dehydroaskorbiniowy (DHA), DPH, DMSO zakupiono w Sigma-Aldrich (Missour, Stany Zjednoczone). N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(kwas 2-etanosulfonowy) (Hepes), chlorek potasu, chlorek sodu, kwas octowy oraz rozpuszczalniki organiczne czystości HPLC pochodziły z VWR International (Pensylwania, Stany Zjednoczone). Do przygotowania wszystkich próbek wykorzystano wodę oczyszczoną o przewodnictwie mniejszym niż $0.1 \mu\text{m S/cm}$ (AquaEngineering, Warszawa).

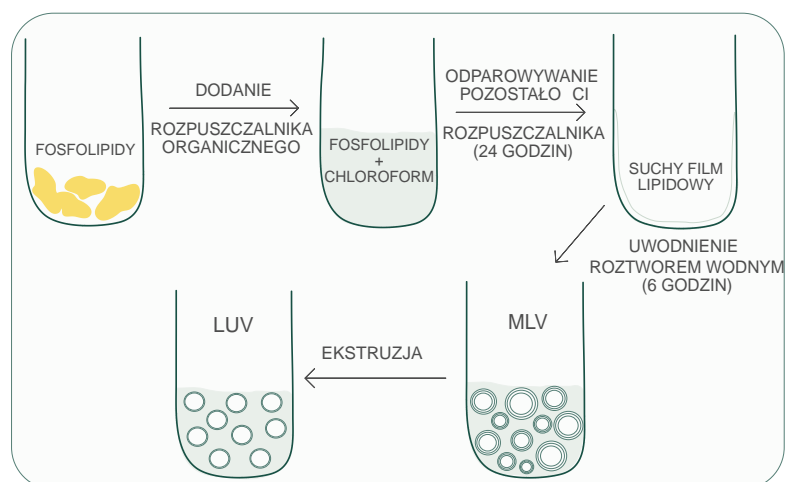
Rozdział 7

Formowanie liposomów

Do pomiarów wykorzystano model dwuwarstwy lipidowej w postaci jednego z rodzajów liposomów — dużych jednowarstwowych pęcherzyków (LUV), które zostały wybrane ze względu na dobrze zdefiniowany, jednorodny rozkład wielkości, powtarzalność wytwarzania, stabilność w czasie oraz możliwość zastosowania wielu technik charakteryzujących te struktury w obecności wybranych cząsteczek [100]. Proces przygotowania liposomów podzielono na dwa etapy:

1. Przygotowanie dużych wielowarstwowych pęcherzyków (MLV) techniką suchego filmu [114].
2. Kalibracja uzyskanych liposomów z wykorzystaniem ekstruzji w celu otrzymania jednorodnej zawiesiny dużych jednowarstwowych pęcherzyków (LUV) [115, 116].

Całą procedurę przedstawiono schematycznie na Rys. 7.1. W pierwszym kroku odważono do fiolki odpowiednią ilość lipidów oraz rozpuszczalnika organicznego — chloroformu.



Rysunek 7.1: Schemat przedstawiający kolejne kroki przygotowania dużych jednowarstwowych pęcherzyków (LUV). Schemat przygotowano na podstawie informacji zawartych w [114, 115].

Tabela 7.1: Zestawienie lipidów, które wykorzystano do wytworzenia liposomów.

Lipid	Bufor
DOPC DOPC + 30% mol chol DOPC + 15% mol DOPE DOPC + 4.2% mol DOPE DOPC + 15% mol DOPS DPPC	20 mM Hepes pH 7.4
DOPC	100 mM bufor octanowy pH 4.2

Po rozpuszczeniu lipidów, próbkę umieszczono w atmosferze argonu w celu odparowania rozpuszczalnika, co doprowadziło do powstania na ściankach fiolki tzw. suchego filmu lipidowego. Aby wyeliminować jakiegokolwiek pozostałości rozpuszczalnika organicznego, próbkę umieszczono w eksykatorze próżniowym na 24 godziny. Kolejno do uzyskanego suchego filmu dodano roztwór wodny, wytrząsano do uzyskania mlecznobiałej zawiesiny i pozostawiono na sześć godzin w celu uwodnienia suchego filmu.

Drugi etap to ekstruzja powstałej zawiesiny liposomów. Technika ta polega na tłoczeniu w kilku cyklach zawiesiny liposomów przez poliwęglanową membranę o określonej średnicy otworów (w prowadzonych badaniach średnica otworów wynosiła 100 nm). Proces ten wykonano z wykorzystaniem automatycznego ekstrudera, z kontrolowaną prędkością oraz temperaturą ekstruzji. Wytworzone tą techniką liposomy zostały odpowiednio scharakteryzowane poprzez określenie średniego rozkładu rozmiarów struktur, polidispersyjności oraz stężenia lipidu. Proces wytwarzania liposomów wykonano w temperaturze pokojowej (22°C) lub w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego odpowiadającej znajdującym się w próbce lipidom.

W prowadzonych badaniach, w zależności od wykonywanych pomiarów, przygotowywano liposomy o różnym składzie lipidowym. Zestawienie składów przygotowanych liposomów zaprezentowano w Tabeli 7.1. Dodatkowo w części prezentującej wyniki prac badawczych umieszczono dokładną informację o stężeniu lipidów w próbce z liposomami w legendzie przygotowanych wykresów lub w tekście opisującym wyniki.

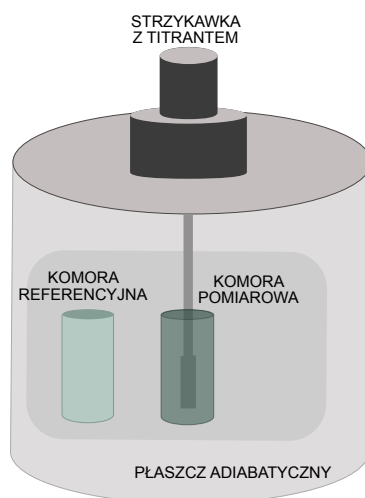
Rozdział 8

Izotermiczna kalorymetria miareczkująca

Techniką pomiarową wybraną do badań nad oddziaływaniami zachodzącymi pomiędzy molekułami jest izotermiczna kalorymetria miareczkująca (ITC). Umożliwia ona wyznaczenie pełnego profilu termodynamicznego dla oddziaływań pomiędzy wybranymi molekułami, dodatkowo charakteryzuje się dużą czułością oraz nie wymaga modyfikacji struktury badanych cząsteczek. Stanowi to jedną z głównych zalet tej techniki, ponieważ minimalizuje ryzyko uszkodzenia próbki podczas jej przygotowania, natomiast wynik pomiaru jest bezpośrednim rezultatem oddziaływań pomiędzy dwoma strukturami, a nie pośrednim pomiarem z wykorzystaniem na przykład sond znakujących. Technika ta jest szeroko wykorzystywana i opisana w literaturze w kontekście pomiaru oddziaływań pomiędzy ligandem a molekułą, takimi jak białko–białko, białko–makromolekuła [117, 118]. Od kilkudziesięciu lat stosuje się ją również do badań oddziaływań pomiędzy modelem dwuwarstwy lipidowej — liposomami a wybranymi cząsteczkami m.in. solami żółciowymi [119], etanolem [120], jonami metali [121], jak i DNA [122], koloidalnymi nanocząsteczkami [123, 124], białkami wybranych wirusów [125, 126], czy lekami m.in. ibuprofenem [127] lub hormonami [128].

Urządzenie pomiarowe wykorzystywane w ITC stanowi integralny system składający się z płaszczka adiabaticznego, w którym znajdują się dwie komory — pomiarowa i referencyjna (Rys. 8.1). W komorze pomiarowej znajduje się roztwór/zawiesina cząsteczek albo badanych struktur, natomiast w komorze referencyjnej wybrany rozpuszczalnik, zazwyczaj bufor, w którym przygotowano próbki do pomiarów, albo woda destylowana. Do komory pomiarowej przy pomocy strzykawki dodawany jest stopniowo roztwór/zawiesina molekuł (titrant). Sposób miareczkowania zależy od zadanej objętości nastrzyku oraz objętości strzykawki, zazwyczaj wynosi 5–20 μl . Dzięki specjalnemu zakończeniu strzykawki miareczkującej zawartość komory jest mieszana przez czas trwania eksperymentu z określoną prędkością (250–400 rpm).

Podczas pomiaru ITC dochodzi do oddziaływań pomiędzy cząsteczkami, które są związane z określoną wymianą ciepła z otoczeniem, co skutkuje obniżeniem albo podwyższeniem temperatury w komorze pomiarowej. Aby utrzymać równowagę tego parametru



Rysunek 8.1: Schemat urządzenia pomiarowego wykorzystywanego w technice ITC. Schemat przygotowano na podstawie [97].

względem temperatury w komorze referencyjnej, urządzenie generuje albo obniża ilość mocy dostarczanej do grzałki utrzymującej temperaturę w komorze pomiarowej [129]. Zmiana mocy w funkcji czasu jest wielkością mierzoną w trakcie pomiaru ITC i przedstawianą w formie termogramu, czyli wykresu prezentującego zmianę mocy (dQ/dt) w funkcji czasu (Rys. 8.2 oraz Rys. 8.3). Na przykładowych zestawach danych zaprezentowano dwa skrajne warianty wyników, jakie można uzyskać. Na schemacie (Rys. 8.2) pokazano, jak zmienia się wartość zmierzonego sygnału w przypadku, gdy oddziaływanie pomiędzy mierzonymi molekułami jest niewielkie lub nie występuje. Natomiast na schemacie (Rys. 8.3) pokazano przykładowe dane dla klasycznego eksperymentu w przypadku techniki ITC — wiązania EDTA z jonami wapnia. Widoczna jest stopniowa zmiana wartości mocy w funkcji czasu, która przekłada się na zmianę wartości entalpii w funkcji stosunku molowego EDTA do jonów wapnia.

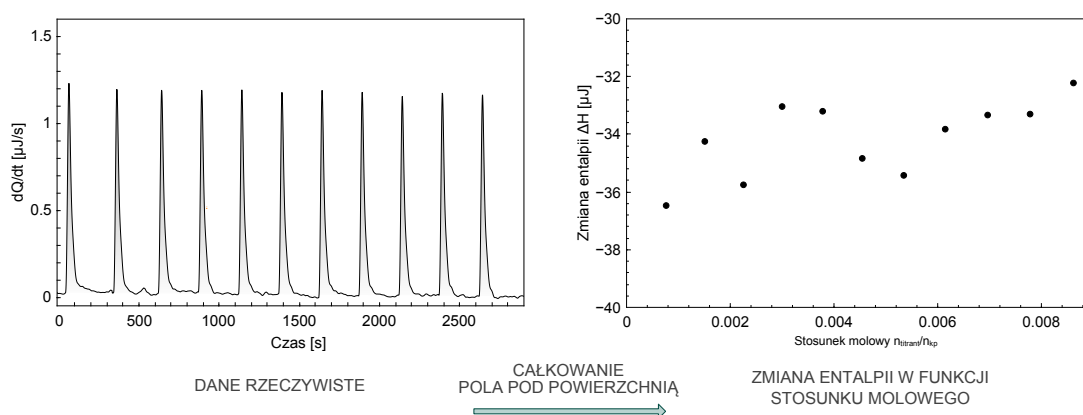
Wyznaczenie parametrów termodynamicznych opisujących oddziaływanie zachodzące w komorze pomiarowej wymaga odniesienia do I prawa termodynamiki. Zgodnie z nim zmiana energii wewnętrznej układu (ΔU) przyjmuje postać:

$$\Delta U = Q - W, \quad (8.1)$$

gdzie Q — ciepło wymienione z otoczeniem, W — praca wykonana przez układ. Przy założeniu, że temperatura oraz ciśnienie są stałe $W = 0$, co prowadzi do zależności:

$$\Delta U \approx Q \sim \Delta H. \quad (8.2)$$

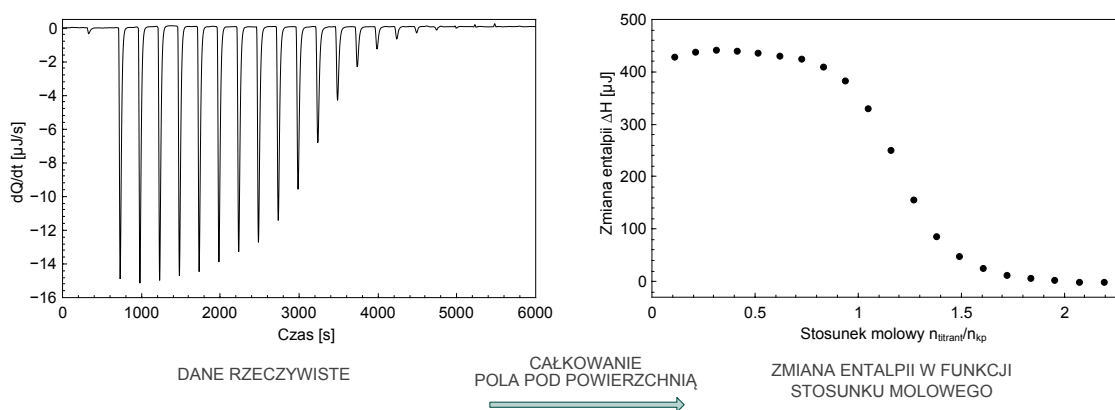
Zmiana entalpii (ΔH) jest bezpośrednią wielkością, jaką można wyznaczyć z pomiaru ITC, poprzez operację całkowania pola pod powierzchnią odpowiadającemu pojedynczemu



Rysunek 8.2: Schemat przedstawiający reprezentatywne dane rzeczywiste dla pomiaru ITC. Dane pomiarowe dla miareczkowania liposomów DOPC (stężenie lipidu $c_{\text{DOPC}} = 1 \text{ mM}$) do buforu (20 mM HEPES, pH 7.4) wraz z podstawową analizą danych, w rezultacie której otrzymano zmianę entalpii związaną z procesem zachodzącym w komorze pomiarowej.

nastrzykowi (Rys. 8.2). Dalsza analiza jest zależna od uzyskanych danych rzeczywistych. Po wyznaczeniu zmiany entalpii możliwe jest zestawienie tej wielkości w funkcji stosunku molowego titranta do ilości cząsteczek w komorze pomiarowej. Następnie, w zależności od doboru odpowiedniego modelu, możliwe jest wyznaczenie stałej wiązania, zmiany energii swobodnej Gibbsa, zmiany entropii, czy stechiometrii reakcji [129]. Pozwala to na określenie charakteru zachodzących oddziaływań, tego czy reakcja była endo- lub egzotermiczna, oraz jak zmieniło się uporządkowanie w układzie.

Oprócz klasycznego podejścia, w którym głównie wykorzystywane są modele opisujące wiązanie pomiędzy cząsteczkami, technika ITC umożliwia wyznaczenie współczynnika podziału błona/woda ($K_{\text{B/W}}$) [97], a coraz częściej dane uzyskane podczas pomiarów kalorymetrycznych wykorzystuje się również w analizach pojedynczych pików pomiaro-



Rysunek 8.3: Schemat przedstawiający reprezentatywne dane rzeczywiste dla pomiaru ITC. Dane pomiarowe dla miareczkowania 10 mM chlorku wapnia do 1 mM EDTA (20 mM HEPES, pH 7.4) wraz z podstawową analizą danych, w rezultacie której otrzymano zmianę entalpii związaną z procesem zachodzącym w komorze pomiarowej.

wych, co umożliwia wyznaczenie wielkości, określających kinetykę reakcji zachodzącej w komorze pomiarowej [130–132].

W prowadzonych badaniach pomiary ITC wykonano w celu określenia możliwych oddziaływań wybranych molekuł — witaminy C (w formie askorbinianu sodu), d-sorbitolu, mocznika, glicerolu i glikolu propylenowego z modelem dwuwarstwy lipidowej. Do badań z witaminą C wykorzystano liposomy o różnym składzie lipidowym zgodnie z informacjami zawartymi w Rozdziale 7. Roztwory wybranych molekuł przygotowano bezpośrednio przed pomiarem, aby uniemożliwić ich degradację, szczególnie w przypadku próbek z askorbinianem sodu. Aby zminimalizować wpływ promieniowania świetlnego na stan próbki, wykorzystano fiolki z oranżowego szkła. Ze względu na czułość metody na zmiany pH, przed pomiarami kontrolnie mierzono pH każdego z roztworów, aby wykluczyć wpływ tego parametru na uzyskane rezultaty.

Pomiary kalorymetryczne wykonano z wykorzystaniem urządzenia NanoITC (TA Instruments, Stany Zjednoczone). W pierwszym kroku umieszczono zawiesinę liposomów w strzykawce pomiarowej, a roztwór badanych molekuł w komorze pomiarowej. Wszystkie roztwory odgazowano przed pomiarami, aby wyeliminować możliwy wpływ powietrza. W komorze referencyjnej znajdował się bufor, który użyto do przygotowania próbek (20 mM HEPES, pH 7.4 lub 100 mM bufor octanowy, pH 4.2). Temperatura w trakcie trwania pomiarów była stała i wynosiła 25°C albo 45°C (dla liposomów DPPC), prędkość mieszania ustawiono na 250 rpm. Objętość, liczbę oraz czas integracji poszczególnych nastrzyków, jak i stężenie cząsteczek różniło się w zależności od pomiarów, dlatego dla przejrzystości informację o tych parametrach umieszczono w opisach wykresów prezentujących wyniki. Dla każdego pomiaru objętość pierwszego nastrzyku była stała (1.14 μ l) i została pominięta w analizie danych ze względu na możliwy proces dyfuzji roztworu znajdującego się na końcu strzykawki do komory pomiarowej [133].

Rozdział 9

Dynamiczne rozpraszanie światła

Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS) pozwala na scharakteryzowanie liposomów pod względem średniego rozkładu wielkości cząstek oraz polidispersyjności (PDI) [68, 134]. Umożliwia badanie agregacji molekuł, oddziaływań pomiędzy białkami, jak i innymi strukturami [68]. Pojawiają się również nowe zastosowania tej techniki, pozwalające na wyznaczenie stężenia cząsteczek w próbce [135], czy temperatury przejścia fazowego dwuwarstwy lipidowej [106].

W przypadku pomiaru umożliwiającego wyznaczenie średniego rozkładu wielkości cząstek, na struktury znajdujące się w próbce pada wiązka promieniowania elektromagnetycznego. Detekcji podlega intensywność promieniowania rozproszonego w funkcji czasu, która ulega fluktuacji ze względu na występujące w próbce ruchy Browna. Ruchy te są zależne m.in. od wielkości molekuł — im większy rozmiar, tym wolniej poruszają się struktury. Pomiar tych fluktuacji umożliwia wyznaczenie współczynnika dyfuzji translacyjnej (D_t), który określa prędkość ruchów Browna. Współczynnik ten jest powiązany z promieniem hydrodynamicznym (R_h) poprzez równanie Stokesa–Einsteina:

$$D_t = \frac{k_b T}{6\pi\eta_r R_h}, \quad (9.1)$$

gdzie k_b — stała Boltzmana, T — temperatura, η_r — lepkość rozpuszczalnika, w którym znajdują się molekuly. Promień hydrodynamiczny jest definiowany, jako promień, który miałaby sfera o takim samym współczynniku dyfuzji translacyjnej, jak mierzone struktury [68]. W celu uzyskania informacji o rozmiarze badanych cząstek urządzenie na podstawie pomiarów fluktuacji intensywności tworzy funkcję korelacji:

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle, \quad (9.2)$$

gdzie G — współczynnik korelacji, $I(t)$ — intensywność światła rozproszonego w chwili czasu t , $I(t+\tau)$ — intensywność światła rozproszonego w chwili czasu $t+\tau$, τ — różnica czasowa pomiędzy kolejnymi pomiarami intensywności. Kolejnym krokiem w przypadku monodispersyjnego układu jest dopasowanie z wykorzystaniem zależności:

$$G(\tau) = A[1 + Be^{-2\Gamma\tau}], \quad (9.3)$$

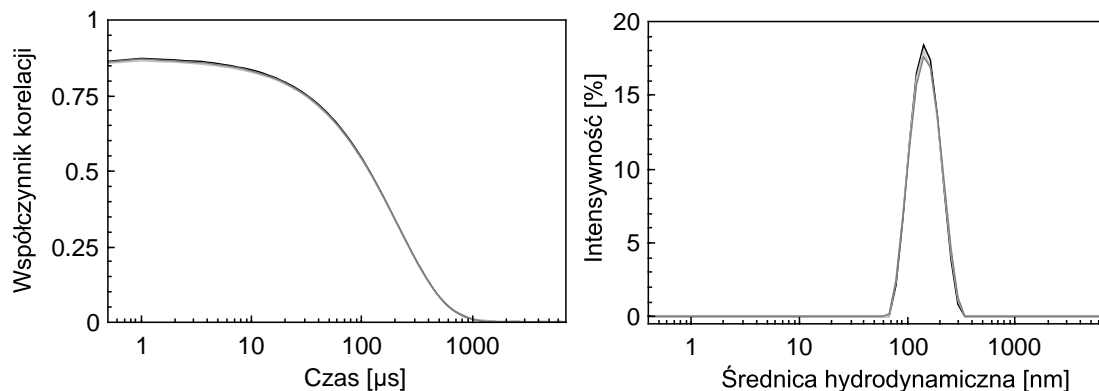
gdzie A — linia bazowa funkcji korelacji, B — nachylenie funkcji korelacji, która jest powiązana ze współczynnikiem dyfuzji translacyjnej poprzez relację:

$$\Gamma = D_t q^2, \quad (9.4)$$

gdzie q to:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\theta/2), \quad (9.5)$$

gdzie n — współczynnik załamania światła w rozpuszczalniku, λ_0 — długość fali źródła promieniowania, θ — kąt rozpraszania. Efektem dopasowania jest uzyskanie informacji o średnim rozkładzie wielkości struktur w próbce (z ang. *Z-average diameter*) oraz polidispersyjność. Rozkład wielkości cząstek zaprezentowany jest na wykresie w postaci względnej intensywności promieniowania rozproszonego w funkcji średnicy hydrodynamicznej [68]. Na Rys. 9.1 znajdują się przykładowe wyniki prezentujące rozkład wielkości cząstek oraz funkcję korelacji, odpowiadające pomiarowi zawiesiny liposomów o jednorodnym rozkładzie rozmiarów. W przypadku analizy danych uzyskanych podczas pomiaru DLS istotne jest zwrócenie uwagi na to, w jakiej formie prezentowane są dane końcowe oraz jak należy je interpretować. Standardowo urządzenie wykonuje trzy pomiary jednej próbki i wyznacza, na podstawie uzyskanych wartości średnich, odchylenie standardowe. Jednak nie jest to parametr charakteryzujący rozrzut wielkości struktur w próbce. Jako, że wynikiem pomiaru DLS jest rozkład rozmiarów struktur w próbce, jak zaprezentowano na Rys. 9.1, istotnym parametrem określającym go jest szerokość rozkładu indeksu polidy-



Rysunek 9.1: Reprezentatywne wyniki uzyskane podczas pomiaru techniką DLS. Po prawej — funkcja korelacji. Po lewej — rozkład wielkości cząstek. Wyniki zaprezentowano dla liposomów DOPC wykonanych techniką suchego filmu, a następnie poddanych procesowi kalibracji z wykorzystaniem ekstruzji.

spersyjności (z ang. *PDI width*). W pracy dane z pomiarów DLS zostaną przedstawione w formie średniego rozkładu rozmiaru struktur plus-minus szerokość rozkładu indeksu polidispersyjności.

9.1 Wyznaczenie średniego rozkładu wielkości oraz polidispersyjności

Każda z przygotowanych próbek liposomów została scharakteryzowana przy pomocy metody DLS w kontekście pomiaru rozkładu wielkości struktur oraz polidispersyjności. Wykorzystano urządzenie Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Wielka Brytania) wyposażone w czerwony laser (długość fali emisji $\lambda_0 = 633$ nm) z ustawieniem detektora pod kątem 173° względem wiązki promieniowania padającej na próbkę. Standardowo do pomiarów próbka była rozcieńczana 50-krotnie buforem, w którym została przygotowana. Różnica w preparatyce miała miejsce w przypadku pomiaru próbek po pomiarach kalorymetrycznych. Aby określić rozkład wielkości struktur w tych próbkach, pobrano je bezpośrednio po pomiarze z komory pomiarowej kalorymetru, i nie rozcieńczano dodatkowo ze względu na odpowiednio niskie stężenie lipidu. Po wykonaniu pomiarów tą techniką do analizy danych wykorzystano wyznaczone przez oprogramowanie urządzenia wartości średniego rozkładu wielkości cząstek oraz PDI.

9.2 Wyznaczenie temperatury przejścia fazowego

W celu wyznaczenia temperatury przejścia fazowego wykorzystano liposomy wykonane techniką suchego filmu zgodnie z protokołem opisanym w Rozdziale 7. Wybrano lipid DPPC, który charakteryzuje się temperaturą przedprzejścia ($T_\beta = 34.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$) oraz przejścia fazowego ($T_\alpha = 41.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$) [106]. Z tego względu proces uwodnienia suchego filmu oraz ekstruzji wykonano w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego (50°C).

Temperaturę przejścia fazowego wyznaczono dla liposomów w obecności askorbinianu sodu oraz innych molekuł — d-sorbitolu, glicerolu i glikolu propylenowego. Miało to na celu porównanie, jak inne cząsteczki hydrofilowe wpływają na tę właściwość błony lipidowej. Kontrolę stanowiła zawiesina liposomów DPPC. Do pomiarów liposomy rozcieńczono roztworami odpowiednich cząsteczek ($c_c = 10$ mM), tak aby końcowe stężenie lipidu wynosiło $c_{\text{DPPC}} = 1$ mM. Wszystkie roztwory przygotowano w 20 mM Hepesie, pH 7.4. Następnie próbki inkubowano przez cztery godziny w temperaturze 37°C , po tym czasie pobrano 1 ml i umieszczono w kuwecie pomiarowej. Pomiarów wykonano dla zakresu temperatur 26.0 – 45.0°C , rozpoczynając od manualnego wyznaczenia odpowiednich parametrów związanych z optyką urządzenia oraz stężeniem struktur znajdujących się w próbce (tzw. wzmocnienie (z ang. *attenuator*)). W rutynowych pomiarach parametry te są automatycznie dobierane i zmienne w zależności od pomiaru, jednak w tym przypadku

wpływałoby to na średnią liczbę zliczanych fotonów na sekundę, a tym samym zaburzyłoby wynik pomiaru. Urządzenie przed każdym pomiarem osiągało określoną temperaturę, która była następnie stabilizowana przez 600 s. Po zebraniu charakterystyki zmiany średniej liczby zliczanych fotonów na sekundę w funkcji temperatury przeanalizowano dane zgodnie z modelem, znajdującym się w części opisującej wyniki prowadzonych badań.

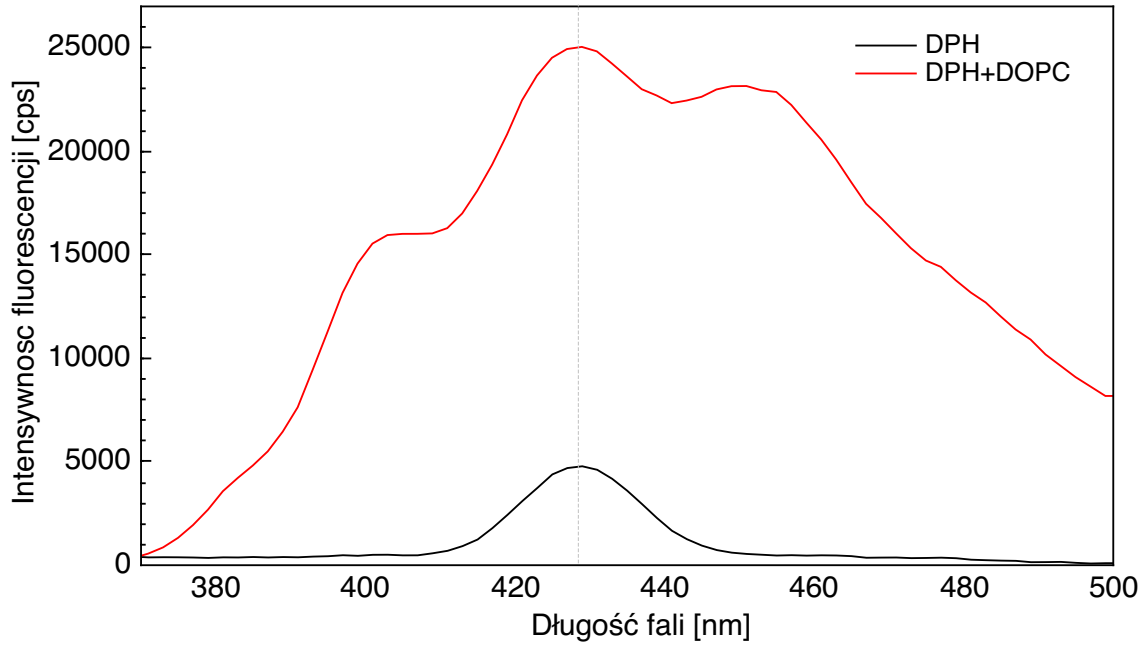
Rozdział 10

Polaryzacyjna spektroskopia fluorescencyjna

Należąca do rodziny technik spektroskopowych — fluorescencja polaryzacyjna jest szeroko wykorzystywana w pomiarach biofizycznych, szczególnie w kontekście właściwości błony lipidowej oraz jej oddziaływań z cząsteczkami. Pomiar anizotropii fluorescencji wykorzystuje się m.in. do określenia oddziaływań lipidów z białkami [136], badania kinetyki rozplątywania DNA indukowanego helikazą DNA [137], płynności błony komórek bakteryjnych [19], mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej [83, 138] oraz zmian w uporządkowaniu błony lipidowej pod wpływem leków [45, 139].

Pomiar anizotropii fluorescencji jest techniką pozwalającą na badanie stopnia uporządkowania dwuwarstwy lipidowej. Umożliwia to m.in. wykorzystanie sondy fluorescencyjnej 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH), która jest hydrofobową cząsteczką, należącą do grupy węglowodorów, spontanicznie wbudowującą się w dwuwarstwę lipidową [108]. Cechą charakterystyczną tej sondy jest to, że w roztworze wodnym tworzy mikroagregaty, które nie wykazują sygnału fluorescencyjnego. Natomiast w obecności dwuwarstwy lipidowej sonda wbudowuje się w jej hydrofobowy region, co skutkuje kilkunastokrotnym wzrostem mierzonej wartości fluorescencji [140], jak pokazano na Rys. 10.1. DPH jest standardowo wykorzystywane do wyznaczania zmian strukturalnych oraz dynamicznych w dwuwarstwie lipidowej, a anizotropia fluorescencji jest parametrem, który może być powiązany z mikrolepkością dwuwarstwy lipidowej [83].

Podczas pomiaru próbka wzbudzana jest światłem o polaryzacji pionowej. Wektor elektryczny wiązki wzbudzającej jest zorientowany równoległe do osi pionowej. Intensywność wyemitowanego promieniowania mierzona jest z wykorzystaniem polaryzatorów. Jeśli polaryzator jest zorientowany równoległe do kierunku polaryzacji wiązki wzbudzającej, mierzona jest intensywność I_{vv} , natomiast gdy polaryzator zorientowany jest w kierunku prostopadłym do polaryzacji promieniowania wzbudzającego, mierzona jest intensywność I_{vh} . Wykorzystując zmierzone intensywności fluorescencji można wyznaczyć dwie powiązane ze sobą wielkości — polaryzację zgodnie z:



Rysunek 10.1: Reprezentatywne widmo emisyjne dla DPH (kolor czarny) oraz DPH w obecności liposomów DOPC (kolor czerwony), długość fali wzbudzającej $\lambda = 355$ nm. Rysunek przygotowany z wykorzystaniem własnych danych.

$$P = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + I_{vh}} \quad (10.1)$$

oraz anizotropię fluorescencji korzystając z równania:

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}, \quad (10.2)$$

gdzie I_{vv} — intensywności promieniowania przechodzącego przez polaryzator zorientowany w kierunku równoległym do polaryzacji wiązki wzbudzającej, I_{vh} — intensywność promieniowania przechodzącego przez polaryzator zorientowany w kierunku prostopadłym. Współczynnik korekcji urządzenia definiowany jest jako:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}, \quad (10.3)$$

gdzie I_{hv} — intensywności promieniowania o polaryzacji poziomej przechodzącego przez polaryzator zorientowany w kierunku prostopadły do polaryzacji wiązki wzbudzającej, I_{hh} — intensywności promieniowania o polaryzacji poziomej przechodzącego przez polaryzator zorientowany w kierunku równoległym do polaryzacji wiązki wzbudzającej. Uwzględniając ten współczynnik, wzór na anizotropię fluorescencji przyjmuje postać:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}. \quad (10.4)$$

Współczynnik korekcji podczas pomiaru został automatycznie wyliczony dla każdej z próbek przez oprogramowanie urządzenia.

