



AUTOREFERAT

Jan Kobierski

Analiza oddziaływań międzycząsteczkowych związków aktywnych biologicznie z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej jako narzędzi wspierających poszukiwanie i ocenę potencjału terapeutycznego

KRAKÓW 2023

UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Spis treści

1. IMIĘ I NAZWISKO	2
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	2
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	2
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ	2
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	2
4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD WIODĄCEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	2
4.3. WPROWADZENIE.....	4
4.4. METODYKA	6
4.4.1. <i>Teoria funkcyjonału gęstości</i>	6
4.4.2. <i>Kwantowa teoria atomów w cząsteczkach</i>	10
4.4.3. <i>Dynamika molekularna</i>	11
4.5. CEL PRACY NAUKOWEJ	12
4.6. UZYSKANE WYNIKI	14
4.6.1. <i>Parametr krytycznego upakowania w opisie aktywnych biologicznie związków amfifilowych</i>	14
4.6.2. <i>Lipidowe składniki błon komórkowych i oksysterole</i>	17
4.6.3. <i>Semifluorowane alkany</i>	28
4.6.4. <i>Pt-103</i>	34
4.6.5. <i>Uszkodzenia radiacyjne DNA</i>	36
4.7. PODSUMOWANIE WIODĄCEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	39
4.7. OMÓWIENIE POZOSTAŁEGO DOROBKU NAUKOWEGO.....	40
<i>Publikacje składające się na pozostały dorobek naukowy</i>	40
<i>Streszczenia jazdowe</i>	41
<i>Dane naukometryczne</i>	42
4.7.1. <i>Agregacja amyloidu β</i>	43
4.7.2. <i>Inne osiągnięcia naukowe</i>	45
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI LUB INSTYTUCJI NAUKOWEJ	46
6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ	47
7. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ	48
PIŚMIENNICTWO	48
WYKAZ SKRÓTÓW	52
ZWIĄZKI CHEMICZNE	52
POZOSTAŁE.....	53

1. Imię i nazwisko

Jan Kobierski

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2014 – stopień doktora nauk fizycznych w zakresie biofizyki, nadany przez Uniwersytet Jagielloński w Krakowie. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant”.

2009 – tytuł zawodowy magistra fizyki, specjalność fizyka medyczna, uzyskany na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Tytuł pracy magisterskiej: „Badania relaksacyjne NMR procesów utleniania osocza krwi”.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2019-obecnie - adiunkt w Zakładzie Biofizyki Farmaceutycznej UJ CM

2017-2019 - asystent z dr w Zakładzie Biofizyki Farmaceutycznej UJ CM

2016 - staż podoktorski na Uniwersytecie Waterloo w Kanadzie (6 miesięcy)

2014-2016 - asystent z dr w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM

2009 - asystent wizytujący na Uniwersytecie Waterloo w Kanadzie (2 miesiące)

4. Omówienie osiągnięć¹

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Jako wiodące osiągnięcie naukowe przedstawiam jedenaście publikacji tworzących cykl pt. „Analiza oddziaływań międzycząsteczkowych związków aktywnych biologicznie z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej jako narzędzi wspierających poszukiwanie i ocenę potencjału terapeutycznego”.

4.2. Publikacje wchodzące w skład wiodącego osiągnięcia naukowego

H1. Kobierski J[✉]

Zastosowanie parametru krytycznego upakowania fizjologicznie aktywnych związków w modelach biologicznych

Farmacja Polska 2022;78:249–62;[10.32383/farmpol/152089](https://doi.org/10.32383/farmpol/152089)

(MEiN: 70)

¹o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

- H2. **Kobierski J**[✉], Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Dynarowicz-Łątka P
Predicting the packing parameter for lipids in monolayers with the use of molecular dynamics
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2022;211:112298;[10.1016/j.colsurfb.2021.112298](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112298)
(IF: 5,999, MNiSW: 100)
- H3. Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, **Kobierski J**, Karwowska K, Petelska AD, Dynarowicz-Łątka P
Unusual behavior of the bipolar molecule 25-hydroxycholesterol at the air/water interface -
Langmuir monolayer approach complemented with theoretical calculations
The Journal of Physical Chemistry B 2020;124:1104–1114;[10.1021/acs.jpccb.9b10938](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.9b10938)
(IF: 2,991, MEiN: 140)
- H4. Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Kuś K, Filiczowska A, Lipiec E, **Kobierski J**, Petelska A,
Dynarowicz-Łątka P
25-hydroxycholesterol interacts differently with lipids of the inner and outer membrane leaflet -
The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2021;211:105909;
[10.1016/j.jsbmb.2021.105909](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105909)
(IF: 5,011, MEiN: 100)
- H5. **Kobierski J**[✉], Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Filiczowska A, Petelska AD, Dynarowicz-Łątka P
How the replacement of cholesterol by 25-hydroxycholesterol affects the interactions with
sphingolipids: The Langmuir Monolayer Study complemented with theoretical calculations
Journal of The Royal Society Interface 2021;18:20210050;[10.1098/rsif.2021.0050](https://doi.org/10.1098/rsif.2021.0050)
(IF: 4,293, MEiN: 100)
- H6. Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Stępnik A, **Kobierski J**, Dynarowicz-Łątka P
Different effects of oxysterols on a model lipid raft – Langmuir monolayer study complemented
with theoretical calculations
Chemistry and Physics of Lipids 2022;244:105182;[10.1016/j.chemphyslip.2022.105182](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105182)
(IF: 3,570, MEiN: 100)
- H7. Chachaj-Brekiesz A, **Kobierski J**, Wnętrzak A, Dynarowicz-Łątka P
Electrical properties of membrane phospholipids in Langmuir monolayers
Membranes 2021;11:53;[10.3390/membranes11010053](https://doi.org/10.3390/membranes11010053)
(IF: 4,562, MEiN: 100)
- H8. Chachaj-Brekiesz A, Wnętrzak A, Lipiec E, **Kobierski J**, Dynarowicz-Łątka P
Perfluorohexyloctane (F₆H₈) as a delivery agent for cyclosporine A in dry eye syndrome therapy -
Langmuir monolayer study complemented with infrared nanospectroscopy
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2019;110564;[10.1016/j.colsurfb.2019.110564](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110564)
(IF: 4,389, MEiN: 100)
- H9. Chachaj-Brekiesz A, **Kobierski J**, Griñón Echaniz R, Wnętrzak A, Dynarowicz-Łątka P
Comprehensive approach to the interpretation of the electrical properties of film-forming
molecules
The Journal of Physical Chemistry B 2022;126:7037–7046;[10.1021/acs.jpccb.2c04526](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c04526)
(IF: 3,466, MEiN: 140)
- H10. Lipiec E, Ruggeri FS, Benadiba C, Borkowska AM, **Kobierski J**, Miszczyk J, Wood BR, Deacon GB,
Kulik A, Dietler G, Kwiatek WM
Infrared nanospectroscopic mapping of a single metaphase chromosome
Nucleic Acids Research 2019;47:e108;[10.1093/nar/gkz630](https://doi.org/10.1093/nar/gkz630)
(IF: 11,501, MEiN: 200)

H11. Kobierski J[✉], Lipiec E

DNA structure change induced by guanosine radicals - A theoretical and spectroscopic study of proton radiation damage

Journal of Molecular Structure 2019;1178:162-168;[10.1016/j.molstruc.2018.10.032](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.032)

(IF: 2,463, MEiN: 70)

✉ - autor korespondencyjny

Podsumowanie cyklu publikacji [H1] – [H11]:

- Suma IF: 48.245
- Suma punktów MEiN : 1220

W opisanych w powyższym cyklu badaniach byłem jedyną osobą wykonującą część obliczeniową.

4.3. Wprowadzenie

Układy żywe są przedmiotami badań naukowych od setek lat. Nowo powstające i nieustannie rozwijane techniki badawcze wprowadza się stopniowo do badań układów biologicznych, co przekłada się na coraz lepsze rozumienie procesów w nich zachodzących oraz oddziaływań z elementami dostarczonymi do takich układów. To z kolei umożliwia opracowywanie leków nowych generacji, o coraz większej skuteczności i lepszym profilu bezpieczeństwa.

Kluczowe dla zrozumienia procesów życiowych zachodzących w organizmach żywych było odkrycie komórki, co miało miejsce już w XVII w. [1]. Jednak dopiero zastosowanie w XX wieku metod fizycznych do badań nad tą jednostką strukturalną organizmów żywych umożliwiło dokładne poznanie jej budowy oraz praw rządzących jej funkcjonowaniem. Dziś wiemy, że wewnątrz komórki otoczone jest błoną, będącą półprzepuszczalną dwuwarstwą lipidową i przyjmujemy, że ma ona charakter płynnej mozaiki, w której zanurzone są białka i węglowodany. Wiedzę tę nabywano stopniowo. Ważnego odkrycia w 1925 roku dokonali Gorter i Grendel [2], którzy stwierdzili, że monowarstwa utworzona ze składników błony komórkowej komórek krwi ma powierzchnię dwa razy większą od powierzchni zewnętrznych tych komórek, postulując tym samym dwuwarstwową budowę błony składającej się z amfifilowych lipidów. Wykorzystana przez nich metoda monowarstw Langmuira pozostaje do dziś nierozzerwalnie związana z doświadczalnymi badaniami modeli błon biologicznych i interakcji ich składników ze związkami aktywnymi biologicznie. Kolejnym kamieniem milowym w zrozumieniu funkcjonowania komórki biologicznej było odkrycie kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA²), a następnie stworzenie modelu podwójnej helisy DNA przez Watsona i Cricka w 1953 r. [3]. Na tych dwóch elementach organizmów żywych: błonach biologicznych oraz DNA, koncentrowały się w ostatnich latach moje zainteresowania naukowe.

² Wykaz użytych skrótów zamieszczony jest na końcu autoreferatu.

Istnieje wiele przykładów metod eksperymentalnych wykorzystywanych w badaniach układów biologicznych. Wymienić można techniki dyfrakcyjne: rentgenografię strukturalną oraz dyfrakcję neutronową. Zastosowanie znajdują techniki spektroskopowe, m. in. magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR), elektronowy rezonans paramagnetyczny (ang. *electron paramagnetic resonance*, EPR), spektroskopia fourierowska w podczerwieni (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) i spektroskopia ramanowska. Korzysta się także z metod mikroskopowych, np. mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM) czy transmisyjnej kriomikroskopii elektronowej (ang. *cryogenic electron microscopy*, cryo-EM). Każda z technik eksperymentalnych posiada jednak swoje ograniczenia. Mogą one wynikać z praw przyrody i dotyczyć rozdzielczości przestrzennej lub czasowej. Ograniczenia mogą mieć również bardziej prozaiczną naturę, związaną z finansowaniem, dostępnością aparatury badawczej czy też brakiem rozwiązań technicznych odpowiadających potrzebom eksperymentatorów. W tym miejscu z pomocą przychodzą modele teoretyczne oraz ich komputerowe implementacje. Od początku istnienia komputerów badacze próbowali je wykorzystać do modelowania zjawisk zachodzących w przyrodzie [4]. Wykładniczy wzrost mocy obliczeniowej komputerów sprawił, że możliwa stała się implementacja modeli teoretycznych dotyczących systemów tak złożonych jak układy biologiczne. Dzięki temu komputer zaczął dorównywać aparaturze eksperymentalnej pod względem przydatności w poznawaniu praw natury. Budowa coraz wydajniejszych superkomputerów oraz udostępnianie ich społeczności akademickiej do obliczeń klastrowych sprawiły, że metody chemii obliczeniowej potrafią obecnie dać odpowiedzi na pytania badawcze również tam, gdzie metody eksperymentalne nie przynoszą satysfakcjonujących efektów.

Właśnie metody obliczeniowe, w szczególności teorię funkcjonału gęstości (ang. *density functional theory*, DFT) oraz dynamikę molekularną (ang. *molecular dynamics*, MD), wykorzystywałem w ramach mojej pracy naukowej towarzyszącej omawianemu osiągnięciu naukowemu. Wyniki moich obliczeń każdorazowo konfrontowane były z wynikami eksperymentalnymi uzyskiwanymi w ramach współpracy naukowej z Zakładem Chemii Ogólnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakładem Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Zakładem Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych Instytutu Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk. Punktem odniesienia dla symulacji teoretycznych były techniki badań zarówno dwuwymiarowych powierzchni (technika monowarstw Langmuira, techniki spektroskopowe w podczerwieni oraz mikroskopowe: kąta Brewstera i sił atomowych), jak i próbek objętościowych (spektroskopia Ramana i w podczerwieni). Połączenie metod teoretycznych z technikami eksperymentalnymi jest podejściem wpisującym się we współczesne naukowe trendy, co nadaje moim badaniom nowatorski charakter. Ponadto prowadzone przeze mnie badania miały charakter interdyscyplinarny, łącząc zagadnienia obejmujące oddziaływanie lipidów błonowych i cząsteczek biologicznie aktywnych z badaniami procesów istotnych z punktu

widzenia stosowanych i potencjalnych terapii. Również zagadnienia związane ze składnikami błon biologicznych potraktowałem wielowymiarowo, badając zarówno wzajemne oddziaływania lipidów błonowych, jak też ich oddziaływania ze związkami powstającymi podczas procesów patologicznych lub dostarczanych do organizmów z pożywieniem, ale także z cząsteczkami o potencjalnym zastosowaniu jako leki lub substancje pomocnicze. To z kolei przekładało się na wiedzę o właściwościach fizycznych modelowych błon biologicznych. Wyniki moich badań pokazują, że takie połączenie podejścia teoretycznego z metodami eksperymentalnymi w znacznym stopniu poszerza wiedzę o oddziaływaniu leków na organizmy, procesach chorobowych, czy stosowanej terapii w modelowych układach biologicznych.

4.4. Metodyka

4.4.1. Teoria funkcjonału gęstości

Zasadniczym aspektem wielu obliczeń kwantowo-chemicznych jest poznanie wartości energii rozpatrywanego układu cząsteczek, której odpowiadają wartości własne hamiltonianu w równaniu Schrödingera niezależnym od czasu w przybliżeniu Borna-Oppenheimera. Znalezienie wartości własnych wymaga zdefiniowania funkcji $\Psi(\mathbf{r})$, stanowiącej reprezentację funkcji falowej badanego układu. Funkcję tę można zbudować z funkcji atomowych χ_μ centrowanych na jądrach poszczególnych atomów budujących układ. Komplet funkcji składających się na funkcję atomową χ_μ nazywa się bazą funkcyjną (ang. *basis set*). Najczęstszym i dającym dobre rezultaty sposobem konstrukcji χ_μ , jest użycie liniowej kombinacji funkcji Gaussa. Takie podejście wykorzystuje program Gaussian [5], którego używałem w swoich badaniach. Zatem:

$$\chi_\mu(\mathbf{r}) = \sum_p d_{\mu,p} g_p(\zeta_p, \mathbf{r})$$

gdzie

$$g_p(\zeta, \mathbf{r}) = c_p x^{n_p} y^{m_p} z^{l_p} e^{-\zeta r^2}$$

$d_{\mu,p}$ jest współczynnikiem funkcji prymitywnej g_p dla orbitalu atomowego χ_μ . Parametr ζ , znajdujący się w wykładniku funkcji Gaussa, mówi o dyfuzyjności (inaczej rozciągłości) funkcji. Parametry n_p , m_p , l_p w wykładnikach współrzędnych przestrzennych x , y , z mówią z kolei o kształcie funkcji prymitywnej. Pozwalają zatem wymodelować odpowiednio orbitale elektronowe (s, p, d, f). Z liniowej kombinacji funkcji atomowych można zbudować orbitale molekularne:

$$\phi_i = \sum_\mu c_{i\mu} \chi_\mu$$

gdzie $c_{i\mu}$ jest współczynnikiem funkcji atomowej χ_μ dla orbitalu molekularnego ϕ_i . Ostatecznie, biorąc wyznacznik Slatera skonstruowany z orbitali molekularnych i funkcji spinowych, dostaniemy funkcję falową całej cząsteczki $\Psi(\mathbf{r})$ [6]. Planując obliczenia należy zwrócić uwagę na odpowiedni wybór bazy funkcyjnej. Duża baza zwiększy dokładność obliczeń, niestety zwiększy również czas obliczeniowy. Wybór bazy musi być zatem zawsze kompromisem pomiędzy jednym a drugim, przy uwzględnieniu celów obliczeń. W swoich obliczeniach wykorzystywałem bazę 6-311+G(d,p) [7] lub większą.

