

mgr inż. Marta Magdalena Orczyk

Warszawa, 29.06.2018

Wydział Chemiczny

Katedra Biotechnologii Medycznej

Politechnika Warszawska

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Badanie wpływu saponin na modelowe warstwy lipidowe

W niniejszej pracy podjęta została próba wyjaśnienia natury oddziaływań między saponinami, naturalnymi surfaktantami posiadającymi szereg potencjalnych właściwości farmakologicznych, a komponentami naturalnych błon komórkowych w monowarstwach Langmuira. Do badań wykorzystano cztery saponiny: hederakozyd C, α -hederinę, sól kwasu glicyryzynowego i digitoninę oraz dwa ekstrakty saponinowe z kory mydłodziurki właściwego nazwane w pracy odpowiednio QBS „Sigma” i QBS „SuperSap”.

Rozprawa doktorska składa się z czterech głównych części tj. części teoretycznej, części doświadczalnej, wniosków oraz bibliografii.

Pierwsza część pracy poświęcona jest przeglądowi literatury przedmiotu i obejmuje trzy podrozdziały, w których przedstawiono kolejno informacje nt. saponin, błon komórkowych oraz modelowych układów imitujących naturalne błony komórkowe. Przedstawiono także genezę badań na temat potencjalnego wpływu saponin na błony biologiczne.

Na początku części eksperymentalnej zaprezentowano wszystkie odczynniki chemiczne stosowane w badaniach, jak również przedstawiono stosowaną procedurę pomiarową. W dalszej części przedstawiono wyniki wykonanych badań. W pierwszej kolejności zaprezentowano nowatorski sposób wprowadzenia do subfazy związków powierzchniowo czynnych za pomocą pompy perystaltycznej pod uprzednio utworzoną monowarstwę Langmuira imitującą połowę błony biologicznej. Przedstawiono wyniki z szeregu testów potwierdzających znikomy wpływ przepływu wymuszonego przez pompę perystaltyczną na monowarstwę Langmuira. To zaowocowało zaprojektowaniem wanny Langmuira ułatwiającej wymianę subfazy pod monowarstwą lipidową. Została ona wykorzystana do większości pomiarów przedstawionych w niniejszej dysertacji. W dalszym etapie zdecydowano się na przeprowadzenie badań, których

celem było porównanie wpływu surfaktantów syntetycznych (SDS, CTAB i Triton X-100) i komercyjnie dostępnego biosurfaktanta pozyskanego z kory drzewa *Quillaja saponaria* Molina (Quillaja bark saponin, QBS „Sigma”) na monowarstwę DPPC (dipalmitylofosfatydylocholiny) jako układ modelowy, symulujący warstwę błony komórkowej. Wykazano odmienny wpływ biosurfaktanta w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi na modelową błonę utworzoną z fosfolipidu DPPC. Następnym etapem było sprawdzenie czy komercyjnie dostępne ekstrakty pochodzące z tego samego źródła naturalnego, tj. kory mydłodziwnego właściwego (QBS), odpowiednio QBS „Sigma i QBS „SuperSap” wykazują te same właściwości adsorpcyjne. Dzięki przeprowadzonym badaniom (pomiar ciśnienia powierzchniowego, reologii powierzchniowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej) zaobserwowano, że pomimo wspólnej nazwy, dostępne handlowo ekstrakty QBS mogą różnić się między sobą właściwościami. Te różnice mogą najprawdopodobniej wynikać z rozbieżności w metodyce ekstrakcji, a także zmienności składu kory mydłodziwnego właściwego. Ze względu na różnorodność w budowie saponin, jak również złożoność składów ekstraktów, do dalszych badań zdecydowano się wykorzystać dostępne komercyjnie oczyszczone saponiny. W pierwszym etapie sprawdzono wpływ saponiny steroidowej - digitoniny na monowarstwy lipidowe (DPPC oraz DPPC:Chol). Najbardziej znaczący wpływ digitoniny zaobserwowano w obecności monowarstwy mieszanej zawierającej DPPC i cholesterol, gdzie prawdopodobnym jest, że digitonina „rywalizuje” z cząsteczkami DPPC o cholesterol. To z kolei może skutkować tworzeniem nowych kompleksów cholesterol-digitonina. Potwierdzają to wyniki IRRAS (odbiciowej spektroskopii w podczerwieni).