Do pomiarów wykorzystano liposomy DOPC przygotowane techniką suchego filmu zgodnie z opisem w Rozdziale 7, które rozcieńczono do stężenia końcowego lipidu $c_{\text{DOPC}} = 50 \mu\text{M}$. Następnie dodano roztwór DPH i inkubowano próbki przez godzinę, w celu inkorporacji sondy w błonę lipidową (stężenie końcowe sondy wynosiło $0.1 \mu\text{M}$). Wcześniej przygotowano roztwór sondy, rozpuszczając jej odpowiednią ilość w DMSO. Aby wykonać pomiar anizotropii fluorescencji dwuwarstwy lipidowej w obecności wybranych cząsteczek — askorbinianu sodu, mocznika, d-sorbitolu, glicerolu, glikolu propylenowy, przygotowano ich roztwory w 20 mM buforze Hepes pH 7.4 i dodano do zawiesiny liposomów z sondą fluorescencyjną w ilości odpowiadającej 0.2, 0.4, 0.6 oraz 0.8 ułamka molowego względem stężenia lipidów w próbce. Następnie inkubowano przez dwie godziny w 37°C . Próbkę kontrolną przygotowano w ten sam sposób, ale bez dodatku badanych molekuł. Dodatkowo do pomiarów wykorzystano roztwór samej sondy w celu weryfikacji metody pomiarowej i określenia, czy intensywność fluorescencji DPH w roztworze bez obecności liposomów będzie miała sygnał bliski zeru. Po czasie inkubacji wykonano pomiary anizotropii fluorescencji z wykorzystaniem fluorometru FluoroMax 4 (Horiba, Japonia). Długość fali wzbudzającej wynosiła 355 nm, a widma emisyjne zbierano dla zakresu 365–500 nm. Szerokość szczelin monochromatorów wzbudzeniowego i emisyjnego wynosiła 2 nm, natomiast czas zbierania 0.1 s.

Rozdział 11

Elektroforetyczne rozpraszanie światła

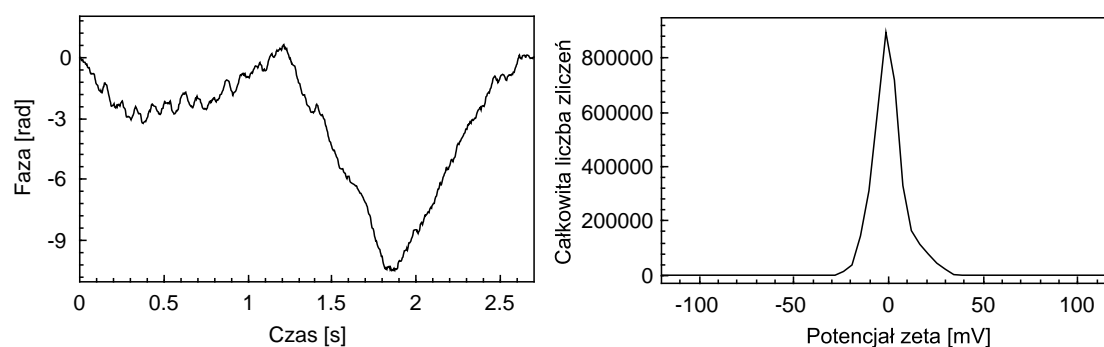
Wyznaczenie potencjału zeta techniką elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS) ma wiele możliwości aplikacyjnych w odniesieniu do liposomów. Umożliwia pomiar oddziaływań z wybranymi cząsteczkami [96], określenie stabilności wytworzonych struktur koloidalnych w zależności od składu lipidowego [66], czy też wyznaczenie współczynnika podziału błona/woda [100].

Potencjał zeta wyznaczany jest na podstawie mobilności elektroforetycznej (μ_e) naładowanych cząsteczek wytworzonej pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Urządzenie wykorzystane do pomiarów ELS — Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Wielka Brytania), wykorzystuje opatentowaną technikę M3-PALS łączącą ze sobą laserowy efekt Dopplera oraz analizę fazową światła rozproszonego [66]. W tej technice laser oświetla próbkę znajdującą się w specjalnej kuwecie z dwoma elektrodami. Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego dochodzi do ruchów cząsteczek w kierunku odpowiedniej elektrody. Ruch ten powoduje zmianę intensywności światła rozproszonego, którego detekcja ma miejsce pod kątem 173° względem wiązki lasera [66]. Po wykonaniu pomiarów zmiany intensywności światła rozproszonego wyliczana jest mobilność elektroforetyczna, a następnie zgodnie z równaniem Henry’ego potencjał zeta:

$$\zeta = \frac{3 \eta_r \mu_e}{2 \varepsilon_r \varepsilon_0 f(Ka)}, \quad (11.1)$$

gdzie η_r — lepkość rozpuszczalnika, ε_r — względna przenikalność elektryczna, ε_0 — przenikalność elektryczna próżni, ζ — potencjał zeta, $f(Ka)$ — funkcja Henry’ego. Funkcja Henry’ego jest zależna od odwrotności długości Debay’a oraz promienia badanej struktury (w tym przypadku liposomów) [121]. W zależności od środowiska w jakim wykonywane są pomiary, funkcja Henry’ego określana jest przy pomocy przybliżenia Smoluchowskiego dla słabych elektrolitów oraz pomiarów w środowisku polarnym $f(Ka) = 1.5$, albo przybliżenia Huckel’a dla pomiarów w środowisku niepolarnym $f(Ka) = 1$ [66]. Reprezentatywne wyniki, z wykorzystaniem techniki ELS zaprezentowano na Rys. 11.1.

Do pomiarów wykorzystano liposomy DOPC przygotowane techniką suchego filmu zgodnie z opisem z Rozdziału 7. Po procesie ekstruzji rozcieńczono je do stężenia lipidu



Rysunek 11.1: Reprezentatywne wyniki uzyskane podczas pomiaru techniką ELS. Po prawej — zmiana fazy w funkcji czasu. Po lewej — całkowita liczba zliczeń odpowiadająca określonej wartości potencjału zeta.

równego $c_{\text{DOPC}} = 1 \text{ mM}$ z wykorzystaniem roztworów wybranych cząsteczek — askorbinianu sodu, d-sorbitolu, mocznika, glicerol oraz glikolu propylenowego. Wybrano trzy różne stężenia molekuł (10 mM, 50 mM oraz 100 mM), a następnie próbki inkubowano przez trzy godziny w temperaturze 37°C . Aby pomiary potencjału zeta przebiegły prawidłowo wszystkie próbki przygotowano w 10 mM chlorku potasu. Po inkubacji próbki przeniesiono do specjalnej kuwety pomiarowej z wbudowanymi elektrodami i wykonano pomiary.

Rozdział 12

Analiza statystyczna

W celu określenia, czy istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy wartościami średnimi odpowiadającym dwu grupom, wykonano test t -Studenta dla prób niezależnych. Wykorzystano test t -Studenta, który jest testem parametrycznym pozwalającym na porównanie wartości średnich dwóch prób charakteryzujących się rozkładem normalnym, jednorodnością wariancji oraz zbliżoną liczebnością [141]. W każdym z wykonanych testów postawiono hipotezę zerową, zakładającą, że nie ma statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wartościami średnimi z prób:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2, \quad (12.1)$$

gdzie μ_1 — wartość średnia z próby pierwszej, μ_2 — wartość średnia z próby drugiej. Hipotezę alternatywną zakłada, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy wartościami średnimi:

$$H_a : \mu_1 \neq \mu_2. \quad (12.2)$$

Aby odrzucić (albo nie) hipotezę zerową, konieczne jest porównanie zwróconej przez test wartości p z założonym poziomem istotności testu, α . Jeśli $p < \alpha$, mamy podstawy do odrzucenia H_0 .

Wszystkie obliczenia wykonano przy pomocy oprogramowania QtiPlot. Normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testu Shapiro–Wilka oraz założono równość wariancji. Z uwagi na niewielką liczebność prób moc testów mogła być ograniczona.

Część III

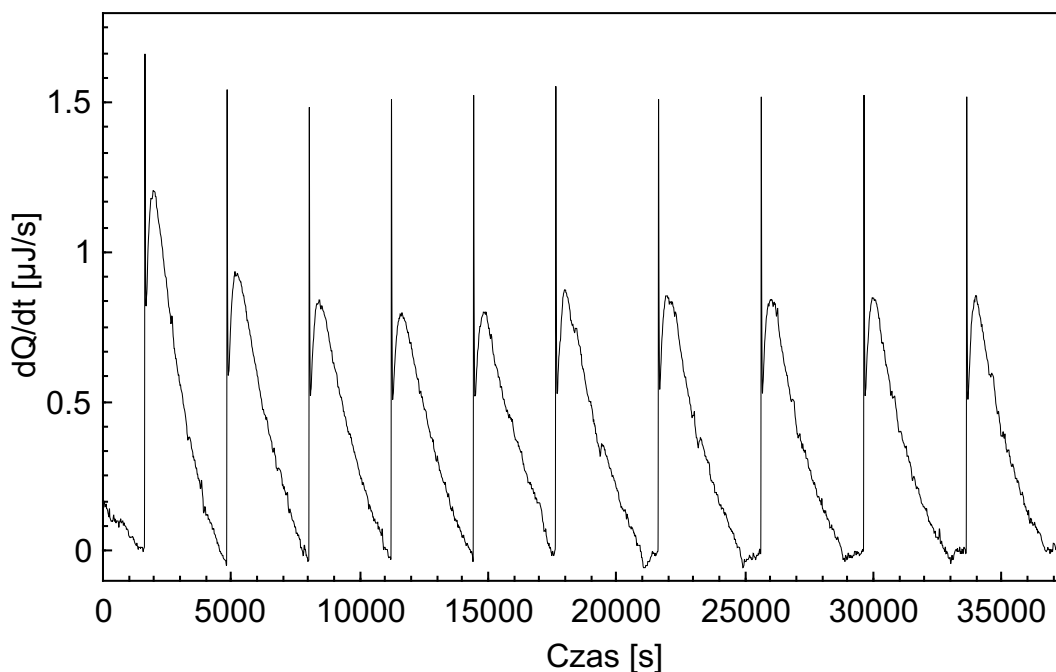
Wyniki

Rozdział 13

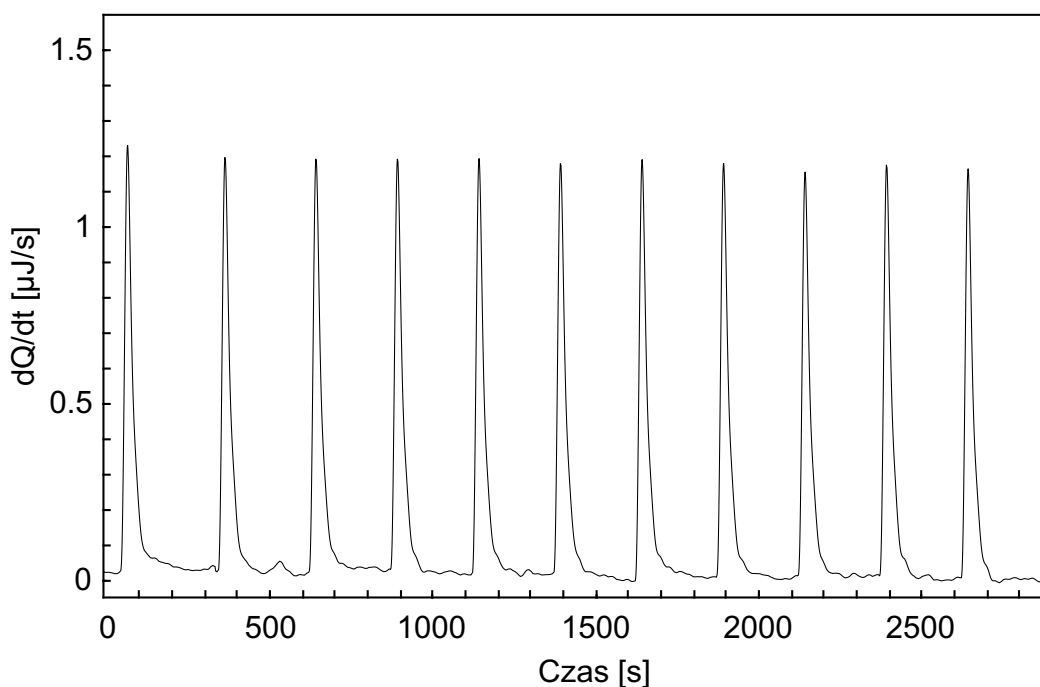
Oddziaływania witaminy C z dwuwarstwą lipidową

W tej części zostaną omówione uzyskane rezultaty pokazujące możliwe oddziaływania pomiędzy witaminą C a modelową błoną lipidową — liposomami. Do tej pory nie wykonano pełnej charakterystyki takich oddziaływań, z wykorzystaniem techniki ITC dla tej molekuly. Prezentację wyników rozpoczęto od zestawienia danych rzeczywistych dla pomiarów z witaminą C w formie askorbinianu sodu. Następnie porównano rezultaty z danymi uzyskanymi podczas pomiarów z innymi molekułami m.in. chlorkiem sodu, czy glukozą w celu wyeliminowania możliwej interferencji innych czynników na uzyskane wyniki. W kolejnym etapie pokazano, jak na oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową wpływa stężenie jonów askorbinowych, skład i uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej, oraz pH środowiska wodnego. Uzyskane wyniki porównano z danymi literaturowymi i rezultatami uzyskanymi podczas prowadzonych badań dla innych molekuł o podobnych właściwościach.

W pierwszym etapie sprawdzono, czy pomiędzy modelową błoną lipidową — liposomami a witaminą C zachodzą specyficzne oddziaływania. Technika wykorzystana w tej części to ITC, którą opisano w Rozdziale 8. W pierwszym kroku do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4) miareczkowano liposomy o stężeniu lipidu równym 1 mM (wybrany lipid — DOPC). Ze względu na to, że w pH 7.4 askorbinian sodu występuje w formie jonów sodu oraz głównie jonów askorbinowych [1], w dalszej części pracy wymiennie stosowane będzie określenie *jonów askorbinowych*, jeśli nie wskazano inaczej. Reprezentatywny termogram zaprezentowano na Wykresie 13.1. Natomiast dla pomiaru kontrolnego, czyli miareczkowania liposomów DOPC o stężeniu lipidu równym 1 mM do buforu (20 mM Hepes, pH 7.4) na Wykresie 13.2. Każdy z pomiarów wykonano co najmniej trzykrotnie, a wyniki obliczeń przedstawiono w formie wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym. Podstawowe wielkości wyznaczone dla każdego zestawu danych to zmiana entalpii odpowiadająca pojedynczemu nastrzykowi, entalpia kumulatywna oraz czas dochodzenia do równowagi (T_1 oraz T_2). Ponadto, ze względu na uzyskanie specyficznego kształtu pików, co zostanie opisane poniżej, porównano jakościowo, jak zmienia się on wraz ze zmianą mierzonych próbek. W przypadku zaprezentowanych



Wykres 13.1: Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μl .

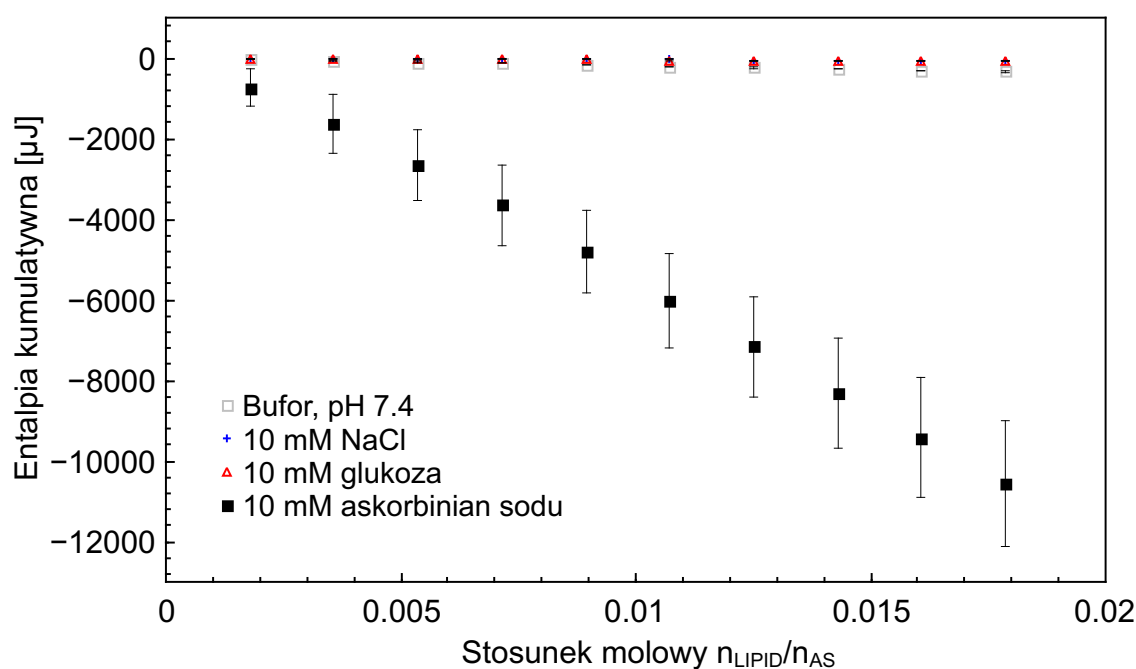


Wykres 13.2: Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do buforu (20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 300 s, objętość nastrzyku: 20 μl .

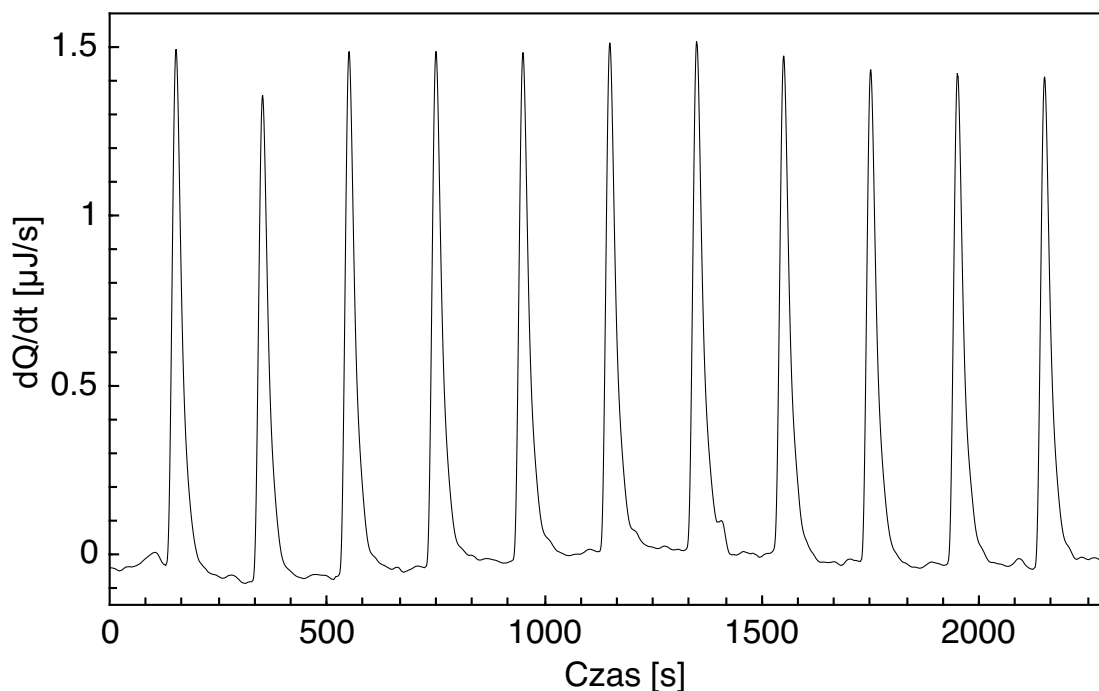
rezultatów warto również zwrócić uwagę na zadany czas pojedynczych nastrzyków — wstępnie zarówno pomiary kontrolne, jak i właściwe wykonano dla czasu nastrzyku równego 3500 s, jednak po sprawdzeniu, że w przypadku miareczkowania liposomów do buforu nie występuje wydłużony proces, skrócono czas pomiarów do 300 s.

Standardową wielkością, wyznaczaną z danych rzeczywistych uzyskanych podczas pomiaru ITC, jest ciepło wydzielone albo pochłonięte podczas oddziaływania/reakcji zachodzącej w komorze pomiarowej, przedstawione jako zmiana entalpii. Wykonanie operacji całkowania pola pod powierzchnią umożliwi wyznaczenie wartości zmiany entalpii (ΔH), a następnie zmiany entalpii molowej (ΔH_{mol}) dla każdego nastrzyku oraz entalpii kumulatywnej (ΔH_{kum}). Wyznaczenie ΔH dla każdej z próbek wymaga odjęcia wartości zmiany entalpii odpowiadającej pomiarom kontrolnym. Ma to na celu wyeliminowanie składowej odpowiadającej za ciepło rozcieńczania poszczególnych molekuł.

W przypadku pomiaru kontrolnego zmiana entalpii molowej dla pojedynczego nastrzyku wynosiła $\Delta H_{\text{mol}} = -1.6 \pm 0.2$ kJ/mol, natomiast dla pomiaru z jonami askorbinowymi $\Delta H_{\text{mol}} = -52.8 \pm 7.3$ kJ/mol. Rząd różnicy w wartości zmiany entalpii molowej wskazuje na większą ilość wydzielonego ciepła podczas pomiaru z jonami askorbinowymi, znajdującymi się w komorze pomiarowej. Różnice w wydzielonym ciepłe, w formie entalpii kumulatywnej, zaprezentowano na Wykresie 13.3. Kolorem szarym oznaczono wartości dla pomiaru kontrolnego, a czarnym dla pomiaru z jonami askorbinowymi. Entalpia kumulatywna dla pomiaru kontrolnego przyjmuje wartość $\Delta H_{\text{kum}} = -341 \pm 3$ μJ , natomiast dla jonów askorbinowych $\Delta H_{\text{kum}} = -10562 \pm 2711$ μJ . Oprócz zauważalnej różnicy w wartościach entalpii kumulatywnej (ponad 30-krotny wzrost wartości wydzielono-



Wykres 13.3: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: buforu 20 mM Hepes pH 7.4 (szary), 10 mM chlorku sodu (granatowy), 10 mM glukozy (czerwony) oraz 10 mM askorbinianu sodu (czarny).

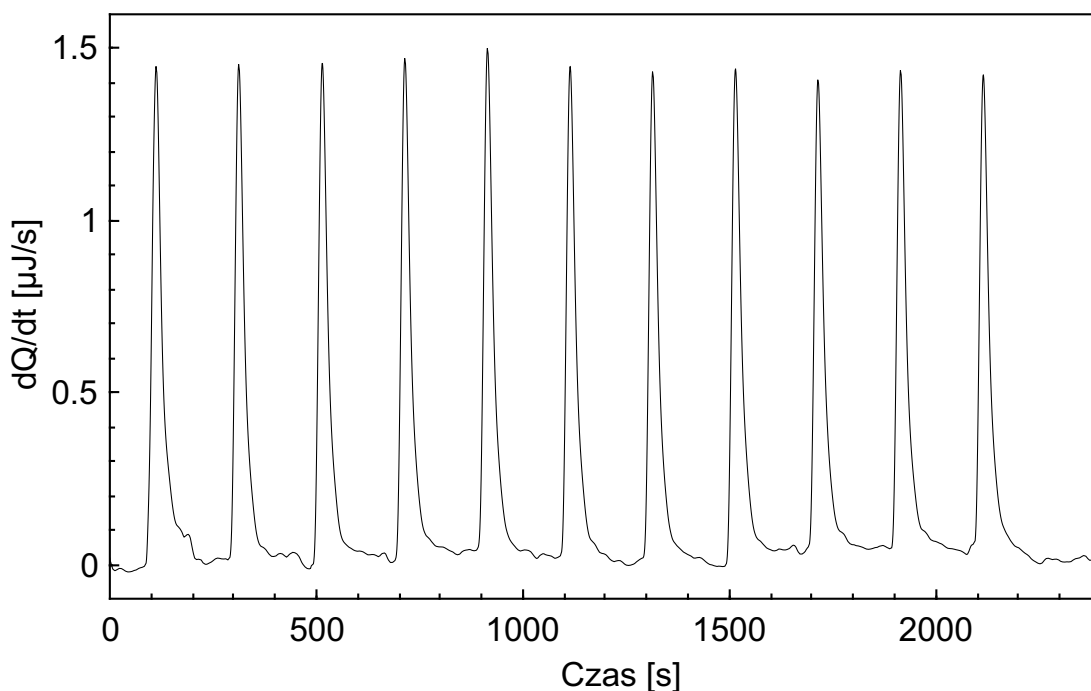


Wykres 13.4: Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM NaCl (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 300 s, objętość nastrzyku: 20 μ l.

nego ciepła), warto również zwrócić uwagę na większą wartość niepewności pomiarowej w drugim przypadku. Względne odchylenie standardowe (RSD) w przypadku pomiaru kontrolnego wynosiło $RSD_{kontrola} = 1\%$, natomiast dla pomiaru z jonami askorbinowymi $RSD_{AS} = 15\%$. Pomiar z wykorzystaniem jonów askorbinowych w pH 7.4 charakteryzowały się długim czasem stabilizacji przed rozpoczęciem pomiaru, oraz trudnościami w ustabilizowaniu metody pod względem prawidłowej linii bazowej i powtarzalności. W tym celu, aby wykluczyć możliwy wpływ innych czynników, które mogłyby zaburzyć wynik lub błędnie prowadzić do założenia, że oddziaływanie pomiędzy jonami askorbinowymi a modelową błoną lipidową prowadzi do wydzielania znacznej ilości ciepła względem kontroli, wykonano dodatkowe pomiary kontrolne.

Pod uwagę zostały wzięte takie zjawiska jak wiązanie jonów sodu z błoną lipidową (miareczkowanie 10 mM NaCl), napędzana ciśnieniem osmotycznym redystrybucja rozpuszczalnika pomiędzy fazami wodnymi oddzielonymi błoną lipidową (miareczkowanie 10 mM glukoza), powstanie kwasu dehydroaskorbinowego na skutek utleniania jonów askorbinowych (miareczkowanie 1 mM DHA), czy zmiany topologiczne błony lipidowej (pomiar rozkładu wielkości cząstek metodą DLS przed i po pomiarze).

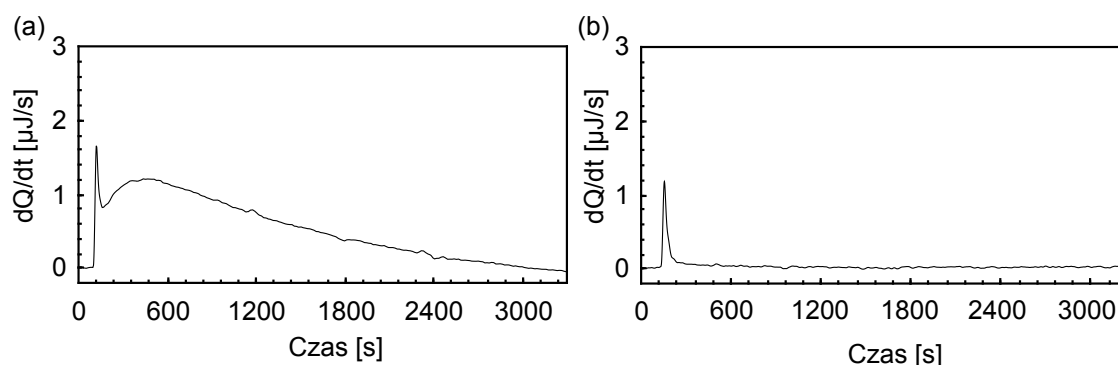
Pomiary techniką ITC wykonano w analogiczny sposób, jak opisano powyżej, przy zmienionej zawartości komory pomiarowej. Termogramy prezentujące dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM NaCl przedstawiono na Wykresie 13.4, a do 10 mM glukozy na Wykresie 13.5. W obecności zarówno jonów sodu oraz chloru, jak i glukozy, nie zaobserwowano oddziaływań, charakteryzujących



Wykres 13.5: Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM glukozy (bufor 20 mM HEPES, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 300 s, objętość nastrzyku: 20 μ l.

się specyficznym kształtem pików, jak i wartością wydzielonego ciepła. W przypadku oddziaływania pomiędzy jonami sodu a liposomami wartość zmiany entalpii molowej wynosiła $\Delta H_{\text{mol}} = -3.6 \pm 1.1$ kJ/mol, natomiast z glukożą $\Delta H_{\text{mol}} = -3.2 \pm 1.0$ kJ/mol. Wartości te są o rząd niższe od zmiany entalpii molowej dla pomiaru z jonami askorbinowymi, a kształt pików jest zbliżony do tego uzyskanego dla miareczkowania liposomów do buforu. Dodatkowo porównano również entalpię kumulatywną, co przedstawiono na Wykresie 13.3. Można wnioskować, że zarówno oddziaływanie jonów sodu, jak i chloru z dwuwarstwą lipidową nie jest wysokoenergetyczne i nie towarzyszy mu znaczne wydzielanie ciepła. Również pomiary z chlorkiem sodu, jak i glukożą pokazały, że przepływ wody indukowany ciśnieniem osmotycznym nie prowadzi do powstania specyficznego oddziaływania, a wartość zmiany entalpii molowej jest o rząd niższa od tej wyznaczonej dla pomiarów z jonami askorbinowymi.

W kolejnym kroku wykonano pomiary z wykorzystaniem DHA. Przykładowy termogram, w formie pojedynczego nastrzyku, umożliwiające lepsze porównanie danych rzeczywistych, przedstawiono na Wykresie 13.6. Panel (a) prezentuje wyniki, które przedstawiono już wcześniej w formie kompletnego termogramu (Wykres 13.1), natomiast na panelu (b) znajdują się dane rzeczywiste odpowiadające miareczkowaniu 1 mM liposomów do 1 mM DHA. W przypadku tych pomiarów nie zaobserwowano charakterystycznego kształtu na termogramach w porównaniu do rezultatów dotyczących oddziaływań z jonami askorbinowymi. Wartość zmiany entalpii molowej dla pojedynczego nastrzyku, po odjęciu odpowiednich wartości odpowiadających pomiarom kontrolnym, wynosiła



Wykres 13.6: Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 10 mM askorbinianu sodu, (b) 1 mM DHA dla pojedynczego nastrzyku. Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μl.

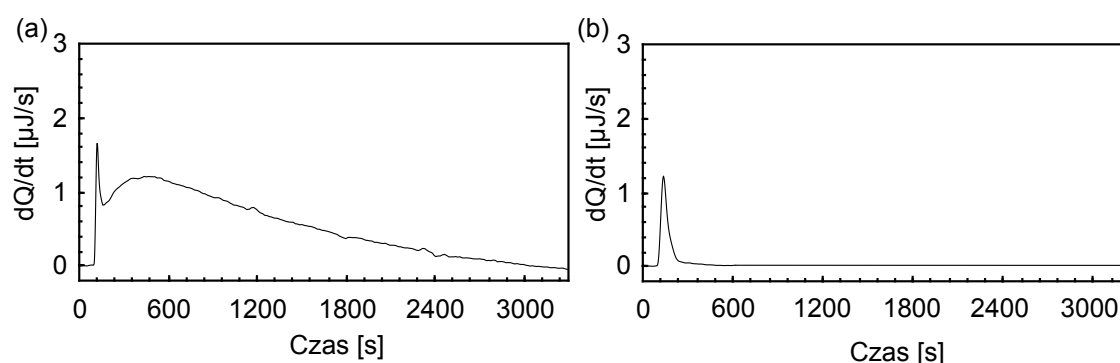
$\Delta H_{\text{mol}} = 7.3 \pm 2.0$ kJ/mol, co różni się o rząd w porównaniu do wartości zmiany entalpii molowej dla oddziaływań z jonami askorbinowymi. Ponadto w tym przypadku dochodzi do zmiany znaku, co związane jest ze zmianą rodzaju oddziaływań z egzotermicznego na endotermiczny. Pokazuje to, że charakter oddziaływań DHA z modelową dwuwarstwą lipidową różni się od tego, gdy w komorze pomiarowej obecne były jony askorbinowe. Pozwala to na wstępne wyeliminowanie wpływu DHA na uzyskane rezultaty.

W celu wykluczenia możliwych zmian topologicznych w liposomach w trakcie pomiarów ITC, zmierzono z wykorzystaniem techniki DLS średni rozkład wielkości tych struktur oraz polidispersyjności przed oraz po pomiarze ITC. Zbiorcze wyniki dla wszystkich kombinacji składu błony lipidowej przedstawiono w Tabeli 13.1. Porównując średni rozkład wielkości struktur w próbkach, uwzględniając to, że uzyskane rezultaty odpowiadają rozkładowi wielkości o określonej szerokości rozkładu, nie ma statystycznie istotnej różnicy pomiędzy mierzonymi parametrami przed oraz po pomiarze ITC. Pozwala to stwierdzić, że nie doszło do zmian, które mogłyby wskazywać na agregację lub destabilizację liposomów.

Ze względu na charakterystyczny kształt pojedynczych pików, na Wykresie 13.7 przedstawiono pojedynczy nastrzyk odpowiadający miareczkowaniu liposomów do (a) jonów

Tabela 13.1: Średni rozkład wielkości liposomów (d_{sr}) \pm szerokość rozkładu indeksu polidispersyjności oraz polidispersyjność (PDI) przed pomiarem ITC oraz po pomiarze dla liposomów o różnym składzie lipidowym.

Próbka	Przed pomiarem		Po pomiarze	
	d_{sr} [nm]	PDI	d_{sr} [nm]	PDI
DOPC pH 7.4	141 \pm 35	0.07 \pm 0.01	137 \pm 43	0.09 \pm 0.03
DOPC pH 4.2	119 \pm 30	0.05 \pm 0.03	121 \pm 32	0.07 \pm 0.01
DOPC + 30% mol chol	128 \pm 34	0.07 \pm 0.04	122 \pm 33	0.08 \pm 0.03
DOPC + 15% mol DOPE	129 \pm 34	0.05 \pm 0.01	135 \pm 45	0.14 \pm 0.02
DOPC + 15% mol DOPS	119 \pm 31	0.09 \pm 0.01	113 \pm 36	0.13 \pm 0.01
DPPC 25°C	106 \pm 30	0.08 \pm 0.02	125 \pm 40	0.20 \pm 0.02
DPPC 45°C	110 \pm 32	0.10 \pm 0.02	105 \pm 32	0.08 \pm 0.01



Wykres 13.7: Termogramy prezentujące dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 10 mM askorbinianu sodu, (b) buforu (20 mM HEPES, pH 7.4) dla pojedynczego nastrzyku. Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μl .

askorbinowych oraz (b) buforu. W przypadku panelu (a) możliwe jest rozróżnienie dwóch procesów — pierwszego, krótszego, trwającego $T_1 = 76 \pm 12$ s oraz dłuższego trwającego $T_1 = 3271 \pm 172$ s. W przypadku pomiarów kontrolnych widoczny jest tylko jeden proces, a czas dochodzenia do równowagi pojedynczego nastrzyku przyjmuje wartości rzędu czasu T_1 . Dlatego na podstawie pomiarów kontrolnych można wnioskować, że pierwszy proces odpowiada ciepłu rozcieńczenia lub wiązaniu się jonów askorbinowych z zewnętrzną warstwą lipidową. Drugi — dłuższy odpowiada redystrybucji jonów askorbinowych w błonie lipidowej [15].