Następnym problemem kwantowo-chemicznym jest znalezienie wartości własnych hamiltonianu dla zdefiniowanego równania. Klasycznym podejściem jest metoda Hartree’ego-Focka (HF). Wykorzystuje ona omówioną powyżej funkcję falową oraz operator Focka, na który składa się operator energii kinetycznej oraz operatory oddziaływań: jądrowo-elektronowego, międzyelektronowego oraz tzw. wymiennego (zapewniającego warunek antysymetryczności funkcji falowej i niemającego klasycznego odpowiednika). Biorąc funkcje próbne (zgadując $c_{i\mu}$) można iteracyjnie rozwiązać równanie. Za pomocą tej metody dostaje się wyniki o ograniczonej dokładności. Uzyskane wartości energii orbitali obliczane są bowiem przy założeniu uśrednionego rozkładu innych elektronów. Model nie uwzględnia zatem korelacji elektronowej. Ponadto jest kosztowny z punktu widzenia czasu obliczeniowego. Wady te zrodziły potrzebę opracowania bardziej dokładnych i nie mniej efektywnych metod, w szczególności DFT.

Teoria funkcyjna gęstości bazuje na twierdzeniu Hohenberga-Kohna, głoszącym, że własności stanu podstawowego układu można określić na podstawie funkcji rozkładu gęstości elektronowej ρ tego układu. Gęstość elektronowa jest wielkością mówiącą o prawdopodobieństwie zaobserwowania elektronu w punkcie \mathbf{r} i jest związana z funkcjami falowymi orbitali molekularnych zależnością:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i \phi_i^2(\mathbf{r})$$

W ogólności, funkcyjna gęstości elektronowej ma postać

$$E_{DFT}[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] + V_{JE} + J[\rho(\mathbf{r})] + E_{KW}^{cz}[\rho(\mathbf{r})]$$

gdzie składniki odpowiadają kolejno energii kinetycznej, potencjałowi przyciągania elektronów przez jądra oraz kulombowskiemu odpychaniu elektronów. Ostatni składnik, E_{KW} , nazywany jest członem korelacyjno-wymiennym i uwzględnia pomijaną w teorii HF zależność ruchu elektronu od chwilowych położenia pozostałych elektronów. W czystej postaci nie zawiera on obecnego w równaniu Focka składnika wymiennego, dlatego definiuje się funkcyjna hybrydowe, dla których:

$$E_{KW}^{hybryd}[\rho(\mathbf{r})] = c_{HF}E_W^{HF} + c_{DFT}E_{KW}^{cz}[\rho(\mathbf{r})]$$

Stałe c_{HF} i c_{DFT} mówią jaki udział w energii mają poszczególne składniki. W praktyce używane funkcjonały dzielą dodatkowo wkłady energii korelacyjnej E_K i wymiennej E_W na część zależną od lokalnej gęstości elektronowej E^{lokal} i od pochodnej gęstości elektronowej $E^{gradient}$. Funkcjonał, którym posługiwałem się najczęściej w swoich badaniach, B3LYP, można zapisać w postaci:

$$E_{KW}^{B3LYP}[\rho(\mathbf{r})] = 0,2 E_W^{HF} + 0,8 E_W^{lokal} + 0,72 E_W^{gradient} + E_K^{lokal} + 0,81 E_K^{gradient}$$

Zdefiniowany geometrycznie układ poddaje się minimalizacji, to znaczy optymalizacji do lokalnego minimum. W tym celu zmienia się wartości parametrów, aż do znalezienia punktu krytycznego, czyli takiego w którym pochodne energii są równe zero. Aby dokonać klasyfikacji takiego punktu liczy się hesjan, czyli macierz drugich pochodnych energii względem parametrów. Jeżeli wszystkie wartości na głównej przekątnej zdiagonalizowanego hesjanu są dodatnie, to w punkcie tym znajduje się szukane minimum lokalne. W programie Gaussian domyślnym algorytmem minimalizacji jest algorytm Berny'ego wykorzystujący GEDIIS (ang. *geometry optimization using energy-represented direct inversion in the iterative subspace*) [8]. Obliczenia tego typu pozwalają uzyskać informacje o optymalnej geometrii układu i energii oddziaływań międzycząsteczkowych w takiej konformacji.

Metoda supermolekularna

Wielokrotnie w swoich badaniach używałem DFT do obliczania energii oddziaływania pomiędzy dwiema cząsteczkami. Zagadnienie z pozoru jest proste. Można wziąć energię całkowitą dimeru AB (zwanego supermolekułą, z bazą ab , na którą składają się funkcje centrowane na jądrach A i B) i odjąć od niej energie izolowanych monomerów A i B dla geometrii takiej samej jaką mają w dimerze:

$$E_{oddziaływania} = E(AB)_{ab} - E(A)_a - E(B)_b$$

Każda niezerowa wartość uzyskana z powyższej formuły wynikać będzie z oddziaływania między cząsteczką A i B. Problem pojawia się podczas obliczania $E(A)$ i $E(B)$, konkretnie przy definiowaniu bazy funkcyjnej dla izolowanych cząsteczek. W dimerze AB, na orbitale cząsteczki A składają się nie tylko funkcje centrowane na jądrach A, ale mają również swój wkład funkcje centrowane na jądrach cząsteczki B. Definiując bazę dla izolowanego monomeru A i biorąc wyłącznie funkcje centrowane na jej jądrach (baza a), popełnilibyśmy tzw. błąd superpozycji bazy (ang. *basis set superposition error*, BSSE) [9]. Różnica energii spowodowana tym błędem jest nieduża względem energii całkowitej, jednak w przypadku badania niekowalencyjnych oddziaływań, tj. wodorowych czy van der Waalsa, nie może być pominięta. Należy zatem w rozpatrywanym przykładzie dla cząsteczki A uwzględnić dodatkowo bazę monomeru B, dołączając tzw. orbitale duchy. W praktyce realizuje się to odejmując od energii zdefiniowanej powyżej poprawkę wyrównującą (ang. *counterpoise correction*, CP):

$$E_{CP} = E(A)_{ab} - E(A)_a + E(B)_{ab} - E(B)_b$$

gdzie $E(A)_{ab}$ i $E(B)_{ab}$ to energie monomerów A i B obliczone przy pełnej bazie ab , ale bez obecności monomerów, odpowiednio B i A [10].

Symulacje widm w podczerwieni i ramanowskich

Dla uzyskanego stanu stacjonarnego cząsteczki, możliwe jest obliczenie stałych siłowych i wynikających z nich częstotliwości stanów wibracyjnych atomów cząsteczki. W tym celu wykorzystuje się hesjan energii. Pochodne liczy się po współrzędnych kartezyjskich, a następnie przeprowadza macierz do układu współrzędnych ważonych masą. Taki hesjan zawiera wartości stałych siłowych. W wyniku diagonalizacji hesjanu otrzymuje się jego wartości i wektory własne. Wartości własne są równe częstościom drgań normalnych, a wektory własne opisują wychylenia we współrzędnych normalnych.

Intensywność absorpcji w podczerwieni I^{IR} liczy się korzystając z faktu, że intensywność ta jest proporcjonalna do kwadratu zmian elektrycznego momentu dipolowego μ względem współrzędnej normalnej q , a ten z kolei jest proporcjonalny do kwadratu pochodnej energii E względem pola elektrycznego F i położenia jądra R :

$$I^{IR} \propto \left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right)^2 \propto \left(\frac{\partial^2 E}{\partial R \partial F} \right)^2$$

Intensywność rozpraszania Ramana I^R jest za to proporcjonalna do kwadratu zmian polaryzowalności α , który jest proporcjonalny do kwadratu trzeciej pochodnej energii względem pola elektrycznego i położenia jądra [10]:

$$I^R \propto \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)^2 \propto \left(\frac{\partial^3 E}{\partial R \partial F^2} \right)^2$$

W praktyce, aby znaleźć intensywność rozpraszania Ramana I^R wykorzystując obliczoną za pomocą programu Gaussian aktywność Ramana A^R , należy uwzględnić liczbę falową odpowiadającą promieniowaniu wzbudzającemu $\tilde{\nu}_0$ oraz temperaturę T :

$$I^R = \frac{C(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^4 A^R}{\tilde{\nu} B}$$

gdzie C jest pewną stałą, a $\tilde{\nu}$ jest liczbą falową odpowiadającą drganiu normalnemu. B jest współczynnikiem temperaturowym:

$$B = 1 - \exp\left(-\frac{hc\tilde{\nu}}{kT}\right)$$

gdzie h , k , c to odpowiednio stała Plancka, stała Boltzmann i prędkość światła w próżni [11].

4.4.2. Kwantowa teoria atomów w cząsteczkach

Na fundamentach podejścia DFT zbudowana jest kolejna teoria – kwantowa teoria atomów w cząsteczkach (ang. *quantum theory of atoms in molecules*, QTAIM) [12], zakładająca, że atomy są topologicznymi tzw. basenami funkcji gęstości elektronowej ρ . Kształt funkcji gęstości elektronowej zdeterminowany jest przyciągającym oddziaływaniem jąder atomowych, stąd maksima ρ znajdują się w jądrach atomowych. Atom zajmuje przestrzeń ograniczoną powierzchnią, dla której spełniony jest warunek:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0$$

gdzie \mathbf{n} jest wektorem normalnym do powierzchni granicznej. Z punktu widzenia analizy oddziaływań międzyatomowych, najbardziej interesujące są punkty krytyczne, czyli takie punkty rozpatrywanej przestrzeni, w których wszystkie pierwsze pochodne są równe 0:

$$\nabla\rho = \mathbf{i} \frac{\partial\rho}{\partial x} + \mathbf{j} \frac{\partial\rho}{\partial y} + \mathbf{k} \frac{\partial\rho}{\partial z} = \mathbf{0}$$

W punktach krytycznych mogą znajdować się maksima, minima lub punkty siodłowe. By o tym rozstrząść, liczy się laplasjan funkcji ρ :

$$\Delta\rho = \nabla^2\rho = \underbrace{\frac{\partial^2\rho}{\partial x^2}}_{\lambda_1} + \underbrace{\frac{\partial^2\rho}{\partial y^2}}_{\lambda_2} + \underbrace{\frac{\partial^2\rho}{\partial z^2}}_{\lambda_3}$$

Wielkości λ_1 , λ_2 i λ_3 określają wartość krzywizny funkcji ρ w trzech kierunkach krzywizny głównej. Liczba niezerowych parametrów λ w punkcie krytycznym określa tzw. rangę (ω) punktu krytycznego. Algebraiczną sumę znaków krzywizn λ nazywa się z kolei sygnaturą (σ) punktu krytycznego. Para liczb (ω , σ) pozwala jednoznacznie skategoryzować punkty krytyczne. Jedynie punkty krytyczne, dla których ω jest równe 3 są matematycznie stabilne, dlatego wystarczy rozpatrzeć cztery przypadki:

- $(3, -3)$ – negatywna krzywizna w każdym kierunku oznacza maksimum i świadczy o jądrze znajdującym się w tym punkcie,
- $(3, +3)$ – minimum funkcji ρ , tzw. *cage critical point*, punkt w centrum klatki molekularnej, ze wszystkich stron otoczony potencjałem jądrowym,
- $(3, +1)$ – minimum gęstości elektronowej w dwóch kierunkach płaszczyzny i maksimum w trzecim kierunku, prostopadłym do pozostałych; np. środek pierścienia aromatycznego,
- $(3, -1)$ – minimum w jednym kierunku i maksimum w pozostałych dwóch; tzw. *bond critical point* [12].

Szczególnie ostatni przypadek jest interesujący i przydatny. Jego obecność pozwala stwierdzić obecność wiązania, a wartość laplasjanu w tym punkcie pozwala wnioskować o typie tego wiązania. Przyjmuje się, że nieduża i dodatnia wartość laplasjanu świadczy o wiązaniu niekowalencyjnym, np. wodorowym [13]. Ponadto, pomiędzy jądrami atomów związanych chemicznie, można wyznaczyć linię, której każdy punkt będzie maksimum gęstości elektronowej w dwóch kierunkach głównych. Takie linie nazywa się ścieżkami wiązań (ang. *bond paths*) i są one również pomocne w analizie wiązań międzycząsteczkowych [12]. Posługując się programem AIMAll [14], wykorzystałem QTAIM do opisu charakteru i siły oddziaływań międzycząsteczkowych w dimerach. Możliwa dzięki temu była identyfikacja wiązań i wyjaśnienie szczególnych właściwości niektórych układów.

4.4.3. Dynamika molekularna

Symulacje dynamiki molekularnej są techniką obliczeniową dostarczającą informacji o strukturze i dynamice układów cząsteczek. Obliczenia opierają się na rozwiązywaniu równań ruchu Newtona dla atomów budujących rozważany układ. Czerpią więc z praw mechaniki klasycznej. W wyniku otrzymuje się położenia i prędkości cząsteczek w funkcji czasu, co nazywa się trajektorią układu. Do obliczeń dynamiki molekularnej wykorzystuje się pola siłowe (ang. *force field*, FF), czyli sparametryzowane funkcje położenia jąder, których wartości mówią o energii układu. Parametry pól siłowych uzyskuje się eksperymentalnie (krystalograficznie lub spektroskopowo) albo z obliczeń kwantowo-chemicznych. Informacji o konkretnych oddziaływaniach nie uzyskuje się zatem z rozwiązania równania Schrödingera dla elektronów, lecz z jawnie zdefiniowanych w polu siłowym informacji o konkretnych atomach znajdujących się w określonym otoczeniu. Kosztem dokładności, uzyskuje się możliwość symulowania dużych układów, dla których rozwiązanie równania Schrödingera trwałoby zbyt długo. Pole siłowe V_{FF} w ogólności jest sumą:

$$V_{FF} = V_{rozc} + V_{zgin} + V_{tors} + V_{vdW} + V_{el}$$

V_{rozc} odpowiada energii potencjalnej rozciągania wiązania chemicznego między dwoma atomami A i B. Stosuje się tu przybliżenie klasycznego oscylatora harmonicznego. V_{zgin} to energia potrzebna do zmiany kąta utworzonego przez dwa wiązania chemiczne w układzie trzech atomów A, B i C. Również tutaj znajduje zastosowanie przybliżenie oscylatora harmonicznego. V_{tors} związana jest z kątem dwuściennym między płaszczyznami wyznaczonymi przez wiązanie A i B oraz C i D w układzie czterech atomów A, B, C i D. Opisuje więc zmianę energii wraz z obrotem atomów A i D dookoła wiązania B-C. V_{vdW} odpowiada energii van der Waalsa i opisywana jest potencjałem Lennarda-Jonesa. V_{el} jest energią oddziaływania elektrostatycznego. Pola siłowe są zdefiniowane i zaimplementowane dla standardowo symulowanych cząsteczek we wszystkich powszechnie używanych pakietach do dynamiki molekularnej. Dla lipidów (fosfolipidów i cholesterolu), których dynamikę molekularną symulowałem

w swoich badaniach w programie AMBER [15], wykorzystywałem pole siłowe lipid14 [16] lub lipid17, a w ostatnim czasie lipid21 [17]. W przypadku niestandardowych cząsteczek (w moich badaniach np. sfingolipidów lub utlenionych postaci cholesterolu), konieczna jest samodzielna parametryzacja. Kluczowym krokiem jest obliczenie potencjału elektrostatycznego (ang. *electrostatic potential*, ESP), odgrywającego szczególnie ważną rolę w przypadku cząsteczek polarnych (lub części polarnej cząsteczki). W tym celu optymalizuje się geometrycznie cząsteczkę na wysokim poziomie teorii – całą lub jej część z dodatkową grupą w miejscu wiązania. Następnie wykorzystując obliczoną kwantowo-chemicznie funkcję gęstości elektronowej ρ , należy dopasować funkcję potencjału elektrostatycznego ϕ_{ESP} , zdefiniowaną w punkcie \mathbf{r} , jako

$$\phi_{ESP}(\mathbf{r}) = \sum_A^{N_{\text{j\u0105der}}} \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|} d\mathbf{r}'$$

Dopasowanie to realizuje się minimalizując funkcję celu:

$$obj(\mathbf{Q}) = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{r}} \left(\phi_{ESP}(\mathbf{r}) - \sum_A^{N_{\text{atom\u00f3w}}} \frac{Q^A(\mathbf{R}_A)}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} \right)^2$$

gdzie Q^A jest ładunkiem częściowym, sumującym się do całkowitego ładunku cząsteczki. Wadą tak zdefiniowanej funkcji jest nadmierny wpływ ładunku atomów znajdujących się na powierzchni cząsteczki. Z tego powodu stosuje się odpowiednie poprawki. W pakiecie AMBER wykorzystywana jest poprawka hiperboliczna, w wyniku której uzyskuje się potencjał elektrostatyczny z dodatkowymi więzami (ang. *restrained electrostatic potential*, RESP) [10]. Pozostałe brakujące parametry uzyskiwałem w swoich badaniach wykorzystując zdefiniowane w pakiecie AMBER pole siłowe o nazwie GAFF (ang. *General Amber force field*) [18], ciągle rozwijane GAFF2 lub wymienione wyżej lipidowe pola siłowe.

Obliczenia DFT oraz dynamiki molekularnej wykonywałem wykorzystując Polską Infrastrukturę Gridową PL-Grid [19], w ramach uzyskiwanych grantów obliczeniowych.

