

**UNIwersYTET W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ BIOLOGICZNO – CHEMICZNY**

Joanna Kotyńska

**RÓWNOWAGI ADSORPCYJNE POMIĘDZY
BŁONĄ LIPOSOMALNĄ A JONAMI ELEKTROLITU
O RÓŻNEJ WARTOŚCIOWOŚCI**

(streszczenie)

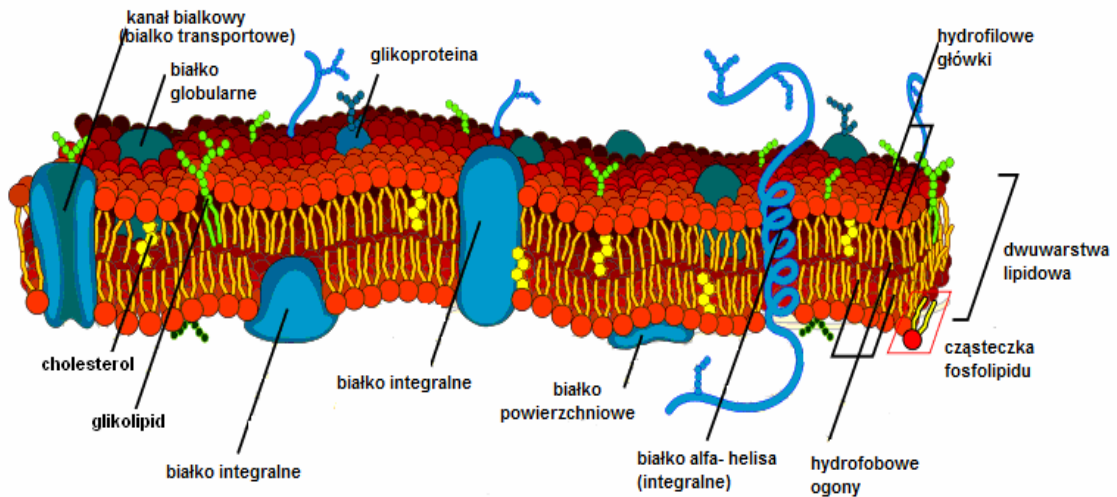
Praca doktorska wykonana w Zakładzie Elektrochemii
Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku

Promotor pracy: prof. dr hab. Zbigniew A. Figaszewski

**Recenzenci pracy: prof. dr hab. Paweł Krysiński (Uniwersytet Warszawski)
dr hab. Tadeusz Krogulec, prof. UwB**

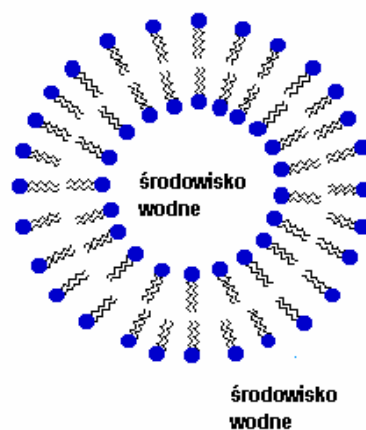
Białystok 2012

Błony biologiczne to dynamiczne, wieloskładnikowe struktury, obecne we wszystkich znanych układach biologicznych zdolnych do samodzielnej egzystencji. Ogrywiają one znaczącą rolę w wielu procesach decydujących o funkcjonowaniu organizmu żywego, a zatem w prawidłowym metabolizmie jak i jego patologicznych zmianach.



Błona biologiczna*

Złożoność strukturalna błon biologicznych decyduje o trudności z jaką wiąże się bezpośrednio badanie ich funkcji oraz właściwości fizykochemicznych. Dlatego też, obok eksperymentów na błonach naturalnych, prowadzone są badania na błonach sztucznie konstruowanych - monowarstwach oraz dwuwarstwach lipidowych (płaskich i liposomach). Większość przedstawionych w rozprawie eksperymentów przeprowadzono przy użyciu liposomów jako materiału badawczego.