Wstępnie wykonane pomiary kalorymetryczne pozwoliły założyć, że ciepło wydzielone podczas pomiaru wraz z wydłużonym czasem trwania tego procesu jest związane z oddziaływaniem pomiędzy jonami askorbinowymi a dwuwarstwą lipidową, lub redystrybucją tych jonów pomiędzy dwoma fazami wodnymi [15]. W oparciu o najnowsze dane literaturowe, w których wyznaczono eksperymentalnie parametry charakteryzujące witaminę C w kontekście dyfuzji prostej tej cząsteczki przez dwuwarstwą lipidową [142], założono, że uzyskane rezultaty, w szczególności powolny drugi proces, mogą również wskazywać na taki transport tej cząsteczki przez błonę lipidową. Z tego względu uzyskane dane z pomiarów ITC zostały wykorzystane do wyznaczenia parametrów witaminy C związanych z transportem przez dwuwarstwą lipidową — współczynnika przepuszczalności (P) oraz współczynnika podziału błona/woda ($K_{B/W}$). Przed przejściem do części opisującej proces wyznaczenia wymienionych powyżej wielkości omówione zostanie, jak na mierzone oddziaływanie wpływa dobór odpowiedniego stężenia lipidów oraz jonów askorbinowych, skład dwuwarstwy lipidowej, stopień jej uporządkowania oraz pH środowiska wodnego.

13.1 Wpływ stężenia lipidu na mierzone oddziaływania

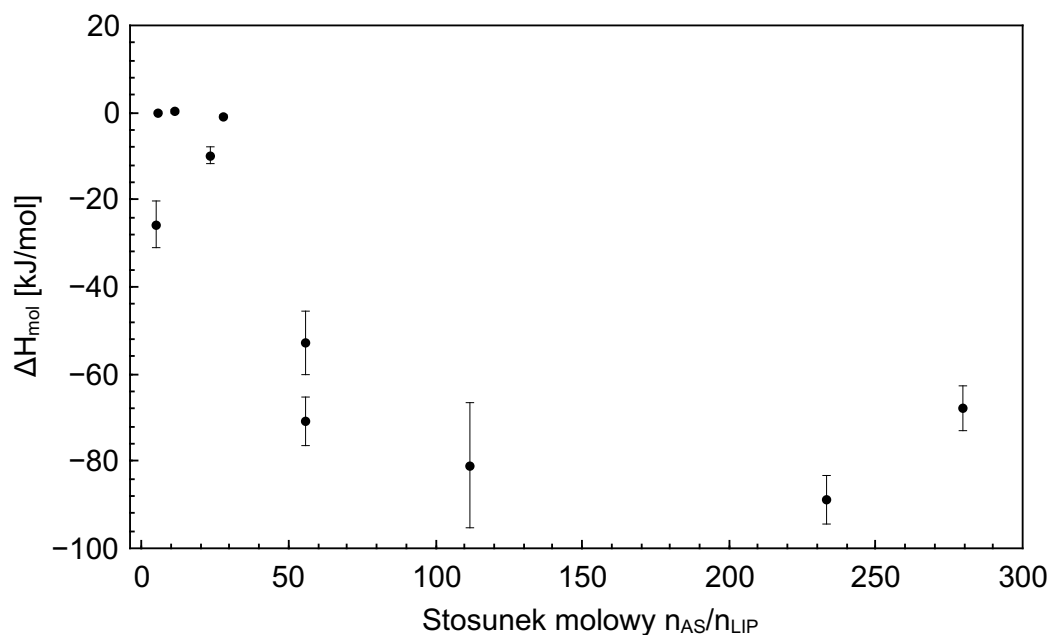
W celu określenia, jak na zaprezentowane w poprzedniej części oddziaływanie pomiędzy jonami askorbinowymi a modelową błoną lipidową wpływa ich stężenie, wykonano

serię pomiarów dla różnego stosunku molowego tych dwóch wielkości. Z uwagi na różnorodność wykonanych pomiarów pod względem stężenia lipidów, stężenia jonów askorbinowych, jak i objętości nastrzyków (która to wpływa na stężenie lipidu) wybrano wielkości, które w jednoznaczny sposób pozwolą ilościowo porównać to, jaki stosunek molowy jonów askorbinowych i lipidów odpowiada określonym oddziaływaniom. W tym celu dla każdego z pomiarów wyznaczono końcowy stosunek molowy jonów askorbinowych i lipidu (n_{AS}/n_{LIP}), a dokładne informacje odnośnie stężeń w każdym z eksperymentów zestawiono w Tabeli 13.2. Na Wykresie 13.8 zaprezentowano, jak zmienia się wartość entalpii molowej ΔH_{mol} odpowiadająca pojedynczemu nastrzykowi w funkcji końcowego stosunku molowego jonów askorbinowych do lipidu w komorze pomiarowej. Na podstawie przedstawionych wyników można zauważyć, że istnieje graniczna wartość stosunku molowego jonów askorbinowych do cząsteczek lipidu. Widoczny jest wzrost wartości entalpii molowej odpowiadającej pojedynczemu nastrzykowi dla wartości tego stosunku większej niż $n_{AS}/n_{LIP} > 55.95$ (w Tabeli 13.2 symbolem gwiazdki oznaczono wartości n_{AS}/n_{LIP} , dla których występuje charakterystyczny kształt termogramu). Oznacza to, że aby doszło do znacznego wydzielienia ciepła na skutek oddziaływania pomiędzy jonami askorbinowymi a błoną lipidową, to na jedną cząsteczkę lipidu musi przypadać co najmniej 56 jonów askorbinowych. Wzrost tego stosunku nie zmienia istotnie statystycznie wartości entalpii molowej. Natomiast dla mniejszego stosunku widoczny jest drastyczny spadek wartości tego parametru. Porównując zarówno uzyskane wartości entalpii molowej, jak i kształt widoczny na zaprezentowanych termogramach (Wykres 13.9), można założyć, że poniżej granicznej wartości n_{AS}/n_{LIP} zachodzące oddziaływania przypominają te, które towarzyszą pomiarom kontrolnym.

Na Wykresie 13.9 zaprezentowano pojedynczy nastrzyk z termogramów, aby podkreślić różnicę w charakterze uzyskanych danych rzeczywistych dla różnego stosunku jonów askorbinowych do lipidu. Panel (a) odpowiada pomiarowi, w którym 1 mM liposomy DOPC były miareczkowane do 20 mM askorbinianu sodu ($n_{AS}/n_{LIP} = 111.9$). Widoczny

Tabela 13.2: Zestawienie stężenia askorbinianu sodu, lipidów, objętości nastrzyków oraz końcowego stosunku molowego jonów askorbinowych oraz lipidów (n_{AS}/n_{LIP}) w komorze pomiarowej.

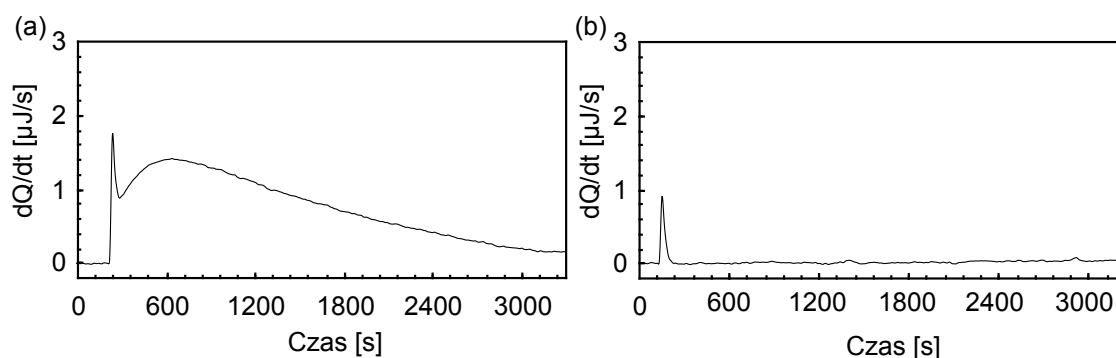
Stężenie askorbinianu sodu	Stężenie lipidów	Objętość nastrzyku	n_{AS}/n_{LIP}
1 mM	1 mM	40 μ l	4.66
50 mM	50 mM	10 μ l	5.59
10 mM	20 mM	20 μ l	11.19
1 mM	5 mM	40 μ l	23.31
10 mM	50 mM	50 μ l	27.97
10 mM	50 mM	50 μ l	27.97
1 mM	10 mM	10 μ l i 20 μ l	55.95*
1 mM	20 mM	20 μ l	111.90*
1 mM	50 mM	40 μ l	233.12*
1 mM	50 mM	50 μ l	279.75*



Wykres 13.8: Zmiana entalpii molowej (ΔH_{mol}) odpowiadającej pojedynczemu nastrzykowi w funkcji końcowego stosunku jonów askorbinowych i lipidów (n_{AS}/n_{LIP}) w komorze pomiarowej.

jest charakterystyczny kształt odpowiadający dwóm procesom oraz długi czas dochodzenia do równowagi. Natomiast na panelu (b), który prezentuje dane rzeczywiste dla miareczkowania 10 mM liposomów DOPC do 20 mM askorbinianu sodu ($n_{AS}/n_{LIP} = 11.9$) kształt, czas dochodzenia do równowagi, jak i wspomniana wcześniej wartość wydzielonego ciepła, jest zbliżona do pomiarów kontrolnych.

Podsumowując rezultaty uzyskane w tej części pracy pozwoliły one wyznaczyć graniczny stosunek jonów askorbinowych do cząsteczek lipidu, powyżej którego dochodzi do wysokoenergetycznych oddziaływań. W przypadku pomiarów w pH 7.4, wynosi on $n_{AS}/n_{LIP} > 55.95$, co oznacza, że konieczne jest duże stężenie jonów askorbinowych, aby

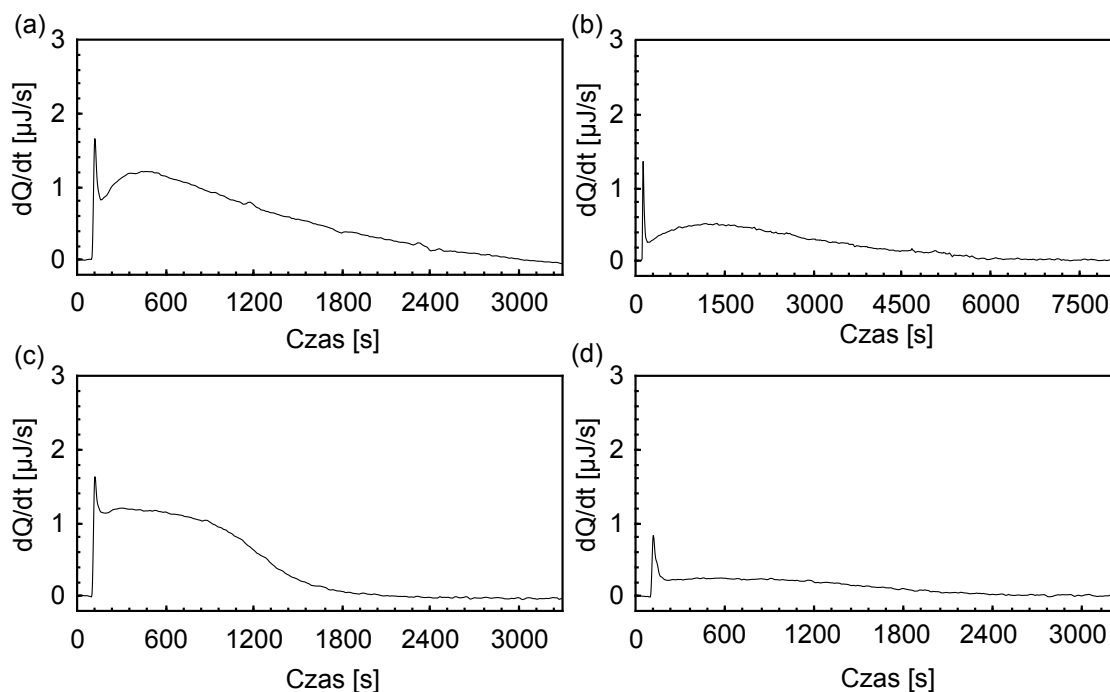


Wykres 13.9: Termogramy prezentujące dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 20 mM askorbinianu sodu, (b) 10 mM liposomów DOPC do 20 mM askorbinianu sodu dla pojedynczego nastrzyku (bufor 20 mM Hepes pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μ l.

można było je obserwować. Wyznaczenie tej wielkości pozwoliło dobrać odpowiednie wartości stężeń do dalszych badań.

13.2 Wpływ składu dwuwarstwy lipidowej na mierzone oddziaływania

W tej części pomiary przeprowadzono analogicznie jak wcześniej, jednak zmianie uległ skład lipidów budujących modelową dwuwarstwę lipidową. Na podstawie rezultatów z poprzedniego podrozdziału, do pomiarów wybrano stałe stężenie lipidów ($c_{LIP} = 1 \text{ mM}$), askorbinianu sodu ($c_{AS} = 10 \text{ mM}$) oraz objętość nastrzyków ($20 \mu\text{l}$). Do badań wybrano lipidy, które stanowią istotną frakcję tych budujących błonę komórkową, są niezbędne do jej prawidłowego funkcjonowania, a oprócz tego wpływają na jej właściwości fizykochemiczne. W pomiarach wykorzystano należący do grupy steroli cholesterol, który wpływa na takie parametry błony lipidowej, jak przepuszczalność, czy jej uporządkowanie [24] oraz fosfolipidy DOPE i DOPS. DOPE charakteryzuje się inną geometrią kształtu od głównego lipidu wykorzystanego w badaniach (DOPC), co wpływa na organizację dwuwarstwy lipidowej, natomiast DOPS jest lipidem o ujemnym ładunku, co pozwala określić, jak ten parametr wpłynie na mierzone oddziaływania [37].

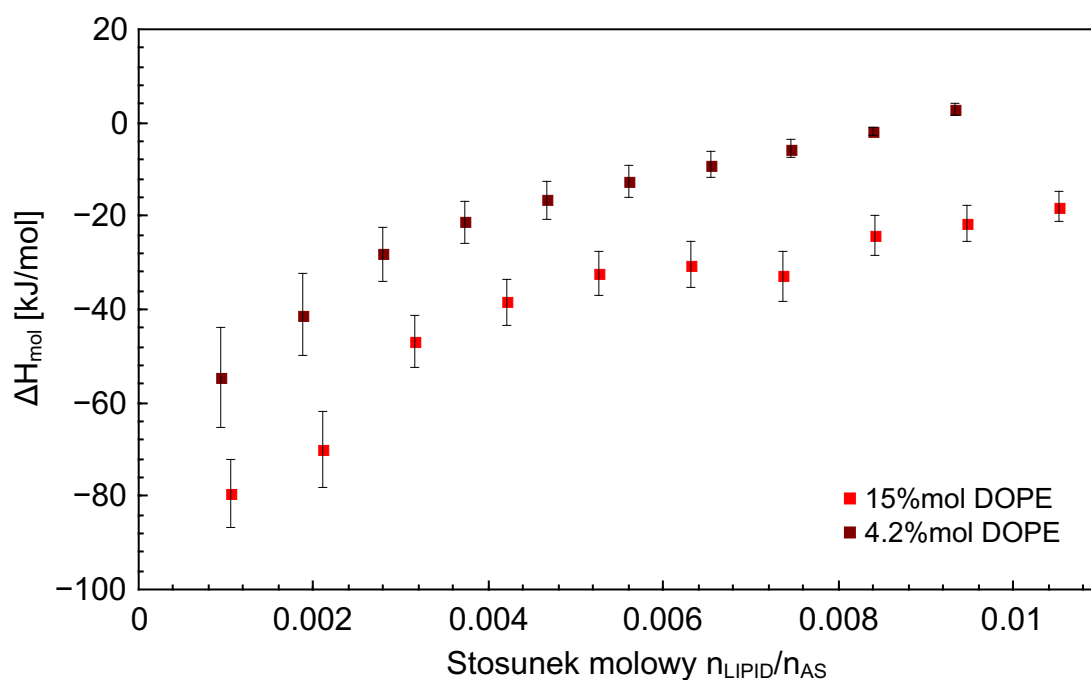


Wykres 13.10: Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 1 mM liposomów DOPC, (b) 1 mM liposomów DOPC + 30% mol chol, (c) 1 mM liposomów DOPC + 15% mol DOPE, (d) 1 mM DOPC + 15% mol DOPS do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM HEPES, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C , prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, 8000 s w przypadku DOPC + 30% mol chol, objętość nastrzyku: $20 \mu\text{l}$. Dane zaprezentowane dla pojedynczego nastrzyku.

Wyznaczone zostały takie wielkości, jak zmiana entalpii molowej odpowiadająca pojedynczemu nastrzykowi, entalpia kumulatywna, czas dochodzenia do równowagi, jak i porównano kształt pojedynczych pików odpowiadający pojedynczemu nastrzykowi. Prezentację wyników rozpoczęto od omówienia termogramu pokazanego wcześniej dla podstawowej błony lipidowej wybranej w prowadzonych badaniach — DOPC oraz pomiaru kontrolnego (Wykres 13.7). Na Wykresie 13.10 zaprezentowano dane rzeczywiste z pomiaru ITC w postaci pojedynczego nastrzyku dla czterech wariantów składu dwuwarstwy lipidowej.

W celu ułatwienia analizy oraz porównania uzyskanych rezultatów przedstawiono dane rzeczywiste prezentujące pojedynczy nastrzyk z każdego pomiaru. Zauważalna jest różnica w kształcie pików na zaprezentowanych termogramach w zależności od składu błony lipidowej. W przypadku obecności cholesterolu oraz DOPE w składzie dwuwarstwy lipidowej różnica dotyczy części wykresu odpowiadającej drugiemu procesowi (dla którego wyznaczono czas T_2). Dla próbki z cholesterolu widoczne jest wypłaszczenie tej części, natomiast w przypadku DOPE pojawia się lokalne maksimum, które stopniowo dąży do stanu równowagi odpowiadającemu linii bazowej. Największa różnica zauważalna jest w przypadku, gdy w błonie lipidowej obecne jest DOPS. Dochodzi do znacznego zaniku drugiej części procesu. W celu porównania ilościowego tych zmian wyznaczono zmiany entalpii molowej oraz czas dochodzenia do równowagi.

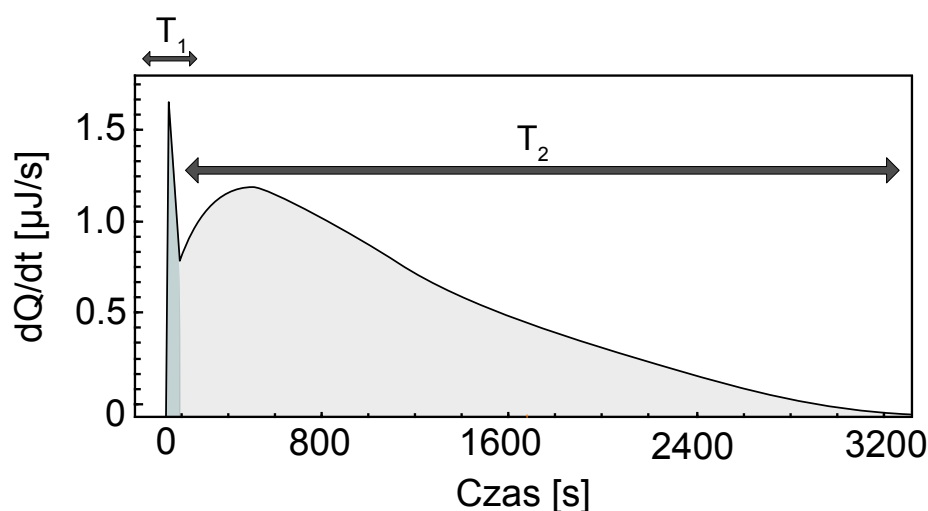
Wartość zmiany entalpii molowej dla podstawowego składu błony lipidowej (DOPC) ($\Delta H_{\text{mol}} = -52.8 \pm 7.3$ kJ/mol) w porównaniu do próbki DOPC + 30% mol chol ($\Delta H_{\text{mol}} = -29.3 \pm 5.1$ kJ/mol) jest dwukrotnie wyższa, co wskazuje na to, że obecność tego sterolu



Wykres 13.11: Zmiana entalpii molowej w funkcji stosunku molowego titrantu — liposomów do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów DOPC + 4.2% mol DOPE (bordowy), DOPC + 15% mol DOPE (czerwony).

w składzie błony lipidowej obniża wartość wydzielonego ciepła podczas oddziaływania z jonami askorbinowymi. W przypadku obecności DOPE w błonie lipidowej wartość zmiany entalpii molowej wzrasta wraz z coraz większą ilością moli lipidu w komorze pomiarowej. Z tego względu na Wykresie 13.11 zaprezentowano, jak zmienia się wartość tej wielkości dla dwóch różnych składów: DOPC + 15% mol DOPE oraz DOPE + 4.2% mol DOPE. Wraz ze zmniejszeniem zawartości DOPE maleje wartość zmiany entalpii molowej, jednak nawet w przypadku, gdy wynosi ona 4.2% mol, jej wartość zmienia się wraz z ilością lipidu. Wartości tej wielkości dla początkowego etapu pomiarów są zbliżone do tych odpowiadających oddziaływaniom jonów askorbinowych z błoną DOPC, natomiast wraz ze wzrostem stężenia lipidu w komorze pomiarowej wartość zmiany entalpii molowej maleje i dąży do wartości, która pojawia się w pomiarach kontrolnych. Wyniki pomiarów dla błony DOPC + 15% mol DOPS różnią się od poprzednich. Wartość zmiany entalpii molowej tylko dla pierwszego nastrzyku przyjmuje wartości ujemne ($\Delta H_{\text{mol}} = -5.7 \pm 2.1$ kJ/mol), natomiast w przypadku kolejnych wartości zmienia się charakter zachodzących oddziaływań w komorze, a średnia wartość zmiany entalpii molowej wynosi $\Delta H_{\text{mol}} = 4.98 \pm 0.8$ kJ/mol. Wynik ten uzyskano po odjęciu odpowiednich wartości zmiany entalpii dla pomiarów kontrolnych, żeby wykluczyć wpływ procesu rozcieńczania na uzyskane rezultaty.

Następnie wyznaczono wartości czasów odpowiadające dwóm procesom opisanym wcześniej — procesowi początkowemu (T_1) oraz drugiemu, dłuższemu (T_2), co schematycznie zaprezentowano na Rys. 13.1. Dane zestawiono w Tabeli 13.3. Pomiędzy średnimi czasami T_1 i T_2 istnieje statystycznie istotna różnica ($N = 3, p < 0.05$), a wartości te różnią się od siebie o dwa rzędy dla każdej z przedstawionych próbek. Chcąc opisać różnice pomiędzy poszczególnymi składami dwuwarstwy lipidowej, należy zwrócić uwagę, że średnia wartość czasu T_2 dla błony DOPC różni się statystycznie istotnie od średnich wartości czasu z pozostałych próbek reprezentujących inny skład lipidowy błony ($N = 3, p < 0.05$). Natomiast czas T_2 dla błony DOPC + 30% mol chol jest prawie dwukrotnie dłuższy od



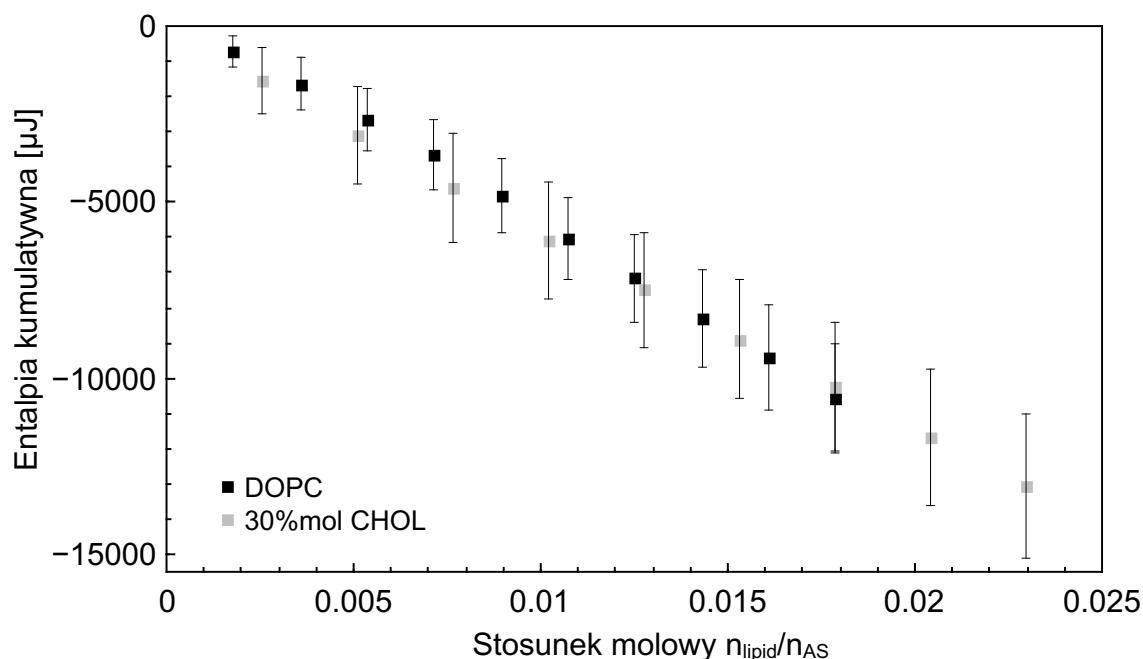
Rysunek 13.1: Schemat przedstawiający obszary na termogramie, które posłużyły do wyznaczenia czasów T_1 oraz T_2 .

Tabela 13.3: Wyznaczony czas T_1 oraz T_2 dla pomiarów kalorymetrycznych badających oddziaływanie z jonami askorbinowymi. Wyniki przedstawiono w formie średniej oraz odchylenia standardowego dla 10 nastrzyków.

Próbka	T_1 [s]	T_2 [s]
DOPC pH 7.4	76 ± 12	3271 ± 172
DOPC + 30% mol chol	71 ± 14	6430 ± 402
DOPC + 15% mol DOPE	99 ± 17	1639 ± 125
DOPC + 4.2% mol DOPE	96 ± 11	1657 ± 401
DOPC + 15% mol DOPS	137 ± 19	2064 ± 231

czasu dla błony DOPC. W przypadku błony z DOPE, bez względu na stosunek molowy tego lipidu widoczne jest prawie dwukrotne skrócenie czasu T_2 . W przypadku liposomów, w których składzie znalazł się lipid DOPS, czas T_2 jest o 23% krótszy niż dla błony DOPC.

W kolejnym kroku porównano wartości entalpii kumulatywnej wyznaczone na podstawie pomiarów oddziaływań pomiędzy jonami askorbinowymi a błoną o różnym składzie lipidowym. Analizę danych rozpoczęto od wyników zaprezentowanych na Wykresie 13.12, gdzie pokazano zmianę entalpii kumulatywnej w funkcji stosunku molowego (n_{lipid}/n_{AS}) dla liposomów DOPC oraz DOPC + 30% mol chol. Nie zauważono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wartościami tej wielkości, dla zaprezentowanych przypadków ($N = 3, p > 0.05$). Wartość entalpii kumulatywnej zarówno dla podstawowej błony DOPC, jak i tej z cholesterolem jest zbliżona i mieści się w granicach niepewności pomiarowej.

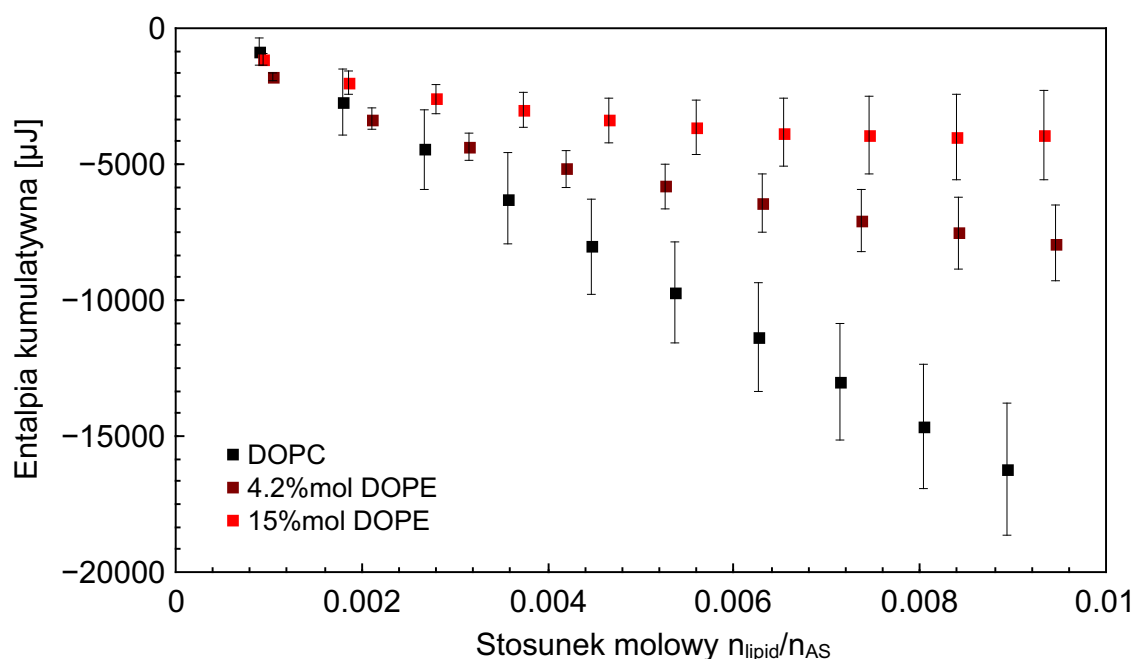


Wykres 13.12: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DOPC + 30% mol chol (szary).

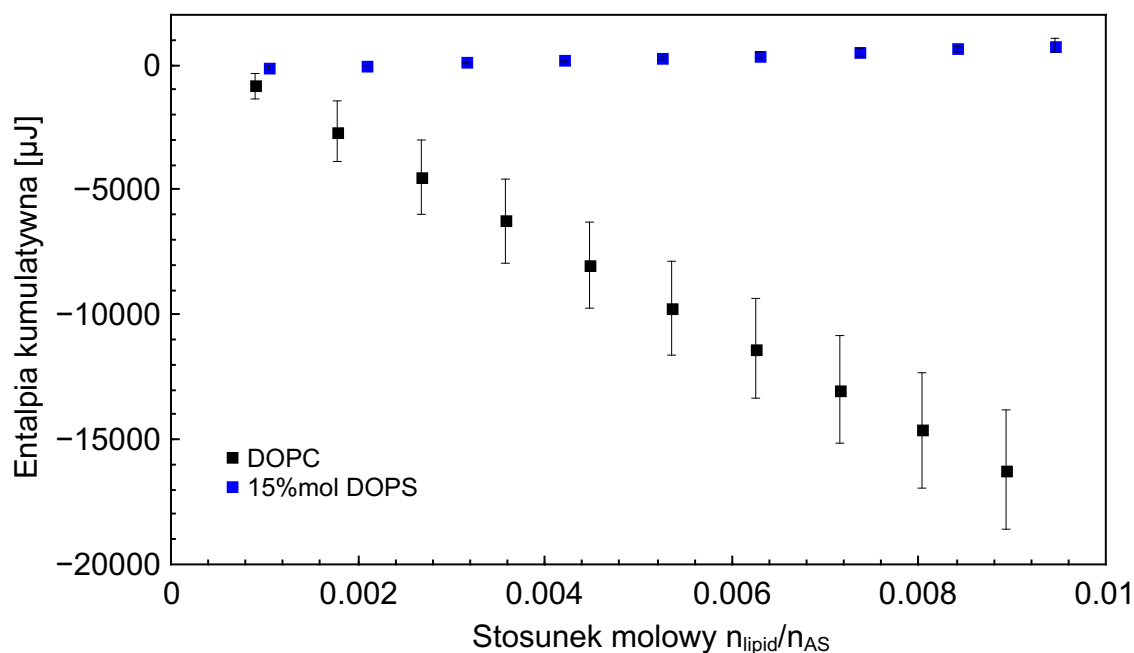
Na Wykresie 13.13 zaprezentowano wyniki dla błony lipidowej DOPC + DOPE (15% mol oraz 4.2% mol). Wraz ze zwiększeniem zawartości DOPE w błonie lipidowej zmniejsza się wartość entalpii kumulatywnej. Co więcej, w przypadku obecności lipidu DOPE, od określonego stosunku molowego ($n_{\text{lipid}}/n_{\text{AS}} = 0.028$) zanika, obecny w przypadku błony DOPC, liniowy wzrost wartości entalpii kumulatywnej w funkcji stosunku molowego. Może to oznaczać, że oddziaływania pomiędzy jonami askorbinowymi a modelem dwuwarstwy lipidowej, w przypadku obecności lipidu DOPE, szybciej zanika i konieczne byłoby zwiększenie liczby cząsteczek askorbinianu w komorze pomiarowej.