4.5. Cel pracy naukowej

Celem mojej pracy naukowej związanej z omawianym osiągnięciem naukowym było opracowanie metodologii badań teoretycznych, która będzie mogła być wykorzystana jako narzędzie wspierające projektowanie leków lub systemów ich dostarczania, a także szacowanie skutków ubocznych wprowadzania do organizmu tych leków i innych związków aktywnych biologicznie. Realizacji tego celu posłużyło wykorzystanie metod chemii obliczeniowej, w szczególności teorii funkcjonału gęstości i

dynamiki molekularnej oraz praktyczne zastosowanie obliczeń w interpretacji wyników następujących metod eksperymentalnych:

- techniki monowarstw Langmuira,
- mikroskopii kąta Brewstera (ang. *Brewster angle microscopy*, BAM),
- refleksyjno-absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. *polarization modulation – infrared reflection-absorption spectroscopy*, PM-IRRAS),
- nanospektroskopii w podczerwieni połączonej z mikroskopią sił atomowych (ang. *atomic force microscopy-based infrared spectroscopy*, AFM-IR),
- fourierowskiej spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *attenuated total reflectance – Fourier-transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR),
- spektroskopii Ramana oraz
- pomiarów zmiany elektrycznego potencjału powierzchniowego.

W trakcie moich badań poszukiwałem informacji zarówno o oddziaływaniach międzycząsteczkowych, jak i relacji pomiędzy strukturą cząsteczek a ich aktywnością biologiczną. Skupiłem się na dwóch wątkach tematycznych, którym towarzyszyły odpowiednie pytania badawcze:

- wzajemne oddziaływania lipidów błonowych oraz ich oddziaływania ze związkami aktywnymi biologicznie:
 - W jaki sposób struktura utlenionych form cholesterolu determinuje ich aktywność biologiczną?
 - Jak oddziaływanie oksysteroli ze składnikami błon biologicznych wpływa na właściwości tych błon i ich budowę?
 - Jaki model teoretyczny najlepiej opisuje wartości momentu dipolowego wybranych grup lipidów?
 - Czy fluorowane alkany mogą znaleźć zastosowanie jako substancje zwiększające dostępność cyklosporyny A w wewnętrznej warstwie filmu łożowego?
- wiązanie przeciwnowotworowego leku z DNA oraz uszkodzenia DNA:
 - W jaki sposób przeciwnowotworowy lek Pt-103 wiązany jest z cząsteczką DNA?
 - Jak przebiega szlak uszkodzeń DNA wywołanych jonizacją guaniny?

We wszystkich omawianych badaniach byłem odpowiedzialny za zaplanowanie, wykonanie i interpretację obliczeń teoretycznych.

4.6. Uzyskane wyniki

4.6.1. Parametr krytycznego upakowania w opisie aktywnych biologicznie związków amfifilowych

Badanie oddziaływania związków aktywnych biologicznie z cząsteczkami tworzącymi organizmy żywe jest zawsze złożonym, wielowymiarowym procesem. Jednym z elementarnych aspektów jest poznanie wpływu takich związków na błonę komórkową. Utrzymanie struktury błony biologicznej możliwe jest dzięki amfifilowej budowie biolipidów oraz szczególnym własnościom wody. Dzieje się tak na skutek dwóch rodzajów tzw. oddziaływań: hydrofobowego i hydrofilowego, które stanowią niejako dwie siły wymuszające w środowisku wodnym agregację cząsteczek amfifilowych w struktury najkorzystniejsze energetycznie. W tak termodynamicznie stabilnym układzie, związki amfifilowe mogą być geometrycznie opisane za pomocą optymalnego pola powierzchni międzyfazowej przypadającego na cząsteczkę a_0 , objętości łańcucha węglowodorowego V i maksymalnej efektywnej długości tego łańcucha l_c . Geometrycznie cząsteczkę można również opisać za pomocą parametru krytycznego upakowania (ang. *critical packing parameter*, CPP), który związany jest z powyższymi wielkościami zależnością [20]:

$$CPP = \frac{V}{a_0 l_c}$$

Znając wartość CPP da się określić bryłę opisującą geometryczną reprezentację cząsteczki. Analizując powyższy wzór można stwierdzić, że CPP równemu 1 będzie odpowiadać walec, a wartości $\frac{1}{3}$ – stożek. Wartości pośrednie będą tożsame stożkowi ściętemu (dla którego podstawa o większym promieniu będzie równa a_0). Wartości większe od 1 odpowiadają odwróconym stożkom ściętym, dla których podstawa o mniejszym promieniu jest równa a_0 . Z powyższego wynika zależność pomiędzy wartością CPP, a fazą tworzonego agregatu. Wartości $CPP \leq \frac{1}{3}$ pozwalają na tworzenie miceli. Większe wartości CPP ($\frac{1}{3} < CPP \leq \frac{1}{2}$) implikują powstawanie miceli niesferycznych, w tym cylindrycznych, co może skutkować przyjmowaniem przez układ fazy heksagonalnej. Liposomy, jak również zakrzywione dwuwarstwy powstają, gdy $\frac{1}{2} < CPP < 1$. Te ostatnie umożliwiają formowanie fazy sześcienniej (która także może powstać z odpowiednio ułożonych miceli). Wreszcie $CPP \approx 1$ związane jest z tworzeniem płaskich dwuwarstw i fazą lamelarną. Wartościom $CPP > 1$ odpowiadają struktury i fazy odwrotne, w porządku odpowiadającym strukturom i fazom normalnym. Taki opis związków amfifilowych dostarcza informacji o organizacji cząsteczek w warstwie i ich upakowaniu, z czego można wyciągnąć wnioski o sile oddziaływań międzycząsteczkowych. Pozwala także przewidzieć procesy towarzyszące wbudowywaniu w błonę podawanych do organizmu związków aktywnych fizjologicznie. Niesie ponadto informację o rodzaju samoorganizującej się struktury, co może znaleźć zastosowanie przy

projektowaniu systemów dostarczania leków (ang. *drug delivery system*, DDS) opartych na związkach amfifilowych. W artykule przeglądowym [H1] przedstawiłem metody wyznaczania CPP oraz przykłady wykorzystania tego parametru w opisie aktywnych biologicznie cząsteczek amfifilowych w trakcie procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Najwięcej uwagi poświęciłem procesowi trawienia. W omawianych przeze mnie badaniach [21–23] użyto CPP do opisu trawienia na przykładzie układów modelowych. Za pomocą metod dyfrakcyjnych sprawdzano, jak zmienia się faza układów pod wpływem dodawanych soli żółciowych. Jako wniosek z tych badań można przyjąć, że sole żółciowe powodują zmniejszenie wartości CPP. W innych publikacjach [24,25] określono wpływ pH na ten parametr. Tu podobnie, stwierdzono, że duże wartości pH powodują zmniejszenie CPP. Inaczej jest w przypadku zmiany temperatury. Rosnąca temperatura powoduje wzrost wartości parametru CPP [24]. Innym wymienianym w literaturze czynnikiem jest obecność jonów. Badając wpływ stężenia NaCl na aktywne biologicznie lipidy stwierdzono, że wzrost stężenia jonów w układzie powoduje wzrost CPP [26]. Wiedza na temat relacji pomiędzy powyższymi czynnikami, a parametrem CPP jest istotna, ze względu na możliwość jej wykorzystania do opisu struktur tworzonych przez doustnie podawane związki amfifilowe, w szczególności stosowane jako DDS. Podjęto już takie próby. Wykorzystując CPP opisano procesy zachodzące w układzie kubosomów na bazie fitantriolu oraz 1,2-dipalmitoiloo-3-glicero-3-fosfoseryny (DPPS) zachodzące pod wpływem zmiennej temperatury, siły jonowej roztworu i stężenia DPPS [27]. Innym przykładem było użycie CPP do opisu poddawanego działaniu soli żółciowych samoemulgującego nanosystemu, wykorzystywanego do dostarczania leków trudno rozpuszczalnych w wodzie [28].

Powyższe przykłady pokazują, że znajomość wartości CPP amfifilowych związków wykorzystywanych jako leki, bądź jako nośniki leków, w połączeniu z wiedzą o tym jak CPP zmienia się po podaniu do organizmu, może znaleźć zastosowanie już na etapie projektowania takich związków i przełożyć się na zwiększenie efektu terapeutycznego. Niestety, wyznaczenie wartości CPP nie zawsze jest proste. Obliczenie krytycznej długości łańcucha węglowodorowego oraz jego objętości, dla łańcuchów w pełni nasyconych, jest możliwe dzięki semiempirycznym wzorom. Wyznaczenie pola powierzchni międzyfazowej przypadającej na cząsteczkę a_0 jest znacznie trudniejsze, ze względu na wiele czynników wpływających na ten parametr. Oprócz oddziaływania sterycznego, jego wartość może być modyfikowana przez oddziaływanie jonowe. Również obecność innych związków w układzie, czy też poziom uwodnienia mogą mieć wpływ na a_0 . Wartości dostępne w literaturze zostały wyznaczone przeważnie w eksperymentach dyfrakcyjnych. Wykonanie takich eksperymentów jest kosztowne, czasochłonne i nie zawsze możliwe. Z pomocą może przyjść podejście teoretyczne, wykorzystujące symulacje dynamiki molekularnej.

Właśnie takie podejście zastosowałem w badaniu [H2]. Wykorzystując symulacje dynamiki molekularnej, uzyskałem termodynamicznie stabilne dwuwarstwy zbudowane z biolipidów wchodzących w skład błon komórkowych: fosfatydylocholin: 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC) oraz 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DPPC), fosfatydyloetanolamin: 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy (POPE) oraz 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy (DPPE), cholesterolu (CHOL), oksysteroli: 7-ketocholesterolu (7-K), 7 α -hydroksycholesterolu (7 α -OH), 7 β -hydroksycholesterolu (7 β -OH) oraz 25-hydroksycholesterolu (25-OH), a także sfingolipidów: sfingomieliny (SM) i gangliozydu (GM₁). Układy były symulowane przez 300 ns ewolucji systemu, a ostatnie 10 ns wykorzystałem do wyznaczenia średnich wartości parametrów α_0 , l_c i V . Dzięki temu możliwe było obliczenie wartości parametru CPP dla wszystkich analizowanych związków (Tabela 1).

Tabela 1. Wartości CPP wyznaczone z symulacji dynamiki molekularnej [H2] oraz oszacowane semiempirycznie wartości literaturowe dla wybranych składników błon komórkowych oraz ich pochodnych. Wartość dla 25-OH została wyznaczona dla skierowanej ku wodzie grupie hydroksylowej przy węglu *C(3) oraz **C(25).

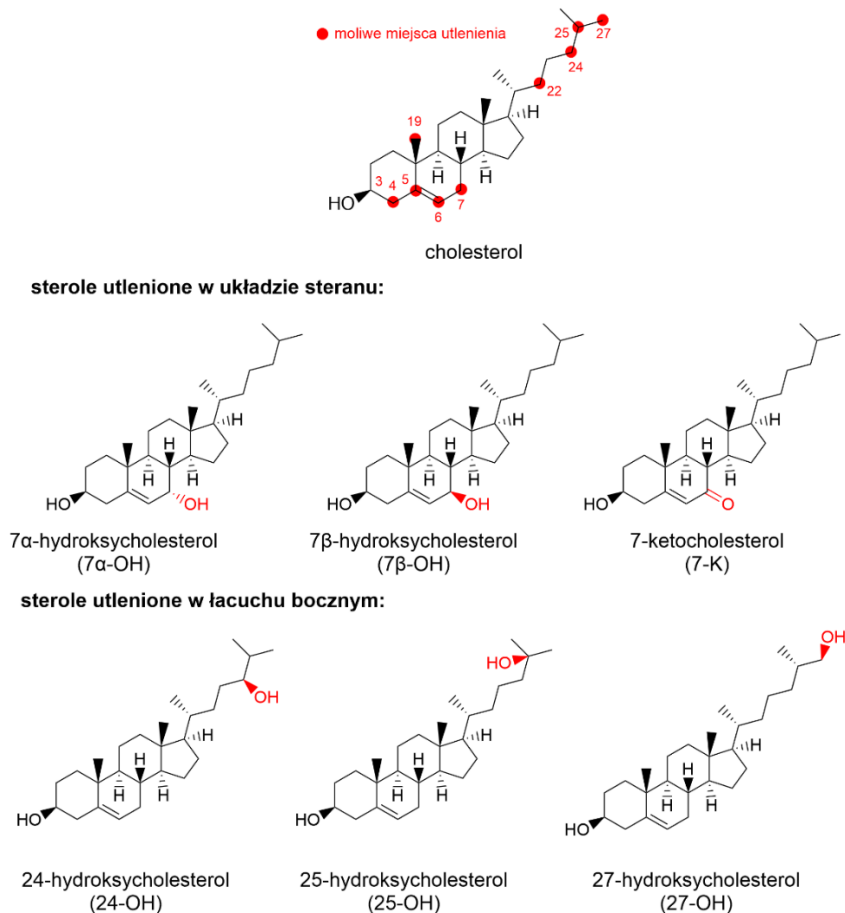
	CPP (z MD)	kształt	CPP (semiempiryczne)	kształt	faza
POPC	0,61	ścięty stożek	0,62	ścięty stożek	L
DPPC	0,60	ścięty stożek	0,58	ścięty stożek	L
POPE	0,66	ścięty stożek	1,08	walec	H _{II}
DPPE	0,64	ścięty stożek	1,00	walec	H _{II}
CHOL	3,00	odwrócony stożek	1,22	odwrócony ścięty stożek	L
SM	0,59	ścięty stożek	0,74	ścięty stożek	L
GM ₁	0,30	stożek	0,42	ścięty stożek	-
7-K	1,40	odwrócony ścięty stożek			
7 α -OH	1,59	odwrócony ścięty stożek			
7 β -OH	1,43	odwrócony ścięty stożek			
25-OH	2,86*/2,95**	odwrócony stożek			

Dla fosfatydylocholin oraz sfingolipidów otrzymałem dużą zgodność pomiędzy wartościami obliczonymi z dynamiki molekularnej a wyznaczonymi doświadczalnie w innych badaniach. Zarówno w obliczeniach MD, jak i w eksperymentach opisanych w literaturze, badany układ był w fazie lamelarniej. Inaczej było dla fosfatydyloetanolamin, dla których doświadczalne wartości a_0 wyznaczone były dla fazy heksagonalnej odwróconej. Może to być przyczyną widocznych rozbieżności uzyskanych wartości. Opisywane w literaturze różne uwodnienie części polarnych fosfatydyloetanolamin względem innych fosfolipidów również może tłumaczyć obserwowane różnice [29,30]. Zwraca uwagę także rozbieżność wartości CPP dla cholesterolu. Może ona wynikać z tego, że wartość eksperymentalna a_0 została wyznaczona dla mieszaniny cholesterolu i fosfatydylocholin, podczas gdy w symulacji dynamiki molekularnej w układzie znajdował się jedynie cholesterol. Biorąc pod uwagę kształt cząsteczki cholesterolu, wyraźnie wpisującej się w odwrócony stożek, wartość wyznaczona z symulacji dynamiki molekularnej wydaje się bardziej prawdopodobna. Zgodność otrzymanych przeze mnie wyników z wartościami literaturowymi pokazuje, że zastosowane podejście jest metodą o dużym potencjale, którą (biorąc pod uwagę względnie nieduże rozmiary amfifilowych cząsteczek błonowych i używanych w DDS) można zastosować do wyznaczenia wartości CPP wielu innych układów.