Aby sprawdzić czy właściwości saponin są uwarunkowane budową chemiczną związku, wliczając w to strukturę części aglikonowej, ilość, a także długość łańcuchów cukrowych, jak również pozycję ich przyłączenia do części aglikonowej w kolejnych badaniach zdecydowano się sprawdzić wpływ saponin triterpenowych: α -hederyny, hederakozydu C i soli kwasu glicyryzynowego na monowarstwy DPPC i monowarstwy mieszane z cholesterol. Okazało się, że budowa cząsteczek saponin wpływa w ogromnej mierze na ich powinowactwo do lipidów. Zaobserwowano duży wpływ α -hederyny na monowarstwy Langmuira. Jest on w zgodzie z doniesieniami literaturowymi nt. jej cytotoksyczności oraz hemolityczności. Niewielki wpływ z kolei zaobserwowano w przypadku hederakozydu C i znikomy w przypadku soli kwasu glicyryzynowego. Okazało się, że subtelne różnice w budowie saponin mogą wpływać na ich aktywność powierzchniową.

Następnie zweryfikowano uprzednio uzyskane wyniki przy użyciu dwuwarstw lipidowych w postaci olbrzymich liposomów jednowarstwowych (GUV). Uzyskane wyniki potwierdzają, że obecność cholesterolu w znaczący sposób wpływa na oddziaływania liposomów z saponinami. Ponadto zaobserwowano korelację między wynikami uzyskanymi dla mono- i dwuwarstw lipidowych.

W kolejnym etapie badań zdecydowano się sprawdzić wpływ digitoniny na monowarstwy fosfolipidowe odpowiednio: DPPC, DMPE, POPC, POPE, DSPC, DSPE, DPPE, DPPS, DPPG przy użyciu odbiciowej spektroskopii w podczerwieni (IRRAS). Technika ta pozwoliła na badanie subtelnych zmian reorganizacji monowarstw lipidów pod wpływem saponiny. Okazało się, że digitonina oddziałuje z fosfolipidami w bardzo wybiórczy sposób. Wyniki wskazują, że zarówno „głowa” lipidowa, długość łańcucha hydrofobowego oraz faza, w której fosfolipid się znajduje, wpływają na te oddziaływania. Największe różnice zaobserwowano w przypadku DPPE i DPPS. Należy jednak tu zaznaczyć, że w żadnym przypadku digitonina nie działała destrukcyjnie na monowarstwy fosfolipidowe. Nawet jeśli wbudowywała się w monowarstwę mogła być z łatwością usunięta poprzez mechaniczną kompresję monowarstwy.

W ostatnim etapie badań w ramach dysertacji przeprowadzono pomiary w monowarstwach odwzorowujących zewnętrzną warstwę błony komórkowej erytrocytów w kontekście badań nad wyjaśnieniem zdolności hemolitycznych. Zbadano wpływ saponiny steroidowej (digitoniny) i ekstraktu zawierającego saponiny triterpenowe (QBS „SuperSap”) na monowarstwy Langmuira składające się z POPC, POPE, SM i cholesterolu. Zbadany został wpływ obu saponin na monowarstwy składające się z pojedynczych składników błony, a w następnym etapie - na monowarstwy mieszane. W tym celu przeprowadzono pomiary relaksacji ciśnienia powierzchniowego, IRRAS i mikroskopii fluorescencyjnej. Wykazano, że digitonina w porównaniu z ekstraktem „SuperSap” już przy stężeniu $3\mu\text{M}$ w obecności cholesterolu powoduje znaczny wzrost ciśnienia powierzchniowego (Π) do wartości krytycznej, przy której monowarstwy lipidowe mogą ulec załamaniu. Świadczy to o bardzo dużym powinowactwie tej saponiny do cholesterolu, co jest szczególnie istotne, gdy zawartość cholesterolu w membranie jest znacząca, tak jak ma to miejsce w erytrocytach.

Całość pracy podsumowana została 16 wnioskami (część trzecia), z których najważniejsze wymieniono poniżej:

1. Opracowanie metodyki pomiarowej badania wpływu surfaktantów na monowarstwy lipidowe, co zaowocowało zaprojektowaniem nowatorskiej wanny Langmuira do wymiany subfazy.
 2. Wykazanie, że ekstrakt QBS „Sigma” nie działa destrukcyjnie na monowarstwę DPPC w przeciwieństwie do surfaktantów syntetycznych (SDS, CTAB i Triton X-100).
 3. Stwierdzenie, że pomimo wspólnej nazwy, dostępne handlowo ekstrakty - QBS „Sigma” i QBS „SuperSap” mogą znacząco różnić się między sobą właściwościami.
 4. Wykazanie, że budowa saponin wpływa w ogromnej mierze na ich powinowactwo do lipidów.
 5. Zaobserwowanie nieopisanego dotąd w literaturze przejścia fazowego LC-LE, z fazy LC (uporządkowanej) do fazy LE (nieuporządkowanej) obserwowane dla DPPE i DPPS w obecności digitoniny. Sugeruje to, że aktywność membranolityczna digitoniny (i ewentualnie innych saponin) niekoniecznie musi być związana wyłącznie z kompleksowaniem cholesterolu. Mimo to, cholesterol odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniach z saponinami.
- Pracę kończy czwarta część - bibliografia zawierająca 202 pozycji.

Monika Dziągła