Na Wykresie 13.14 zaprezentowano zależność zmiany ciepła kumulatywnego dla błony DOPC + 15% mol DOPS. Pomimo, że na wykresie prezentującym dane rzeczywiste (Wykres 13.10) widoczny jest charakterystyczny kształt odpowiadający długiemu procesowi, to po uwzględnieniu pomiarów kontrolnych entalpia kumulatywna przyjmuje niewielkie dodatnie wielkości, co wskazuje na zmianę charakteru oddziaływań — z egzotermicznych na endotermiczne.

Podsumowując tę część prowadzonych badań, skład dwuwarstwy lipidowej wpływa na oddziaływania występujące pomiędzy jonami askorbinowymi a modelową błoną lipidową. Wykonane pomiary wskazują na to, że pojawiają się istotne różnice w zależności od rodzaju lipidów, z jakich składa się dwuwarstwa lipidowa. W przypadku próbki DOPC + 30% mol chol zauważono ponad dwukrotne wydłużenie czasu T_2 , co może być związane z efektem energetycznym wynikającym z transportu jonów askorbinowych przez dwuwarstwę lipidową lub ich redystrybucją w błonie lipidowej. Biorąc pod uwagę, że sterol ten zwiększa sztywność dwuwarstwy lipidowej, co zmniejsza jej przepuszczalność



Wykres 13.13: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DOPC + 4.2% mol DOPE (bordowy), DOPC + 15% mol DOPE (czerwony).



Wykres 13.14: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny) oraz DOPC + 15% mol DOPS (granatowy).

ści dla molekuł, taka zmiana w czasie T_2 może wskazywać na wolniejszy transport lub redystrybucję jonów askorbinowych w tej strukturze.

W przeciwieństwie do powyższych wyników dla cholesterolu, w przypadku pomiarów z wykorzystaniem lipidu DOPE widoczne jest dwukrotne zmniejszenie czasu T_2 (bez względu na stężenie DOPE) oraz ponad dwukrotny spadek entalpii kumulatywnej wraz z zanikiem liniowego wzrostu tej wielkości w funkcji stosunku molowego n_{lipid}/n_{AS} . Lipid DOPE różni się pod względem geometrii od lipidu DOPC, jak i zachowania w środowisku wodnym ponieważ nie tworzy samoistnie lamelarniej dwuwarstwy lipidowej (preferowana są struktury odwróconej fazy heksagonalnej) [143]. Jego obecność w błonie lipidowej, która makroskopowo tworzy stabilną, lamelarną strukturę, prowadzi do lokalnych zmian w jej uporządkowaniu powiązanych ze zmianą m.in. rozkładu ciśnień w dwuwarstwie lipidowej [143]. Dodatkowo wpływa na mechaniczne i elektryczne właściwości błony lipidowej, co wraz z obecnością grup aminowych w grupach polarnych DOPE umożliwiającymi tworzenie wiązań wodorowych, może wpływać na przepuszczalności oraz oddziaływanie błony lipidowej z otaczającym ją środowiskiem [143]. Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty, zmiana rozkładu ciśnień w dwuwarstwie lipidowej w obecności DOPE — zmniejszenie tego parametru w okolicy grup polarnych oraz zwiększenie w obszarze hydrofobowych łańcuchów alkilowych może wpływać na szybszą redystrybucję jonów askorbinowych w interfazie.

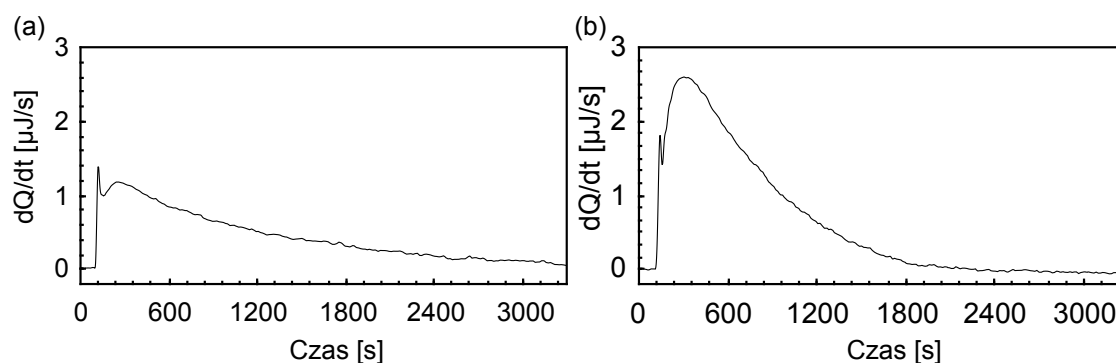
Ostatni lipid, jaki wykorzystano do sprawdzenia jak wpływa na mierzone oddziaływania, to ujemnie naładowana DOPS. Rezultaty, jakie uzyskano znacznie różnią się od pozostałych próbek o innym składzie lipidowym. W przypadku pomiarów dla DOPC + 15% mol

DOPS zmienił się charakter oddziaływań, co może być związane z tym, że doszło do absorpcji jonów askorbinowych na powierzchni ujemnie naładowanej błony lipidowej.

13.3 Wpływ uporządkowania dwuwarstwy lipidowej na mierzone oddziaływania

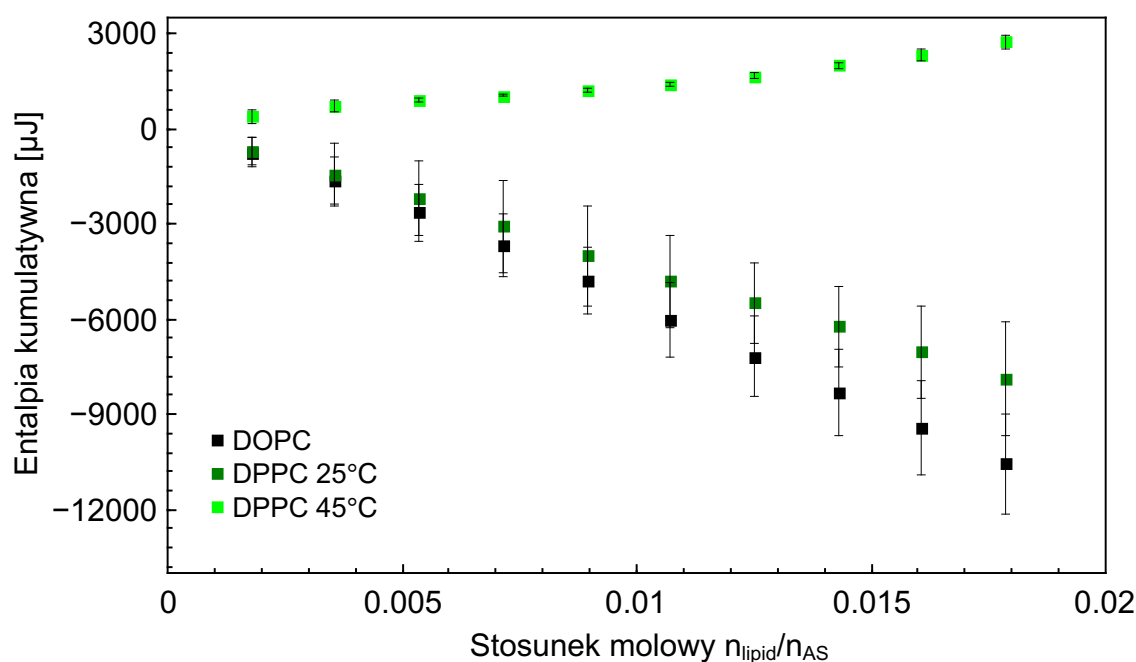
W celu określenia jak uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej wpływa na oddziaływanie pomiędzy jonami askorbinowymi a dwuwarstwą lipidową, wykonano pomiary ITC z wykorzystaniem lipidu DPPC. Ze względu na temperaturę przejścia fazowego tego lipidu wynoszącą $T_{\alpha} = 41.5^{\circ}\text{C}$ możliwe było przeprowadzenie badań z wykorzystaniem modelu błony lipidowej w fazie żelowej (25°C) oraz ciekłokrystalicznej (45°C). Miało to na celu określić, jak zmienne właściwości błony lipidowej o różnym stopniu uporządkowania wpływają na możliwe oddziaływania.

Na Wykresie 13.15 zaprezentowano, jak w poprzednich rozdziałach, dane rzeczywiste dla pojedynczych nastrojków pokazujące charakterystyczny kształt. Zarówno w jednym, jak i drugim przypadku można go powiązać z wcześniej opisanymi procesami — krótszym związanym z ciepłem rozcieńczania oraz dłuższym powiązanym z możliwym oddziaływaniem jonów askorbinowych z dwuwarstwą lipidową. Porównując jakościowo obydwa termogramy, widoczny jest wzrost lokalnego maksimum, odpowiadającemu drugiemu procesowi dla pomiarów w temperaturze 45°C . Wyznaczona zmiana entalpii molarowej wynosiła $\Delta H_{\text{mol}} = -37.3 \pm 3.6 \text{ kJ/mol}$ dla pomiarów w temperaturze 25°C oraz $\Delta H_{\text{mol}} = 11.0 \pm 6.4 \text{ kJ/mol}$ w temperaturze 45°C . Rezultat uzyskany dla niższej temperatury jest tego samego rzędu, co w przypadku pomiarów z błoną DOPC. Możliwe różnice mogą wynikać z innego składu lipidowego, jak i uporządkowania błony lipidowej. Dwuwarstwa lipidowa składająca się z lipidów DPPC w temperaturze 25°C znajdowała się w fazie żelowej, natomiast z DOPC w fazie ciekłokrystalicznej.



Wykres 13.15: Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania 1 mM liposomów DPPC w temperaturze: (a) 25°C , (b) 45°C do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C lub 45°C , prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrojki: 3500 s. Dane zaprezentowane dla pojedynczego nastrojki.

W przypadku pomiarów w temperaturze 45°C, na podstawie wartości zmiany entalpii molowej, można założyć, że mierzone oddziaływania mają charakter endotermiczny. Jednak dane rzeczywiste — kształt pojedynczych nastrzyków, wskazują na oddziaływanie analogiczne, jak dla pozostałych pomiarów, dopiero wyliczone wartości zmiany entalpii sugerują, że proces, jaki zaszedł w komorze różni się i ma endotermiczny charakter. Wymaga to analizy tego, co mogło wpłynąć na taki rezultat. Oprócz różnic w właściwościach występujących pomiędzy dwuwarstwą lipidową w fazie żelowej oraz ciekłokrystalicznej, dochodzi tutaj problem związany ze stabilnością askorbinianu sodu w podwyższonej temperaturze. Związek ten jest niezwykle czuły na warunki środowiska i łatwo dochodzi do jego destabilizacji oraz rozpadu [1]. Widoczne jest to w pomiarach kontrolnych, gdzie do 10 mM askorbinianu sodu miareczkowany był bufor (20 mM Hepes, pH 7.4) w dwóch różnych temperaturach. Wartość zmiany entalpii molowej na nastrzyk w przypadku pomiarów kontrolnych wynosiła $H_{\text{mol}} = -0.17 \pm 0.05$ kJ/mol dla 25°C oraz $H_{\text{mol}} = 2.37 \pm 0.6$ kJ/mol dla 45°C, co daje ponad dziesięciokrotną różnicę i znacząco wpływa na uzyskane rezultaty, co pokazano również na Wykresie 13.16. Zaprezentowano tutaj zmianę ciepła kumulatywnego dla trzech przypadków — pomiarów wstępnych z błoną DOPC oraz dwóch omawianych w tym rozdziale, czyli z błoną DPPC dla dwóch różnych temperatur. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że nie ma istotnej różnicy pomiędzy ciepłem kumulatywnym dla błony DOPC oraz DPPC w 25°C. W przypadku pomiarów w temperaturze 45°C widoczna jest wspomniana zmiana w charakterze oddziaływań, na co, jak opisano wcześniej, mogła mieć wpływ stabilność askorbinianu sodu w podwyższonej temperaturze. Biorąc pod uwagę, że podczas wykonywania pomiarów kontrolnych



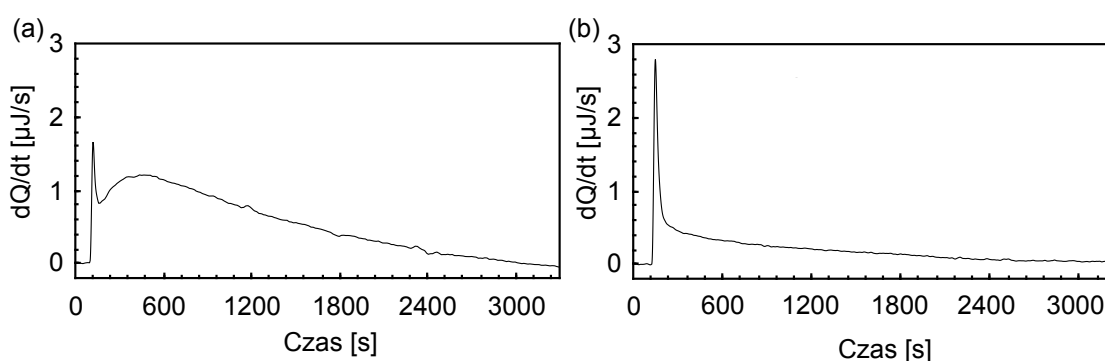
Wykres 13.16: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DPPC 25°C (ciemnozielony), DPPC 45°C (jasnozielony).

z jednym z produktów rozpadu askorbinianu sodu — DHA, uzyskano również wartości zmiany entalpii molowej, które wskazywały na oddziaływania endotermiczne i możliwe wiązanie z powierzchnią błony lipidowej.

Podsumowując uzyskane rezultaty, na podstawie przeprowadzonych badań nie można stwierdzić jednoznacznie, czy stan uporządkowania dwuwarstwy lipidowej ma znaczenie w kontekście mierzonych oddziaływań. Porównując wyniki dla błony DOPC (faza ciekłokrystaliczna) oraz błony DPPC (faza żelowa, pomiar w 25°C) uzyskano zbliżone rezultaty, co pozwala założyć, że uporządkowanie hydrofobowej części dwuwarstwy lipidowej z punktu widzenia transportu jonów askorbinowych nie ma znaczenia, a tym samym może wskazywać na to, że oddziaływania zachodzą w interfacie. Wyniki dla pomiarów z błoną DPPC w temperaturze 45°C, nie są jednoznaczne pod kątem oceny, czy na zmianę charakteru oddziaływań wpływa uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej, czy możliwy rozpad jonów askorbinowych. W tym przypadku konieczne byłoby rozszerzenie badań o lipid charakteryzujący się temperaturą przejścia fazowego, dla której pomiar mieściłby się w możliwościach technicznych urządzenia oraz nie wpływał na stabilności jonów askorbinowych.

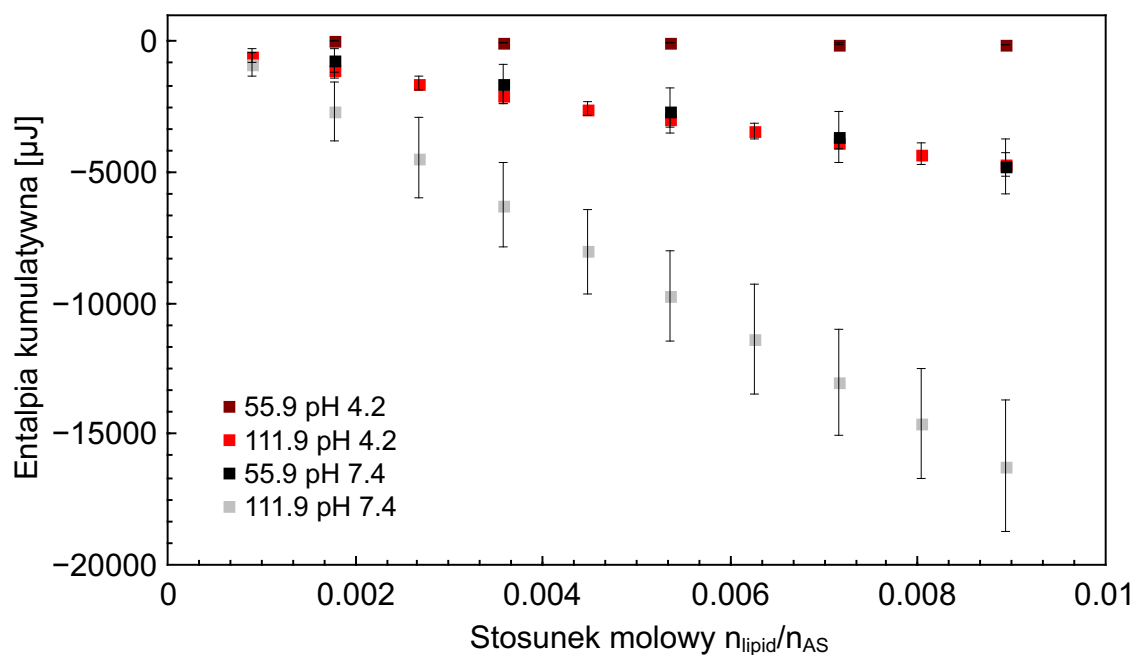
13.4 Wpływ pH środowiska wodnego na mierzone oddziaływania

Witamina C w organizmie człowieka, przy założeniu wartości fizjologicznej pH 7.4, występuje w większości w formie jonów askorbinowych [1]. Aby sprawdzić, czy pH środowiska wodnego wpływa na oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową, wykonano pomiary dla wartości pH równej $pK_{a1} = 4.2$. Dla tej wartości pH kwas askorbinowy w 47.64% występuje w formie uprotonowanej, natomiast w 52.23% w formie jonów askorbinowych (wartości uzyskano przy użyciu kalkulatora Chemicalize).



Wykres 13.17: Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 1 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM HEPES, pH 7.4), (b) 0.5 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 100 mM octanowy, pH 4.2). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μ l. Dane zaprezentowane dla pojedynczego nastrzyku.

Na Wykresie 13.17 zaprezentowano dane odpowiadające pojedynczym nastrożkom dla pomiarów z wykorzystaniem błony DOPC w pH fizjologicznym oraz równym pK_{a1} (pH 4.2). Widoczna jest różnica w kształcie termogramów, w przypadku niższego pH nie widać tak znacznego lokalnego maksimum i nie są rozróżnialne dwa procesy widoczne dla pH 7.4. Pomiar w pH 4.2 wykonano dla dwóch różnych stosunków molowych jonów askorbinowych do lipidów ($n_{AS}/n_{LIP} = 55.9$ oraz 111.9) w celu sprawdzenia, czy wyznaczona wcześniej graniczna wartość n_{AS}/n_{LIP} w niższym pH oraz dla innego składu próbki pod względem form kwasu askorbinowego będzie wskazywała na wysokoenergetyczne oddziaływania. Wartość zmiany entalpii molowej wynosiła $H_{mol} = -0.3 \pm 1.2$ kJ/mol dla $n_{AS}/n_{LIP} = 55.9$ oraz $H_{mol} = -23.54 \pm 2.7$ kJ/mol dla $n_{AS}/n_{LIP} = 111.9$, co oznacza, że aby zaszło oddziaływanie pomiędzy formami witaminy C obecnymi w komorze pomiarowej a modelową błoną lipidową, konieczny jest dwa razy większy stosunek n_{AS}/n_{LIP} . Ze względu na to, że dla tej wartości pH tylko 50% obecnej formy witaminy C stanowią jony askorbinowe, a pozostałą część forma uprotonowana w postaci kwasu askorbinowego można założyć, że to jony askorbinowe odpowiadają za zmierzony, znaczny efekt energetyczny w komorze pomiarowej. W celu ilościowego porównania uzyskanych rezultatów wyznaczono ciepło kumulatywne dla różnego stosunku molowego lipidów do askorbinianu sodu, co zestawiono na Wykresie 13.18. Dane na wykresie, dla ułatwienia porównania, opisano końcowym stosunkiem molowym askorbinianu sodu do lipidu (n_{AS}/n_{LIP}), który szerzej opisano w Podrozdziale 13.1. Również ten wykres pokazuje, że w przypadku pH 4.2 konieczne jest dwa razy większe stężenie askorbinianu sodu, aby uzyskać podobną



Wykres 13.18: Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC w pH 7.4 (czarny, szary) oraz pH 4.2 (bordowy, czerwony).

wartość ciepła kumulatywnego dla zadanego stosunku jonów askorbinowych do lipidu, jak w pH 7.4.

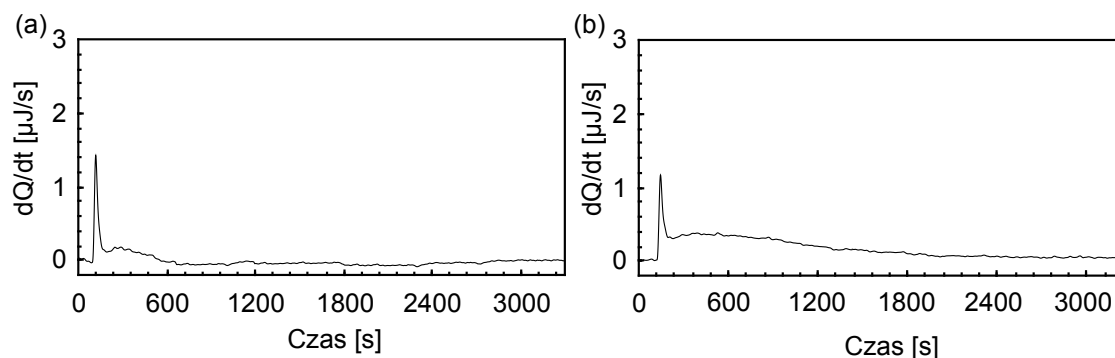
13.5 Porównanie mierzonych oddziaływań z innymi molekułami

W celu sprawdzenia, czy uzyskane rezultaty są charakterystyczne dla oddziaływań pomiędzy jonami askorbinowymi a błoną lipidową, wykonano dodatkowe pomiary z wykorzystaniem innych cząsteczek. Wybrano molekuly hydrofilowe, które są transportowane przez błonę komórkową na drodze dyfuzji prostej. Pomiary wykonano poprzez miareczkowanie liposomów o określonym stężeniu lipidu (DPPC) do komory pomiarowej, w której znajdował się roztwór wybranych molekuł. Ze względu na hydrofilowy charakter witaminy C oraz założenie, że cząsteczka ta może przechodzić przez błonę lipidową na drodze dyfuzji prostej, do porównania wybrano cząsteczki o podobnych właściwościach. Parametry każdej z nich, takie jak masę cząsteczkową, logarytm z współczynnika podziału oktanol/woda ($\log(K_{O/W})$), wartość pH odpowiadającą punktom pK oraz pole powierzchni polarnej zestawiono w Tabeli 13.4.

Molekuly hydrofilowe oprócz ich możliwego transportu przez błonę lipidową wpływają również na właściwości fizykochemiczne tej struktury. Mocznik i glicerol pełnią rolę czynników chroniących błonę komórkową przed działaniem stresu osmotycznego poprzez obniżenie potencjału chemicznego wody, który może prowadzić do szkodliwych procesów takich, jak fuzja błon, wyciekanie zawartości komórki, przejścia fazowe w błonie komórkowej [149]. Pokazano również, że obecność mocznika zapobiega przejściom termodynamicznym z fazy ciekłokrystalicznej do żelowej błony lipidowej w stanie dehydratacji, oraz że zarówno mocznik, jak i glicerol stabilizują błonę lipidową w fazie ciekłokrystalicznej [149]. Natomiast, przy użyciu modelu opartego o monowarsty lipidowe pokazano, że glicerol usztywnia błonę lipidową [150], a glikol propylenowy destabilizuje jej lamelną strukturę w temperaturze powyżej przejścia fazowego [151]. Z tych względów wybrano te cząsteczki, jako punkt odniesienia do pomiarów z jonami askorbi-

Tabela 13.4: Zestawienie prezentujące wybrane właściwości witaminy C, d-sorbitolu, mocznika, glicerolu, glikolu propylenowego.

Molekuła	Masa cząsteczkowa [g/mol]	$\log(K_{O/W})$ -	pK -	Pole powierzchni polarnej [Å ²]
Witamina C [144]	176.12	-1.85	4.2, 11.6	107
D-sorbitol [145]	182.17	-2.20	13.9	121
Mocznik [146]	60.06	-2.11	13.6	69
Glicerol [147]	92.09	-1.76	14.4	61
Glikol propylenowy [148]	76.09	-0.92	14.9	41

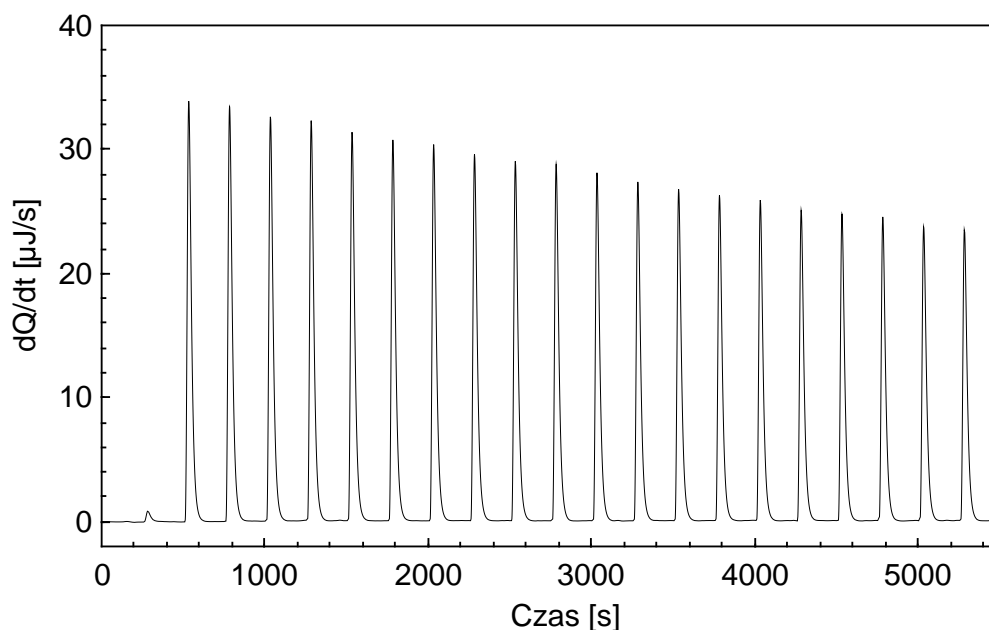


Wykres 13.19: Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 5 mM liposomów DPPC do 10 mM d-sorbitolu, (b) 5 mM liposomów DPPC do 5 mM mocznika (bufor 20 mM Hepses, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 3500 s, objętość nastrzyku: 20 μ l. Dane zaprezentowane dla pojedynczego nastrzyku.

wymi. W tej części zaprezentowane zostaną wyniki pokazujące oddziaływania pomiędzy wybranymi cząsteczkami a modelową błoną lipidową — liposomami.

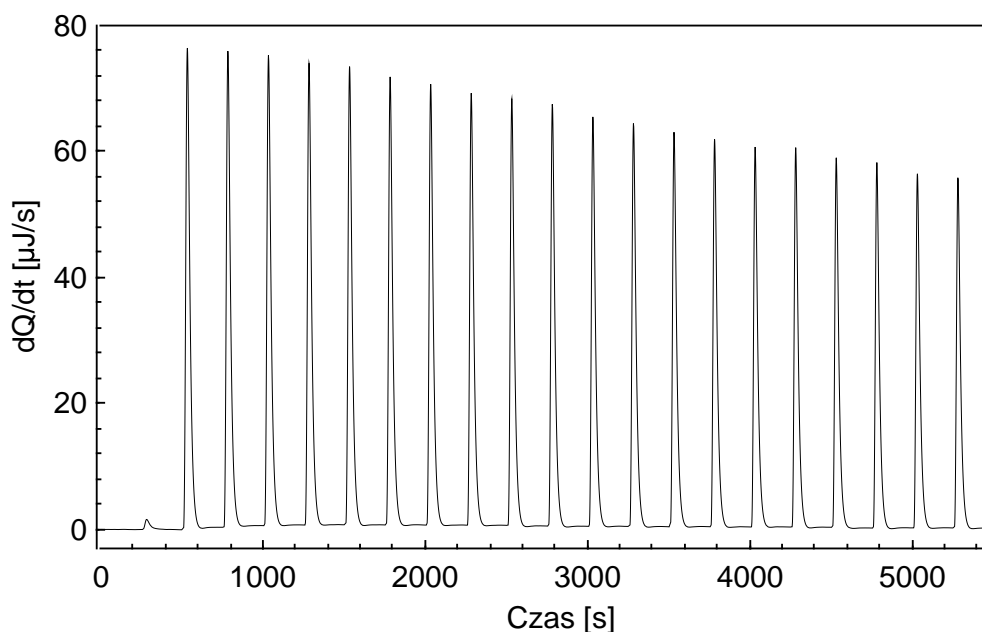
Ze względu na założenie, że charakterystyczny kształt prezentowany na wcześniejszych termogramach może być powiązany z oddziaływaniem jonów askorbinowych i ich transportem na drodze dyfuzji prostej przez błonę lipidową, porównano jak wygląda sygnał dla innych molekuł, które charakteryzują się takim rodzajem transportu. Każdy z pomiarów wykonano zgodnie z procedurą, jak dla jonów askorbinowych, zmieniając tylko roztwór w komorze, a gdy było to konieczne, stężenie lipidu lub cząsteczek znajdujących się w komorze pomiarowej. Na Wykresie 13.19 zaprezentowano dane rzeczywiste dla miareczkowania 5 mM liposomów do 10 mM d-sorbitolu (Panel (a)) lub 5 mM mocznika (Panel (b)). W obydwu przypadkach na termogramach można rozróżnić dwa procesy, jednak sygnał jest mniej intensywny niż w przypadku oddziaływania pomiędzy jonami askorbinowymi a błoną lipidową. W przypadku tych cząsteczek dla innych stosunków molowych nie wykazano oddziaływania różniącego się statystycznie od pomiarów kontrolnych. Wartość zmiany entalpii molowej na nastrzyk dla zaprezentowanych danych wyniosła $\Delta H_{\text{mol}} = -7.4 \pm 1.9$ kJ/mol dla mocznika oraz $\Delta H_{\text{mol}} = -2.0 \pm 0.6$ kJ/mol dla d-sorbitolu, co jest wartością o rząd mniejszą niż wartość dla jonów askorbinowych. Wskazuje to, że oddziaływanie pomiędzy tymi cząsteczkami a błoną lipidową nie jest porównywalne pod względem energetycznym.

W przypadku oddziaływań pomiędzy błoną lipidową a glicerolem oraz glikolem propylenowym nie zauważono analogicznych zmian na termogramie (reprezentatywne dane zaprezentowano na Wykresie 13.20 oraz 13.21). Pomiary wykonano dla różnych stężeń zarówno lipidu, jak i glicerolu/glikolu propylenowego w celu sprawdzenia, czy różny stosunek molowy lipidu do wymienionych cząsteczek wpłynie na rodzaj oddziaływań, jednak nie zauważono takiej zmiany. W przypadku zaprezentowanych termogramów widoczny jest standardowy kształt piku, na podstawie którego nie można wyróżnić dwóch procesów, jak w przypadku oddziaływania z jonami askorbinowymi. Wartość zmiany entalpii przypadający na pojedynczy nastrzyk wyniosła $\Delta H_{\text{mol}} = 0.17 \pm 0.05$ kJ/mol dla

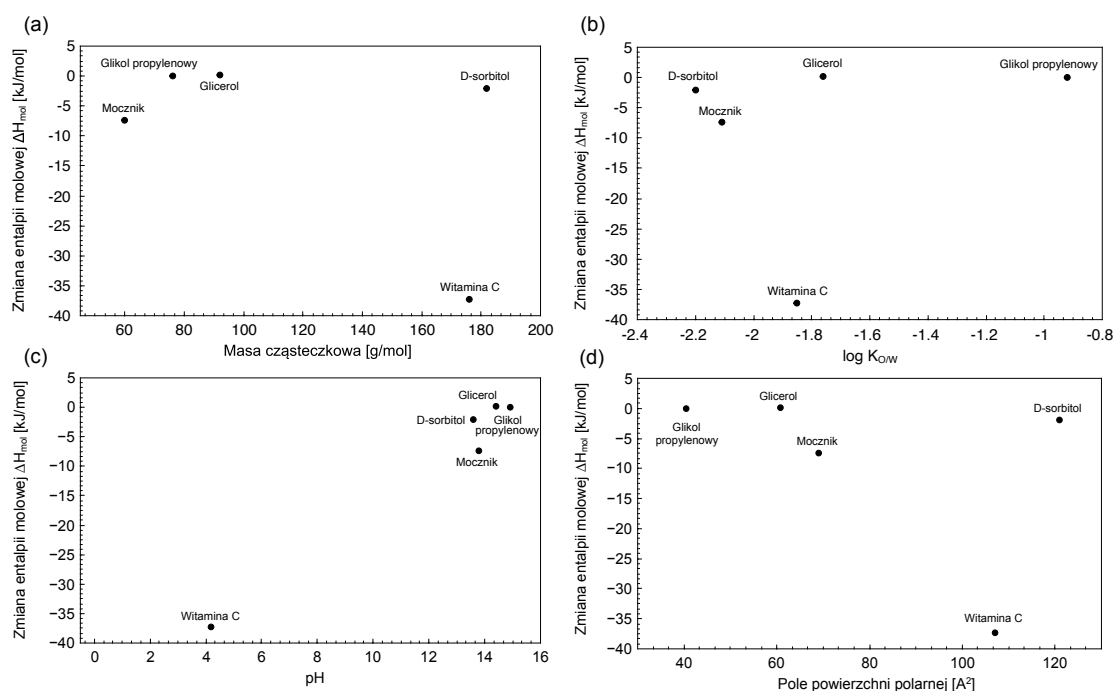


Wykres 13.20: Termogram prezentujący ciepło miareczkowania 5 mM liposomów DPPC do 0.5 mM glicerolu, (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 300 s, objętość nastrzyku: 20 µl.

glicerolu oraz $\Delta H_{\text{mol}} = 0.024 \pm 0.003$ kJ/mol dla glikolu propylenowego, co o dwa rzędy w przypadku glicerolu, oraz trzy rzędy dla glikolu propylenowego różni się względem wartości uzyskanej dla jonów askorbinowych. Pomimo, że dane rzeczywiste w postaci termogramów wskazują na proces egzotermiczny, po odjęciu odpowiednich wartości kontrolnych wyznaczona wartość zmiany entalpii molowej wskazuje na proces endotermiczny.