Liposom**

* Według: <http://www.freewebs.com/mascibiology/photos/0006.png>

** Według: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Images3/bilyrstr.gif>

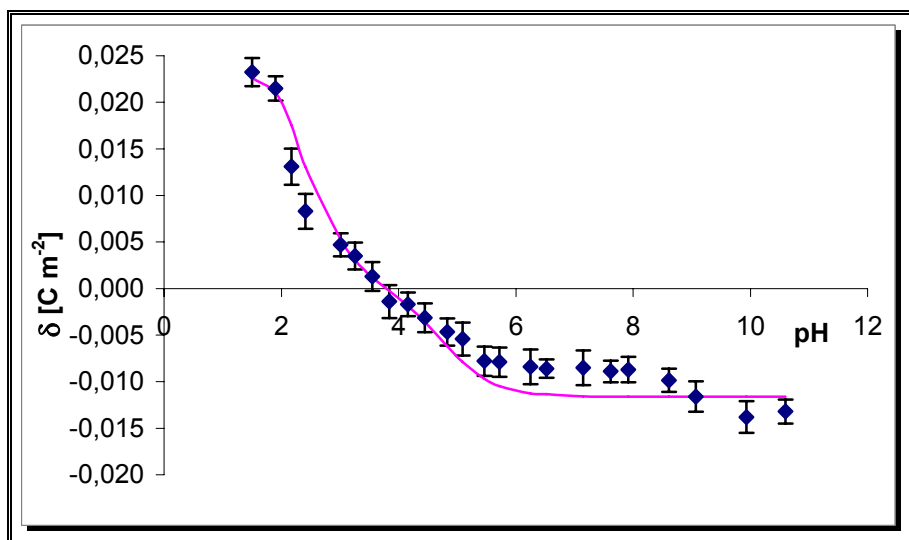
Powierzchnia błon biologicznych, z uwagi na obecność ugrupowań obdarzonych ładunkiem elektrycznym ($-\text{PO}^{(-)}$, $-\text{COO}^{(-)}$, $-\text{N}^{(+)}\text{H}_3$, ...), jest silnie zjonizowana. Dlatego też możliwa jest na niej adsorpcja wielu różnych substancji obecnych w środowisku zewnętrznym. Szczególne znaczenie, z punktu widzenia funkcjonowania komórki, ma adsorpcja jonów elektrolitu. Powstające na granicy faz błona/roztwór równowagi adsorpcyjne nie tylko wpływają na właściwości fizykochemiczne i elektryczne błon, ale także są istotne dla przebiegu wielu procesów związanych z błoną, takich jak np. transport. Wszystko to sprawia, iż zmienia się funkcjonowanie błon. Fakt ten ma ważne fizjologiczne konsekwencje - wszelkie bowiem procesy zachodzące na poziomie błon przekładają się na funkcjonowanie komórki, a tym samym na funkcjonowanie całego żywego organizmu.

Głównym celem rozprawy było zbadanie równowag adsorpcyjnych pomiędzy błonami liposomalnymi a jonami obecnymi w roztworze elektrolitu. Zagadnienie to potraktowano w pracy bardzo szeroko. W oparciu o wyniki pomiarów ruchliwości elektroforetycznej liposomów poddanych działaniu wybranych jonów (jedno- i trójwartościowych) prześledzono, powstałe na skutek adsorpcji tych jonów, zmiany ładunku powierzchniowego badanych błon. Szczególnie istotna dla zrozumienia zjawisk zachodzących na powierzchni błony jest ich ilościowa ocena, niezbędna dla pełnej interpretacji badanych zjawisk. Oceny tej dokonano poprzez opracowanie, korzystając z prostych zależności matematycznych, modeli teoretycznych odnoszących się do ilościowego opisu rozważanych równowag.

Rozprawa w części literaturowej przedstawia podstawowe wiadomości na temat błon biologicznych oraz liposomów. Omówiono główne składniki błon biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem lipidów - ich budowy i wybranych właściwości. Opisano strukturę i podział liposomów oraz przybliżono metody ich otrzymywania. Scharakteryzowano wybrane właściwości elektryczne błon biologicznych, w tym ładunek powierzchniowy. Przedstawiono przegląd literatury dotyczącej adsorpcji jonów o różnej wartościowości na powierzchni błon lipidowych. Przesłanką dla zaprezentowania dotychczasowych osiągnięć w tym temacie było zarówno wprowadzenie czytelnika w problematykę pracy, jak również pokazanie kontekstu podjętych badań.

Szczególnie dużo miejsca praca poświęca adsorpcji wybranych jednowartościowych jonów elektrolitu na powierzchni błon liposomalnych. W pierwszej grupie badań analizie poddano liposomy zarówno jednoskładnikowe zbudowane z: fosfatydylocholiny, sfingomieliny, fosfatydyloseryny, jak i dwuskładnikowe: fosfatydylocholina-fosfatydyloseryna, fosfatydylocholina-fosfatydyloglicerol, fosfatydylocholina-difosfatydylo-