4.6.2. Lipidowe składniki błon komórkowych i oksysterole

Z punktu widzenia zachowania struktury i utrzymania własności fizykochemicznych błony komórkowej, najważniejszymi jej składnikami są amfifilowe lipidy. Największy udział w całkowitej masie lipidów zwierzęcej błony komórkowej po fosfolipidach ma cholesterol. Cholesterol jest cząsteczką zapewniającą odpowiednią sztywność lipidowej dwuwarstwy oraz zmniejszającą jej przepuszczalność. Stabilizujące działanie cholesterolu na błonę wynika z oddziaływania tego związku z łańcuchami węglowodorowymi fosfolipidów, co ogranicza ich ruchliwość [31]. Zgodnie z przyjętym modelem błony komórkowej, jest ona w stanie ciekłym, co umożliwia składnikom swobodne przemieszczanie się w kierunkach leżących w płaszczyźnie błony. Dyfuzja lateralna jest zatem procesem niezwykle szybkim - sąsiednie cząsteczki mogą zamieniać się miejscami nawet 10^7 razy na sekundę. Inaczej jest z ruchem pomiędzy warstwami błony komórkowej. Proces przemieszczania się lipidów z jednej warstwy do drugiej, zwany *flip-flop*, zachodzi wiele rzędów wielkości rzadziej, co oznacza, że do przejść może dochodzić raz na kilka minut, a nawet raz na kilka dni. Małe prawdopodobieństwo takiego przejścia da się wytłumaczyć termodynamicznie: proces wymaga reorientacji cząsteczki (*flip*) i przepchnięcia jej, zatem również jej części polarnej, przez hydrofobową część błony (*flop*). Ta bariera energetyczna pozwala utrzymać asymetrię budowy błony (szczególnie komórkowej), co z kolei obok właściwych proporcji składników błony, jest niezbędne do zachowania jej cech strukturalnych i funkcji fizjologicznych. W wyniku procesów patologicznych, takich jak procesy nowotworzenia [32], może dochodzić do zmian proporcji składników błony, czego konsekwencją będzie zaburzenie prawidłowego

funkcjonowania całej komórki. Niektóre substancje wprowadzane do organizmu, takie jak leki, czy składniki pożywienia mogą wbudowywać się w błony komórkowe, modyfikując tym samym ich skład i funkcjonalność. Może być to efektem korzystnym i zamierzonym; może być również zjawiskiem patologicznym, prowadzącym do uszkodzenia błony [33]. Istotną grupą związków mogących w ten sposób oddziaływać są oksysterole, czyli utlenione formy cholesterolu. Posiadają one dodatkową grupę funkcyjną (np. hydroksylową lub karbonylową), która jeśli jest przyłączona w odpowiednim oddaleniu od grupy hydroksylowej cholesterolu, czyni cząsteczkę związkami bolaamfifilowymi (rysunek 1). Rodzi to pytanie, czy utlenianie cholesterolu lub też dostarczanie do organizmu jego utlenionych form prowadzi do zmniejszenia bariery potencjału procesu *flip-flop*, bądź nawet umożliwia transport sterolu do sąsiedniej warstwy bez reorientacji? Zwiększenie częstotliwości migracji sterolu powodowałoby zmianę asymetrii jego dystrybucji w błonie komórkowej, co prowadziłoby z kolei do zmian jej własności fizycznych i niesłoby poważne skutki biologiczne.



Rysunek 1. Wzory strukturalne cholesterolu i jego utlenionych pochodnych – oksysteroli [34].

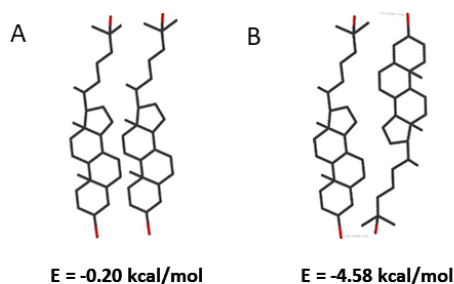
Oksysterole mogą być produkowane na drodze enzymatycznej lub na drodze rodnikowej, w wyniku działania np. rodnika hydroksylowego [35]. Utlenienie węgla przy pierścieniu, głównie węgla C(7), zachodzi przeważnie na drodze nieenzymatycznej (produktami są 7β-OH lub 7-K). Natomiast 24(S)-hydroksycholesterol (24-OH) i 27-hydroksycholesterol (27-OH), mające utleniony węgiel w łańcuchu

węglowodorowym, powstają w wyniku reakcji enzymatycznych. Istnieją jednak odstępstwa od tej reguły, np. 25-OH i 7 α -OH mogą być wytwarzane zarówno w sposób enzymatyczny, jak i nieenzymatyczny [35]. Oksysterole, np. 7-K, 7 α -OH i 7 β -OH, mogą być również dostarczane do organizmu z pożywieniem, szczególnie w przypadku diety bogatej w produkty wysoko przetworzone [36]. Utlenione formy cholesterolu w niewielkich stężeniach (trzy rzędy wielkości mniejszych od stężenia cholesterolu) są obecne w organizmach zwierzęcych w warunkach normalnych. Pełnią wówczas rolę w homeostazie cholesterolu [35]. Ich podwyższone stężenie związane jest jednak ze stanami patologicznymi, przy czym to one mogą ten stan inicjować, jak również być efektem procesu chorobowego. Do przewlekłych chorób podwyższających poziom oksysteroli zaliczyć można te związane ze starzeniem, jak osteoporoza, cukrzyca, miażdżyca, zaćma, choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera czy Parkinsona) oraz niektóre formy raka (okrężnicy lub prostaty) [37–39]. Z drugiej strony, istnieją doniesienia na temat przeciwwirusowego działania 25-OH względem ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV), reowirusów, norowirusów, wirusów pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, dalekowschodniego kleszczowego zapalenia mózgu, Zika, Ebola oraz Nipah [40,41]. Stwierdzono także aktywność 25-OH przeciw wirusowi SARS-CoV-2 [42]. Działanie to prawdopodobnie polega na podmianianiu w błonach komórkowych cholesterolu, co utrudnia łączenie błony wirusa z komórką gospodarza. Podobne działanie postuluje się w przypadku 27-OH [43]. U pacjentów z COVID-19 zaobserwowano podwyższone stężenie 7-K oraz 7 β -OH [43,44], co wskazuje na możliwość wykorzystania ich jako biomarkerów lipidowych COVID-19. Obniżony poziom oksysteroli jest z kolei jedną z hipotez wyjaśniających niższą śmiertelność wśród pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 przyjmujących statyny [45].

Wzajemne oddziaływanie cząsteczek 25-hydroksycholesterolu

Ponieważ oksysterole mogą wbudowywać się w błony komórkowe organizmów żywych [7], kluczowe jest zrozumienie, jak proces ten wpływa na właściwości błony. W publikacji [H3] przedstawiliśmy nasze badania mające na celu określenie orientacji w błonie komórkowej oksysterolu 25-OH, będącego związkiem bolaamfifilowym. W części eksperymentalnej naszego badania wykorzystano technikę monowarstw Langmuira, BAM, PM-IRRAS oraz ATR-FTIR. Wykonane przeze mnie obliczenia teoretyczne DFT posłużyły do interpretacji widm PM-IRRAS oraz ATR-FTIR układów 25-OH. W technice PM-IRRAS, intensywność sygnału jest największa, gdy moment dipolowy, którego zmiana jest obserwowana, jest zorientowany równoległe do powierzchni wody. Dlatego w przypadku monowarstw Langmuira obserwuje się wzmocnienie pasm drgań prostopadłych do długiej osi cząsteczki (cząsteczki amfifilowe są zwykle zorientowane równoległe lub nachylone pod niewielkim kątem względem normalnej do powierzchni wody). Dzięki temu pasma widoczne w PM-IRRAS mogą służyć do wyznaczenia orientacji cząsteczek w monowarstwie. W naszym eksperymencie cennych informacji

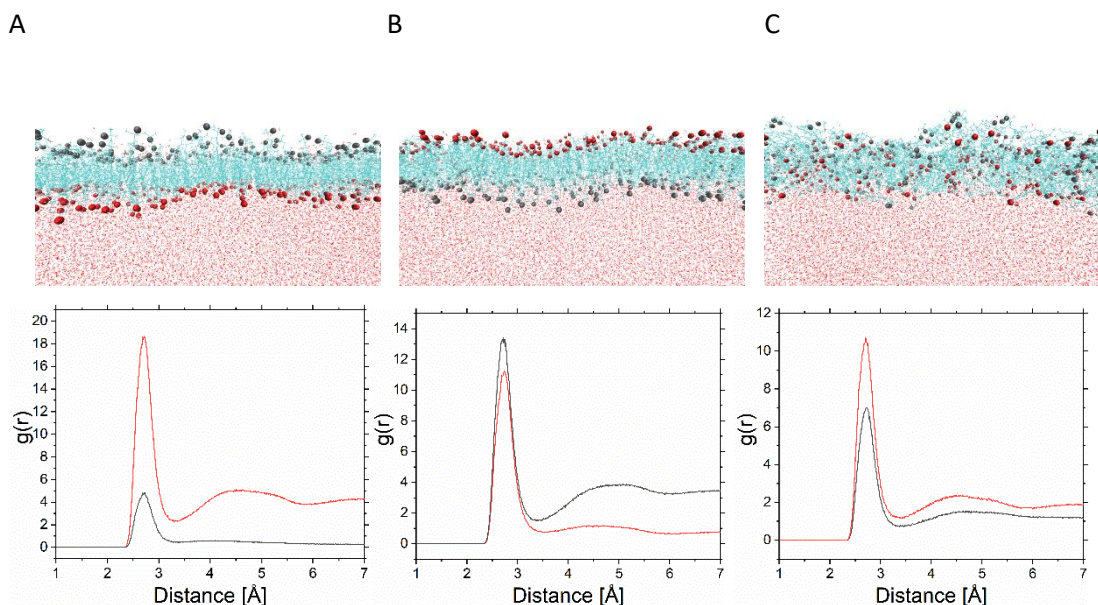
dostarczyła obserwacja drgań rozciągających wiązania C-O przy C(3) oraz C(25). Drgania te charakteryzowały się wartościami liczb falowych $\tilde{\nu}=1039\text{ cm}^{-1}$ oraz $\tilde{\nu}=1116\text{ cm}^{-1}$ odpowiednio dla C(3)-O oraz C(25)-O. Położenie pasma pochodzącego od drgań rozciągających wiązanie C(3)-O przesunęło się podczas kompresji monowarstwy (czemu towarzyszyła zmiana ciśnienia powierzchniowego π od 5 do 20 mN/m) w kierunku mniejszych wartości liczby falowej, co sugeruje pojawienie się dodatkowych oddziaływań (prawdopodobnie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody). Dla większych wartości ciśnienia powierzchniowego (35 i 40 mN/m) tendencja ta ulegała odwróceniu (pasma przesunęło się w stronę większych wartości liczb falowych i poszerzało się), co może sugerować, że w dwuwarstwach 25-OH grupa OH przy C(3) może występować w dwóch różnych środowiskach (oddziałując z cząsteczkami wody lub z sąsiednimi 25-OH). Pasma rozciągające C(25)-O pokrywało się z innymi pasmami (pochodzącymi od drgań wachlarzowych i skręcających CH_2 , nożycowych $\text{C}=\text{C}=\text{C}$ i deformacyjnych układu steranowego), dlatego dla mniejszych wartości ciśnienia powierzchniowego (5, 10 i 20 mN/m) nie było możliwe precyzyjne określenie położenia pików. Przy π równym 40 mN/m pasmo to było przesunięte w stronę większej wartości liczby falowej, co potwierdza, że w dwuwarstwach grupa hydroksylowa przy C(25), podobnie jak przy C(3), może występować w dwóch różnych środowiskach. Reasumując, pasma drgań rozciągających wiązania C-O przy C(3) oraz C(25) na widmach PM-IRRAS ulegały poszerzeniu wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego, co sugerowało zarówno oddziaływania wzajemne, jak i oddziaływania z wodą. Pozwoliło to wysnuć wniosek, że oksysterol 25-OH wbudowuje się w monowarstwę grupą hydroksylową przy węglu C(3) i C(25) zamiennie skierowaną do powierzchni międzyfazowej. Doświadczenia nie rozstrzygały natomiast, która z grup jest bardziej hydrofilowa oraz która orientacja cząsteczki 25-OH w monowarstwie jest bardziej prawdopodobna. Wątpliwości te miały rozwiązać obliczenia teoretyczne wykorzystujące DFT. W tym celu obliczyłem wartości energii wiązania wodorowego tworzonego pomiędzy cząsteczką wody, a grupą hydroksylową związaną z węglem C(3) lub C(25). Postawienie takiego problemu jest o tyle zasadne, że surfaktanty zawierające tę samą grupę polarną przyłączoną w różnych miejscach mogą mieć inną aktywność powierzchniową [46]. By rozstrzygnąć tę wątpliwość zoptymalizowałem geometrycznie dimery, składające się z cząsteczki 25-OH oraz jednej cząsteczki wody, umieszczonej w pobliżu grupy C(3)-OH lub C(25)-OH, a następnie obliczyłem całkowitą energię oddziaływania międzycząsteczkowego. Nie stwierdziłem jednak istotnej różnicy w wartościach energii oddziaływania dla cząsteczki wody znajdującej się w pobliżu grup hydroksylowych po przeciwnych stronach 25-OH. Sugerowało to, że ewentualne preferowane ułożenie 25-OH w monowarstwie wynikać może nie z oddziaływania z wodą, lecz z zależnych od orientacji różnic w oddziaływaniu między cząsteczkami budującymi monowarstwę. By sprawdzić tę tezę obliczyłem całkowitą energię oddziaływań dimerów utworzonych z cząsteczek 25-OH w różnym wzajemnym ułożeniu. Wartości energii oddziaływań międzycząsteczkowych wraz z odpowiadającą im wzajemną orientacją cząsteczek w dimerach zostały pokazane na rysunku 2.



Rysunek 2. Wartości energii oddziaływań pomiędzy cząsteczkami 25-OH w dimerach [H3].

Dla ułożeń przedstawionych na rysunku 2 oddziaływanie odbywa się poprzez obydwie grupy hydroksylowe w każdej molekuie, co ma miejsce w monowarstwie. Najbardziej ujemną energię oddziaływania otrzymałem dla ułożenia antyrównoległego (rysunek 2 B). Jest to potwierdzeniem opisywanego wcześniej „zapętlonego” ułożenia w błonach oksysteroli utlenionych przy pierścieniu węglowodorowym, jako najbardziej preferowanego [47].

Kolejnym krokiem analizy oddziaływań tych oksysteroli była symulacja dynamiki molekularnej. Zbudowałem trzy układy stanowiące dwuwarstwy otoczone wodą: z cząsteczkami 25-OH skierowanymi grupą C(3)-OH w stronę granicy międzyfazowej, ze skierowanymi grupą C(25)-OH w stronę tej granicy oraz zbudowaną z cząsteczek w powyższych orientacjach w stosunku 1:1 (rysunek 3 – panel górny). Do analizy wyników posłużyłem się funkcją rozkładu radialnego (ang. *radial distribution function*, RDF), opisującą uśrednioną odległość pomiędzy zadaną parą atomów. W celu określenia uwodnienia wyznaczyłem funkcję RDF dla par: tlen w grupie hydroksylowej – tlen w cząsteczce wody (rysunek 3 – panel dolny).



Rysunek 3. Monowarstwy otrzymane w wyniku symulacji MD po 110 ns ewolucji układów o różnych wzajemnych orientacjach (dla cząsteczek skierowanych C(3)-OH ku wodzie (A) i skierowanych C(25)-OH ku wodzie (B) losowej (C)). Czerwone kulki i linie na wykresie reprezentują C(3)-OH, a ciemnoszare C(25)-OH. Dolny panel przedstawia odpowiednie funkcje rozkładu radialnego par O w wodzie – O w oksysterolu.

Tak zdefiniowane funkcje pozwoliły stwierdzić, że dla wymuszonego ułożenia tego oksysterolu grupą C(3)-OH skierowaną ku wodzie, uwodnienie grupy hydroksylowej przy C(25) jest zgodnie z

oczekiwaniami znacznie mniejsze od uwodnienia grupy C(3)-OH. Natomiast w układzie z grupami C(25)-OH skierowanymi ku wodzie, funkcja RDF przyjmuje zbliżone wartości dla obydwu grup hydroksylowych, co sugeruje podobne uwodnienie. Wynikało to z częściowej reorientacji cząsteczek oksysterolu, co znaczący może, że ułożenie z grupą hydroksylową przy C(3) skierowaną do powierzchni międzyfazowej jest bardziej korzystne energetycznie. Znalazło to potwierdzenie w symulacjach układu z naprzemiennym ułożeniem cząsteczek oksysterolu 25-OH. Po 110 ns symulacji 60% molekuł było zorientowanych grupą C(3)-OH w stronę powierzchni międzyfazowej. Eksponowanie grupy C(3)-OH do granicy faz znalazło również potwierdzenie w symulacji samoporzędkowania się układu składającego się z losowo rozmieszczonych cząsteczek. Po 300 ns symulacji układ oksysterolu tworzył rozgałęzioną monowarstwę o nieznacznie większym uwodnieniu grup C(3)-OH. Obliczenia teoretyczne pozwoliły zatem stwierdzić, że obydwie orientacje oksysterolu 25-OH są możliwe, jednak preferowane będzie ułożenie z grupą hydroksylową związaną z C(3) skierowaną ku płaszczyźnie międzyfazowej.