Wykres 13.21: Termogram prezentujący ciepło miareczkowania 5 mM liposomów DPPC do 0.4 mM glikolu propylenowego, (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4). Parametry pomiarowe urządzenia: 25°C, prędkość obrotów: 250 rpm, czas nastrzyku: 300 s, objętość nastrzyku: 20 µl.



Wykres 13.22: Zestawienie zmiany entalpii molowej ΔH_{mol} w funkcji wybranych właściwości molekuł: (a) masy cząsteczkowej, (b) logarytmu z współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$), (c) wartości pH odpowiadającej punktom pK_a , (d) pola powierzchni polarnej.

Uzyskany rezultat pozwala stwierdzić, że w tym przypadku występują niewielkie oddziaływania z błoną lipidową. Podobieństwo wyników dla glikolu propylenowego oraz glicerolu wynika z podobnej budowy chemicznej tych związków oraz ich wpływu na właściwości dwuwarstwy lipidowej.

W celu porównania uzyskanych wyników z pomiarów ITC na Wykresie 13.22 zestawiono zmianę entalpii molowej w funkcji wybranych właściwości poszczególnych molekuł, zaprezentowanych w Tabeli 13.4. Zestawienie miało na celu określenie, czy któraś z wybranych cech molekuł może zostać powiązana z otrzymanymi rezultatami. Analizując przygotowane zestawienia w przypadku masy cząsteczkowej oraz pola powierzchni polarnej brakuje zależności, która pozwoliłaby stwierdzić, że ΔH_{mol} jest od nich zależna. W przypadku logarytmu z współczynnika podziału oktanol/woda widoczne jest to, że wszystkie hydrofilowe molekuły charakteryzują się mniejszą wartością ΔH_{mol} oprócz witaminy C. Najciekawszy rezultat uzyskano w przypadku zestawienia ΔH_{mol} w funkcji punktów pK wybranych molekuł. Na wykresie zestawiono tylko jedną wartość pK dla witaminy C ($pK_{a1} = 4.2$), warto również podkreślić, że jest ona jedyną z wybranych molekuł, która charakteryzuje się dwoma punktami pK_a , a tym samym większą różnorodnością form jonowych, jakie tworzy w środowisku wodnym. Widoczne jest to, że ΔH_{mol} dla wszystkich molekuł o punkcie $pK_a > 12$ przyjmuje niewielkie wartości bliskie zeru. Ze względu na określony wybór molekuł do pomiarów i brak wyników dla pełnego przekroju różnorodnych cząsteczek nie można mówić tutaj o korelacji w uzyskanych rezultatach, jednak wynik ten jest interesujący i może stanowić punkt wyjściowy do przyszłych prac ba-

dawczych otwierający możliwość stworzenia macierzy korelacji pomiędzy parametrami termodynamicznym uzyskanymi z pomiarów ITC a właściwościami fizykochemicznymi molekuł.

Rozdział 14

Właściwości termodynamiczne dwuwarstwy lipidowej w obecności witaminy C

Podsumowując wyniki opisane w poprzednim rozdziale, pokazujące oddziaływania pomiędzy jonami askorbinowymi a błoną lipidową, konieczne jest zwrócenie uwagi na charakterystyczny sygnał zmiany mocy w funkcji czasu, który zaprezentowano w formie termogramów. Uzyskane rezultaty, w tym wyznaczone wartości zmiany entalpii molowej, jak i entalpii kumulatywnej pozwalają stwierdzić, że pomiędzy modelową błoną lipidową a witaminą C dochodzi do wysokoenergetycznych oddziaływań w porównaniu do pomiarów kontrolnych. Jak wspomniano, wygenerowanie takiego sygnału może wskazywać na redystrybucję tej molekuly w dwuwarstwie lipidowej lub jej transport na drodze dyfuzji prostej.

W tym rozdziale zaprezentowana zostanie analiza danych uzyskanych podczas pomiaru ITC z wykorzystaniem modeli pozwalających wyznaczyć wielkości powiązane z oddziaływaniem molekuł z dwuwarstwą lipidową — współczynnik podziału błona/woda ($K_{B/W}$) oraz współczynnik przepuszczalności (P). Po raz pierwszy wykorzystano model [97] do wyznaczenia współczynnika podziału błona/woda witaminy C w obecności modelowej dwuwarstwy lipidowej, oraz przeprowadzono analizę danych uzyskanych podczas pomiarów ITC z wykorzystaniem modeli kinetycznych w celu wyznaczenia współczynnika przepuszczalności (P).

14.1 Współczynnik podziału

Parametrem, który charakteryzuje oddziaływania pomiędzy molekułą a błoną lipidową jest współczynnik podziału błona/woda ($K_{B/W}$). Z wykorzystaniem modelu opisanego w literaturze [97] możliwe jest wyznaczenie tej wielkości na podstawie danych uzyskanych podczas pomiarów techniką ITC, które zaprezentowano w Rozdziale 13. W celu

wyznaczenia współczynnika podziału błona/woda konieczne jest wykorzystanie zależności pomiędzy zmianą entalpii kumulatywnej a stężeniem lipidu [97].

Zgodnie z modelem molowy współczynnik podziału K_m definiowany jest jako:

$$K_m = \frac{c_B}{c_L c_F}, \quad (14.1)$$

gdzie c_B — stężenie molekuł znajdujących się w błonie lipidowej, c_L — stężenie lipidów w próbce, c_F — stężenie molekuł w środowisku wodnym. Podczas pomiaru liposomy o określonym stężeniu lipidów są wstrzykiwane do roztworu wodnego wybranej cząsteczki (znajdującego się w komorze pomiarowej) w serii kilkunastu nastrzyków o wybranej objętości (zazwyczaj 5–20 μl). Z każdym nastrzykiem w komorze dochodzi do oddziaływań pomiędzy cząsteczkami a błoną lipidową, z którymi powiązane jest ciepło reakcji (δh_i). W idealnej sytuacji wraz z coraz to większą ilością moli lipidu w komorze ciepło reakcji powinno maleć ze względu na coraz to mniejszą liczbę cząsteczek, które mogą związać się z błoną [97]. Wykres prezentujący ciepło reakcji dla każdego nastrzyku lub ciepła kumulatywnego w funkcji stężenia lipidu (c_L) umożliwi wyznaczenie molowego współczynnika podziału K_m oraz ciepła oddziaływania (ΔH_D). Poniżej znajduje się zależność pomiędzy kumulatywnym ciepłem reakcji a powyższymi wielkościami:

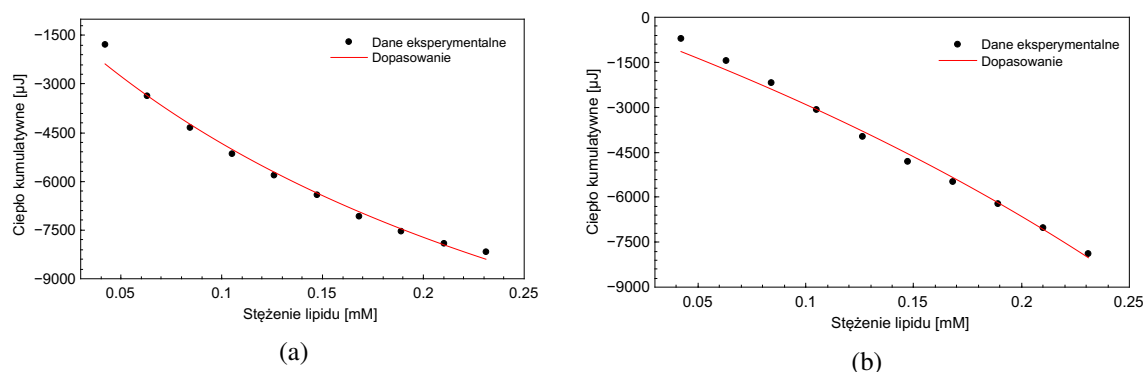
$$\sum_{k=1}^i \delta h_k = \Delta H_D V_{\text{kom}} c_D^0 \frac{K_m c_L^0}{1 + K_m c_L^0}, \quad (14.2)$$

gdzie V_{kom} — objętość komory pomiarowej (1.014 ml), c_D^0 — stężenie molekuł w komorze pomiarowej, c_L^0 — stężenie lipidów w komorze po i -tym nastrzyku. K_m jest powiązany ze współczynnikiem podziału $K_{B/W}$ poprzez zależność:

$$K_m = \frac{K_{B/W}}{c_W} \left(1 + \frac{c_B}{c_L} \right), \quad (14.3)$$

gdzie c_W — stężenie molowe wody równe 55.5 M [97]. Po dopasowaniu Równania (14.2) do danych rzeczywistych prezentujących entalpię kumulatywną w funkcji stężenia lipidu możliwe jest wyznaczenie K_m .

Wyznaczenie współczynnika podziału $K_{B/W}$ z wykorzystaniem przedstawionego powyżej modelu wymagało uzyskania zależności zmiany entalpii kumulatywnej w funkcji stężenia lipidu, oraz dopasowania do niej funkcji opisanej przez Równanie (14.2). Przykładowe zależności dla dwóch wybranych rodzajów błony — DOPC + 15% mol DOPE oraz DPPC (pomiar dla 25°C) wraz z dopasowaniem zaprezentowano na Wykresie 14.1. Współczynnik podziału $K_{B/W}$ wyznaczono dla jonów askorbinowych w obecności błony lipidowej o różnym składzie, uporządkowaniu oraz pH środowiska wodnego. Rezultaty zaprezentowano w Tabeli 14.1. Porównując pomiędzy sobą wartości wyznaczonego współczynnika podziału ($K_{B/W}$) dla próbki z liposomami DOPC z pozostałymi wariantami pomiarowymi, nie zauważono statystycznie istotnej różnicy ($N = 3, p > 0.05$).



Wykres 14.1: Reprezentatywne wyniki przedstawiające ciepło kumulatywne w funkcji stężenia lipidu wraz z dopasowaniem funkcją (Równanie (14.2)). Zależności dla (a) 1mM liposomów DOPC + 15% mol DOPE, (b) 1mM liposomów DPPC w temperaturze 25°C miareczkowanych do 10 mM askorbinianu sodu.

Najbardziej istotny wniosek z uzyskanych wyników jest taki, że wartość współczynnika podziału błona/woda ($K_{B/W}$) różni się od danych literaturowych. Współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$) w zależności od metody, jaką został wyznaczony przyjmuje wartości od -2.86 do -4.4 [17]. Pomimo znacznej rozbieżności danych literaturowych wskazują one jednoznacznie na większe powinowactwo tej molekuly do środowiska polarnego. Natomiast wyniki uzyskane w prowadzonych badaniach z wykorzystaniem modelowej dwuwarstwy lipidowej wskazują na jej większe powinowactwo do środowiska niepolarnego — błony lipidowej, co znacznie wpływa na zdolność do przechodzenia przez błonę lipidową na drodze dyfuzji prostej. Wynik ten jest interesujący, ponieważ pozwala postawić hipotezę, że witamina C jest kolejnym przykładem cząsteczki, która nie spełnia zasady Overtona. Potwierdzają to również obliczenia przedstawione w publikacji [17], gdzie korzystając z zasady Overtona wyliczono współczynniki przepuszczalności w oparciu o dostępne w literaturze wartości współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$). Zaprezentowane rezultaty nie były zgodne z wartościami współczynnika przepuszczalności wyznaczonymi na podstawie danych eksperymentalnych z wykorzystaniem modelowych błon lipidowych [15, 17]. Uzyskane wyniki mogą prowadzić do stwierdzenia, że współczynnik podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$) nie jest dobrym parametrem w kontekście oddziaływania

Tabela 14.1: Zestawienie logarytmu ze współczynnika podziału, $\log(K_{B/W})$, dla jonów askorbinyowych dla liposomów o różnym składzie lipidowym.

Próbka	$\log(K_{B/W})$
DOPC pH 7.4	3.3 ± 0.5
DOPC pH 4.2	2.7 ± 0.6
DOPC + 30% mol chol	2.9 ± 0.9
DOPC + 15% mol DOPE	3.3 ± 0.6
DOPC + 4.2% mol DOPE	3.6 ± 0.8
DPPC 25°C	3.1 ± 0.7
DPPC 45°C	3.4 ± 0.7

wybranych cząsteczek z dwuwarstwą lipidową, i potwierdzić to, że oktanol nie stanowi dobrego przybliżenia tej struktury [50].

14.2 Współczynnik przepuszczalności

Drugim z parametrów opisującym zachowanie molekuly w obecności dwuwarstwy lipidowej jest współczynnik przepuszczalności (P). Dane uzyskane podczas pomiaru ITC umożliwiły stworzenie modelu, który pozwala na wyznaczenie parametru charakteryzującego molekulę pod względem możliwego transportu przez błonę lipidową. Charakterystyczny kształt termogramów uzyskany podczas pomiarów oddziaływań pomiędzy jonami askorbinowymi a dwuwarstwą lipidową porównano z danymi literaturowymi. W pierwszym kroku zweryfikowano, czy istnieje model pozwalający na wyznaczenie zmiany stężenia jonów askorbinowych w funkcji czasu, związanej z ich możliwym transportem przez błonę lipidową. Ze względu na brak takiego modelu umożliwiającego analizę danych ITC, w kroku drugim porównano uzyskane charakterystyczne kształty termogramów z danymi literaturowymi. Całą metodykę pozwalającą na wyznaczenie zmiany stężenia jonów askorbinowych w funkcji czasu stworzono na podstawie modeli kinetycznych, wykorzystanych do wyznaczenia szybkości reakcji enzymatycznych [130–132].

W celu wyznaczenia współczynnika przepuszczalności molekuly wykorzystano I Prawo Ficka opisujące dyfuzję prostą cząsteczek:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial t}, \quad (14.4)$$

gdzie D — współczynnik dyfuzji, c — stężenie cząsteczek w czasie t . Wykonując odpowiednie podstawienia z wykorzystaniem równań (3.2) i (3.4), otrzymano zależność:

$$\frac{dm}{dt} \frac{1}{A} = P \left(c_{\text{out}} - \frac{m(t)}{V_{\text{lip}}} \right), \quad (14.5)$$

gdzie $m(t)$ — masa cząsteczek w czasie t , A — powierzchnia błony, P — współczynnik przepuszczalności, c_{out} — stężenie na zewnątrz błony, V_{lip} — objętość komórki (w tym przypadku liposomu). Po dalszych przekształceniach otrzymano równanie w postaci:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{PA}{V_{\text{lip}}} \left(\frac{c_{\text{out}}}{V_{\text{lip}}} - m(t) \right), \quad (14.6)$$

co przybliżono równaniem różniczkowym:

$$\frac{dx}{dt} = a(b - x(t)), \quad (14.7)$$

którego rozwiązanie analityczne wygląda następująco:

$$x(t) = b - C e^{-at}. \quad (14.8)$$

Funkcję daną równaniem (14.8) można następnie dopasować do danych prezentujących zależność masy cząsteczek od czasu. Następnie, przyrównując do siebie równania (14.6) i (14.7), można wyznaczyć współczynnik przepuszczalności:

$$P = \frac{aV_{\text{lip}}}{A}, \quad (14.9)$$

gdzie P — współczynnik przepuszczalności, a — współczynnik z dopasowania Równaniem (14.8) do danych eksperymentalnych, V_{lip} — objętość komórki (w tym przypadku modelu błony lipidowej), A — powierzchnia błony. Objętość oraz powierzchnię modelowej błony lipidowej, czyli liposomów, wyznaczono na podstawie poniższych zależności zgodnie z pracą [152]. Zakładając sferyczny kształt liposomów, objętość pojedynczego liposomu wyrażono wzorem na objętość sfery:

$$V_{\text{lip}} = \frac{4}{3}\pi r^3, \quad (14.10)$$

gdzie r — promień liposomów wyznaczony eksperymentalnie poprzez pomiar techniką DLS. Całkowitą objętość liposomów w próbce wyznaczono na podstawie:

$$V_{\text{cal}} = N_{\text{cal}} V_{\text{lip}}, \quad (14.11)$$

gdzie N_{cal} — całkowita liczba liposomów w próbce, V_{lip} — objętość liposomu. Liczbę liposomów w próbce wyznaczono z zależności:

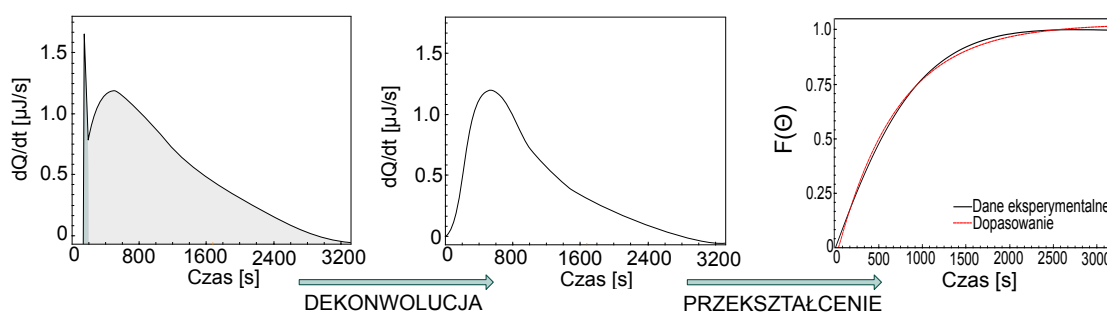
$$N_{\text{cal}} = \frac{N_{\text{lip}}}{N_{\text{lipid/liposom}}}, \quad (14.12)$$

gdzie N_{lip} — liczba cząsteczek lipidu w próbce wyznaczona na podstawie stężenia molo-
wego lipidu, $N_{\text{lipid/liposom}}$ — liczba cząsteczek lipidu przypadająca na liposom wyznaczona
zgodnie z:

$$N_{\text{lipid/liposom}} = \frac{4\pi r^2 + 4\pi(r-h)^2}{a}, \quad (14.13)$$

gdzie r — promień liposomu wyznaczony eksperymentalnie, h — grubość dwuwarstwy
fosfolipidowej budującej liposom (przyjęto $h = 4.37$ nm [153]), a — powierzchnia głowy
lipidowej budującej cząsteczkę lipidu (przyjęto $a = 0.724$ nm² [154]).

Wyznaczenie współczynnika przepuszczalności poprzez dopasowanie Równania (14.8) do danych rzeczywistych wymagało uzyskania zależności zmiany masy badanej cząsteczki



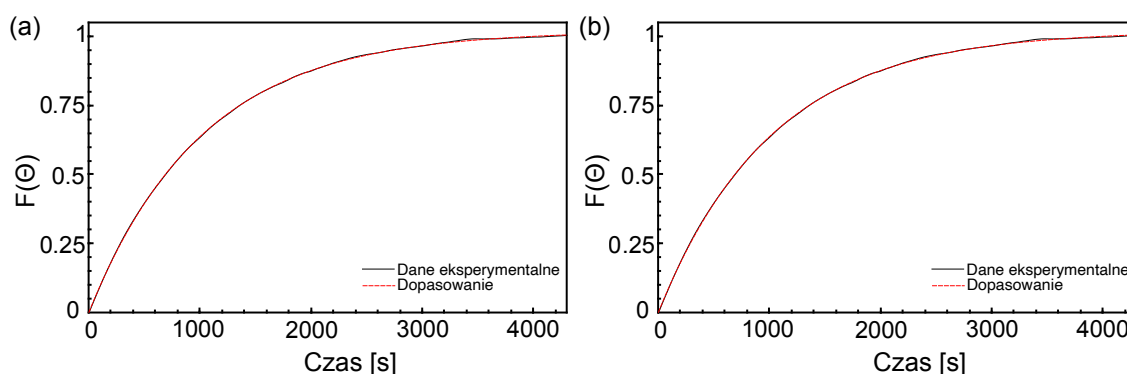
Rysunek 14.1: Schemat procesu wyznaczenia współczynnika przepuszczalności w oparciu o dane rzeczywiste uzyskane podczas pomiaru ITC. Zaprezentowano dane rzeczywiste dla pojedynczego nastrzyku (po lewej), dane rzeczywiste po procesie dekonwolucji (pośrodku), zależność zmiany stężenia w funkcji czasu, uzyskana poprzez opisane w tym rozdziale przekształcenia (po prawej).

w funkcji czasu. Wykorzystano do tego metodę analizy pojedynczych pików pozwalającą na badanie kinetyk reakcji, głównie stosowaną do reakcji enzymatycznych [130–132]. Na Rys. 14.1 zaprezentowano uproszczony schemat umożliwiający wyznaczenie współczynnika przepuszczalności. Po prawej stronie widoczny jest reprezentatywny termogram dla pojedynczego nastrzyku uzyskany w trakcie badań oddziaływań jonów askorbinyowych z błoną lipidową. Założono, że każdy z pików można podzielić na dwa procesy — początkowy, krótszy, charakteryzujący się mniejszym wydzielonym ciepłem, odpowiadający ciepłu rozcieńczenia oraz drugi, dłuższy, z odpowiednio większą wartością ciepła, wynikającą z oddziaływań wybranej cząsteczki z błoną lipidową [15]. Dalsza analiza wymagała wyodrębnienia danych odpowiadających drugiemu procesowi poprzez dekonwolucję. Następnie wyznaczono strumień przepływu masy cząsteczek przez błonę zgodnie z równaniem:

$$F(\Theta) = \frac{\int_0^t f(t) dt}{\int_0^\infty f(t) dt}, \quad (14.14)$$

co w rezultacie pozwoliło na uzyskanie zależności zaprezentowanej na Rys. 14.1 (lewy panel). Dopasowanie do niej Równania (14.8) i uzyskanie odpowiednich parametrów umożliwia wyznaczenie współczynnika przepuszczalności błony na podstawie Równania (14.9).

Na Wykresie 14.2 zaprezentowano reprezentatywne zależności zmiany stężenia w funkcji czasu dla dwóch wybranych rodzajów błony wraz z dopasowaniem funkcją (Równanie (14.8)). Analogiczne zależności wykreślono dla pozostałych wyników, co pozwoliło wyznaczyć współczynnik przepuszczalności dla różnego składu błony lipidowej, uporządkowania błony lipidowej oraz pH środowiska wodnego. W Tabeli 14.2 zaprezentowano wyznaczone wartości współczynników przepuszczalności. Uzyskane rezultaty są zgodne co do rzędu z wynikami literaturowymi uzyskanymi dla tego samego rodzaju modelu błony lipidowej (wykorzystano inną technikę pomiarową oraz przedstawiono wyniki tylko dla błony zbudowanej z DPPC) [155]. Wartość współczynnika przepuszczalności w publikacji [142] dla jonów askorbinyowych wynosiła $P = 1.1 \cdot 10^{-8}$ cm/s, widoczna jest



Wykres 14.2: Reprezentatywne wyniki przedstawiające przekształcenie danych rzeczywistych. Zależności dla pojedynczego nastrzyku odpowiadają wykresowi: (a) 1 mM liposomy DOPC + 15% mol DOPE, (b) 1mM liposomy DPPC w temperaturze 25°C miareczkowane do 10 mM askorbinianu sodu wraz z dopasowaniem funkcją opisaną Równaniem (14.8).

różnica jednego rzędu względem wartości współczynnika przepuszczalności wyznaczonej w prowadzonych badaniach. Dla kwasu askorbinowego wynosiła $P = 3 \cdot 10^{-12}$ cm/s [142], co różni się o trzy rzędy względem uzyskanych wyników. Jednak wykorzystano tam inny model dwuwarstwy lipidowej (BLM) oraz znacznie wyższe stężenia kwasu askorbinowego (100 mM) nie odpowiadające fizjologicznemu zakresowi stężenia tej molekuly w organizmie człowieka.

Porównując współczynnik przepuszczalności wyznaczony dla zaprezentowanych próbek, w przypadku błony DOPC pH 7.4 oraz DOPC + 30% mol chol istnieje statystyczna różnica ($N = 3, p < 0.05$) pomiędzy jego wartościami. Współczynnik przepuszczalności dla błony z cholesterolem jest o ponad połowę mniejszy, co wskazuje na wolniejszy proces transportu przez dwuwarstwę lipidową. Rezultat ten jest zgodny z danymi literaturowymi, które wskazują, że obecność tego sterolu w błonie lipidowej zmniejsza jej przepuszczalność. W przypadku próbki DOPC + 15% mol DOPE oraz DOPC + 4.2% mol DOPE widoczne jest trzykrotne zwiększenie wartości współczynnika przepuszczalności, co potwierdza wstępne wnioski, które zostały opisane w Rozdziale 13. Obecność DOPE, lipidu o innej geometrii, wpływa na przyspieszony proces dyfuzji jonów askorbinowych.

Dla błony DOPC pH 7.4 oraz błony DPPC (pomiar w temperaturze 25°C) nie ma statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wartościami współczynnika przepuszczalności

Tabela 14.2: Współczynnik przepuszczalności P witaminy C dla liposomów o różnym składzie lipidowym.

Próbka	Współczynnik przepuszczalności P [$\cdot 10^{-9}$ cm/s]
DOPC pH 7.4	2.96 ± 0.42
DOPC pH 4.2	1.99 ± 0.41
DOPC + 30% mol chol	1.21 ± 0.14
DOPC + 15% mol DOPE	6.72 ± 0.14
DOPC + 4.2% mol DOPE	5.64 ± 0.14
DPPC 25°C	2.39 ± 0.54

($N = 3$, $p > 0.05$). W temperaturze 25°C błona lipidowa DOPC znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej, natomiast błona DPPC w fazie żelowej. Inny stopień uporządkowania błony lipidowej wraz z jednoczesnym brakiem różnicy w wartości współczynnika przepuszczalności może oznaczać, że organizacja części hydrofobowej nie wpływa na proces oddziaływań witaminy C oraz jej możliwy transport przez błonę lipidową, a większą rolę odgrywa interfeza.

Podsumowując rezultaty badań zaprezentowane w tym rozdziale, zarówno uzyskane wartości współczynnika podziału błona/woda, jak i współczynnika przepuszczalności wskazują, że pomiędzy jonami askorbinowymi a dwuwarstwą lipidową może dochodzić do oddziaływań, których rezultatem jest transport jonów askorbinowych na drodze dyfuzji prostej. Uzyskana wartość współczynnika podziału błona/woda witaminy C oznacza większe powinowactwo tej molekuly do interfazy, co pokazano po raz pierwszy. Wartości współczynników przepuszczalności wyznaczone z wykorzystaniem nowej metody analizy danych ITC są zgodne co do rzędu z danymi literaturowymi, dodatkowo wraz ze zmianą składu dwuwarstwy lipidowej wielkości te zmieniają się w oczekiwany sposób, zgodny z właściwościami poszczególnych lipidów budujących dwuwarstwę lipidową.

14.3 Znaczenie wyznaczonych parametrów termodynamicznych w kontekście transportu witaminy C przez dwuwarstwę lipidową

Do tej pory opisy mechanizmów dotyczących transportu witaminy C przez błonę lipidową skupiały głównie swoją uwagę na transporterach białkowych. Jednak, jak wskazano na początku pracy takie podejście pozostawia nierozstrzygniętą kwestię tego, jak dochodzi do wypływu jonów askorbinowych z komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest niezbędnym procesem do utrzymania określonej dystrybucji tej molekuly w poszczególnych komórkach [14]. Transportery SVCT1 oraz SVCT2 to główne struktury umożliwiające napływ witaminy C do wnętrza komórek (z wyjątkiem erytrocytów, gdzie transport odbywa się tylko poprzez transportery GLUT [3]), i utrzymanie jej wewnętrznego stężenia na określonym poziomie. Jednak mechanizm wypływu tej molekuly nie został do tej pory wyjaśniony.

Wykorzystanie dyfuzji prostej, jako procesu, który tłumaczyłby wypływ witaminy C z komórki nie było brane pod uwagę ze względu na cechy tej molekuly — zbyt duży rozmiar, ujemny ładunek jonu askorbinowego oraz współczynnik podziału oktanol/woda, determinujący większe powinowactwo tej molekuly do części polarnej [9]. Uwzględniając to, alternatywne mechanizmy transportu witaminy C przez błonę komórkową do środowiska zewnętrznego, jakie zostały zbadane to m.in. transport przez kanały anionowe służące do regulowania objętości komórki, homowymiana pomiędzy jonami askorbinowymi (z ang. *ascorbate-ascorbate homoexchange*), transport przez koneksyny (rodzaj połączeń szczylinowych), heterowymiana pomiędzy neuroprzekaznikami — kwasem glutaminowym

a jonami askorbinowymi (z ang. *glutamate-ascorbate heteroexchange*) oraz egzocytoza z wykorzystaniem pęcherzyków zawierających jony askorbinowe [9].

Wymienione powyżej możliwe rodzaje transportu witaminy C, tłumaczące wpływ tej molekuli z komórki, wciąż są badane ze względu na brak wyników, które potwierdzałyby dominującą rolę któregoś z nich. Rezultaty badań dotyczące roli kanałów anionowych są najbardziej obiecujące, jednak wskazują na to, że mniej niż 50% wszystkich jonów askorbinowych może być transportowane w taki sposób. W przypadku homowymiany pomiędzy jonami askorbinowymi wciąż nie odkryto transporterów, które pośredniczyłyby w tym procesie, a w badaniach nie uwzględniono możliwej roli kanałów SVCT, które mogłyby wpłynąć na uzyskane rezultaty [9]. Pozostałe mechanizmy charakteryzują się błędnymi założeniami, co pokazano eksperymentalnie (heterowymiana pomiędzy neuroprzekaznikami — kwasem glutaminowym a jonami askorbinowymi) lub koniecznością poszerzenia badań o dodatkowe modele komórkowe i techniki eksperymentalne (transport przez koneksyny, egzocytoza z wykorzystaniem pęcherzyków, zawierających jony askorbinowe) [9].

Jak wskazano powyżej, to w jaki sposób witamina C jest transportowana na zewnątrz komórki wciąż nie zostało wyjaśnione pomimo powstania modeli próbujących wyjaśnić ten proces. Uzyskane w ramach prowadzonych prac rezultaty, a w szczególności wyznaczone wartości współczynnika podziału błona/woda wskazujące na większe powinowactwo jonów askorbinowych do dwuwarstwy lipidowej, oraz współczynnika przepuszczalności pozwalają stwierdzić, że transport tej molekuli na drodze dyfuzji prostej może odgrywać istotną rolę w możliwym modelu opisującym homeostazę witaminy C w organizmie człowieka.

Rozdział 15

Fizykochemiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej w obecności witaminy C

W tym rozdziale zostaną przedstawione wyniki dotyczące tego, jak na wybrane parametry fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej wpływa obecność jonów askorbinowych. Wybrane właściwości fizykochemiczne to temperatura przejścia fazowego, mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej oraz ładunek powierzchniowy. Ze względu na ich specyfikę oprócz bezpośredniego wskazania, czy wybrane właściwości ulegają zmianie pod wpływem oddziaływań z witaminą C, dodatkowo możliwe będzie odniesienie do transportu jonów askorbinowych przez dwuwarstwę lipidową. Wykonano również badania z wykorzystaniem molekuł, których wyniki dla oddziaływań z błoną lipidową zaprezentowano w Rozdziale 13. Ma to na celu określenie ich wpływu na wybrane właściwości dwuwarstwy lipidowej w porównaniu do możliwego wpływu jonów askorbinowych.