-glicerol oraz fosfatydylocholina-decyloamina. Jednym z składników błon dwuskładnikowych była w każdym przypadku fosfatydylocholina. Wybór tego lipidu podyktowany był faktem, iż formuje on trwałe struktury do których można w prosty sposób wbudowywać inne składniki. Jako roztworu elektrolitu w tej grupie badań użyto roztworu chlorku sodu o stężeniu $0.155 \text{ mol dm}^{-3}$. Rozważono istnienie, oprócz równowag kwasowo - zasadowych, równowag związanych z adsorpcją na błonie pozostałych jonów obecnych w roztworze (sodowych i chlorkowych). Ponieważ liczba równowag tworzonych przez grupy funkcyjne z jonami jednowartościowymi determinowana jest liczbą grup ujemnych i dodatnich na powierzchni danej błony, dlatego też zaproponowano modele o czterech, sześciu i ośmiu równowagach. Wyprowadzono równania pozwalające na wyznaczenie, w oparciu o wartości doświadczalne, wartości teoretycznych powierzchniowej gęstości ładunku badanych błon. Równania te umożliwiają również wyznaczenie wartości stałych asocjacji grup funkcyjnych badanych lipidów błonowych z jonami: wodorowymi, wodorotlenowymi, sodowymi i chlorkowymi. Dla wszystkich analizowanych błon jednoskładnikowych i większości błon dwuskładnikowych uzyskano satysfakcjonującą zgodność wyników doświadczalnych z danymi teoretycznymi. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosku o poprawności zaproponowanych modeli opisujących oddziaływanie jonów jednowartościowych z badanymi błonami. Jedynie dla błony o składzie fosfatydylocholina-decyloamina zaobserwowano rozbieżności w zakresie niskich wartości pH. Świadczy to o tym, iż model (o sześciu równowagach) - za pomocą którego opisano ten układ - nie charakteryzuje go w sposób zadowalający. Na tej podstawie wysunięto tezę o występowaniu oddziaływań pomiędzy fosfatydylocholiną a decyloaminą w błonie. W oparciu o wyznaczone wartości stałych asocjacji grup funkcyjnych badanych lipidów z jonami elektrolitu wykazano, że adsorpcja jonów sodowych i chlorkowych na błonie liposomalnej jest znacznie słabsza niż jonów wodorowych i wodorotlenowych. Dodatkowo przeprowadzono obliczenia stopnia pokrycia powierzchni badanych błon jonami elektrolitu. Uzyskane dane pozwoliły na stwierdzenie, iż asocjacja jonów sodowych i chlorkowych z błoną pomimo tego, iż wyraźnie słabsza niż jonów wodorowych i wodorotlenowych, to jest jednak na tyle istotna, iż konieczne jest jej uwzględnienie przy rozpatrywaniu i interpretacji zjawisk zachodzących na powierzchni błony. Dla wszystkich badanych błon dwuskładnikowych wykazano ponadto, zgodnie z oczekiwaniem, iż ładunek powierzchniowy błony w istotnym stopniu zależy od jej składu lipidowego.



Powierzchniowa gęstość ładunku błony liposomalnej uformowanej z fosfatydylocholiny w funkcji pH (punkty – wartości eksperymentalne, linia ciągła - krzywa teoretyczna).

W drugiej grupie eksperymentów dotyczących adsorpcji jonów jednowartościowych z błoną liposomalną przeanalizowano wpływ kationów litu, potasu i cezu. Przedmiotem badań była błona fosfatydylocholinowa solwatowana w roztworach chlorków tych metali. Dobór roztworów elektrolitów podyktowany był faktem, iż w literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu jaki wywierają inne, poza sodem, kationy alkaliczne na błony lipidowe. Szczególnie zaskakujące jest to w przypadku potasu, którego znaczenie fizjologiczne jest porównywalne do roli jaką w organizmie żywym odgrywa sód. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wykazały brak zauważalnych różnic w wartościach ładunku powierzchniowego błon w obecności chlorków sodu, potasu i cezu; jedynie dane otrzymane dla chlorku litu różnią się od pozostałych. Na tej podstawie wysunięto wniosek o największym spośród analizowanych kationów powinowactwie kationu litu z błoną fosfatydylocholinową. Wyznaczone, w oparciu o model o czterech równowagach adsorpcyjnych, wartości teoretyczne ładunku powierzchniowego badanych błon oraz wartości stałych asocjacji grup fosforanowej i trimetyloamoniowej fosfatydylocholiny z jonami badanych elektrolitów, potwierdziły tezę o najsilniejszej adsorpcji jonów litu.

elektrolit	stała asocjacji [$\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$]			
	K_{AH}	K_{BOH}	K_{AX}	K_{BCI}
LiCl	1.22E+03	5.20E+03	3.33E-01	2.31E-01
NaCl	7.17E+02	3.35E+09	2.30E-01	7.60E-02
KCl	7.70E+02	1.34E+09	2.11E-01	7.75E-02
CsCl	4.66E+02	9.97E+08	2.18E-01	5.99E-02

Stale asocjacji grup funkcyjnych fosfatydylocholiny, z jonami Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Cl^- , H^+ , OH^- (A^- - grupa $-\text{PO}^{(+)}$, B^+ - grupa $-\text{N}^{(+)}(\text{CH}_3)_3$ fosfatydylocholiny X^+ - Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+).