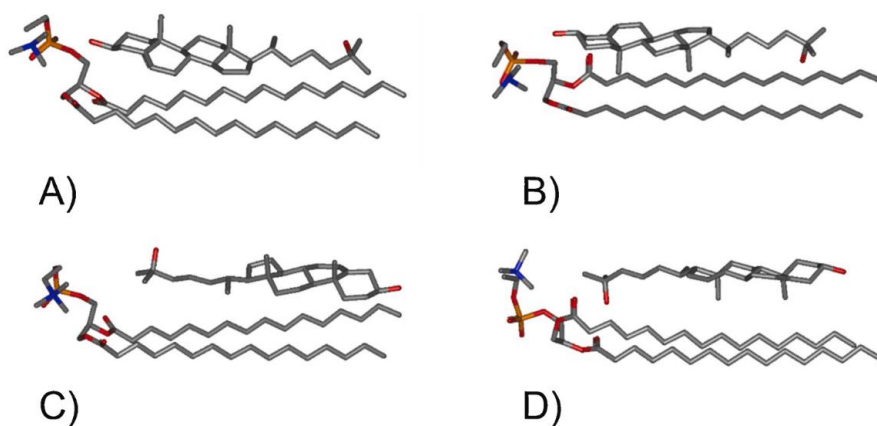
Oddziaływanie 25-hydroksycholesterolu z fosfolipidami

Asymetria błon biologicznych może być utrzymywana dzięki barierze potencjału dla ruchu *flip-flop* cząsteczek amfifilowych. W sytuacji podmienienia cholesterolu przez bolaamfifilowy oksysterol, bariera energetyczna takiego przejścia staje się znacznie mniejsza, co może doprowadzić do zaburzenia asymetrii i wpłynąć na sztywność, przepuszczalność oraz funkcje fizjologiczne błony komórkowej. Wcześniejsze badania pokazały, że transport oksysteroli utlenionych w łańcuchu przez błonę komórkową fibroblastów i erytrocytów zachodzi bardzo szybko [48–50]. Proces ten nie został jednak wówczas dokładnie opisany i wyjaśniony. Właśnie pod tym kątem w pracy [H4] zbadaliśmy oksysterol 25-OH. Podjęliśmy się opisanie oddziaływań 25-OH z głównymi fosfolipidowymi składnikami błon komórkowych, tj. przykładowymi fosfatydylocholinami (PC) i fosfatydyloetanolaminami (PE) oraz opisanie orientacji 25-OH względem powierzchni międzyfazowej w obecności tych fosfolipidów. Wybór tych fosfolipidów jest uzasadniony tym, że warstwa zewnętrzna błony komórkowej ssaków jest bogatsza w PC, natomiast warstwa wewnętrzna w PE. Techniki eksperymentalne, jakie wykorzystano w omawianym w publikacji badaniu, to metoda monowarstw Langmuira, BAM, mikroskopia AFM monowarstw naniesionych na podłoże stałe oraz PM-IRRAS. Wielkością ułatwiającą interpretację wyników eksperymentów na monowarstwach Langmuira jest nadmiarowa entalpia swobodną ΔG^{exc} :

$$\Delta G^{exc} = N_A \int_0^\pi (A_{12} - (A_1 X_1 + A_2 X_2)) d\pi$$

gdzie X_1 i X_2 to ułamek molowy substancji nr 1 i 2, A_1 , A_2 i A_{12} to powierzchnia monowarstwy utworzonej odpowiednio przez substancję 1, 2 oraz mieszaninę 1 i 2. Ujemne wartości ΔG^{exc} sugerują stabilność monowarstwy i oddziaływania przyciągające pomiędzy jej składnikami, natomiast wartości dodatnie świadczą o oddziałyvaniach odpychających, a nawet separacji faz [51]. W przypadku

mieszanin 25-OH z fosfatydylocholinami wartości ΔG^{exc} były duże i ujemne, co sugeruje silne oddziaływania oraz tworzenie stabilnych kompleksów powierzchniowych. Jednocześnie, na izotermie (otrzymanych dla monowarstw Langmuira) dla dwóch różnych ciśnień powierzchniowych zaobserwowano obszary nieciągłości, odpowiadające załamaniom monowarstwy (kolaps, ang. *collapse*), czyli sytuacji, gdy molekuly są wypychane poza powierzchnię międzyfazową. Może to sugerować istnienie w układzie dwóch rodzajów kompleksów oksysterolu z fosfolipidami, odpowiadających dwóm różnym orientacjom 25-OH. Kompleksy takie w ogólności mogą być w różnym stopniu stabilne, stąd dla każdego z tych dwóch przypadków może istnieć inne graniczne ciśnienie, przy którym dochodzi do kolapsu. W celu zweryfikowania tej hipotezy, przeprowadziłem obliczenia kwantowo-chemiczne, mające na celu ilościowy opis oddziaływań między oksysterolem 25-OH a DPPC oraz 25-OH a 2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholiną (DOPC). Uwzględniłem jedynie oddziaływanie między cząsteczką oksysterolu i fosfolipidu, pomijając oddziaływanie z wodą. Zoptymalizowane układy widoczne są na rysunku 4.



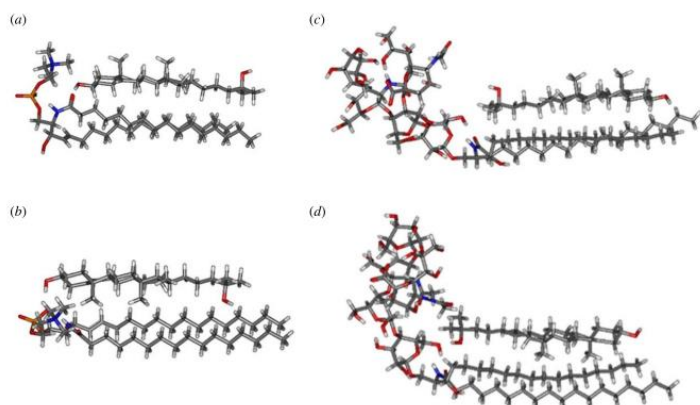
Rysunek 4. Geometryczne reprezentacje zoptymalizowanych układów 25-OH/DPPC w różnych względnych ułożeniach: część polarna DPPC znajdująca się w pobliżu grupy hydroksylowej związanej z C(3)-OH (A, B) lub C(25)-OH (C, D), grupy metylowe oksysterolu zorientowane na zewnątrz (A, C) lub do wewnątrz (B, D) dimeru [H4].

Obliczone energie wiązania charakteryzowały się dużymi wartościami, lecz niewielkim rozrzutem. Świadczy to o stabilności każdej konfiguracji i o możliwości tworzenia tych dwóch rodzajów kompleksów dla każdej pary związków. Dalszym krokiem moich obliczeń, były symulacje dynamiki molekularnej. Dokonałem analizy układów składających się z mieszaniny 25-OH z DPPC lub DPPE. 25-OH zwrócony był do granicy międzyfazowej grupą C(3)-OH lub C(25)-OH. Na podstawie otrzymanych wartości nie stwierdziłem istotnych różnic w energii oddziaływania między lipidami dla różnej orientacji 25-OH. Co ciekawe, uzyskałem znacznie bardziej ujemną wartość energii potencjalnej dla układów 25-OH z DPPC niż dla układów z DPPE. Wynik ten pozwolił stwierdzić większe powinowactwo 25-OH do fosfatydylocholiny niż fosfatydyloetyloaminy. Potwierdziło to hipotezę

sformułowaną na podstawie otrzymanej z eksperymentów monowarstw Langmuira bardziej ujemnej wartości nadmiarowej entalpii swobodnej ΔG^{exc} mieszaniny fosfatydylocholin. Stwierdziłem ponadto, że obydwa ułożenia 25-OH względem badanych fosfolipidów są energetycznie równoważne. Umożliwiło to na postawienie wniosku, że transport 25-OH między wewnętrzną warstwą błony komórkowej (bogatą w fosfatydyloetyloaminy) a zewnętrzną warstwą (bogatą w fosfatydylocholinę), może przebiegać bez zmian orientacji. Proces taki charakteryzować się będzie zatem niższą barierą potencjału niż analogiczny proces dla cholesterolu. Konsekwencją tego może być zaburzenie asymetrycznej budowy błony.

Oddziaływanie 25-hydroksycholesterolu ze sfingolipidami

W kolejnym artykule [H5] opisaliśmy wyniki badań oddziaływania oksysterolu 25-OH ze sfingolipidami: sfingomieliną (SM) i gangliozydem (GM₁). Sfingolipidy są następną po fosfolipidach i sterolach grupą lipidów najliczniej występujących w błonach komórkowych ssaków. Silne oddziaływania pomiędzy grupami polarnymi sfingomieliny i gangliozydu a cholesterolom sprawiają, że związki te mają tendencję do tworzenia mikrodomen w błonach komórkowych, zwanych tratwami lipidowymi. Tratwy różnią się składem od reszty błony, i co z tym związane, również sztywnością. Biorą one udział w procesach fizjologicznych, takich jak przekazywanie sygnałów, wiązanie białek, czy polaryzacja błony. Istnienie tratw lipidowych jest ponadto związane z wnikaniem wirusów otoczkowych do komórek gospodarza (w tym HIV, Zika i koronawirusów). Jak wcześniej wspomniano, niektóre procesy patologiczne zwiększają stężenie oksysteroli w organizmie. Te mogą wypierać cholesterol również wchodzący w skład tratw lipidowych. Z tego względu niezwykle ważne wydaje się zbadanie oddziaływań oksysteroli ze sfingolipidami. W omawianym badaniu, przeprowadziłem obliczenia DFT mające na celu dokładny opis oddziaływań pomiędzy oksysterolem 25-OH a sfingomieliną i gangliozydem. W pierwszym kroku wykonałem optymalizację geometryczną dimerów 25-OH i sfingolipidów, dla dwóch kombinacji ułożeń: dla grupy polarnej sfingolipidów znajdującej się w pobliżu C(3)-OH lub C(25)-OH. Ponadto



Rysunek 5. Reprezentacje geometryczne dimerów 25-OH ze sfingomieliną (a i b) oraz gangliozydem (c i d) [H5].

uwzględniłem różną orientację grup metylowych oksysterolu (skierowane do wnętrza dimeru lub na zewnątrz, rysunek 5).

W przypadku dimeru 25-OH/SM największa energia wiązania charakteryzowała układ z grupą polarną sąsiadującą z C(3)-OH, niezależnie od orientacji grup metylowych w 25-OH. Dla układów z grupą polarną

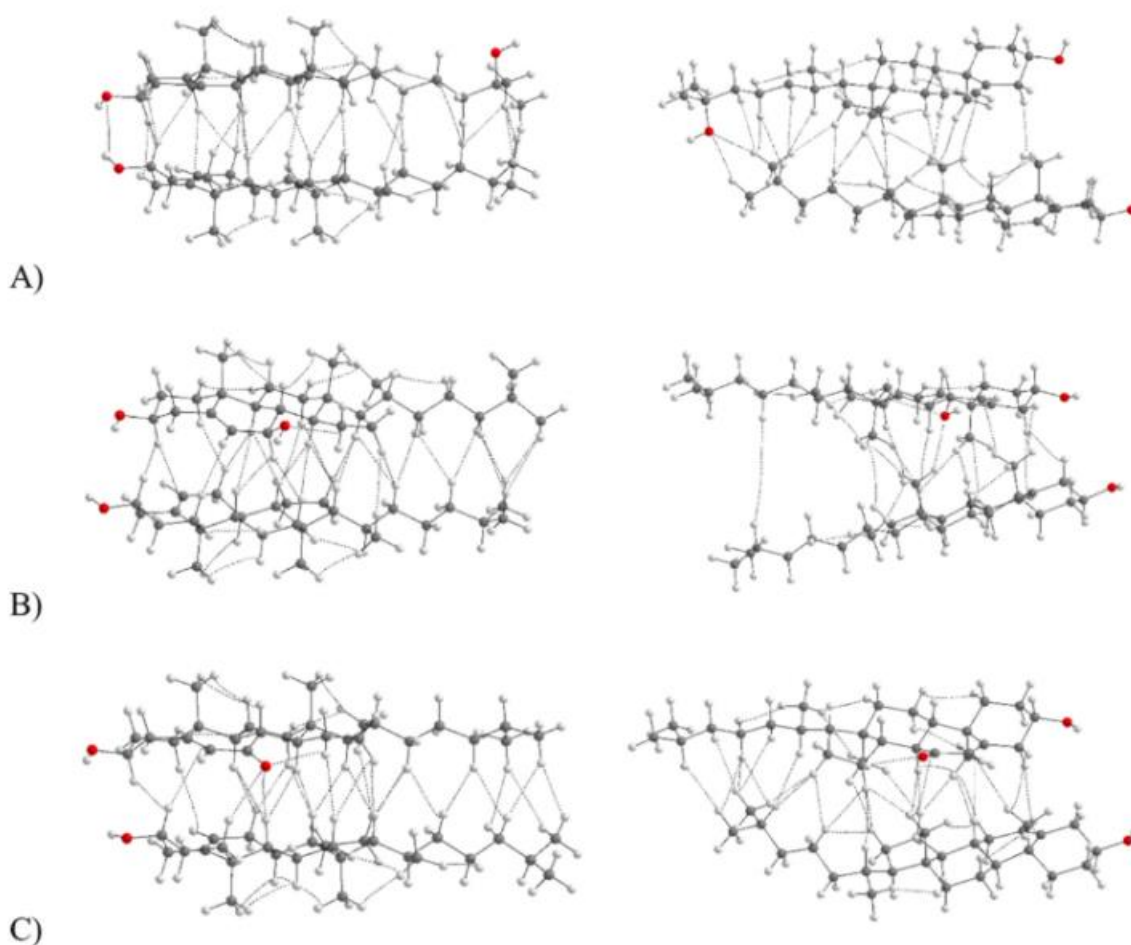
sfigomielinę sąsiadującą z C(25)-OH, energie wiązań były o około jedną trzecią mniejsze. Z kolei dla układu 25-OH/GM₁ najbardziej preferowaną energetycznie orientacją była ta z grupami metylowymi skierowanymi do wewnątrz, niezależnie od orientacji grup hydroksylowych. Na tej podstawie sformułowałem wniosek, że w przypadku układu oksysterolu 25-OH ze sfigomieliną, preferowane jest ułożenie z grupą C(3)-OH skierowaną ku granicy międzyfazowej. W przypadku układu z gangliozydem obydwie orientacje są energetycznie równoważne. Znalazło to potwierdzenie w symulacjach dynamiki molekularnej. Wartości całkowitej energii potencjalnej symulowanych układów charakteryzowały się większą różnicą dla przeciwnych ułożeń 25-OH dla układu ze sfigomieliną i niewielką różnicą dla układu z gangliozydem. Również dla układu ze sfigomieliną więcej cząsteczek zmieniło orientację względem orientacji początkowej, pokazując, że dla układu ze sfigomieliną orientacja z grupą z C(3)-OH znajdującą się w pobliżu grupy polarnej tego sfigolipidu jest bardziej preferowana energetycznie.

Oddziaływanie oksysteroli z cholesterolem

Badanie wpływu oksysteroli na tratwy lipidowe kontynuowaliśmy za pomocą techniki monowarstw Langmuira oraz mikroskopii BAM. Analizowaliśmy oddziaływania między sfigomieliną, cholesterolem a przykładowymi oksysterolami, tj. 25-OH, 7 β -OH oraz 7-K, co opisaliśmy w pracy [H6]. W przypadku 25-OH, 7 β -OH otrzymane układy były stabilne i charakteryzowały się ujemnymi wartościami nadmiarowej entalpii swobodnej ΔG^{exc} . Sytuacja była inna w przypadku mieszaniny 7-K, cholesterolu i sfigomielinę. Tutaj, w zależności od proporcji molowych, wartości ΔG^{exc} były dodatnie lub bliskie zeru, co świadczy o możliwości wystąpienia separacji faz. Największa wartość ΔG^{exc} charakteryzowała mieszaninę, w której 7-K i cholesterol były w stosunku 1:1. Pozwoliło to postawić hipotezę, że za separację faz w tym układzie odpowiada tworzenie stabilnych kompleksów 7-K/CHOL, które oddzielają się od fazy sfigomielinę. W celu zweryfikowania tej hipotezy zbadałem za pomocą metod DFT oddziaływanie oksysteroli 25-OH, 7 β -OH oraz 7-K z cholesterolem. W obliczeniach tych, dla dokładnego scharakteryzowania oddziaływań międzycząsteczkowych w dimerach, posłużyłem się dodatkowo wartościami laplasjanu gęstości elektronowej w punktach krytycznych wiązań (rysunek 6).

Stwierdziłem, że największa energia wiążąca charakteryzowała układ oksysterolu 7-K z cholesterolem z grupami metylowymi skierowanymi na zewnątrz. Analiza funkcji gęstości elektronowej pozwoliła zidentyfikować wiązania odpowiedzialne za tak duże wartości energii oddziaływania. Dwie ścieżki gęstości elektronowej, prowadzące od tlenu przy C(7) do atomów wodoru w cząsteczce cholesterolu, świadczą o dwóch wiązaniach wodorowych. Pozostałe ścieżki gęstości elektronowej odpowiadają stabilizującym tzw. wiązaniom wódór-wódór [52]. Również dla dimeru 7 β -OH/CHOL udało się zidentyfikować wiązanie wodorowe, jednak mniejsza liczba wiązań wódór-wódór sprawia, że całkowita energia oddziaływania jest mniejsza. Dla 25-OH także stwierdziłem tworzenie wiązania wodorowego, zarówno w konfiguracji z grupami metylowymi skierowanymi do wewnątrz, jak i na zewnątrz. Podobnie

jednak jak w przypadku dimeru 7 β -OH/CHOL, mniejsza liczba wiązań stabilizujących odpowiada za mniejszą energię oddziaływania niż w przypadku dimeru 7-K/CHOL.