15.1 Temperatura przejścia fazowego

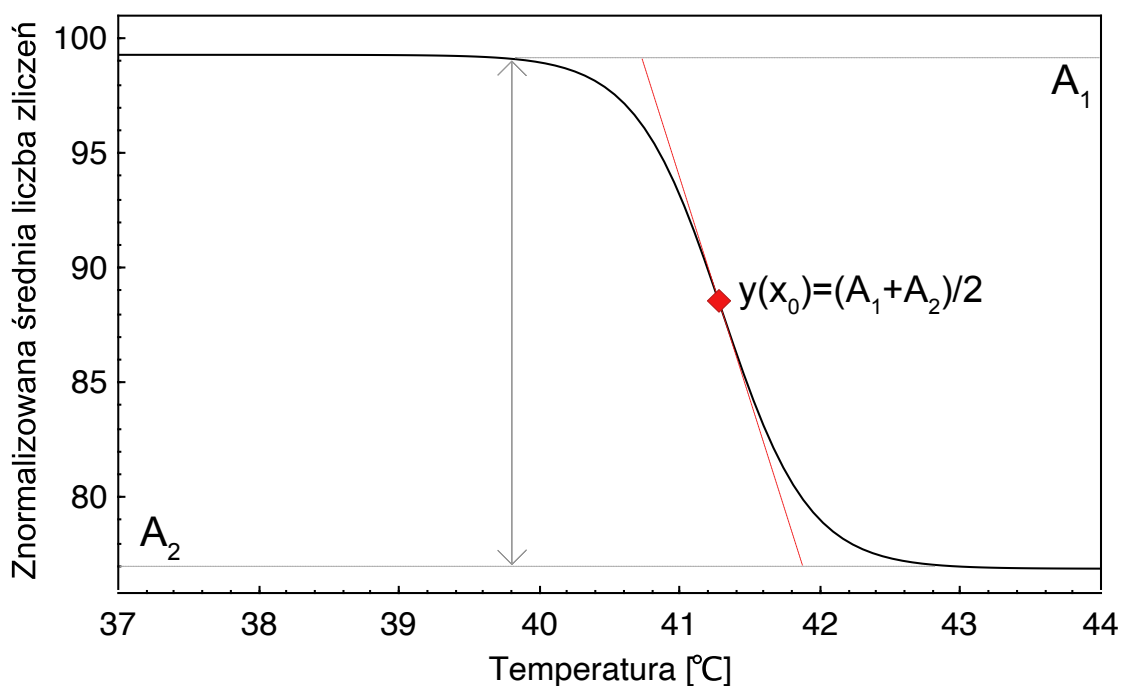
W celu określenia wpływu witaminy C na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej wyznaczono wielkości charakteryzujące termotropowe przejście fazowe w błonie lipidowej. Temperatura przejścia fazowego oraz kooperatywność definiowana między innymi, jako ilość łańcuchów alkilowych, które jednocześnie ulegają przejściu fazowemu [138], to parametry pozwalające w ilościowy sposób określić, jak obecność wybranych molekuł wpływa na ten proces. Wyznaczenie temperatury przejścia fazowego (T_{α}) z wykorzystaniem DLS jest możliwe dzięki zmianie właściwości optycznych dwuwarstwy lipidowej w zależności od jej uporządkowania. Przy założeniu, że badane struktury, w tym wypadku liposomy, nie zmieniają swojego kształtu ani rozmiaru w trakcie pomiaru, możliwe jest skorelowanie zmian właściwości optycznych z procesem przejścia fazowego w błonie lipidowej [106].

Model pozwalający na wyznaczenie temperatury przejścia fazowego wykorzystuje jedną z wielkości mierzonych w typowym pomiarze DLS. Parametrem tym jest średnia liczba zliczeń fotonów na sekundę (z ang. *mean count rate*) [106], która jest wyznaczana dla stałych parametrów urządzenia. Oznacza to, że w przeciwieństwie do standardowego pomiaru techniką DLS, gdzie wartość wzmocnienia (z ang. *attenuator*) jest zmieniana w zależności od zawartości próbki, w tej metodzie została ustawiona stała wartość tego parametru, co umożliwiło powiązanie zmiany średniej liczby zliczeń fotonów na sekundę, ze zmianą uporządkowania dwuwarstwy lipidowej. Zestawienie zmiany tego parametru w funkcji temperatury prowadzi do uzyskania zależności zaprezentowanej na Wykresie 15.1, z której możliwe jest wyznaczenie temperatury przejścia fazowego, poprzez dopasowanie funkcją Boltzmanna:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (15.1)$$

gdzie y — średnia liczba zliczeń dla określonej temperatury, x — temperatura, A_1 — początkowa średnia liczba zliczeń fotonów (dla błony przed przejściem fazowym), A_2 — końcowa średnia liczba zliczeń fotonów (dla błony po przejściu fazowym), Δx — szerokość nachylenia, x_0 — wartość odpowiadająca temperaturze przejścia fazowego definiowana jako:

$$y(x_0) = \frac{A_1 + A_2}{2}. \quad (15.2)$$



Rysunek 15.1: Schemat przedstawiający funkcję pozwalającą na wyznaczenie temperatury przejścia fazowego z wykorzystaniem techniki DLS.

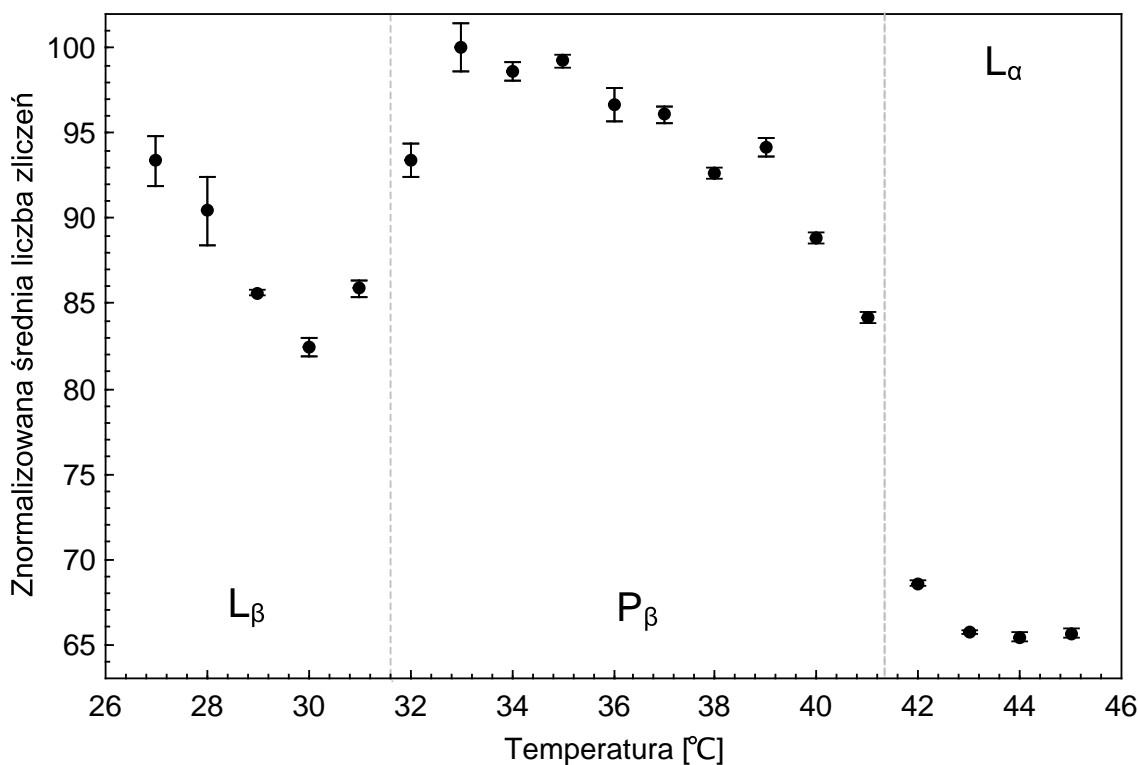
Modyfikacja Równania (15.1) zaprezentowana w [45] pozwala na wyznaczenia T_α oraz parametru B definiowanego jako kooperatywność przejścia fazowego. Równanie ma postać:

$$y = b_1 + m_1 y + \frac{b_2 - b_1 + m_2 y - m_1 y}{1 + 10^{B(1/y - 1/T_\alpha)}}, \quad (15.3)$$

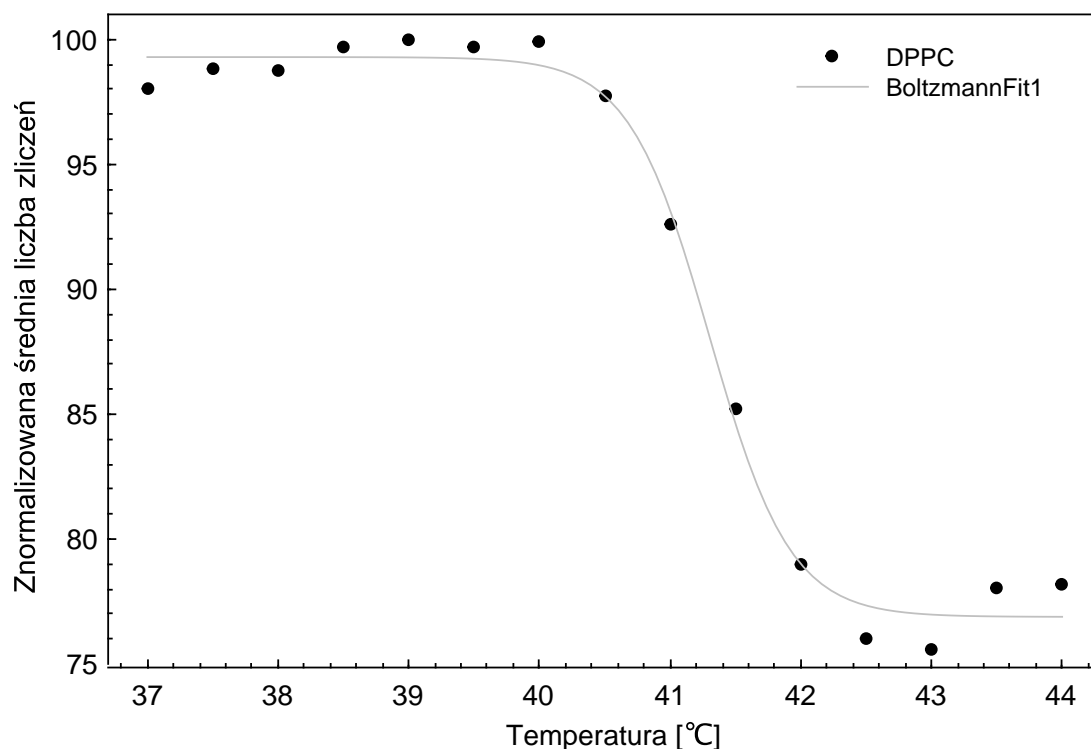
gdzie m_1 oraz b_1 to, odpowiednio, współczynnik kierunkowy prostej oraz wyraz wolny funkcji liniowej dopasowanej do danych przed przejściem fazowym, zaś m_2 oraz b_2 to, odpowiednio, współczynnik kierunkowy prostej oraz wyraz wolny funkcji liniowej dopasowanej do danych po przejściu fazowym.

Reprezentatywne wyniki przedstawiono na Wykresie 15.1 dla próbki kontrolnej z liposomami DPPC. Korzystając z modelu opisanego powyżej, możliwe było wyznaczenie temperatury przedprzejścia (T_β) odpowiadającej przedprzejściu fazowemu ($L_\beta \rightarrow P_\beta$), oraz temperatury przejścia fazowego (T_α) odpowiadającej przejściu fazowemu ($P_\beta \rightarrow L_\alpha$). Dla pomiarów kontrolnych, których celem było sprawdzenie poprawności zastosowanej metody, wyznaczono T_β i T_α dla liposomów DPPC, następnie porównano uzyskane wartości z danymi literaturowymi.

Uzyskane wartości $T_\beta = 31.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ oraz $T_\alpha = 41.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ wraz z wartością kooperatywności $B = 1554 \pm 75$ są zgodne z danymi literaturowymi [106, 156, 157]. Na Wykresie 15.2 zaprezentowano przykładowe dopasowanie Równaniem 15.3 do danych



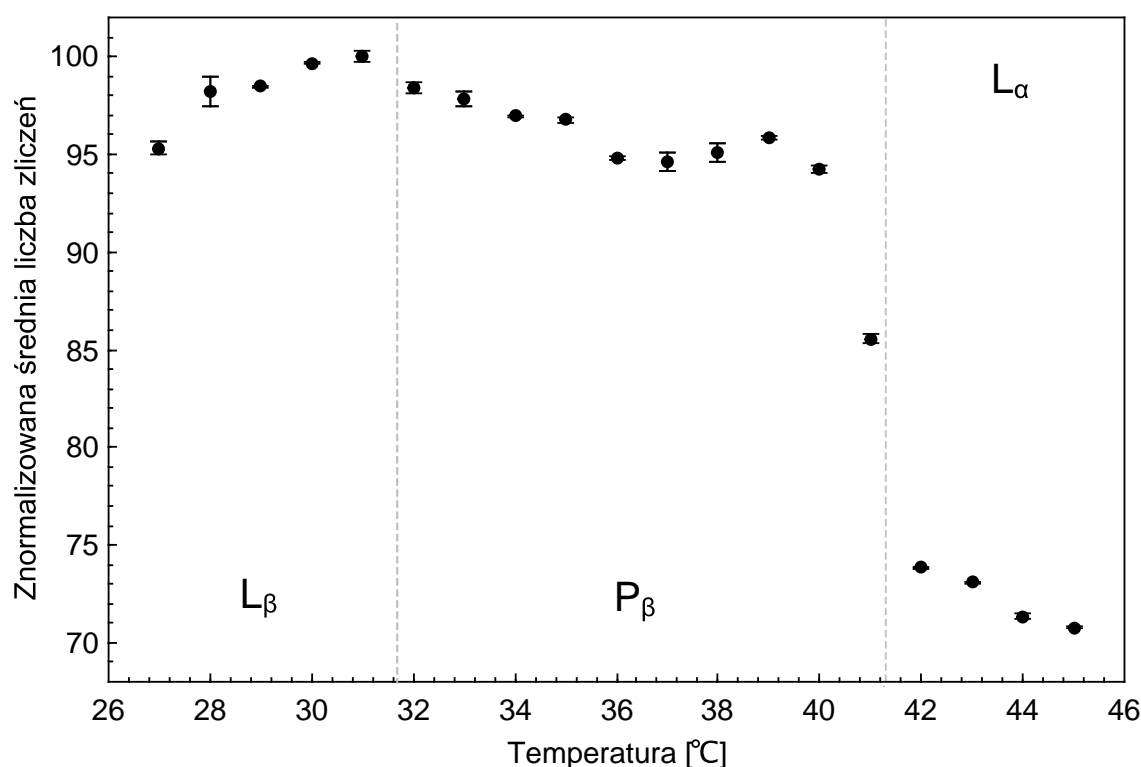
Wykres 15.1: Przebieg charakterystyki zmiany znormalizowanej średniej liczby zliczeń w funkcji temperatury dla zakresu 27–45°C dla 1 mM liposomów DPPC. Na wykresie oznaczono poszczególne stany termodynamiczne błony L_β — faza żelowa, P_α — faza ripple phase, L_α — faza ciekłokrystaliczna.



Wykres 15.2: Znormalizowana średnia liczba zliczeń w funkcji temperatury dla 1 mM liposomów DPPC wraz z dopasowaniem funkcją Boltzmanną.

rzeczywistych dla zakresu temperatur 37–45°C. Analogiczne wykresy uzyskano dla liposomów DPPC w obecności jonów askorbinowych, jak i innych molekuł. Miało to na celu porównanie, czy obecność wybranych cząsteczek wpływa na uporządkowanie błony lipidowej. Dodatkowo dzięki dobraniu różnego rodzaju molekuł hydrofilowych możliwe było sprawdzenie, czy wpływ jonów askorbinowych jest do nich porównywalny.

Wartość temperatury przejścia fazowego (T_{α}) oraz kooperatywność (B) wyznaczono dla wszystkich próbek, co zestawiono w Tabeli 15.1. Porównując T_{α} dla próbki kontrolnej oraz próbki z jonami askorbinowymi, pojawia się statystycznie istotna różnica ($N = 3$, $p < 0.05$), wskazująca na obniżenie wartości tej wielkości w obecności jonów askorbinowych. Dodatkowo można zaobserwować wzrost kooperatywności. Dane literaturowe wskazują, że wpływ na zmianę kooperatywności ma głównie oddziaływanie form jonowych z dwuwarstwą lipidową, co w tym przypadku również ma zastosowanie ze względu na to, że w pH 7.4 główną formą witaminy C jest jon askorbinowy. Wzrost kooperatywności w obecności jonów askorbinowych wskazuje na ich oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową oraz prawdopodobną lokalizację blisko grup polarnych lipidów [138]. Dodatkowo na Wykresie 15.3 widoczny jest zanik przedprzejścia fazowego ($L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$) w obecności jonów askorbinowych. Jako, że proces ten związany jest z obszarem grup polarnych dwuwarstwy lipidowej oraz interfazy, wskazuje to na możliwą interakcję jonów askorbinowych z tą częścią błony lipidowej. Porównując uzyskane wartości temperatury T_{α} dla dwuwarstwy lipidowej w obecności innych molekuł w przypadku d-sorbitolu nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy względem pomiaru kontrolnego ($N = 3$, $p > 0.05$), natomiast



Wykres 15.3: Przebieg charakterystyki zmiany znormalizowanej średniej liczby zliczeń w funkcji temperatury dla zakresu 27–45°C dla 1 mM liposomów DPPC w obecności 10 mM askorbinianu sodu. Na wykresie oznaczono poszczególne stany termodynamiczne błony: L_β — faza żelowa, P_α — faza ripple phase, L_α — faza ciekłokrystaliczna.

obecność glicerolu oraz glikolu propylenowego obniżyły wartość temperatury przejścia fazowego podobnie, jak dla jonów askorbinowych. W przypadku kooperatywności różnice dla poszczególnych molekuł są zbliżone do pomiarów kontrolnych, nie zauważono wzrostu tego parametru, tak jak dla jonów askorbinowych. Jako, że wzrost kooperatywności jest m.in. związany z oddziaływaniami jonów z dwuwarstwą lipidową, a wybrane molekuły: d-sorbitol, glicerol oraz glikol propylenowy mają pK_a równe 14 (dokładne dane znajdują się w Tabeli 13.4) to brak zmiany tego parametru może wynikać z formy, w jakiej się znajdowały.

Tabela 15.1: Temperatura przejścia fazowego T_α wyznaczona dla próbki kontrolnej — liposomów DPPC oraz liposomów DPPC w obecności wybranych molekuł. Wielkości wyznaczono na podstawie trzech niezależnych pomiarów i przedstawiono w postaci wartości średniej z odchyleniem standardowym.

Próbka	T_α [°C]	Kooperatywność B
DPPC	41.5 ± 0.1	1554 ± 74
10 mM askorbinian sodu	40.9 ± 0.1	2134 ± 121
10 mM d-sorbitol	41.5 ± 0.2	1411 ± 319
10 mM glicerol	40.9 ± 0.2	1593 ± 668
10 mM glikol propylenowy	40.8 ± 0.1	1366 ± 181

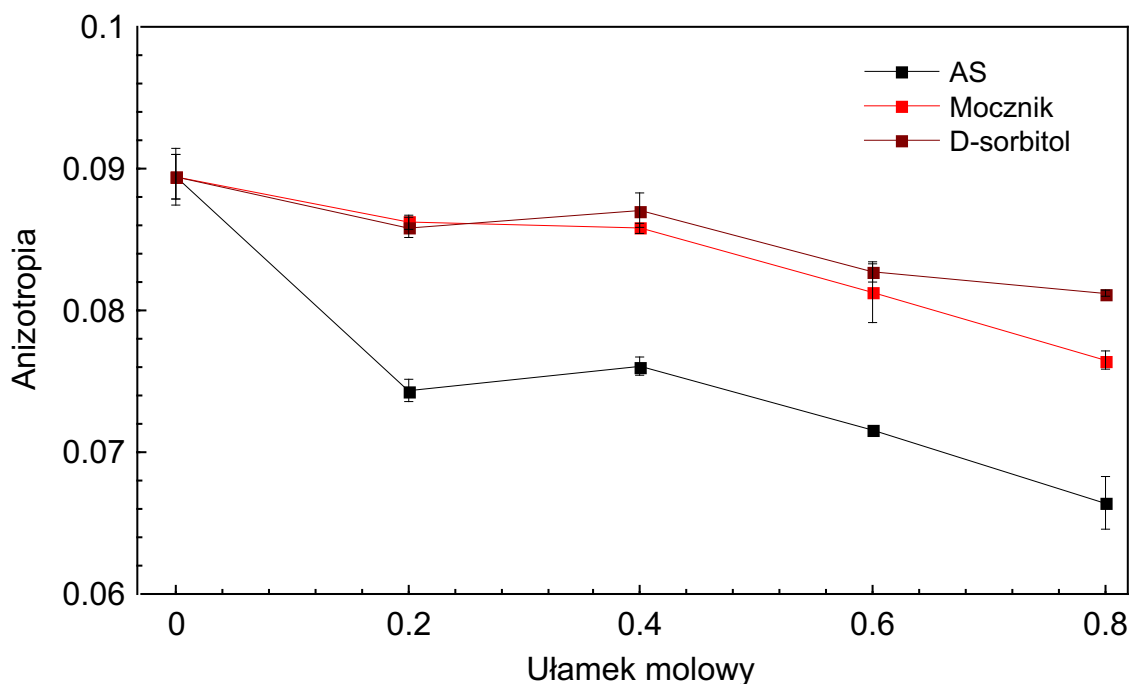
15.2 Płynność dwuwarstwy lipidowej

Płynność błony lipidowej to parametr, na który główny wpływ ma rodzaj łańcuchów alkilowych budujących rdzeń dwuwarstwy lipidowej, stopień ich nasycenia oraz ich długość, a jak pokazują badania również rodzaj grup polarnych [158]. Aby możliwe było określenie, jak ta wielkość, charakteryzująca dwuwarstwę lipidową, zmienia się w obecności wybranych cząsteczek, a szczególnie witaminy C, wykonano pomiary z wykorzystaniem fluorescencji polaryzacyjnej.

Wybrana do pomiarów sonda fluorescencyjna — DPH, charakteryzuje się lokalizacją w hydrofobowym rdzeniu, który tworzą łańcuchy alkilowe. Przy założeniu, że sonda znajduje się w ciągłej, jednorodnej błonie tworzącej cienką, hydrofobową warstwę, można uznać, że właściwości fizykochemiczne wybranej sondy, w każdym miejscu błony są niezmiennie. Wtedy mierzona zmiana anizotropii DPH może zostać powiązana ze zmianą położenia sondy w funkcji czasu, a tym samym z jej ruchliwością i płynnością otaczającego ją środowiska. Z wykorzystaniem pomiarów fluorescencji polaryzacyjnej możliwe jest wyznaczenie parametru powiązanego z płynnością błony lipidowej — lokalnej mikrolepkości (η) [83]. Parametr ten definiuje się jako:

$$\eta = \frac{2.4r}{0.362 - r}, \quad (15.4)$$

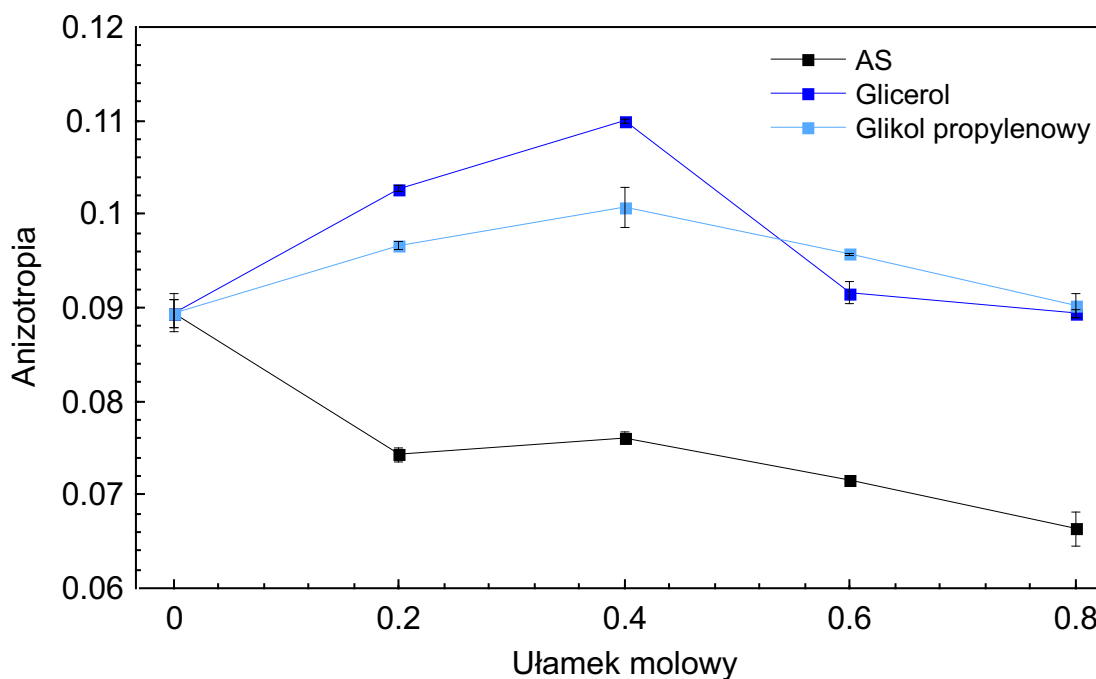
gdzie r — anizotropia, wartość wyznaczona podczas pomiaru, zgodnie z metodyką opisaną w Rozdziale 10.



Wykres 15.4: Zmiana anizotropii dwuwarstwy lipidowej w obecności: askorbinianu sodu (czarny), mocznika (czerwony) oraz d-sorbitolu (bordowy). Pomiary wykonano dla błony DOPC, wyniki przedstawiono w formie wartości średniej z odchyleniem standardowym dla trzech powtórzeń.

Pomiary wykonano z wykorzystaniem liposomów DOPC ($c_{\text{DOPC}} = 50 \mu\text{M}$), które były inkubowane z sondą fluorescencyjną (DPH) oraz wybranymi cząsteczkami o różnym stężeniu, tak aby końcowa wartość ułamka molowego wynosiła od 0 do 0.8. Oprócz określenia, jak na mikrolepkość dwuwarstwy lipidowej wpływa obecność jonów askorbinowych, wykonano pomiary dla innych cząsteczek, których oddziaływanie z modelową błoną lipidową zaprezentowano w Rozdziale 13.

Na Wykresie 15.4 zaprezentowano zmianę anizotropii w funkcji ułamka molowego dla trzech cząsteczek: askorbinianu sodu, mocznika oraz d-sorbitolu. W przypadku askorbinianu sodu widoczny jest spadek anizotropii wraz ze zwiększającą się ilością jonów askorbinowych. Zależność ta charakteryzuje się podobnym przebiegiem dla mocznika oraz d-sorbitolu. Porównując pomiędzy sobą uzyskane wartości, odpowiadające anizotropii próbki z jonami askorbinowymi oraz z mocznikiem, występuje pomiędzy nimi statystycznie istotna różnica ($N = 3$, $p < 0.05$), co wskazuje na to, że cząsteczki te w inny sposób wpływają na rdzeń dwuwarstwy lipidowej. Podobnie prezentują się rezultaty porównujące wpływ jonów askorbinowych oraz d-sorbitolu. Co istotne, porównując wartości anizotropii dla próbek z mocznikiem oraz d-sorbitolem to znacząca statystycznie różnica pomiędzy nimi pojawia się dopiero dla największej wartości ułamka molowego. Na Wykresie 15.5 zaprezentowano zmianę anizotropii, jednak w tym przypadku oprócz askorbinianu sodu pokazano wyniki dla glicerolu oraz glikolu propylenowego. Zarówno w przypadku glicerolu, jak i glikolu propylenowego wartości anizotropii różnią się statystycznie dla każdej wartości ułamka molowego względem próbki z jonami askorbinowymi ($N = 3$, $p < 0.05$).



Wykres 15.5: Zmiana anizotropii dwuwarstwy lipidowej w obecności: askorbinianu sodu (czarny), glicerolu (granatowy) oraz glikolu propylenowego (niebieski). Pomiary wykonano dla błony DOPC, wyniki przedstawiono w formie wartości średniej z odchyleniem standardowym dla trzech powtórzeń.

Podobnie jest w przypadku, gdy porównano wartości anizotropii dla próbek z glicerolem oraz glikolem propylenowym, które również różnią się od siebie statystycznie. Pomimo tego widoczny jest zbliżony przebieg zmian tego parametru dla tych cząsteczek w funkcji ułamka molowego. Wartości anizotropii rośnie do wartości ułamka molowego równej 0.4, a następnie maleje.

Na podstawie wykonanych pomiarów techniką fluorescencji polaryzacyjnej, z wykorzystaniem Równania (15.4) wyznaczono lokalną mikrolepkość błony lipidowej, co zestawiono w Tabeli 15.2. Spadek mikrolepkości najbardziej widoczny jest w przypadku askorbinianu sodu ($\Delta\eta = 24.8$). Zmiana tej wartości dla mocznika wynosiła $\Delta\eta = 9.3$, a $\Delta\eta = 14.4$ dla d-sorbitolu. W przypadku glicerolu ($\Delta\eta = 26.0$) oraz glikolu propylenowego ($\Delta\eta = 13.9$) dochodzi do wzrostu tego parametru dla ułamka molowego równego 0.4, a następnie mikrolepkość maleje i wraca do wartości początkowej.

Podsumowując uzyskane rezultaty, obecność jonów askorbinowych w próbce wpływa na anizotropię, a tym samym mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej. Wraz ze wzrostem ilość moli tej substancji zmniejsza się mikrolepkość, a tym samym wzrasta nieuporządkowanie błony i jej płynność. Podobny efekt uzyskano dla mocznika oraz d-sorbitolu. W przypadku glicerolu oraz glikolu propylenowego początkowo zwiększająca się ilość tych cząsteczek, zwiększa uporządkowanie w błonie lipidowej oraz zmniejsza płynność dwuwarstwy lipidowej, jednak po przekroczeniu określonego stosunku mikrolepkość wraca do wartości początkowej. Dane literaturowe wskazują, że glicerol zwiększa uporządkowanie oraz sztywność błon biologicznych [150]. Porównując wpływ innych cząsteczek na płynność błony lipidowej, to w przypadku cząsteczek hydrofobowych, takich jak α -tokoferol, czy amfifilowych, jak pochodna kwasu askorbinowego — estry alkilowe kwasu askorbinowego zwiększają one anizotropię dwuwarstwy lipidowej [159, 160]

Analizując zmianę anizotropii, a tym samym płynności dwuwarstwy lipidowej, w kontekście jej przepuszczalności, to jak pokazują badania z wykorzystaniem różnych molekuł (m.in. mocznika, czy amoniaku) wraz ze wzrostem płynności błony lipidowej zwiększa się jej przepuszczalność [161]. Podobny charakter zmiany anizotropii w funkcji rosnącego ułamka molowego (Wykres 15.4) dla cząsteczek kontrolnych (mocznika, d-sorbitolu) oraz askorbinianu sodu może być kolejnym parametrem wskazującym na zdolność tej

Tabela 15.2: Wyliczone wartości mikrolepkości na podstawie pomiaru anizotropii dla pięciu różnych cząsteczek: askorbinianu sodu, mocznika, d-sorbitolu, glicerolu oraz glikolu propylenowego.

Ułamek molowy	Mikrolepkość [cP]				
	Askorbinian sodu	Mocznik	D-sorbitol	Glicerol	Glikol propylenowy
0	78.7 ± 1.4	78.7 ± 1.4	78.7 ± 1.4	78.7 ± 1.4	78.7 ± 1.4
0.2	62.0 ± 0.7	75.0 ± 0.5	74.6 ± 0.5	95.1 ± 0.4	87.4 ± 0.3
0.4	63.8 ± 0.5	74.6 ± 0.4	76.0 ± 0.9	105.1 ± 0.2	92.6 ± 1.4
0.6	59.1 ± 0.3	69.5 ± 1.8	71.1 ± 0.5	81.3 ± 0.9	86.3 ± 0.1
0.8	53.9 ± 1.4	64.3 ± 0.5	69.4 ± 0.2	78.8 ± 0.4	79.7 ± 0.9

cząsteczki do dyfuzji prostej przez błonę lipidową. Dodatkowo uwzględniając znaną z literatury wartość współczynnika podziału oktanol/woda, wskazującą na hydrofilowy charakter witaminy C, nie powinno się obserwować wpływu tej molekuly na płynność dwuwarstwy lipidowej powiązanej z jej hydrofobową częścią. Jednak wartość współczynnika podziału błona/woda uzyskana w prowadzonych badaniach jest spójna z uzyskanymi rezultatami, wskazującymi na wpływ jonów askorbinowych na uporządkowanie hydrofobowego obszaru dwuwarstwy lipidowej.