W układach biologicznych znajdują się jednak nie tylko jony jednowartościowe, ale również dwu- i trójwartościowe. Fakt ten zdecydował o potrzebie rozszerzenia realizowanej w pracy tematyki badawczej o aspekt związany z asocjacją jonów wielowartościowych do błon lipidowych. Siła oddziaływania jonów z błoną wzrasta wraz z ładunkiem jonu, a zatem największe powinowactwo z grupami funkcyjnymi składników błonowych wykazują jony trójwartościowe. Dlatego też to jony trójwartościowe zostały wybrane do badań. Przeanalizowano wpływ jonów glinu, indu i lantanu na ładunek powierzchniowy fosfatydylocholinowych błon liposomalnych. Pomiaru ruchliwości wykonano w funkcji pH roztworów elektrolitów, dla różnych ich stężeń. Zaproponowano matematyczny opis równowag związanych z adsorpcją jonów trójwartościowych na błonie. Wykazano jednak, iż duża liczba równowag, jaka występuje w analizowanym układzie, znacznie komplikuje rozważany model i uniemożliwia wyznaczenie parametrów charakteryzujących dany model. Dlatego też w tym przypadku ograniczono się jedynie do przedstawienia wniosków, jakie wyciągnięto na podstawie wyników doświadczalnych. Nakreślono także dalszy kierunek prac teoretycznych nad badanym układem równowag; jest to bowiem niezbędne dla dokonania pełnej interpretacji zmian spowodowanych oddziaływaniem jonów trójwartościowych na błonę lipidową.

Ostatnią grupę eksperymentów, których wyniki zamieszczono w pracy, stanowiły badania erytrocytów i płytek krwi człowieka. Przeanalizowano wpływ jaki wywiera lek przeciwplatektonowy (Plavix), środek kontrastowy stosowany w ultrasonografii (SonoVue) oraz proces fizjologiczny (śmierć nagła gwałtowna) na powierzchniową gęstość ładunku błon

komórek naturalnych. Przebieg ściśle kontrolowanych w organizmie procesów ulega bowiem zasadniczym zmianom pod wpływem działania zarówno różnych czynników toksycznych, jak również w stanach fizjologicznych i patologicznych organizmu. Wszelkie nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórki przekładają się na działanie błony komórkowej, a zatem wpływają m.in. na jej właściwości fizykochemiczne, np. na ładunek powierzchniowy. Ponieważ parametr ten zależy od składu danej błony, jakiegokolwiek zmiany w ilości i jakości naładowanych grup funkcyjnych na jej powierzchni pociągają za sobą zmiany w wartości ładunku powierzchniowego, wpływając tym samym na równowagi pomiędzy błoną a środowiskiem. Zamierzeniem tych badań było, obok oceny wpływu wyżej wymienionych czynników na błonę komórkową człowieka, także pokazanie aplikacyjności badań dokonanych na błonach liposomalnych, a ściślej wykazanie użyteczności rozważań teoretycznych przeprowadzonych w odniesieniu do liposomów dla analizy oddziaływań występujących pomiędzy błoną naturalną a środowiskiem. Wyznaczono wartości parametrów charakteryzujących równowagi zachodzące w błonach naturalnych: sumaryczne stężenia powierzchniowe grup kwasowych i zasadowych oraz uśrednione stałe asocjacji grup kwasowych z jonami wodorowymi i zasadowych z jonami wodorotlenowymi. Możliwe to było dopiero po przyjęciu, iż wartości stałych asocjacji grup kwasowych i zasadowych z jonami odpowiednio: sodowymi i chlorkowymi są identyczne jak te obliczone dla liposomów fosfatydylocholinowych. W oparciu o uzyskane dane doświadczalne i teoretyczne omówiono i oceniono wpływ SonoVue oraz śmierci nagłej gwałtownej na błonę komórkową erytrocytów i płytek krwi człowieka. Wykazano także użyteczność metody elektroforetycznej do badań oddziaływań pomiędzy błoną liposomalną a lekiem Plavix.

Podsumowując, badania przeprowadzone przeze mnie zarówno na błonach liposomalnych, jak i naturalnych mogą mieć znaczenie praktyczne, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do głębszego zrozumienia zjawisk zachodzących przy udziale błon biologicznych w żywej komórce.