Rysunek 6. Geometryczne reprezentacje zoptymalizowanych dimerów wraz ze ścieżkami wiązań (linie przerywane) otrzymanymi z analizy QTAIM dla dimerów: (A) 25-OH/CHOL, (B) 7 β -OH/CHOL, (C) 7-K/CHOL. Lewy panel prezentuje dimery w orientacji z grupami metylowymi skierowanymi na zewnątrz, prawy panel z grupami metylowymi skierowanymi do wewnątrz [H6].

Dodatkowo wykonałem symulacje dynamiki molekularnej. Wartości energii potencjalnej, obliczonej jako suma energii oddziaływań elektrostatycznych oraz van der Waalsa, potwierdziły wyniki obliczeń QTAIM. Znacząco największą wiążącą energią charakteryzowała się mieszanina cholesterolu z 7-K (-4570 kcal/mol), podczas gdy energie układów z pozostałymi badanymi oksysterolami były znacznie mniejsze i wynosiły -2484 kcal/mol i -2180 kcal/mol, odpowiednio dla mieszanin 7 β -OH/CHOL i 25-OH/CHOL. Pozwoliło to ostatecznie sformułować wniosek z badania, mówiący, że 7-K, ze względu na swoje wysokie powinowactwo do cholesterolu, jest zdolny do wbudowywania się w strukturę tratw, ale nie jest zdolny do wypychania cząsteczek cholesterolu. Zamiast tego konkuruje ze sfingomieliną w tworzeniu kompleksów z cholesterolem. Dlatego też jego włączenie do tratwy lipidowej może skutkować rozdzieleniem faz.

Własności elektryczne fosfatydylocholin

Ważnym aspektem wpływającym na prawidłowe funkcjonowanie komórki jest orientacja lipidów budujących błonę komórkową. Jedną z wielkości niosących informację o orientacji cząsteczek w monowarstwie jest elektryczny moment dipolowy μ . Względna przenikalność elektryczna monowarstwy ε jest z kolei wielkością związaną z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi w błonie. Te dwie wielkości przekładają się na wartość potencjału elektrycznego ΔV monowarstwy:

$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{A\varepsilon_0\varepsilon}$$

gdzie ε_0 jest przenikalnością elektryczną próżni, μ_{\perp} jest składową normalną (względem powierzchni międzyfazowej) momentu dipolowego cząsteczki na granicy faz, natomiast A jest średnim polem powierzchni międzyfazowej zajmowanym przez cząsteczkę. Istnieje wiele modeli pozwalających wyznaczyć wartość ε . W badaniu [H7] wykorzystaliśmy model Demchaka i Forta [53], w którym monowarstwa utworzona z cząsteczek amfifilowych, znajdująca się na granicy faz woda-próżnia, traktowana jest jako trójwarstwowy kondensator płaski:

$$\Delta V = \frac{1}{A\varepsilon_0} \left(\frac{\mu_{\perp}^w}{\varepsilon_w} + \frac{\mu_{\perp}^p}{\varepsilon_p} + \frac{\mu_{\perp}^a}{\varepsilon_a} \right)$$

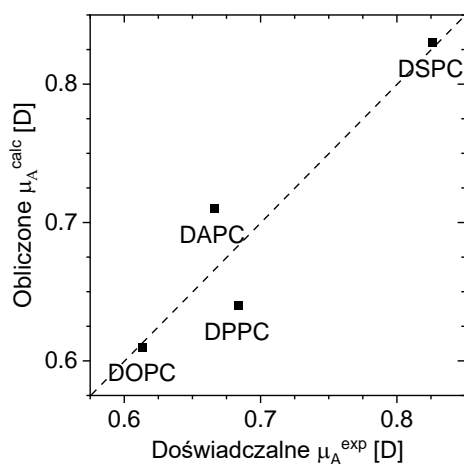
gdzie efektywny moment dipolowy cząsteczki monowarstwy można podzielić na składniki pochodzące od cząsteczek wody w monowarstwie oraz polarnej i niepolarniej części monowarstwy (odpowiednio μ_{\perp}^w , μ_{\perp}^p i μ_{\perp}^a), podzielone przez lokalne względne przenikalności elektryczne. W naszym badaniu wyznaczyliśmy eksperymentalnie potencjały elektryczne monowarstw Langmuira utworzonych z bioaktywnych fosfatydylocholin: DPPC, 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DSPC), 1,2-diarachidooleilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DAPC) oraz DOPC. Pozwoliło to na doświadczalne poznanie wartości normalnej do powierzchni międzyfazowej momentu dipolowego:

$$\mu_A^{exp} = \frac{\mu_{\perp}}{\varepsilon} = \Delta V A \varepsilon_0$$

Korzystając z teorii funkcjonatu gęstości, dla zoptymalizowanych geometrycznie fosfolipidów, obliczyłem wartości składowych momentów dipolowych dla całych cząsteczek oraz dla ich części polarnych i niepolarnych. Wykorzystując tak otrzymane wartości μ_{\perp}^p i μ_{\perp}^a jako zmienne objaśniające, a μ_A^{exp} jako zmienną objaśnianą, zastosowałem regresję wieloraką:

$$\mu_A^{calc} = -1,8 + 0,098 \cdot \mu_{\perp}^p + 1,05 \cdot \mu_{\perp}^a$$

Pozwoliło to wyznaczyć wartości parametrów wraz z odchyleniami standardowymi $\mu_{\perp}^w/\varepsilon_w = (-1,8 \pm 1,4) D$; $\varepsilon_p = 10,2 \pm 7,0$ i $\varepsilon_a = 0,95 \pm 0,52$ dla rozważanej grupy związków. Postępując się



Rysunek 7. Obliczone z przedstawionego modelu oraz wyznaczone doświadczalnie wartości μ_A [H7].

skonstruowanym modelem wyznaczyłem następnie wartości μ_A^{calc} (rysunek 7), które charakteryzowały się dużą zgodnością z wartościami μ_A^{exp} (R^2 równe 86%).

Wyznaczone parametry stanowią ulepszenie wartości stosowanych w starszych podejściach [54]. Pozwalają obliczyć momenty dipolowe dla innych fosfatydylocholin, podobnie uwodnionych, ale o innej długości łańcuchów węglowodorowych lub też wiązań nienasyconych w tych łańcuchach. Nie mogą być jednak

zastosowane dla pozostałych fosfolipidów, np. fosfatydyloetanolamin, ze względu na odmienne uwodnienie części polarnej. Model taki, dla innej grupy związków amfifilowych może być jednak opracowany, przy wykorzystaniu zaprezentowanej powyżej metodyki.

zastosowane dla pozostałych fosfolipidów, np. fosfatydyloetanolamin, ze względu na odmienne

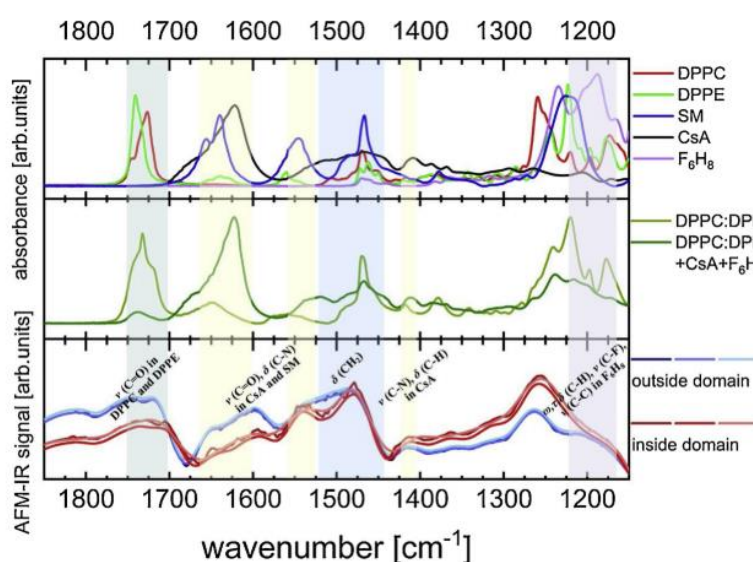
4.6.3. Semifluorowane alkanoy

Oddziaływanie semifluorowanych alkanoy ze składnikami modelowego filmu łzowego

Kolejnym wątkiem tematycznym omawianego osiągnięcia było badanie semifluorowanych alkanoy, jako substancji pomocniczych w leczeniu zespołu suchego oka. Schorzenie to wynika z zaburzeń homeostazy filmu łzowego. Film łzowy składa się z trzech warstw: śluzowej, wodnej i lipidowej. Najbardziej zewnętrzna, lipidowa warstwa zbudowana jest z kolei z amfifilowej podwarstwy pokrytej zewnętrznym niepolarnym filmem. Zespół suchego oka może być następstwem zbyt małej produkcji frakcji wodnej cieczy łzowej lub nadmiernego jej parowania. Schorzenie to stwierdza się u 4,4% do nawet 50% osób, w zależności od badanej populacji [55]. Niedobór frakcji wodnej, a tym samym występowanie zespołu suchego oka, bywa związany z chorobami autoimmunologicznymi i stanem zapalnym. W terapii stosuje się wtedy miejscowo cyklosporynę A (CsA), cykliczny polipeptyd, będący inhibitorem uwalniania interleukiny-2 podczas aktywacji komórek T. Poprzez hamowanie stanu zapalnego, CsA zwiększa produkcję łez i gęstość komórek kubkowych [56,57]. Skuteczność CsA została potwierdzona w badaniach klinicznych [19]. Obecnie istnieje kilka dostępnych na rynku preparatów do oczu zawierających CsA. Efektywne dostarczenie tej substancji do wewnętrznych warstw filmu łzowego jest jednak trudne, co związane jest z dużym rozmiarem i hydrofobowością tej cząsteczki. W tym celu wykorzystuje się nośniki, ułatwiające transport przez składającą się z niepolarnych lipidów zewnętrzną warstwę filmu łzowego. Nośnik taki powinien być chemicznie obojętny dla filmu łzowego i oka oraz charakteryzować się hydrofobowością. Nośniki CsA, zwykle stosowane w preparatach do oczu, są oparte na niepolarnych lipidach, takich jak olej rycynowy, kukurydziany, oliwa z oliwek lub triacyloglicerole o średniej długości łańcuchów. Inną stosowaną strategią jest poprawa

rozpuszczalności CsA w etanolu za pomocą niejonowych środków powierzchniowo czynnych, m.in. polioksylu-40 lub polisorbatu 80 [58]. Obiecującym środkiem dostarczającym CsA są semifluorowane alkany. Związki te cechuje niepolarność i amfifilowość, co umożliwia dystrybucję zarówno w niepolarnej, jak i amfifilowej warstwie filmu tłuszczowego. Wstępne badania wykazały, że takie połączenie właściwości zapewnia rozpuszczanie CsA i przenoszenie jej przez niepolarną warstwę filmu tłuszczowego do warstwy amfifilowej. Obiecujące okazały się wyniki badań modelowych na zwierzętach z użyciem perfluoroheksyloktanu ($F(CF_2)_6(CH_2)_8H$, w skrócie F_6H_8) [59,60]. Semifluorowane alkany są obojętne dla powierzchni oka i same w sobie mają działanie terapeutyczne [61,62]. W pracy [H8] opisaliśmy działanie CsA i semifluorowanych alkanów na poziomie molekularnym. Aby uzyskać kompleksowy obraz organizacji cząsteczek w warstwie, aktywności powierzchniowej oraz termodynamiki filmu tłuszczowego w obecności CsA i F_6H_8 , przeprowadzono badania wykorzystujące technikę monowarstw Langmuira, mikroskopię BAM oraz AFM, a także nanospektroskopię w podczerwieni (AFM-IR). W badaniu wykorzystaliśmy model filmu składający się z DPPC, DPPE oraz SM. Mikroskopia BAM monowarstw Langmuira, jak i AFM monowarstw naniesionych na podłoże stałe wykazały, że mieszanina filmu tłuszczowego DPPC/DPPE/SM oraz F_6H_8 tworzy struktury o jednorodnej teksturze, niezależnie od stężenia F_6H_8 . Dodanie CsA powoduje z kolei powstawanie domen o mikrometrowych rozmiarach. Ważną obserwacją był spadek wartości nadmiarowej entalpii swobodnej ΔG^{exc} mieszaniny DPPC/DPPE/SM, CsA i F_6H_8 , wraz ze zwiększaniem stężenia F_6H_8 , co świadczy o silniejszym oddziaływaniu przyciągającym i stabilizacji układu. W celu zbadania składu domen i ich otoczenia wykorzystano nanospektroskopię w podczerwieni AFM-IR domen oraz obszarów je otaczających oraz spektroskopię ATR-FTIR z próbek objętościowych (rysunek 8). Aby umożliwić interpretację zarejestrowanych widm

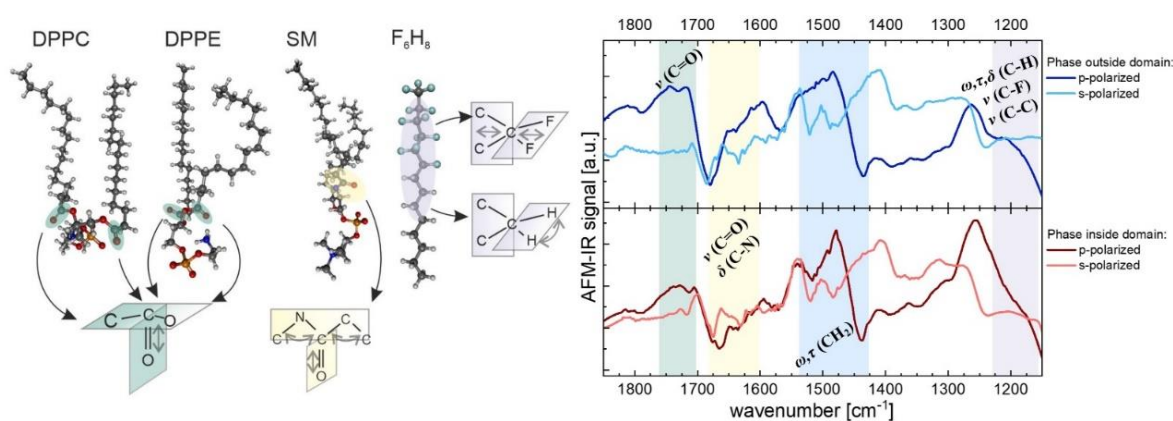
wykonałem optymalizację geometryczną cząsteczek DPPC, DPPE, SM, CsA oraz F_6H_8 , a następnie symulację widm w podczerwieni tych związków. Dla F_6H_8 stwierdzono absorpcję jedynie w zakresie pasm $\tilde{\nu}=1188\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1234\text{ cm}^{-1}$, które odpowiadają drganiom rozciągającym wiązań C-F i C-C i zginającym (wachlarzowym C-H, kotyszającym C-H i skręcającym C-H). Pasma te



Rysunek 8. Widma ATR-FTIR z próbek objętościowych związków DPPC, DPPE, SM, CsA i F_6H_8 (widmo górne), mieszaniny DPPC/DPPE/SM oraz CsA i F_6H_8 (widmo środkowe) oraz widma AFM-IR w polaryzacji p w warstwy DPPC/DPPE/SM i CsA i F_6H_8 (widmo dolne) [H8].

obecne były zarówno w obszarze domen, jak i poza nimi, co potwierdza równomierne rozmieszczenie cząsteczek F_6H_8 . W widmie CsA widoczne było charakterystyczne pasmo od drgań deformacyjnych CH_3 (przy $\tilde{\nu}=1410\text{ cm}^{-1}$), II pasmo amidowe (przy $\tilde{\nu}=1540\text{ cm}^{-1}$) i I pasmo amidowe ($\tilde{\nu}$ w zakresie $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) [63]. Pasma zarejestrowane w AFM-IR przy $\tilde{\nu}=1410\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1540\text{ cm}^{-1}$ miały większą intensywność dla widm zarejestrowanych z obszarów domen. Pasma dla wartości $\tilde{\nu}$ z przedziału $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ poza domeną pochodzi najprawdopodobniej od I pasma amidowego SM (co świadczy o jej większym stężeniu poza obszarami domen). Można zatem wnioskować, że CsA gromadzi się w domenach.

W widmach AFM-IR zaobserwowano różnice pasm zarejestrowanych dla polaryzacji *s* i *p* (rysunek 9). Intensywność pasma z łańcuchów węglowodorowych (przy $\tilde{\nu}=1480\text{ cm}^{-1}$) słabła dla polaryzacji *s*. Ta obserwacja sugerowała, że łańcuchy węglowodorowe (zarówno fosfolipidowe, jak i F_6H_8) są zorientowane głównie prostopadłe do powierzchni, na której wyniesiona była warstwa lipidowa. Kolejną przesłanką przemawiającą za taką orientacją fosfolipidów DPPC i DPPE było częściowe zmniejszenie intensywności absorpcji dla polaryzacji *s* przy $\tilde{\nu}=1702\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1744\text{ cm}^{-1}$ odpowiadającej drganiom rozciągającym wiązania C=O. Wyniki moich obliczeń pokazały, że drgania grup estrowych DPPC są prostopadłe do powierzchni warstwy, podczas gdy w przypadku DPPE są one zorientowane pod kątem 45° . Dodatkowo, dla widm zebranych dla polaryzacji *s* zaobserwowano wyraźne pasma w obszarze poniżej $\tilde{\nu}=1200\text{ cm}^{-1}$. Obliczenia teoretyczne potwierdziły, że pochodzą one od drgań rozciągających wiązań C-F i C-C oraz zginających C-H w cząsteczce F_6H_8 . Co ważne, pasma te były widoczne dla widm zebranych zarówno z domen, jak i z ich otoczenia, co świadczy o równomiernym rozmieszczeniu semifluorowanych alkanów na całej powierzchni próbki.