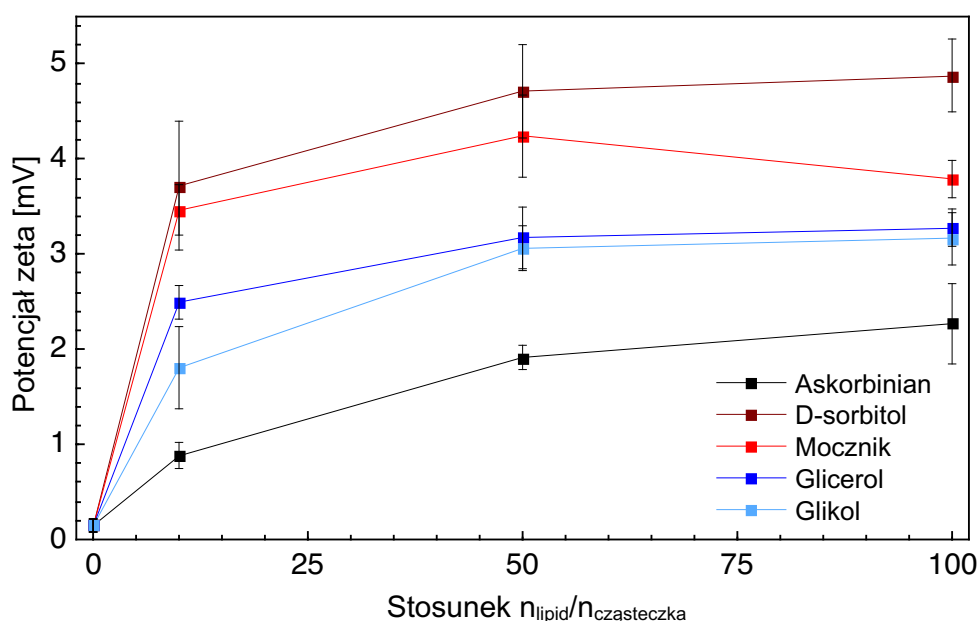
15.3 Ładunek powierzchniowy

W celu określenia, jak zmienia się wartość ładunku powierzchniowego błony lipidowej w obecności jonów askorbinowych wykonano pomiary z wykorzystaniem techniki elektroforetycznego rozpraszania światła. Umożliwia ona pomiar mobilności elektroforetycznej oraz wyznaczenie potencjału zeta. Mobilność elektroforetyczna jest powiązana z ładunkiem efektywnym (Q_{ef}), czyli ilością ładunków, przypadającą na jedną strukturę, w tym przypadku na jeden liposom, poprzez równanie:

$$Q_{ef} = \frac{\mu_e}{6\pi\eta_r R_{ef}}, \quad (15.5)$$

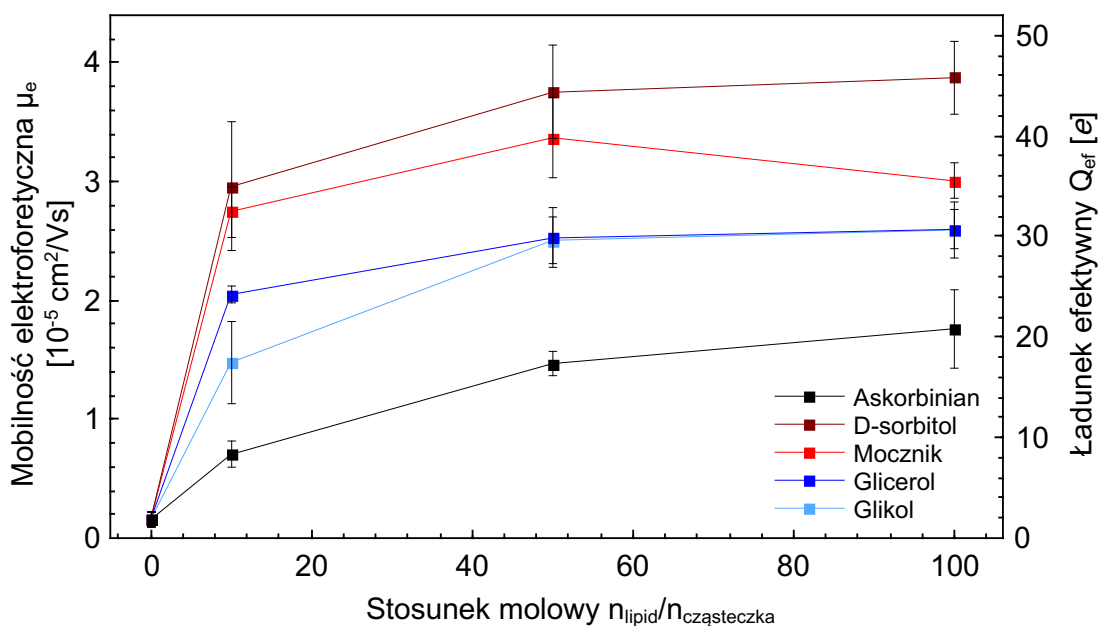
gdzie μ_e — mobilność elektroforetyczna, η_r — lepkość ośrodka, R_{ef} — promień efektywny badanej struktury, definiowany jako wielkość badanej struktury wraz z warstwą Sterna.

Dla odpowiednio niskich wartości elektrolitów w próbce (10–100 mM), potencjał zeta jest dobrym przybliżeniem ładunku powierzchniowego [162]. Do pomiarów wybrano



Wykres 15.6: Zmiana potencjału zeta w funkcji stosunku molowego lipidów do wybranych cząsteczek.

blonę lipidową zbudowaną z lipidów DOPC, które to są lipidami obojnaczymi, a wartość potencjału zeta dla takich liposomów powinna przyjmować wartość zbliżoną do zera. Liposomy o określonym stężeniu lipidu ($c_{\text{DOPC}} = 1 \text{ mM}$) inkubowano przez trzy godziny w temperaturze 37°C , a następnie wykonano pomiar. Podobnie, jak w przypadku poprzednich właściwości fizykochemicznych oprócz pomiarów dla jonów askorbinowych w celu porównania wybrano inne molekuly. Na Wykresie 15.6 zaprezentowano, jak zmienia się wartość potencjału zeta w funkcji stosunku molowego lipidów do określonej substancji. Dla próbki kontrolnej, liposomów DOPC, uzyskano wartość potencjału zeta ($\zeta_0 = 0.5 \pm 0.2$). Ze względu na to, że błona liposomów zbudowana jest z lipidów o ładunku neutralnym, wartość potencjału zeta powinna być bliska zeru. Na możliwe odchylenia mogą wpływać grupy polarne, polaryzacja wody, jak i możliwe zanieczyszczenia w próbce [158, 163]. Gdy w próbce oprócz modelowej błony lipidowej — liposomów, znajdują się jony askorbinowe, potencjał zeta wzrasta w niewielkim stopniu ($\Delta\zeta = 2.1 \text{ mV}$). W przypadku próbki, gdzie znajdują się jony askorbinowego, wartość potencjału zeta rośnie wraz ze wzrostem stosunku molowego, jednak od $n_{\text{lipid}}/n_{\text{cz}} = 50$ następuje stabilizacja tej wielkości, co znajduje także odzwierciedlenie w niewykryciu statystycznie istotnej różnicy pomiędzy średnimi wartościami ζ dla $n_{\text{lipid}}/n_{\text{cz}} = 50$ oraz 100 ($N = 3$, $p > 0.05$). Analogicznie prezentują się rezultaty dla pomiarów z innymi molekułami. Porównując pomiędzy sobą wartości potencjału zeta dla próbek z askorbinianem sodu oraz innymi cząsteczkami, to dla każdej wartości stosunku molowego $n_{\text{lipid}}/n_{\text{cz}}$ pojawiają się statystycznie istotne różnice. Podobnie, jak w przypadku mikrolepkości można zauważyć, że wartości dla d-sorbitolu oraz mocznika, jak i glikolu propylenowego oraz glicerolu są do siebie zbliżone. Może

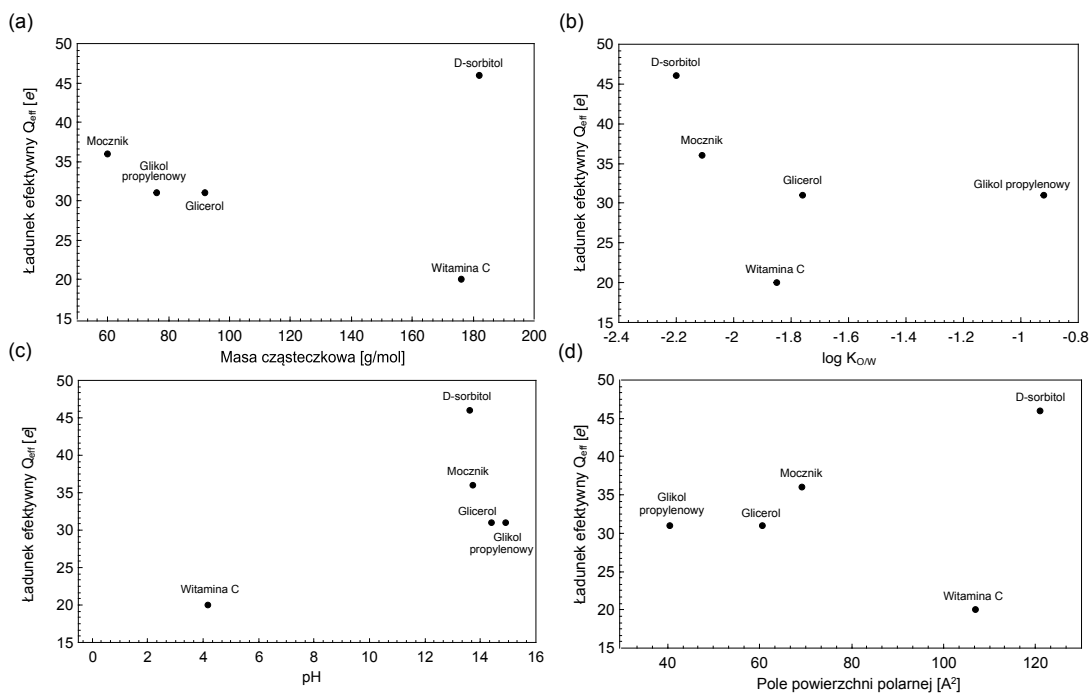


Wykres 15.7: Zmiana mobilności elektroforetycznej (oś lewa) oraz ładunku efektywnego (oś prawa) w funkcji stosunku molowego lipidów do wybranych cząsteczek.

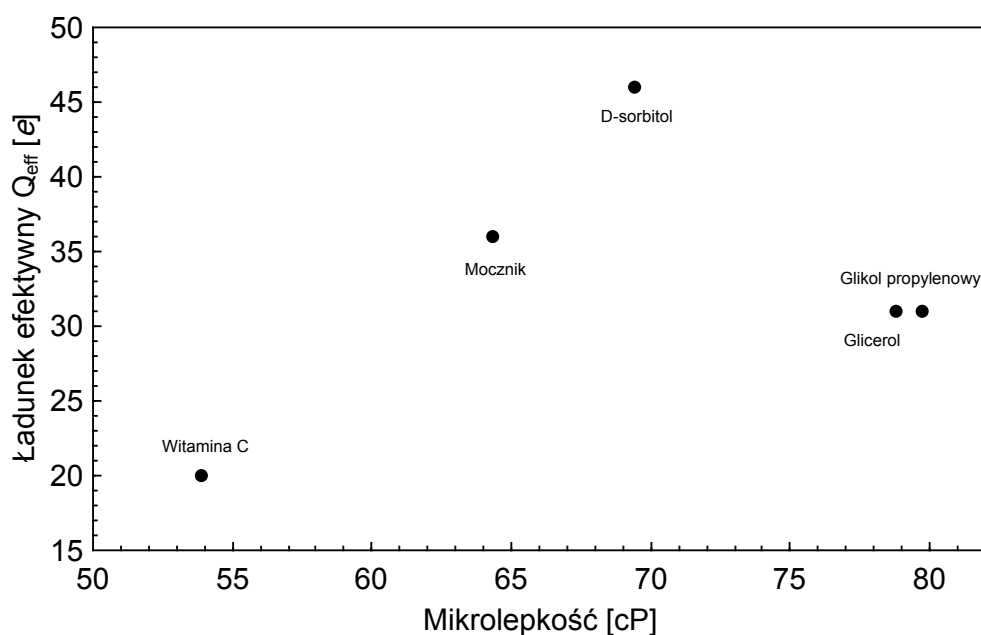
to wynikać z podobnego rodzaju oddziaływań tych cząsteczek z błoną lipidową, jak i ich właściwości.

Wykorzystując Równanie (15.5) wyznaczono wartość ładunku efektywnego, czyli wielkość określającą, jaka liczba ładunków przypada na jeden liposom. Jako promień efektywny wykorzystano zmierzoną wartość średnicy hydrodynamicznej. Biorąc pod uwagę, że warstwę Sterna stanowi kilka warstw cząsteczek wody zmierzona wartość średnicy hydrodynamicznej stanowi dobre przybliżenie promienia efektywnego badanej struktury [163]. Wyznaczoną wartość ładunku efektywnego oraz zmianę mobilność elektroforetycznej zaprezentowano na Wykresie 15.7. Zmiana ładunku efektywnego w funkcji stosunku molowego dla każdej z molekuł przebieg w analogiczny sposób, jak zmiana potencjału zeta. W przypadku obecności jonów askorbinowych w próbce ilość ładunków efektywnych rośnie dwudziestokrotnie względem wartości początkowej.

Analogicznie, jak w Rozdziale 13 zaprezentowano zestawienie ładunku efektywnego w funkcji wybranych właściwości fizykochemicznych molekuł, co przedstawiono na Wykresie 15.8. Można zaobserwować, że wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej zmniejsza się ilość ładunków efektywnych na powierzchni liposomów, podobną zależność można zauważyć w przypadku wartości logarytmu z współczynnika podziału oktanol/woda. Wraz ze zmniejszeniem tej wielkości spada liczba ładunków efektywnych. W przypadku punktów pK_a , podobnie jak dla zestawień prezentujących zmianę entalpii molowej w funkcji tego parametru, ciężko jest ocenić, czy wielkość ta ma znaczenie, ze względu na brak danych dla całego przekroju osi pH. Na Wykresie 15.9 zestawiono zmianę ładunku efek-



Wykres 15.8: Zestawienie zmiany ładunku efektywnego Q_{ef} w funkcji wybranych właściwości molekuł: (a) masy cząsteczkowej, (b) logarytmu ze współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$), (c) wartości pH odpowiadającej punktom pK_a , (d) pola powierzchni polarnej.



Wykres 15.9: Zestawienie zmiany ładunku efektywnego Q_{ef} w funkcji wartości mikrolepkości wybranych molekuł uzyskanej podczas wykonanych pomiarów.

tywnego w funkcji wartości mikrolepkości, którą wyznaczono w trakcie prowadzenia badań. Widoczny jest wzrost ładunku efektywnego wraz ze wzrostem mikrolepkości dla trzech molekuł — witaminy C, mocznika oraz d-sorbitolu, co może wskazywać, że te istnieje grupa cząsteczek, dla której te parametry są ze sobą skorelowane.

Dodatkowo, aby sprawdzić, czy oprócz zmiany potencjału zeta obecność cząsteczek wpływa na średnicę hydrodynamiczną (D_h) liposomów, wykonano pomiary techniką DLS. Uzyskane wartości prezentujące średni rozkład wielkości liposomów oraz PDI dla badanych próbek, zestawiono w Tabeli 15.3. Dla próbki kontrolnej, czyli liposomów DOPC, średnica hydrodynamiczna wynosiła $D_h = 152$ nm, natomiast w obecności askorbinianu sodu wartość tego parametru spadła do $D_h = 116$ nm, co przesunęła rozkład prezentujący średnicę struktur w próbce w stronę mniejszych wartości wraz ze zwiększoną ilością jonów askorbinowych. Podobna zmiana widoczna jest dla pozostałych cząsteczek. Zjawisko to może wynikać z obecności jonów w roztworze, co wpływa na grubość podwójnej warstwy elektrycznej, określanej jako długość Debay'a [121]. Jednak, w takim przypadku

Tabela 15.3: Rozkład rozmiarów oraz polidispersyjność dla liposomów w obecności różnych cząsteczek. Wynik przedstawiono w formie wartości średniej z trzech pomiarów.

Próbka	D_h [nm]	PDI
Kontrola	152 ± 35	0.15 ± 0.03
Askorbinian sodu	116 ± 25	0.08 ± 0.01
Mocznik	115 ± 31	0.09 ± 0.01
D-sorbitol	115 ± 27	0.07 ± 0.01
Glicerol	115 ± 28	0.09 ± 0.01
Glikol propylenowy	120 ± 26	0.09 ± 0.01

wartość średnicy hydrodynamicznej powinna zmniejszać się wraz ze wzrostem stężenia substancji w próbce, czego nie zaobserwowano. Ze względu na to, że dzięki pomiarowi DLS mierzony jest rozkład rozmiarów, lokalna zmiana średnicy hydrodynamicznej mogła zostać nie zaobserwowana [121].

Część IV

Podsumowanie i wnioski

Głównym celem prowadzonych badań było określenie, jak możliwe oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową wpływają na właściwości fizykochemiczne błony lipidowej z jednoczesnym odniesieniem uzyskanych rezultatów do transportu witaminy C przez błonę komórkową. Na początku postawiono trzy tezy badawcze, które stanowiły punkt wyjściowych w prowadzonych badaniach.

Pierwsza część pracy prezentująca wyniki eksperymentalne, potwierdziła tezę, że pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową zachodzą wysokoenergetyczne oddziaływania. Co więcej, w zależności od składu lipidowego oddziaływania te zmieniają swoją specyfikę. Obecność cholesterolu wydłuża proces dochodzenia do równowagi, a DOPE przyspiesza z jednoczesnym obniżeniem wartości ciepła wydzielonego podczas zachodzących oddziaływań. Natomiast obecność ujemnie naładowanego lipidu DOPS zmienia charakter mierzonych oddziaływań z egzotermicznych na endotermiczne. Wyniki zaprezentowane dla oddziaływań z dwuwarstwą lipidową o różnym uporządkowaniu (w fazie żelowej oraz ciekłokrystalicznej) wskazały, że parametr ten nie wpływa na uzyskane rezultaty. W przypadku zmiennego pH środowiska wodnego zmierzono, jak zmieniają się oddziaływania w pH fizjologicznym (7.4) oraz równym punktowi pK_a kwasu askorbinowego ($pK_{a1} = 4.2$). Wyniki wskazują, że główną formą witaminy C, która generuje wysokoenergetyczne oddziaływania są jony askorbinowe.

Uzyskane rezultaty stanowiły podstawę do drugiej części badań, w której przy wykorzystaniu odpowiednich modeli wyznaczono współczynnik podziału błona/woda oraz współczynnik przepuszczalności dla jonów askorbinowych. Dzięki specyficznym oddziaływaniom pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową, dane rzeczywiste z pomiarów kalorymetrycznych pozwoliły na wykorzystanie znanego z literatury modelu stosowanego do wyznaczenia współczynnika podziału błona/woda oraz stworzenie nowego modelu, na podstawie zależności stosowanych w badaniach dotyczących wyznaczenia kinetyki reakcji enzymatycznych, pozwalającego wyznaczyć współczynnik przepuszczalności. W przypadku współczynnika podziału błona/woda uzyskane rezultaty wskazują na większe powinowactwo witaminy C do dwuwarstwy lipidowej niż do środowiska wodnego ($\log(K_{O/W})$ wynoszący od 2.7 do 3.6 w zależności od składu dwuwarstwy lipidowej), co jest wynikiem przeciwnym do wartości klasycznego współczynnika oktanol/woda dla witaminy C, wskazującym na jej większe powinowactwo do środowiska wodnego. Uzyskane rezultaty współczynnika przepuszczalności są zgodne, co do rzędu, z wartościami literaturowymi, oraz potwierdzają wstępne wnioski z części pierwszej dotyczącej wpływu składu dwuwarstwy lipidowej na transport witaminy C. Potwierdza to, że wyznaczone parametry termodynamiczne oraz uzyskane dane rzeczywiste z pomiarów oddziaływań pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową umożliwiły wyznaczenie wielkości charakteryzujących transport witaminy C przez błonę lipidową.

Ostatnim celem prowadzonych badań było określenie, czy witamina C wpływa na właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej. Wykonano pomiary pozwalające stwierdzić, czy obecność tej molekuly zmienia wartość temperatury przejścia fazowego, mikrolepkości oraz ładunku powierzchniowego dwuwarstwy lipidowej. Obecność jonów

askorbinowych doprowadziła do zaniku przedprzejęcia fazowego oraz w niewielkim stopniu obniżyła temperatury przejścia fazowego. Proces ten można powiązać z wpływem jonów askorbinowych na interfazę dwuwarstwy lipidowej. Witamina C zmienia płynność hydrofobowego obszaru błony lipidowej, co jest interesującym rezultatem. Znany z literatury hydrofilowy charakter tej molekuly wskazywałby, że nie powinna ona oddziaływać oraz ulegać dystrybucji w fazie hydrofobowej. Jednak wynik ten jest spójny z wyznaczoną wartością współczynnika podziału błona/woda, wskazującą na większe powinowactwo witaminy C do dwuwarstwy lipidowej.

Podsumowując powyższe, w ramach prowadzonych badań sformułowano następujące wnioski odnoszące się do postawionych tez badawczych:

1. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem izotermicznej kalorymetrii miareczkującej potwierdziły występowanie wysokoenergetycznych oddziaływań pomiędzy witaminą C a modelem błony lipidowej, w tym:
 - Obecność cholesterolu, DOPE oraz DOPS w składzie dwuwarstwy lipidowej wpływa na mierzone oddziaływania, czego nie zauważono dla zmiennego uporządkowania błony lipidowej.
 - Różnice w oddziaływaniach w zależności od pH środowiska wskazują, że za wysokoenergetyczne oddziaływania odpowiedzialna jest witamina C w formie jonów askorbinowych.
2. Uzyskane parametry termodynamiczne z badań kalorymetrycznych umożliwiły wyznaczenie wielkości charakteryzujących transport witaminy C przez dwuwarstwę lipidową, w tym:
 - Wyznaczono współczynnik podziału błona/woda dla witaminy C, którego wartość wskazuje na większe powinowactwo tej molekuly do środowiska niepolarnego.
 - Wyznaczono współczynnik przepuszczalności witaminy C przez dwuwarstwę lipidową o różnym składzie wykorzystując nową metodę analizy danych.
 - Obecność cholesterolu obniża wartość współczynnika przepuszczalności, natomiast DOPE zwiększa, co jest zgodne z wpływem tych lipidów na właściwości błony lipidowej.
3. Oddziaływania pomiędzy witaminą C a dwuwarstwą lipidową wpływają na niektóre z jej właściwości fizykochemicznych, a dokładniej:
 - Wykazano, że obecności jonów askorbinowych obniża temperaturę przejścia fazowego oraz doprowadza do zaniku przedprzejęcia fazowego, co można powiązać z jej wpływem na interfazę dwuwarstwy lipidowej.
 - Witamina C wpływa na płynność hydrofobowego obszaru błony lipidowej, co wraz z uzyskaną wartością współczynnika podziału błona/woda może wskazywać na transport tej molekuly na drodze dyfuzji pasywnej.

Podsumowanie przeprowadzonych badań wymaga odniesienia się do aktualnego stanu wiedzy dotyczącego transportu witaminy C przez błonę komórkową opisanego w Rozdziale 1. Opierając się na poznanych do tej pory modelach opisujących transport tej molekuly przez błonę komórkową w organizmie człowieka, pojawia się kilka problematycznych kwestii, które nie zostały wyjaśnione. Porównując wartość stężenia witaminy C w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (40–400 μM [164]) ze stężeniem w wybranych komórkach (od 0.05 mM w erytrocytach do 10 mM w neuronach [2]), konieczne jest zwrócenie uwagi na to, jak duży gradient stężeń występuje pomiędzy przestrzenią zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkową. O ile poznane do tej pory i zbadane transportery białkowe (SVCT1 oraz SVCT2) odgrywają kluczową rolę w procesie przenoszenia witaminy C do wnętrza komórki, to brak wyjaśnienia przeciwstawnego mechanizmu, który przy tak dużych różnicach wartości stężeń, jest konieczny do wygenerowania określonego poziomu witaminy C w wybranych tkankach. W Rozdziale 1 opisano wchłanianie jonów askorbinowych w jelicie, i zwrócono uwagę na to, że w modelu opisującym przepływ tych jonów brakuje elementu dotyczącego procesu wypływu witaminy C do przestrzeni międzykomórkowych, jak i wnętrza jelita. Innym przykładem są komórki znajdujące się w mózgu. Neurony produkują DHA, które jest redukowane w astrocytach do jonów askorbinowych. Nie poznano do tej pory mechanizmu, który odpowiadałby za wypływ tych jonów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [14]. Nie można tutaj zapomnieć o transporterach GLUT, które również biorą udział w pośrednim transporcie witaminy C. Jednak, ze względu na niskie stężenie DHA we krwi ($< 2 \mu\text{M}$), nie można uznać tego mechanizmu transportu witaminy C za dominujący w utrzymaniu jej lokalnej homeostazy [14].

Jak pokazano w prowadzonych badaniach możliwy mechanizm transportu witaminy C na drodze dyfuzji prostej, może być brakującym elementem w spójnym opisie transportu tej molekuly przez błonę komórkową. Do tej pory, ze względu na hydrofilowy charakter witaminy C nie uważano, że transport na drodze dyfuzji prostej przez hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej może stanowić istotny wkład w mechanizmy transportu tej cząsteczki. Jednak, jak pokazano w prowadzonych badaniach, wartość współczynnika podziału błona/woda różni się do danych literaturowych ($\log(K_{O/W})$ od 2.7 do 3.6 w zależności od składu dwuwarstwy lipidowej). Ten wynik wraz z pozostałymi rezultatami pokazującymi, że obecności witaminy C prowadzi do określonych oddziaływań z dwuwarstwą lipidową, a w szczególności z jej interfazą, wskazuje na to, że transport na drodze dyfuzji prostej może być brakującym elementem modelu opisującego utrzymanie lokalnej homeostazy witaminy C, jak pokazano w [14]. Dodatkowo uzyskane rezultaty stanowiły punkt wyjściowy w modelu opisującym dochodzenie do równowagi wewnątrzkomórkowego stężenia jonów askorbinowych, i jego możliwej aplikacji w doustnej podaży witaminy C [165]. Pokazuje to istotność prowadzonych badań oraz wskazuje potencjalne ich zastosowanie. Dodatkowo metoda izotermicznej kalorymetrii miareczkującej będąca główną techniką pomiarową w prowadzonych badaniach, oraz stworzony model analizy danych może zostać szeroko zastosowana w charakteryzacji oddziaływań pomiędzy liposomalnymi nośnikami leków (m.in. stosowanymi w szczepionkach mRNA) a strukturami biologicznymi. Takie

badania są niezwykle istotne w kontekście biodostępności, efektywności działania, jak i wystąpienia możliwych działań niepożądanych substancji leczniczych.

Bibliografia

- [1] J. Du, J. J. Cullen, and G. R. Buettner, "Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1826, no. 2, pp. 443–457, 2012.
- [2] S. Padayatty and M. Levine, "Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks," *Oral Diseases*, vol. 22, no. 6, pp. 463–493, 2016.
- [3] S. Chambial, S. Dwivedi, K. K. Shukla, P. J. John, and P. Sharma, "Vitamin C in disease prevention and cure: An overview," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 28, no. 4, pp. 314–328, 2013.
- [4] J. Lykkesfeldt and P. Tveden-Nyborg, "The Pharmacokinetics of Vitamin C," *Nutrients*, vol. 11, no. 10, p. 2412, 2019.
- [5] B. Frei, I. Birlouez-Aragon, and J. Lykkesfeldt, "Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans?," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 52, no. 9, pp. 815–829, 2012.
- [6] M. G. Traber and J. F. Stevens, "Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 5, pp. 1000–1013, 2011.
- [7] V. Camarena and G. Wang, "The epigenetic role of vitamin C in health and disease," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 8, pp. 1645–1658, 2016.
- [8] D. Lane, P. Jansson, and D. Richardson, "Bonnie and Clyde: Vitamin C and iron are partners in crime in iron deficiency anaemia and its potential role in the elderly," *Ageing*, vol. 8, no. 5, pp. 1150–1152, 2016.
- [9] D. J. Lane and A. Lawen, "Ascorbate and plasma membrane electron transport - enzymes vs efflux," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 5, pp. 485–495, 2009.
- [10] M. Lindblad, P. Tveden-Nyborg, and J. Lykkesfeldt, "Regulation of vitamin C homeostasis during deficiency," *Nutrients*, vol. 5, no. 8, pp. 2860–79, 2013.

- [11] J. M. May, "The SLC23 family of ascorbate transporters: Ensuring that you get and keep your daily dose of vitamin C," *British Journal of Pharmacology*, vol. 164, no. 7, pp. 1793–1801, 2011.
- [12] J. X. Wilson, "Regulation of vitamin C transport.," *Annual review of nutrition*, vol. 25, pp. 105–125, 2005.
- [13] J. M. May, Z. Qu, and J. D. Morrow, "Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1528, no. 2-3, pp. 159–166, 2001.
- [14] M. Przybyło, J. Procek, M. Hoff, and M. Langner, "The alteration of lipid bilayer dynamics by phloretin and 6-ketocholestanol," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 178, pp. 38–44, 2014.
- [15] M. Łukawski, P. Dałek, T. Borowik, A. Foryś, M. Langner, W. Witkiewicz, and M. Przybyło, "New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability," *Journal of Liposome Research*, vol. 30, no. 3, pp. 227–234, 2020.
- [16] C. Muñoz-Montesino, F. J. Roa, E. Peña, M. González, K. Sotomayor, E. Inostroza, C. A. Muñoz, I. González, M. Maldonado, C. Soliz, A. M. Reyes, J. C. Vera, and C. I. Rivas, "Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2," *Free radical biology medicine*, vol. 70, pp. 241–254, 2014.
- [17] C. Hanneschläger, T. Barta, C. Siligan, and A. Horner, "Quantification of water flux in vesicular systems," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 8516, 2018.
- [18] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–731, 1972.
- [19] L.-H. Wang, X.-A. Zeng, M.-S. Wang, C. S. Brennan, and D. Gong, "Modification of membrane properties and fatty acids biosynthesis-related genes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Implications for the antibacterial mechanism of naringenin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1860, no. 2, pp. 481–490, 2018.
- [20] K. Simons and E. Ikonen, "Functional rafts in cell membranes," *Nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 569–572, 1997.
- [21] P. Janmey and P. Kinnunen, "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes," *Trends in Cell Biology*, vol. 16, no. 10, pp. 538–546, 2006.
- [22] H. T. McMahon and J. L. Gallop, "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling," *Nature*, vol. 438, pp. 590–596, 2005.
- [23] J. Zimmerberg, "Membrane biophysics," *Current Biology*, vol. 16, no. 8, 2006.

- [24] G. Van Meer and A. I. De Kroon, "Lipid map of the mammalian cell," *Journal of Cell Science*, vol. 124, no. 1, pp. 5–8, 2011.
- [25] J. Bigay and B. Antonny, "Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: Defining cellular territories in determining specificity," *Developmental Cell*, vol. 23, no. 5, pp. 886–895, 2012.
- [26] C. Tanford, "The hydrophobic effect and the organization of living matter," *Science*, vol. 200, no. 4345, pp. 1012–1018, 1978.
- [27] R. A. Khalil and A. A. Zarari, "Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates," *Applied Surface Science*, vol. 318, pp. 85–89, 2014.
- [28] E. A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini, E. Tymczyszyn, M. Frías, H. Almaleck, and G. J. Gordillo, "Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1778, no. 12, pp. 2655–2670, 2008.
- [29] M. Salim, H. Minamikawa, A. Sugimura, and R. Hashim, "Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics," *Med. Chem. Commun.*, vol. 5, no. 11, pp. 1602–1618, 2014.
- [30] J. B. de la Serna, G. J. Schütz, C. Eggeling, and M. Cebecauer, "There is no simple model of the plasma membrane organization," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 4, p. 106, 2016.
- [31] T. Kimura, W. Jennings, and R. M. Epand, "Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism," *Progress in Lipid Research*, vol. 62, pp. 75–92, 2016.
- [32] N. J. Yang and M. J. Hinner, *Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins*, pp. 29–53. Springer New York, 2015.
- [33] P. Yagle, *The Structure of Biological Membranes*. CRC Press, 2011.
- [34] M. De Los Angeles Frías and E. A. Disalvo, "Configuration of carbonyl groups at the lipid interphases of different topological arrangements of lipid dispersions," *Langmuir*, vol. 25, no. 14, pp. 8187–8191, 2009.
- [35] D. Casares, P. V. Escribá, and C. A. Rosselló, "Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues," *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no. 9, pp. 8181–8191, 2019.

- [36] A. Luchini and G. Vitiello, “Mimicking the mammalian plasma membrane: An overview of lipid membrane models for biophysical studies,” *Biomimetics*, vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2021.
- [37] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, “Membrane lipids: Where they are and how they behave,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, 2008.
- [38] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, and J. Peter Slotte, “Cholesterol interactions with phospholipids in membranes,” *Progress in Lipid Research*, vol. 41, no. 1, pp. 66–97, 2002.
- [39] D. Lingwood and K. Simons, “Lipid rafts as a membrane-organizing principle,” *Science*, vol. 327, no. 5961, pp. 46–50, 2010.
- [40] O. G. Mouritsen and M. J. Zuckermann, “What’s so special about cholesterol?,” *Lipids*, vol. 39, no. 11, pp. 1101–1113, 2004.
- [41] K. Simons and J. L. Sampaio, “Membrane organization and lipid rafts,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, no. 10, pp. 1–17, 2011.
- [42] D. Marquardt, B. Geier, and G. Pabst, “Asymmetric lipid membranes: Towards more realistic model systems,” *Membranes*, vol. 5, no. 2, pp. 180–196, 2015.
- [43] C. Contini, M. Schneemilch, S. Gaisford, and N. Quirke, “Nanoparticle–membrane interactions,” *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 13, no. 1, pp. 62–81, 2018.
- [44] M. L. Manca, I. Castangia, P. Matricardi, S. Lampis, X. Fernández-Busquets, A. M. Fadda, and M. Manconi, “Molecular arrangements and interconnected bilayer formation induced by alcohol or polyalcohol in phospholipid vesicles,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 117, pp. 360–367, 2014.
- [45] A. M. Carvalho, E. Fernandes, H. Gonçalves, J. J. Giner-Casares, S. Bernstorff, J. B. Nieder, M. E. C. D. Real Oliveira, and M. Lúcio, “Prediction of paclitaxel pharmacokinetic based on in vitro studies: Interaction with membrane models and human serum albumin,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 580, p. 119222, 2020.
- [46] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 46, no. 1, pp. 3–26, 2001.
- [47] G. Caron, M. Vallaro, and G. Ermondi, “Log P as a tool in intramolecular hydrogen bond considerations,” *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 27, pp. 65–70, 2018.