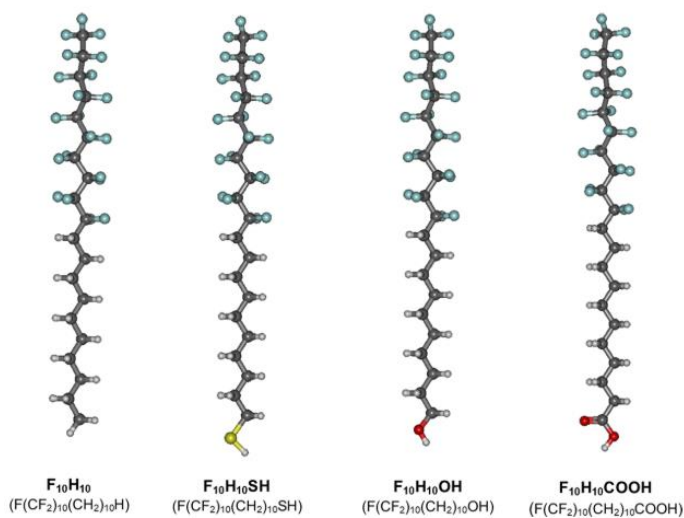
Rysunek 9. Widma AFM-IR zarejestrowane dla polaryzacji *p* i *s*, z wybranych obszarów próbki AFM, stanowiącej model filmu lipidowego (DPPC/DPPE/SM) z dodanym CsA i F_6H_8 : wewnątrz (panel dolny) i na zewnątrz (panel górny) domeny wraz z modelami molekularnymi [H8].

Dla obszaru widmowego przypisanego do I pasma amidowego w SM w widmach zebranych z domen zaobserwowaliśmy niewielką absorpcję przy $\tilde{\nu}=1665\text{ cm}^{-1}$ dla widm otrzymanych dla polaryzacji *s*. Poza domenami absorpcja dla $\tilde{\nu}$ w zakresie $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (odpowiadająca II pasmu amidowemu) była większa dla polaryzacji *p*. Wzrost intensywności absorpcji obserwowany dla światła spolaryzowanego *p* sugeruje, że cząsteczki SM w badanym układzie są nachylone do powierzchni.

Badanie wykazało, że F_6H_8 nie wpływa na właściwości międzyfazowe, stan fizyczny i teksturę modelu filmu tłuszczowego, złożonego z DPPC/DPPE/SM. Dodatkowo pokazaliśmy, że technika AFM-IR dostarcza dokładnych informacji o rozmieszczeniu i orientacji molekularnej w badanych próbkach, a obliczenia teoretyczne widm IR oraz przestrzennej orientacji drgań cząsteczkowych umożliwiają interpretację AFM-IR i wnioskowanie na temat orientacji geometrycznej cząsteczek budujących monowarstwę.

Własności elektryczne semifluorowanych alkanów

Kontynuację badań semifluorowanych związków opisaliśmy w publikacji [H9]. Wykorzystałem metodologię opisaną w pracy [H7] do stworzenia modelu pozwalającego obliczyć momenty dipolowe dla cząsteczek należących do tej grupy. Tym razem wybraliśmy perfluorodecylodekane ($\text{F}(\text{CF}_2)_{10}(\text{CH}_2)_{10}\text{H}$, w skrócie $\text{F}_{10}\text{H}_{10}$) i jego pochodne zawierające różne grupy polarne, tj. grupę tiolową ($\text{F}_{10}\text{H}_{10}\text{SH}$), hydroksylową ($\text{F}_{10}\text{H}_{10}\text{OH}$) i karboksylową ($\text{F}_{10}\text{H}_{10}\text{COOH}$). Zoptymalizowane geometrycznie struktury tych związków przedstawione są na rysunku 10.



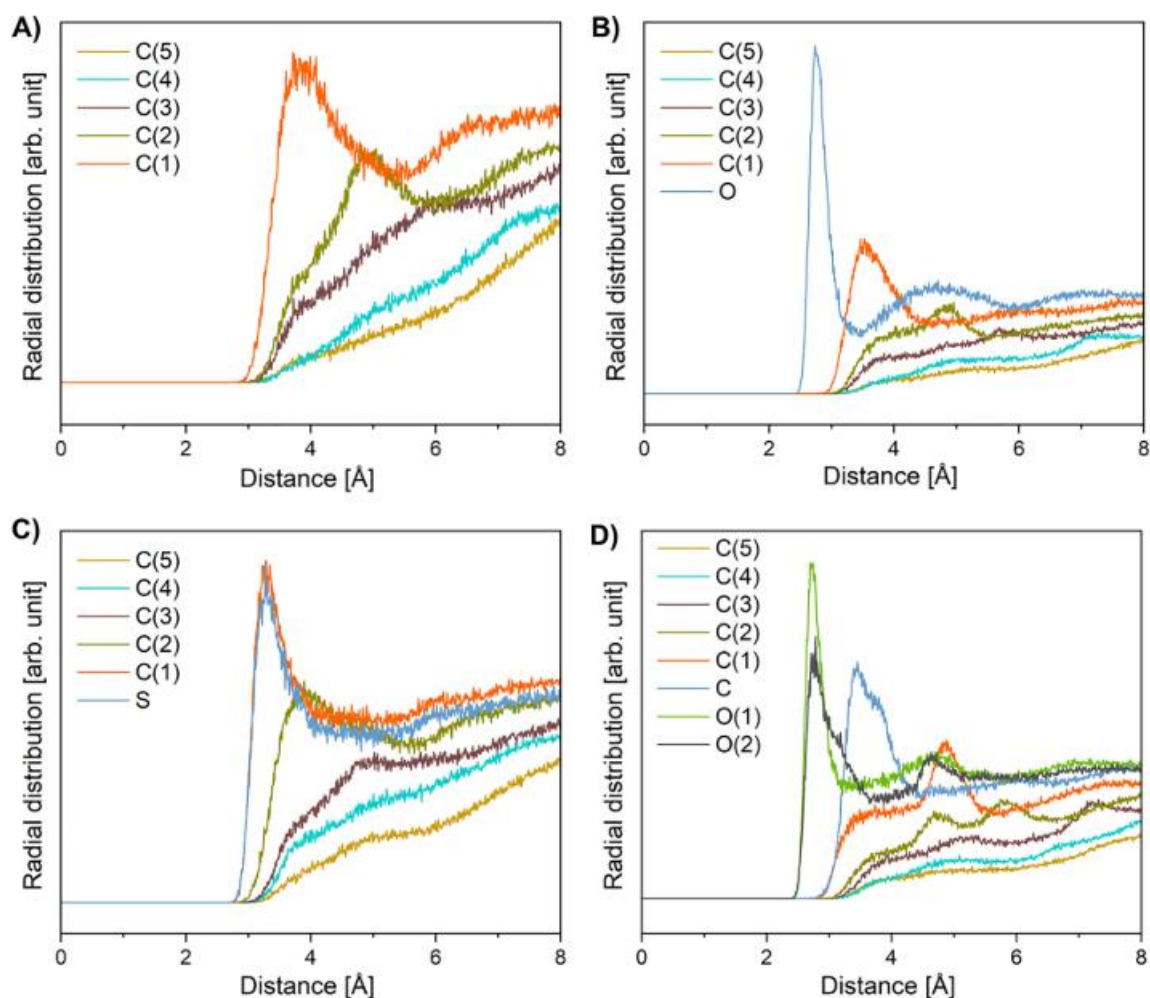
Rysunek 10. Zoptymalizowane geometrycznie struktury perfluorodecylodekane i jego pochodnych [H9].

W części eksperymentalnej wykonano badanie monowarstw Langmuira tworzonych przez te związki, z których uzyskano krzywe zależności ciśnienia powierzchniowego i potencjału elektrycznego od powierzchni przypadającej na cząsteczkę w filmie. Umożliwiło to wyznaczenie eksperymentalnych wartości momentu dipolowego μ_A^{exp} dla stanu odpowiadającego największemu upakowaniu cząsteczek. Podobnie jak w

badaniu [H7], celem symulacji komputerowych było wyznaczenie składowych prostopadłych do powierzchni międzyfazowej elektrycznych momentów dipolowych części polarnych i niepolarnych cząsteczek, odpowiednio μ_{\perp}^p oraz μ_{\perp}^a . Wcześniej należało jednak ustalić, jaką orientację względem powierzchni międzyfazowej przyjmują te cząsteczki w formowanej monowarstwie. Wiadomo bowiem,

że dla tego typu związków orientacja może być inna niż prostopadła do powierzchni. Na przykład, w pracy [64] kąt pomiędzy osią podłużną cząsteczki semifluorowanego alkanu a normalną względem powierzchni międzyfazowej wyznaczono na $35,25^\circ$.

W pierwszej kolejności dokonałem symulacji dynamiki molekularnej warstw utworzonych przez badane związki. Stwierdziłem, że po osiągnięciu przez każdy z układów stanu równowagi termodynamicznej, cząsteczki $F_{10}H_{10}$ są nachylone względem normalnej do powierzchni międzyfazowej pod kątem 47° , $F_{10}H_{10}SH$ pod kątem 53° , $F_{10}H_{10}OH$ pod kątem 44° , a $F_{10}H_{10}COOH$ pod kątem 38° . Następnie określiłem uwodnienie cząsteczek w wysymulowanych układach. Posłużyłem się funkcją rozkładu radialnego, wyznaczoną dla par składających się z atomu tlenu w cząsteczkach wody oraz ciężkich atomach w grupach funkcyjnych oraz pięciu kolejnych atomów węgla znajdujących się po stronie grupy funkcyjnej (rysunek 11).



Rysunek 11. Funkcje rozkładu radialnego mówiące o średniej odległości atomów tlenu z cząsteczek wody od wybranych atomów perfluorodecylodekana i jego pochodnych (pięć atomów węgla najbliższych fazie wodnej i ciężkie atomy z grup polarnych): $F_{10}H_{10}$ (A), $F_{10}H_{10}OH$ (B), $F_{10}H_{10}SH$ (C) i $F_{10}H_{10}COOH$ (D) [H9].

Przyjąłem, że atomy tlenu zlokalizowane w odległości pomiędzy 3 Å a 4 Å znajdują się w cząsteczkach wody tworzącej pierwszą warstwę uwadniającą, natomiast atomy tlenu z wody zlokalizowane w odległości większej niż 4 Å znajdują się w kolejnych warstwach uwadniających, bądź nie wchodzą w skład żadnej warstwy uwadniającej [65]. Zidentyfikowanie uwodnionych części badanych cząsteczek pozwoliło zdefiniować ich części polarne: skrajna grupa -CH₃ dla F₁₀H₁₀, -CH₂SH dla F₁₀H₁₀SH, -CH₂OH dla F₁₀H₁₀OH oraz -COOH dla F₁₀H₁₀COOH.

Wiedząc z symulacji dynamiki molekularnej pod jakim średnim kątem cząsteczki są nachylone do powierzchni międzyfazowej oraz jaka ich część jest uwodniona oraz znając z obliczeń DFT funkcję gęstości elektronowej tych cząsteczek, mogłem w precyzyjny sposób wyznaczyć składowe normalne względem powierzchni wody momentów dipolowych części polarnej i niepolarniej: μ_{\perp}^p i μ_{\perp}^a . Następnie, analogicznie jak w badaniu [H7], biorąc wartości μ_A^{exp} wyznaczone z pomiarów potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni monowarstw Langmuira, wyznaczyłem równanie opisujące regresję wieloraką:

$$\mu_A^{calc} = -0,85 + 0,20 \cdot \mu_{\perp}^p + 0,55 \cdot \mu_{\perp}^a$$

Dzięki temu możliwe było wyliczenie wartości $\mu_{\perp}^w/\epsilon_w = -0,85 D$; $\epsilon_p = 5,00$ i $\epsilon_a = 1,80$. Wartości literaturowe ϵ_p i ϵ_a zawierają się w przedziale odpowiednio od 6 do 7 i od 2 do 3 [66], jednak duża zgodność pomiędzy wartością obliczoną a zmierzoną świadczy o przydatności tego modelu.

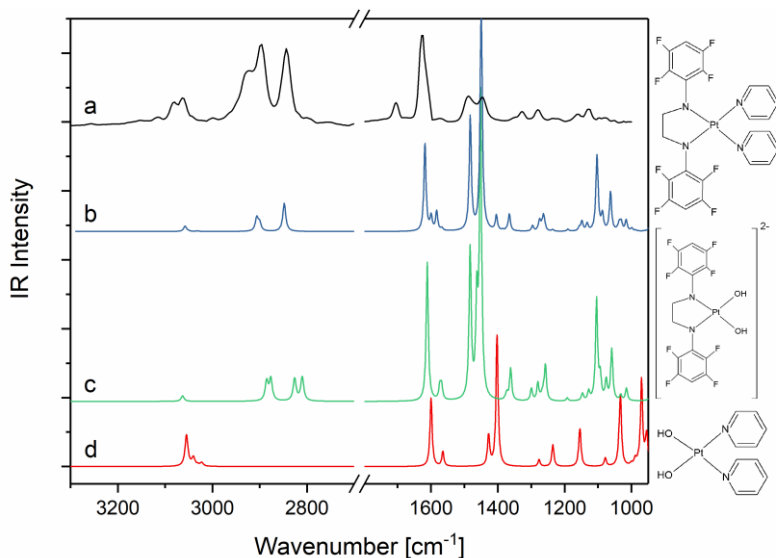
W artykule [H9] pokazaliśmy zatem, że opracowana przeze mnie metodologia obliczania parametrów opisujących elektryczne własności związków z modelu uzyskanego w oparciu o powiązanie wartości eksperymentalnych i obliczonych przy użyciu dynamiki molekularnej i DFT, jest podejściem uniwersalnym o niezaprzeczalnych zaletach w porównaniu do innych podejść opisywanych w literaturze. Przede wszystkim, może być zastosowana dla wszystkich związków amfifilowych, również tych, które nie zawierają typowej grupy polarnej. Wykorzystanie dynamiki molekularnej pozwoliło zidentyfikować skrajną grupę metylową jako część polarną perfluorodecylodekana. Dla pochodnych perfluorodecylodekana z dołączoną grupą hydroksylową i tiolową mogłem stwierdzić, że polarne są nie tylko grupy funkcyjne, ale również bezpośrednio znajdujące się przy nich grupy metylenowe. Ponadto, wykorzystanie symulacji dynamiki molekularnej nie wymaga założenia, że cząsteczki w monowarstwie zorientowane są prostopadle do powierzchni międzyfazowej. Umożliwia za to uwzględnienie orientacji wynikającej z oddziaływań międzycząsteczkowych, odpowiadającej orientacji cząsteczek w układzie fizycznym. Zalety te, biorąc pod uwagę informacje dające się uzyskać z opracowanego modelu, mogą umożliwić jego wykorzystanie przy projektowaniu związków o pożądanym własnościach elektrycznych.

4.6.4. Pt-103

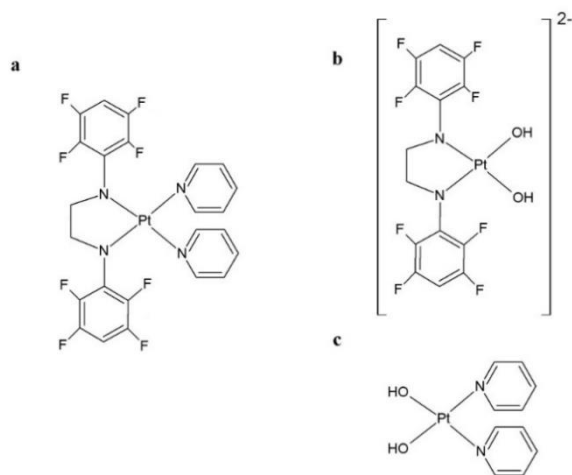
Kolejną cząsteczką biologiczną, na której koncentrowały się moje naukowe zainteresowania, jest DNA. DNA gromadzony jest w jądrze komórkowym w dwóch postaciach: chromatyny skondensowanej – heterochromatyny i luźnej – euchromatyny. Obecnie brakuje wiarygodnej metody eksperymentalnej, która umożliwiłaby poznanie różnic w budowie chemicznej między tymi dwoma rodzajami chromatyny. W pracy [H10] wykorzystaliśmy nanospektroskopię w podczerwieni (AFM-IR) do zbadania tych różnic oraz do uzyskania widma z pojedynczego

chromosomu. W części doświadczalnej badania udało się rozróżnić euchromatynę i heterochromatynę na podstawie metylacji z nanometryczną rozdzielczością. Ponadto udało się zlokalizować miejsca wiązania Pt-103 – przeciwnowotworowego leku opartego na platynie, którego wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 12.