- [48] K. Bittermann, S. Spycher, and K.-U. Goss, "Comparison of different models predicting the phospholipid-membrane water partition coefficients of charged compounds," *Chemosphere*, vol. 144, pp. 382–391, 2016.
- [49] S. Lin, X. Yang, and H. Liu, "Development of liposome/water partition coefficients predictive models for neutral and ionogenic organic chemicals," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 179, pp. 40–49, 2019.
- [50] S. Endo, B. Mewburn, and B. I. Escher, "Liposome and protein–water partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)," *Chemosphere*, vol. 90, no. 2, pp. 505–511, 2013.
- [51] D. Holcman and Z. Schuss, "Time scale of diffusion in molecular and cellular biology," *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, no. 17, 2014.
- [52] A. K. Mandagere, T. N. Thompson, and K.-K. Hwang, "Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and in vitro liver enzyme metabolic stability rates," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, no. 2, pp. 304–311, 2002.
- [53] R. Zhao, L. H. Matherly, and I. D. Goldman, "Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 11, p. E4, 2009.
- [54] P. R. Lockman and D. D. Allen, "The transport of choline," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 28, no. 7, pp. 749–771, 2002.
- [55] H. Tapiero and K. D. Tew, "Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 57, no. 9, pp. 399–411, 2003.
- [56] D. Alexander and G. Goldberg, "Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 19, pp. 2045–2058, 2005.
- [57] S. Paula, A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines, and D. W. Deamer, "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness," *Biophysical Journal*, vol. 70, no. 1, pp. 339–348, 1996.
- [58] A. Walter and J. Gutknecht, "Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 90, no. 3, pp. 207–217, 1986.
- [59] D. Bemporad, J. W. Essex, and C. Luttmann, "Permeation of small molecules through a lipid bilayer: a computer simulation study," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 15, pp. 4875–4884, 2004.

- [60] R. Menichetti and T. Bereau, "Revisiting the Meyer-Overton rule for drug-membrane permeabilities," *Molecular Physics*, vol. 117, no. 20, pp. 2900–2909, 2019.
- [61] S. D. Krämer, D. Lombardi, A. Primorac, A. V. Thomae, and H. Wunderli-allenspach, "Lipid-bilayer permeation of drug-like compounds," *Chem Biodivers*, vol. 6, pp. 1900–1916, 2009.
- [62] R. N. Lewis and R. N. McElhaney, "Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by fourier transform infrared spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1828, no. 10, pp. 2347–2358, 2013.
- [63] A. V. Popova and D. K. Hinch, "Thermotropic phase behavior and headgroup interactions of the nonbilayer lipids phosphatidylethanolamine and monogalactosyl-diacylglycerol in the dry state," *BMC Biophysics*, vol. 4, p. 11, 2011.
- [64] L. Sun and R. A. Böckmann, "Membrane phase transition during heating and cooling: molecular insight into reversible melting," *European Biophysics Journal*, vol. 47, no. 2, pp. 151–164, 2018.
- [65] S. Ballweg, E. Sezgin, M. Doktorova, R. Covino, J. Reinhard, D. Wunnicke, I. Hänel, I. Levental, G. Hummer, and R. Ernst, "Regulation of lipid saturation without sensing membrane fluidity," *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, p. 756, 2020.
- [66] M. C. Smith, R. M. Crist, J. D. Clogston, and S. E. McNeil, "Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 409, no. 24, pp. 5779–5787, 2017.
- [67] R. Xu, "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement," *Particuology*, vol. 6, no. 2, pp. 112–115, 2008.
- [68] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016.
- [69] C. Ayala-Torres, N. Hernández, A. Galeano, L. Novoa-Aponte, and C.-Y. Soto, "Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells," *Annals of Microbiology*, vol. 64, no. 3, pp. 1189–1195, 2014.
- [70] E. Rascol, J.-M. Devoisselle, and J. Chopineau, "The relevance of membrane models to understand nanoparticles-cell membrane interactions," *Nanoscale*, vol. 8, no. 9, pp. 4780–4798, 2016.
- [71] Y. H. M. Chan and S. G. Boxer, "Model membrane systems and their applications," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 11, no. 6, pp. 581–587, 2007.

- [72] M. A. Crosio, M. A. Via, C. I. Cámara, A. Mangiarotti, M. G. Del Pópolo, and N. Wilke, "Interaction of a polyarginine peptide with membranes of different mechanical properties," *Biomolecules*, vol. 9, no. 10, 2019.
- [73] K. Morigaki and Y. Tanimoto, "Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1860, no. 10, pp. 2012–2017, 2018.
- [74] Z. Aminipour, M. Khorshid, H. Keshvari, S. Bonakdar, P. Wagner, and B. Van der Bruggen, "Passive permeability assay of doxorubicin through model cell membranes under cancerous and normal membrane potential conditions," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 146, pp. 133–142, 2020.
- [75] C. F. Su, H. Merlitz, H. Rabbel, and J. U. Sommer, "Nanoparticles of various degrees hydrophobicity interacting with lipid membranes," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 8, no. 17, pp. 4069–4076, 2017.
- [76] W. C. Wimley and T. E. Thompson, "Transbilayer and interbilayer phospholipid exchange in dimyristoylphosphatidylcholine/dimyristoylphosphatidylethanolamine large unilamellar vesicles," *Biochemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 1702–1709, 1991.
- [77] C. M. Rosetti, A. Mangiarotti, and N. Wilke, "Sizes of lipid domains: What do we know from artificial lipid membranes? What are the possible shared features with membrane rafts in cells?," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1859, no. 5, pp. 789–802, 2017.
- [78] A. D. Bangham, "Surrogate cells or trojan horses. The discovery of liposomes," *BioEssays*, vol. 17, no. 12, pp. 1081–1088, 1995.
- [79] C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, "Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 6, no. 5, pp. 1264–1276, 2009.
- [80] N. Kahya, "Protein–protein and protein–lipid interactions in domain-assembly: Lessons from giant unilamellar vesicles," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1798, no. 7, pp. 1392–1398, 2010.
- [81] S. Li, P. C. Hu, and N. Malmstadt, "Imaging molecular transport across lipid bilayers," *Biophysical Journal*, vol. 101, no. 3, pp. 700–708, 2011.
- [82] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, and K. Nejati-Koshki, "Liposome: classification, preparation, and applications," *Nanoscale research letters*, vol. 8, no. 1, p. 102, 2013.

- [83] C. Poojari, N. Wilkosz, R. B. Lira, R. Dimova, P. Jurkiewicz, R. Petka, M. Kepczynski, and T. Róg, “Behavior of the DPH fluorescence probe in membranes perturbed by drugs,” *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 223, p. 104784, 2019.
- [84] P. Dałek, T. Borowik, K. Reczyńska, E. Pamuła, W. Chrzanowski, and M. Langner, “Evaluation of the in vitro stability of stimuli-sensitive fatty acid-based microparticles for the treatment of lung cancer,” *Langmuir*, vol. 36, no. 37, pp. 11138–11146, 2020.
- [85] G. Nasr, H. Greige-Gerges, A. Elaissari, and N. Khreich, “Liposomal membrane permeability assessment by fluorescence techniques: Main permeabilizing agents, applications and challenges,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 580, p. 119198, 2020.
- [86] K. F. Hermann, C. S. Neuhaus, V. Micallef, B. Wagner, M. Hatibovic, H. E. Aschmann, F. Paech, R. Alvarez-Sanchez, S. D. Krämer, and S. Belli, “Kinetics of lipid bilayer permeation of a series of ionisable drugs and their correlation with human transporter-independent intestinal permeability,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, pp. 150–161, 2017.
- [87] B. I. Escher, C. Berger, N. Bramaz, J. H. Kwon, M. Richter, O. Tsinman, and A. Avdeef, “Membrane-water partitioning, membrane permeability, and baseline toxicity of the parasiticides ivermectin, albendazole, and morantel,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, no. 4, pp. 909–918, 2008.
- [88] G. E. Flaten, A. B. Dhanikula, K. Luthman, and M. Brandl, “Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 80–90, 2006.
- [89] X.-Y. Liu, Q. Yang, N. Kamo, and J. Miyake, “Effect of liposome type and membrane fluidity on drug–membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 913, no. 1, pp. 123–131, 2001.
- [90] J. C. Mathai, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, and M. L. Zeidel, “Structural determinants of water permeability through the lipid membrane,” *Journal of General Physiology*, vol. 131, no. 1, pp. 69–76, 2008.
- [91] M. Nilam, S. Collin, S. Karmacharya, A. Hennig, and W. M. Nau, “Membrane permeability and its activation energies in dependence on analyte, lipid, and phase type obtained by the fluorescent artificial receptor membrane assay,” *ACS Sensors*, vol. 6, no. 1, pp. 175–182, 2021.
- [92] J. Mathai and M. Zeidel, “Permeability by stopped-flow fluorimetry,” *Dopico A.M. (eds) Methods in Membrane Lipids. Methods in Molecular Biology™*, vol. 400, 2007.

- [93] T. Shimanouchi, H. Ishii, N. Yoshimoto, H. Umakoshi, and R. Kuboi, "Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 73, no. 1, pp. 156–160, 2009.
- [94] T. Bhatia, T. Robinson, and R. Dimova, "Membrane permeability to water measured by microfluidic trapping of giant vesicles," *Soft Matter*, vol. 16, no. 31, pp. 7359–7369, 2020.
- [95] B. J. Bennion, N. A. Be, M. W. McNerney, V. Lao, E. M. Carlson, C. A. Valdez, M. A. Malfatti, H. A. Enright, T. H. Nguyen, F. C. Lightstone, and T. S. Carpenter, "Predicting a drug's membrane permeability: A computational model validated with in vitro permeability assay data," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 121, no. 20, pp. 5228–5237, 2017.
- [96] M. Ikonen, L. Murtomäki, and K. Kontturi, "Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 78, no. 2, pp. 275–282, 2010.
- [97] H. Heerklotz, "The microcalorimetry of lipid membranes," *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 16, no. 15, p. 441, 2004.
- [98] S. Ong, H. Liu, X. Qiu, G. Bhat, and C. Pidgeon, "Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces," *Analytical chemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 755–762, 1995.
- [99] B. I. Escher, M. Berg, J. Mühlemann, M. A. A. Schwarz, J. L. M. Hermens, W. H. J. Vaes, and R. P. Schwarzenbach, "Determination of liposome/water partition coefficients of organic acids and bases by solid-phase microextraction," *Analyst*, vol. 127, pp. 42–48, 2002.
- [100] C. Matos, C. Moutinho, and P. Lobão, "Liposomes as a model for the biological membrane: Studies on daunorubicin bilayer interaction," *Journal of Membrane Biology*, vol. 245, no. 2, pp. 69–75, 2012.
- [101] L. M. Magalhães, C. Nunes, M. Lúcio, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, "High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients," *Nature Protocols*, vol. 5, no. 11, pp. 1823–1830, 2010.
- [102] A. Avdeef, K. J. Box, J. E. A. Comer, C. Hibbert, and K. Y. Tam, "pH-metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 2, pp. 209–215, 1998.
- [103] D. A. Middleton, D. G. Reid, and A. Watts, "Combined quantitative and mechanistic study of drug–membrane interactions using a novel 2H NMR approach," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, no. 2, pp. 507–514, 2004.

- [104] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, and I. Isac, "Phase transitions in phospholipid vesicles fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 311, no. 3, pp. 330–348, 1973.
- [105] R. C. YashRoy, "Determination of membrane lipid phase transition temperature from ^{13}C -nmr intensities," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 20, no. 4, pp. 353–356, 1990.
- [106] N. Michel, A.-S. Fabiano, A. Polidori, R. Jack, and B. Pucci, "Determination of phase transition temperatures of lipids by light scattering," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 139, no. 1, pp. 11–19, 2006.
- [107] W. Chen, F. Duša, J. Witos, S.-K. Ruokonen, and S. K. Wiedmer, "Determination of the main phase transition temperature of phospholipids by nanoplasmonic sensing," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 14815, 2018.
- [108] M. Shinitzky and Y. Barenholz, "Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 515, pp. 367–394, dec 1978.
- [109] A. Marczak, "Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 2, pp. 236–239, 2009.
- [110] D. A. Los and N. Murata, "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1666, no. 1, pp. 142–157, 2004.
- [111] K. J. Seu, L. R. Cambrea, R. M. Everly, and J. S. Hovis, "Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions," *Biophysical journal*, vol. 91, no. 10, pp. 3727–3735, 2006.
- [112] S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, C. Charcosset, and H. Greige-Gerges, "Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 113, pp. 40–48, 2018.
- [113] A. S. Dukhin and P. J. Goetz, "Acoustic and Electroacoustic Spectroscopy," *Langmuir*, vol. 12, no. 18, pp. 4336–4344, 1996.
- [114] A. Bangham, J. De Gier, and G. Greville, "Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 1, no. 3, pp. 225–246, 1967.
- [115] L. Mayer, M. Hope, and P. Cullis, "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 858, no. 1, pp. 161–168, 1986.

- [116] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, and L. rong Hu, "Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1061, no. 2, pp. 297–303, 1991.
- [117] S. Leavitt and E. Freire, "Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 11, no. 5, pp. 560–566, 2001.
- [118] J. W. Chang, A. Armaou, and R. M. Rioux, "Continuous Injection Isothermal Titration Calorimetry for In Situ Evaluation of Thermodynamic Binding Properties of Ligand–Receptor Binding Models," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 125, no. 29, pp. 8075–8087, 2021.
- [119] A. Hildebrand, K. Beyer, R. Neubert, P. Garidel, and A. Blume, "Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 279, no. 2, pp. 559–571, 2004.
- [120] C. Trandum, P. Westh, K. Jørgensen, and O. G. Mouritsen, "Association of ethanol with lipid membranes containing cholesterol, sphingomyelin and ganglioside: a titration calorimetry study," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1420, no. 1-2, pp. 179–188, 1999.
- [121] P. Maity, B. Saha, G. S. Kumar, and S. Karmakar, "Binding of monovalent alkali metal ions with negatively charged phospholipid membranes," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1858, no. 4, pp. 706–714, 2016.
- [122] M. Keller, M. R. Jorgensen, E. Perouzel, and A. D. Miller, "Thermodynamic aspects and biological profile of CDAN/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes," *Biochemistry*, vol. 42, no. 20, pp. 6067–6077, 2003.
- [123] M. J. Scott and M. N. Jones, "A microcalorimetric study of the interaction of phospholipid liposomes with colloidal titanium dioxide and silica: An example of enthalpy-entropy compensation," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 207, no. 1-3, pp. 69–79, 2002.
- [124] Y. Navon, H. Radavidson, J. L. Putaux, B. Jean, and L. Heux, "pH-Sensitive interactions between cellulose nanocrystals and DOPC liposomes," *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 9, pp. 2918–2927, 2017.
- [125] F. A. Carneiro, M. L. Bianconi, G. Weissmüller, F. Stauffer, and A. T. Da Poian, "Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions," *Journal of Virology*, vol. 76, no. 8, pp. 3756–3764, 2002.
- [126] M. J. Swamy and R. S. Sankhala, "Probing the thermodynamics of protein-lipid interactions by isothermal titration calorimetry," *Methods in Molecular Biology*, vol. 974, pp. 37–53, 2013.

- [127] M. M. Moreno, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, and K. Brandenburg, "The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1788, no. 6, pp. 1296–1303, 2009.
- [128] E. Sikorska, E. Iłowska, D. Wyrzykowski, and A. Kwiatkowska, "Membrane structure and interactions of peptide hormones with model lipid bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1818, no. 12, pp. 2982–2993, 2012.
- [129] V. K. Srivastava and R. Yadav, "Chapter 9 - Isothermal Titration Calorimetry," in *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, pp. 125–137, Academic Press, 2019.
- [130] M. J. Todd and J. Gomez, "Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity?," *Analytical Biochemistry*, vol. 296, no. 2, pp. 179–187, 2001.
- [131] K. Maximova, J. Wojtczak, and J. Trylska, "Enzyme kinetics in crowded solutions from isothermal titration calorimetry," *Analytical Biochemistry*, vol. 567, pp. 96–105, 2019.
- [132] C. F. Quinn and L. D. Hansen, "Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1964, pp. 241–249, 2019.
- [133] L. S. Mizoue and J. Tellinghuisen, "The role of backlash in the "first injection anomaly" in isothermal titration calorimetry," *Analytical Biochemistry*, vol. 326, no. 1, pp. 125–127, 2004.
- [134] C. M. Hoo, N. Starostin, P. West, and M. L. Mecartney, "A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, no. 1, pp. 89–96, 2008.
- [135] V. V. Vysotskii, O. Y. Uryupina, A. V. Gusel'nikova, and V. I. Roldugin, "On the feasibility of determining nanoparticle concentration by the dynamic light scattering method," *Colloid Journal*, vol. 71, no. 6, p. 739, 2009.
- [136] H. Zhao and P. Lappalainen, "A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions.," *Molecular biology of the cell*, vol. 23, no. 15, pp. 2823–2830, 2012.
- [137] H. Q. Xu, A. H. Zhang, C. Auclair, and X. G. Xi, "Simultaneously monitoring DNA binding and helicase-catalyzed DNA unwinding by fluorescence polarization.," *Nucleic acids research*, vol. 31, no. 14, p. E70, 2003.

- [138] M. Pinheiro, M. Arêde, C. Nunes, J. M. Caio, C. Moiteiro, M. Lúcio, and S. Reis, “Differential interactions of Rifabutin with human and bacterial membranes: implication for its therapeutic and toxic effects,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 56, no. 2, pp. 417–426, 2013.
- [139] A. R. Neves, C. Nunes, and S. Reis, “Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: Implication for its pleiotropic action,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 1, pp. 12–18, 2016.
- [140] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 1983.
- [141] P. Mishra, U. Singh, C. M. Pandey, P. Mishra, and G. Pandey, “Application of student’s t-test, analysis of variance, and covariance,” *Annals of cardiac anaesthesia*, vol. 22, no. 4, pp. 407–411, 2019.
- [142] C. Hanneschlaeger, T. Barta, H. Pechova, and P. Pohl, “The effect of buffers on weak acid uptake by vesicles,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 2, 2019.
- [143] W. Ding, M. Palaiokostas, W. Wang, and M. Orsi, “Effects of lipid composition on bilayer membranes quantified by all-atom molecular dynamics,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 49, pp. 15263–15274, 2015.
- [144] National Centre for Biotechnology Information (2022), “PubChem Compound Summary for CID 54670067, Ascorbic acid.”
- [145] National Centre for Biotechnology Information (2022), “PubChem Compound Summary for CID 5780, Sorbitol.”
- [146] National Centre for Biotechnology Information (2022), “PubChem Compound Summary for CID 1176, Urea.”
- [147] National Centre for Biotechnology Information (2022), “PubChem Compound Summary for CID 753, Glycerol.”
- [148] National Centre for Biotechnology Information (2022), “PubChem Compound Summary for CID 1030, Propylene glycol.”
- [149] A. Nowacka, S. Douezan, L. Wadsö, D. Topgaard, and E. Sparr, “Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions,” *Soft Matter*, vol. 8, pp. 1482–1491, 2012.
- [150] L. Pocivavsek, K. Gavrillov, K. Cao, E. Chi, D. Li, B. Lin, M. Meron, J. Majewski, and K. Lee, “Glycerol-induced membrane stiffening: the role of viscous fluid adlayers,” *Biophysical journal*, vol. 101, no. 1, pp. 118–127, 2011.
- [151] R. D. Harvey, N. Ara, R. K. Heenan, D. J. Barlow, P. J. Quinn, and M. J. Lawrence, “Stabilization of distearoylphosphatidylcholine lamellar phases in propylene glycol using cholesterol,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, no. 12, pp. 4408–4417, 2013.

- [152] M. R. Mozafari, E. Mazaheri, and K. Dormiani, "Simple equations pertaining to the particle number and surface area of metallic, polymeric, lipidic and vesicular nanocarriers," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 89, no. 2, 2021.
- [153] T.-H. Lee, M.-A. Sani, S. Overall, F. Separovic, and M.-I. Aguilar, "Effect of phosphatidylcholine bilayer thickness and molecular order on the binding of the antimicrobial peptide maculatin 1.1," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1860, no. 2, pp. 300–309, 2018.
- [154] N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, "Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains," *The Journal of membrane biology*, vol. 208, no. 3, pp. 193–202, 2005.
- [155] H. Sapper, K.-D. Roth, and W. Lohmann, "The diffusion of L(+)-ascorbic acid across DPPC vesicle membranes," *Journal of Microencapsulation*, vol. 2, no. 1, pp. 23–30, 1985.
- [156] K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, and M. T. Lamy, "Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, no. 5, pp. 954–963, 2009.
- [157] C. Nunes, G. Brezesinski, D. Lopes, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and M. Lúcio, "Lipid–drug interaction: biophysical effects of Tolmetin on membrane mimetic systems of different dimensionality," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 43, pp. 12615–12623, 2011.
- [158] G. Neunert, J. Tomaszewska-Gras, A. Baj, M. Gauza-Włodarczyk, S. Witkowski, and K. Polewski, "Phase transitions and structural changes in DPPC liposomes induced by a 1-carba-alpha-tocopherol analogue," *Molecules*, vol. 26, no. 10, 2021.
- [159] X. Wang and P. J. Quinn, "Vitamin E and its function in membranes," *Progress in Lipid Research*, vol. 38, no. 4, pp. 309–336, 1999.
- [160] F. Giudice, E. E. Ambroggio, M. Mottola, and M. L. Fanani, "The amphiphilic alkyl ester derivatives of l-ascorbic acid induce reorganization of phospholipid vesicles," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 9, pp. 2132–2139, 2016.
- [161] M. B. Lande, J. M. Donovan, and M. L. Zeidel, "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons.," *Journal of General Physiology*, vol. 106, no. 1, pp. 67–84, 1995.
- [162] P. Maity, B. Saha, G. Suresh Kumar, and S. Karmakar, "Effect of zwitterionic phospholipid on the interaction of cationic membranes with monovalent sodium salts," *Langmuir*, vol. 34, no. 33, pp. 9810–9817, 2018.

-
- [163] B. Klasczyk, V. Knecht, R. Lipowsky, and R. Dimova, "Interactions of alkali metal chlorides with phosphatidylcholine vesicles," *Langmuir*, vol. 26, no. 24, pp. 18951–18958, 2010.
- [164] D. J. Lane and D. R. Richardson, "The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption!," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 75, pp. 69–83, 2014.
- [165] M. Gąbka, P. Dałek, M. Przybyło, D. Gackowski, R. Oliński, and M. Langner, "The membrane electrical potential and intracellular ph as factors influencing intracellular ascorbate concentration and their role in cancer treatment," *Cells*, vol. 10, no. 11, 2021.

Spis rysunków

1.1	Schemat przedstawiający formy kwasu askorbinowego w zależności od pH środowiska	11
1.2	Schemat przedstawiający przejście jonu askorbinowego do formy rodnika askorbinowego i DHA	12
1.3	Schemat przedstawiający transport witaminy C w jelicie cienkim	14
2.1	Schemat przedstawiający budowę dwuwarstwy lipidowej	17
2.2	Schemat przedstawiający zależność pomiędzy kształtem cząsteczki amfifilowej a parametrem <i>CPP</i> oraz strukturami, jakie tworzą w środowisku wodnym	18
2.3	Schemat przedstawiający budowę głównych lipidów, wchodzących w skład błony komórkowej	19
3.1	Schemat przedstawiający zmianę współczynnika przepuszczalności w zależności od rodzaju cząsteczki	24
3.2	Schemat przedstawiający zależność pomiędzy potencjałem powierzchniowym a potencjałem zeta struktur w środowisku wodnym	28
4.1	Schemat przedstawiający różne rodzaje liposomów w zależności od rozmiaru — <i>GU</i> V, <i>LU</i> V, <i>SU</i> V — oraz liczby warstw budujących pęcherzyki (<i>MLV</i>)	31
7.1	Schemat przedstawiający kolejne kroki przygotowania dużych jednowarstwowych pęcherzyków (<i>LUV</i>)	38
8.1	Schemat urządzenia pomiarowego wykorzystywanego w technice <i>ITC</i>	41
8.2	Schemat przedstawiający reprezentatywne dane rzeczywiste dla pomiaru <i>ITC</i>	42
8.3	Schemat przedstawiający reprezentatywne dane rzeczywiste dla pomiaru <i>ITC</i> (chlorek wapnia i <i>EDTA</i>)	42
9.1	Reprezentatywne wyniki uzyskane podczas pomiaru techniką <i>DLS</i>	45
10.1	Reprezentatywne widmo emisyjne dla <i>DPH</i>	49
11.1	Reprezentatywne wyniki uzyskane podczas pomiaru techniką <i>ELS</i>	52

13.1 Schemat przedstawiający obszary na termogramie, które posłużyły do wyznaczenia czasów T_1 oraz T_2	66
14.1 Schemat procesu wyznaczenia współczynnika przepuszczalności w oparciu o dane rzeczywiste uzyskane podczas pomiaru ITC	84
15.1 Schemat przedstawiający funkcję pozwalającą na wyznaczenie temperatury przejścia fazowego z wykorzystaniem techniki DLS	89

Spis tabel

7.1	Zestawienie lipidów, które wykorzystano do wytworzenia liposomów . . .	39
13.1	Średni rozkład wielkości liposomów oraz polidispersyjność (PDI) przed pomiarem ITC oraz po pomiarze	60
13.2	Zestawienie stężenia askorbinianu sodu, lipidów, objętości nastrzyków oraz końcowego stosunku molowego jonów askorbinowych oraz lipidów (n_{AS}/n_{LIP}) w komorze pomiarowej	62
13.3	Wyznaczony czas T_1 oraz T_2 dla pomiarów kalorymetrycznych badających oddziaływania z jonami askorbinowymi	67
13.4	Zestawienie prezentujące wybrane właściwości witaminy C, d-sorbitolu, mocznika, glicerolu, glikolu propylenowego	74
14.1	Zestawienie logarytmu ze współczynnika podziału, $\log(K_{B/W})$, dla jonów askorbinowych dla liposomów o różnym składzie lipidowym	81
14.2	Współczynnik przepuszczalności P witaminy C dla liposomów o różnym składzie lipidowym	85
15.1	Temperatura przejścia fazowego T_α wyznaczona dla próbki kontrolnej — liposomów DPPC oraz liposomów DPPC w obecności wybranych molekuł	92
15.2	Wyliczone wartości mikrolepkości na podstawie pomiaru anizotropii dla pięciu różnych cząsteczek: askorbinianu sodu, mocznika, d-sorbitolu, glicerolu oraz glikolu propylenowego	95
15.3	Rozkład rozmiarów oraz polidispersyjność dla liposomów w obecności różnych cząsteczek	99

Spis wykresów

13.1	Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu	56
13.2	Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do buforu	56
13.3	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: buforu 20 mM Hapes pH 7.4 (szary), 10 mM chlorku sodu (granatowy), 10 mM glukozy (czerwony) oraz 10 mM askorbinianu sodu (czarny)	57
13.4	Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM NaCl	58
13.5	Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do 10 mM glukozy	59
13.6	Termogram prezentujący dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 10 mM askorbinianu sodu, (b) 1 mM DHA dla pojedynczego nastrzyku	60
13.7	Termogramy prezentujące dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 10 mM askorbinianu sodu, (b) buforu (20 mM Hapes, pH 7.4) dla pojedynczego nastrzyku	61
13.8	Zmiana entalpii molowej (ΔH_{mol}) odpowiadającej pojedynczemu nastrzykowi w funkcji końcowego stosunku jonów askorbinowych i lipidów ($n_{\text{AS}}/n_{\text{LIP}}$) w komorze pomiarowej	63
13.9	Termogramy prezentujące dane rzeczywiste dla miareczkowania 1 mM liposomów DOPC do: (a) 20 mM askorbinianu sodu, (b) 10 mM liposomów DOPC do 20 mM askorbinianu sodu dla pojedynczego nastrzyku	63
13.10	Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 1 mM liposomów DOPC, (b) 1 mM liposomów DOPC + 30% mol chol, (c) 1 mM liposomów DOPC + 15% mol DOPE, (d) 1 mM DOPC + 15% mol DOPS do 10 mM askorbinianu sodu	64
13.11	Zmiana entalpii molowej w funkcji stosunku molowego titrantu — liposomów do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów DOPC + 4.2% mol DOPE (bordowy), DOPC + 15% mol DOPE (czerwony)	65

13.12	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DOPC + 30% mol chol (szary)	67
13.13	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DOPC + 4.2% mol DOPE (bordowy), DOPC + 15% mol DOPE (czerwony)	68
13.14	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny) oraz DOPC + 15% mol DOPS (granatowy)	69
13.15	Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania 1 mM liposomów DPPC w temperaturze: (a) 25°C, (b) 45°C do 10 mM askorbinianu sodu	70
13.16	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC (czarny), DPPC 25°C (ciemnozielony), DPPC 45°C (jasnozielony)	71
13.17	Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 1 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 20 mM Hepes, pH 7.4), (b) 0.5 mM liposomów DOPC do 10 mM askorbinianu sodu (bufor 100 mM bufor octanowy, pH 4.2)	72
13.18	Entalpia kumulatywna w funkcji stosunku molowego titrantu do substancji znajdującej się w komorze pomiarowej — askorbinianu sodu dla liposomów: DOPC w pH 7.4 (czarny, szary) oraz pH 4.2 (bordowy, czerwony)	73
13.19	Termogramy prezentujące ciepło miareczkowania: (a) 5 mM liposomów DPPC do 10 mM d-sorbitolu, (b) 5 mM liposomów DPPC do 5 mM mocznika	75
13.20	Termogram prezentujący ciepło miareczkowania 5 mM liposomów DPPC do 0.5 mM glicerolu	76
13.21	Termogram prezentujący ciepło miareczkowania 5 mM liposomów DPPC do 0.4 mM glikolu propylenowego	76
13.22	Zestawienie zmiany entalpii molowej ΔH_{mol} w funkcji wybranych właściwości molekuł: (a) masy cząsteczkowej, (b) logarytmu z współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{\text{O/W}}$), (c) wartości pH odpowiadającej punktom pK_a , (d) pola powierzchni polarnej	77
14.1	Reprezentatywne wyniki przedstawiające ciepło kumulatywne w funkcji stężenia lipidu wraz z dopasowaniem funkcją (Równanie (14.2))	81

14.2	Reprezentatywne wyniki przedstawiające przekształcenie danych rzeczywistych. Zależności dla pojedynczego nastrzyku odpowiadają wykresowi: (a) 1 mM liposomy DOPC + 15% mol DOPE, (b) 1mM liposomy DPCC w temperaturze 25°C miareczkowane do 10 mM askorbinianu sodu wraz z dopasowaniem funkcją opisaną Równaniem (14.8)	85
15.1	Przebieg charakterystyki zmiany znormalizowanej średniej liczby zliczeń w funkcji temperatury dla zakresu 27–45°C dla 1 mM liposomów DPPC	90
15.2	Znormalizowana średnia liczba zliczeń w funkcji temperatury dla 1 mM liposomów DPPC wraz z dopasowaniem funkcją Boltzmana	91
15.3	Przebieg charakterystyki zmiany znormalizowanej średniej liczby zliczeń w funkcji temperatury dla zakresu 27–45°C dla 1 mM liposomów DPPC w obecności 10 mM askorbinianu sodu	92
15.4	Zmiana anizotropii dwuwarstwy lipidowej w obecności: askorbinianu sodu (czarny), mocznika (czerwony) oraz d-sorbitolu (bordowy)	93
15.5	Zmiana anizotropii dwuwarstwy lipidowej w obecności: askorbinianu sodu (czarny), glicerolu (granatowy) oraz glikolu propylenowego (niebieski)	94
15.6	Zmiana potencjału zeta w funkcji stosunku molowego lipidów do wybranych cząsteczek	96
15.7	Zmiana mobilności elektroforetycznej (oś lewa) oraz ładunku efektywnego (oś prawa) w funkcji stosunku molowego lipidów do wybranych cząsteczek	97
15.8	Zestawienie zmiany ładunku efektywnego Q_{ef} w funkcji wybranych właściwości molekuł: (a) masy cząsteczkowej, (b) logarytmu ze współczynnika podziału oktanol/woda ($K_{O/W}$), (c) wartości pH odpowiadającej punktom pK_a , (d) pola powierzchni polarnej	98
15.9	Zestawienie zmiany ładunku efektywnego Q_{ef} w funkcji wartości mikrolepkości wybranych molekuł uzyskanej podczas wykonanych pomiarów	99

Wykaz dorobku naukowego

1. **P. Dalek**, D. Drabik, H. Wołczańska, A. Foryś, M. Jagas, N. Jędruchniewicz, M. Przybyło, W. Witkiewicz, M. Langner, "Bioavailability by design – vitamin D3 liposomal delivery vehicles," *Nanomedicine, Biology and Medicine*, vol. 47, 2022.
2. M. Gąbka, **P. Dalek**, M. Przybyło, D. Gackowski, R. Oliński, M. Langner, "The Membrane Electrical Potential and Intracellular pH as Factors Influencing Intracellular Ascorbate Concentration and Their Role in Cancer Treatment," *Cells*, vol. 10, no. 11, 2021.
3. **P. Dalek**, T. Borowik, K. Reczyńska, E. Pamuła, W. Chrzanowski, M. Langner, "Evaluation of the in vitro stability of stimuli-sensitive fatty acid- based microparticles for the treatment of lung cancer," *Langmuir*, vol. 36, no. 37, pp. 11138–11146, 2020.
4. M. Łukawski, **P. Dalek**, W. Witkiewicz, M. Przybyło, M. Langner, "Experimental evidence and physiological significance of the ascorbate passive diffusion through the lipid bilayer," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 232, pp. 1–6, 2020.
5. M. Łukawski, **P. Dalek**, T. Borowik, A. Foryś, M. Langner, W. Witkiewicz, M. Przybyło, "New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability," *Journal of Liposome Research*, vol. 30, no. 3, pp. 227–234, 2020.
6. J. Doskocz, **P. Dalek**, M. Przybyło, B. Trzebicka, A. Foryś, A. Kobylukh, A. Iglíč, M. Langner, "The elucidation of the molecular mechanism of the extrusion process," *Materials*, vol. 14, no. 15, pp. 4278, 2020.
7. J. Doskocz*, **P. Dalek***, A. Foryś, B. Trzebicka, M. Przybyło, L. Mesarec, A. Iglíč, M. Langner, "The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress," *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, vol. 1862, no. 9, pp. 1–9, 2020. *Authors contributed equally.