Pt-103 jest związkiem wykazującym aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych opornych na cisplatynę, co pokazano wykorzystując model zwierzęcy [67]. Wysoka cytotoksyczność i



Rysunek 13. Eksperymentalne widma AFM-IR Pt103 (a), widma teoretyczne: Pt103 (b), Pt103 z pierścieniami pirydynowymi zastąpionymi grupami hydroksylowymi (c), Pt-103 z N,N'-bis(tetrafluorofenylo)etyleno-1,2-diaminą zastąpioną grupami hydroksylowymi (d) [H10].



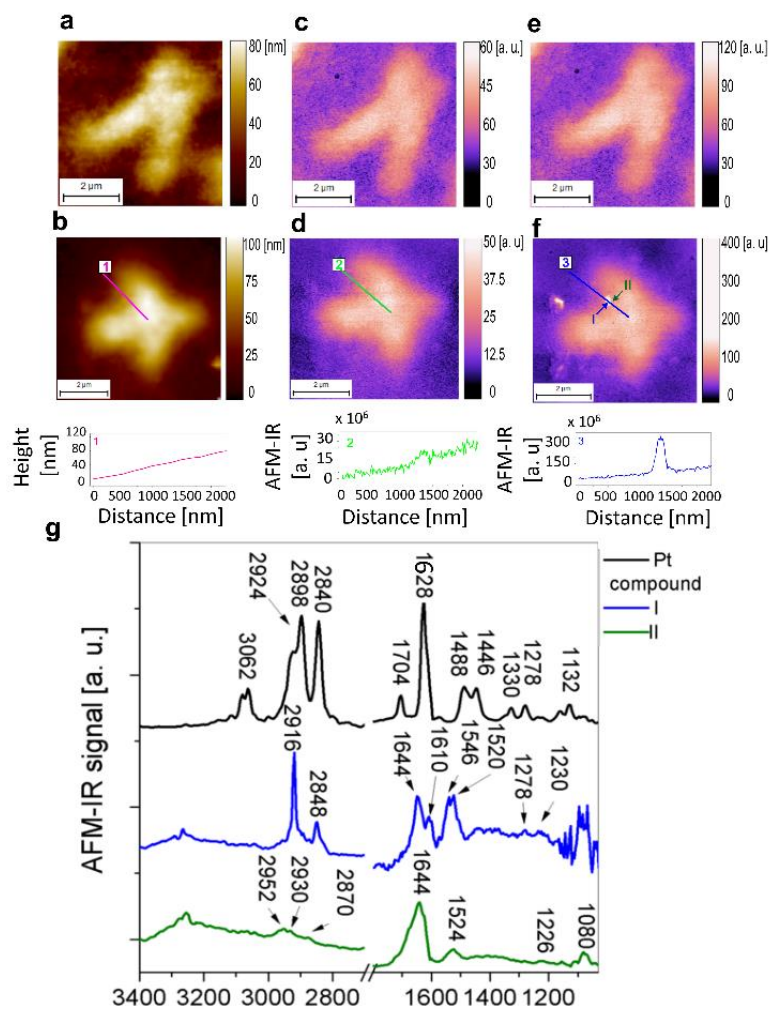
Rysunek 12. Wzór strukturalny Pt-103 (a) i jej postaci zdysocjowanych: pierścienie pirydynowe zastąpione grupami hydroksylowymi (b) oraz N,N'-bis(tetrafluorofenylo)etyleno-1,2-diamina zastąpiona grupami hydroksylowymi (c) [H10].

zwiększony wychwył w komórkach opornych na cisplatynę są związane z większą hydrofobowością Pt-103 w porównaniu z cisplatyną. Dyskusyjny pozostaje sposób wiązania Pt-103 do DNA: czy przed oddziaływaniem z DNA traci pierścienie pirydynowe czy układ N,N'-bis(tetrafluorofenylo)etyleno-1,2-diaminy (rysunek 12).

Aby przypisać mody wibracyjne w widmie Pt-103 i widmie zebranym z chromosomu traktowanego lekiem, obliczyłem teoretyczne widma IR cząsteczki Pt-103 (rysunek 13). W chromosomach izolowanych z komórek traktowanych lekiem występowały małe obszary z silnymi pasmami absorpcji przy $\tilde{\nu}=2916\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=2844\text{ cm}^{-1}$ (odpowiadającym odpowiednio asymetrycznym i symetrycznym drganiom rozciągającym CH_2), niewidocznymi w chromosomach nietraktowanych lekiem. Silne pasmo związane z tymi drganiami w widmie czystego leku zaobserwowano odpowiednio przy $\tilde{\nu}=2898\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=2840\text{ cm}^{-1}$. Obecność tych pasm była potwierdzeniem zlokalizowania obszaru w chromosomach, w którym gromadził się lek Pt-103.

Ponadto czyste Pt-103 posiada charakterystyczne pasmo przy $\tilde{\nu}=1628\text{ cm}^{-1}$, odpowiadające drganiom oddychającym pierścieni tetrafluorofenylowych (symetrycznych drgań całych pierścieni). Pasma to zostało również w niewielkiej intensywności zaobserwowane w obszarach ze zgromadzonym lekiem w chromosomach dla $\tilde{\nu}=1610\text{ cm}^{-1}$. Na rysunku 14 przedstawiono topografie AFM próbek oraz jedno z widm AFM-IR z obszaru o zwiększonej absorpcji przy $\tilde{\nu}=2916\text{ cm}^{-1}$ (widmo niebieskie) i porównano z widmem zebranym bardzo blisko obszaru wiązania leku (widmo zielone) w tym samym typie chromatyny.

Dane eksperymentalne poparte moimi obliczeniami teoretycznymi potwierdziły obecność pierścienia tetrafluorofenyłowego i reszty ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) w obrębie chromosomu



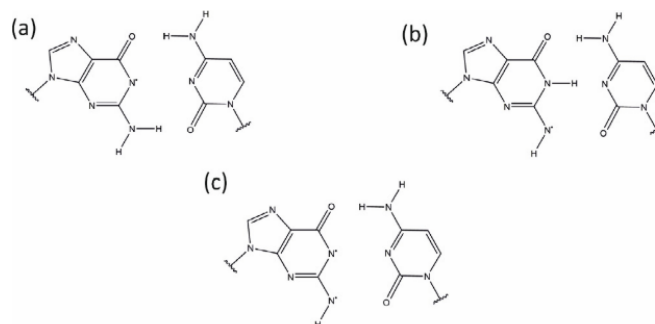
Rysunek 14. Topografia AFM jednego chromosomu izolowanego z komórek kontrolnych (a). Topografia AFM chromosomu izolowanego z komórek poddanych działaniu Pt-103 (b). Rozkład absorpcji dla pasma $\tilde{\nu}=1240\text{ cm}^{-1}$ w chromosomie kontrolnym (c). Rozkład absorpcji dla pasma 1240 cm^{-1} w chromosomie izolowanym z komórek poddanych działaniu Pt-103 (d). Rozkład absorpcji dla pasma $\tilde{\nu}=2916\text{ cm}^{-1}$ w chromosomie kontrolnym (e). Rozkład absorpcji dla pasma 2916 cm^{-1} w chromosomie izolowanym z komórek poddanych działaniu Pt-103 (f). Widma AFM-IR zebrane z czystego związku Pt i miejsc oznaczonych jako I i II (g) [H10].

jako markera związku Pt-103. Wskazały ponadto na poprzedzającą wiązanie dysocjację pierścieni pirydynowych, co wyjaśnia sposób wiązania leku do DNA. Stwierdziliśmy również, że Pt-103 preferencyjnie wiąże się z heterochromatyną, tworząc zlokalizowane dyskretne ogniska w postaci agregatów DNA oddziałującego z lekiem. Wyniki te wykazały potencjał AFM-IR w wykrywaniu miejsc wiązania leku w chromosomach. Biorąc pod uwagę znaczenie metylacji DNA w rozwoju prawie wszystkich typów nowotworów, podejście spektroskopowe AFM-IR może być wykorzystane do wykrywania miejsc ekspresji/supresji genów w całym genomie i stać się narzędziem wczesnego badania przesiewowego w kierunku złośliwości.

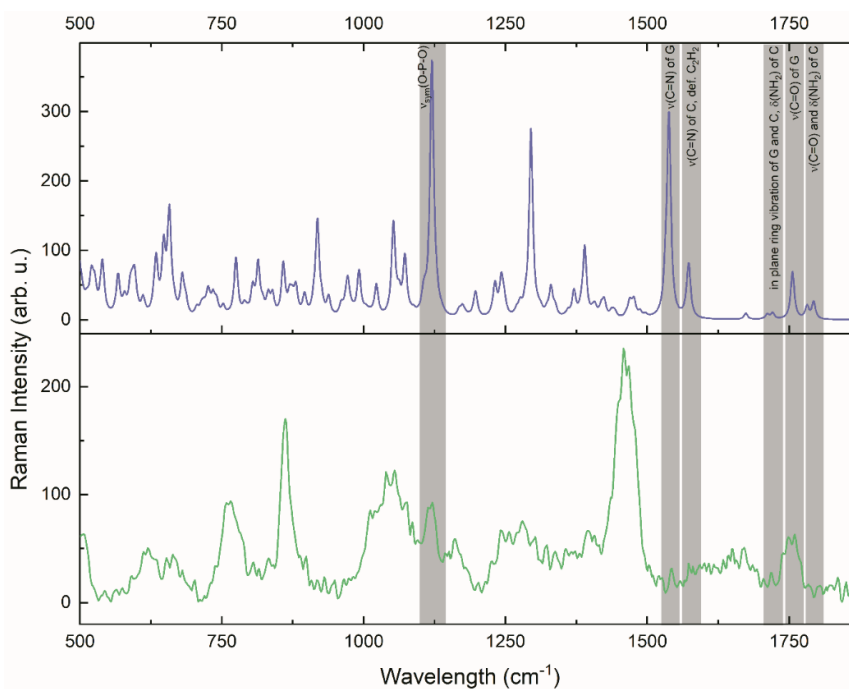
4.6.5. Uszkodzenia radiacyjne DNA

Radioterapia protonowa jest jedną z najnowszych i najbardziej obiecujących metod stosowanych we współczesnej onkologii. Opiera się ona na stosowaniu wiązki protonów w leczeniu guzów znajdujących się głęboko w ludzkim organizmie. Biorąc pod uwagę dużą skuteczność i (w porównaniu do innych rodzajów radioterapii) jej niewielkie działania niepożądane, terapia ta nie jest szeroko rozpowszechniona. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy jest brak szczegółowej wiedzy na temat oddziaływania protonów z cząsteczkami biologicznymi. Promieniowanie jonizujące, a zwłaszcza jony, takie jak protony, mogą bezpośrednio uszkadzać DNA, ale także powodują powstawanie rodników, co może prowadzić do jeszcze poważniejszych uszkodzeń szkieletu cukrowego DNA niż bezpośrednie oddziaływanie z cząstką jonizującą. W pracy [H11] opisaliśmy wpływ rodników guaninowych na strukturę DNA, to jest na konformację i stabilność nici DNA. Jako metodą doświadczalną posłużyliśmy się spektroskopią Ramana, nieinwazyjną techniką analityczną. Widma doświadczalne zebrano dla DNA nieuszkodzonego oraz napromienionego wiązką protonów o energii kinetycznej 2 MeV. Interpretacja zmian widmowych związanych z ekspozycją DNA na promieniowanie jonizujące jest niezwykle trudna, ze względu na duże rozmiary tej cząsteczki i nakładanie się pasm spektralnych pochodzących od wielu grup funkcyjnych. By poradzić sobie z tym problemem, wykonałem obliczenia DFT, optymalizując geometrycznie oligomer DNA AGAGCTCT w konformacji B, a następnie symulując widma ramanowskie. W eksperymentalnych widmach Ramana po ekspozycji na protony zaobserwowaliśmy pojawienie się silnych pasm związanych z rozciąganiem wiązań C=O i NH₂ z cytozyny i guaniny, dlatego skupiłem się na parze guanina-cytozyna oraz zmianach molekularnych, które mogą być konsekwencją oddziaływania z rodnikiem guaninowym. Jest to podejście uzasadnione, ponieważ guanina spośród wszystkich zasad DNA ma najniższy potencjał jonizacyjny, co oznacza, że jest głównym centrum utleniania DNA [68,69]. Z tego powodu napromienianie DNA prowadzi do powstania dużej ilości utlenionej guaniny (G•). Ponadto rodniki guaninowe mogą powstawać w wyniku naturalnych procesów metabolicznych w komórce [70] lub też w wyniku przewlekłego stanu zapalnego, co prowadzić może do nowotworzenia [71].

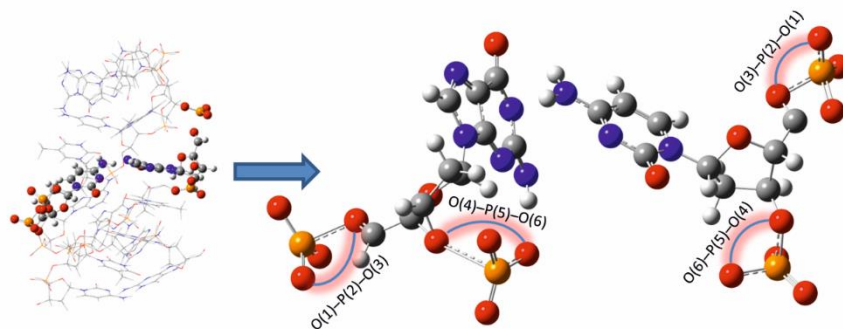
W symulacji użyłem metody hybrydowej ONIOM [72], jedną parę zasad guanina-cytozyna (GC) traktując kwantowo metodą B3LYP z bazą 6-311++G(d,p). Reszta oligomeru obliczona była z użyciem klasycznego pola siłowego UFF (ang. *Universal Force Field*) [73]. Widma obliczyłem dla DNA bez uszkodzeń oraz DNA uszkodzonego, dla którego przyjąłem trzy modele: DNA z rodnikiem •G_{N1}, •G_{N2} lub •G_{N1,N2} w parze GC (rysunek 15).



Rysunek 15. Wzory strukturalne par rodnik guaninowy – cytozyna: •G_{N1}C (a), •G_{N2}C (b) i •G_{N1,N2}C (c) [H11].



Rysunek 16. Przykładowe porównanie doświadczalnego widma ramanowskiego DNA napromieniowanego 2 MeV wiązką protonów (panel dolny) z wyliczonym widmem Ramana uszkodzonego DNA z parą •G_{N1,N2}C (panel górny) [H11].



Rysunek 17. Schematyczny model teoretycznego układu uszkodzonego DNA (po lewej) z parą $\bullet G_{N1,N2}C$ (po prawej) potraktowaną kwantowo [H11].

W widmach eksperymentalnych uzyskanych z DNA poddanemu napromienieniu zaobserwowaliśmy przesunięcie pasma od drgań rozciągających symetrycznych O–P–O z $\tilde{\nu}=1069\text{ cm}^{-1}$ na $\tilde{\nu}=1017\text{ cm}^{-1}$ (Rysunek 16 16), co świadczy o zmianie energii wiązań O–P–O i wskazuje, że pewna ilość DNA zmienia swoją konformację w wyniku napromieniania. Efekt ten zaobserwowałem w widmach teoretycznych dla DNA z parami $\bullet G_{N2}C$ i $\bullet G_{N2,N2}C$. Według źródeł literaturowych, zmiany intensywności pasm od drgań rozciągających O–P–O o częstotliwościach $\tilde{\nu}=1240\text{ cm}^{-1}$, $\tilde{\nu}=1190\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1080\text{ cm}^{-1}$ są związane z przerwaniem nici DNA, podczas gdy modyfikacje pasm od drgań rozciągających C–O przy $\tilde{\nu}=1060\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=880\text{ cm}^{-1}$ wskazują na zmianę struktury reszty cukrowej [74]. Ponadto dla obliczeń modeli uszkodzonego DNA z parami $\bullet G_{N2}C$ i $\bullet G_{N1,N2}C$ zaobserwowałem wzrost odległości między fosforem a tlenem do wartości powyżej 2 Å dla jednego wiązania w przypadku $\bullet G_{N2}C$ i dwóch wiązań w przypadku $\bullet G_{N1,N2}C$. Długość wiązania P–O w estrach fosforanowych powinna mieścić się w przedziale 1,59-1,63 Å. Tak ekstremalny wzrost odległości jest związany z rozszczepieniem fosfodiestrów i pęknięciem szkieletu DNA [75]. Również kąt wiązania O–P–O we wszystkich zoptymalizowanych uszkodzonych strukturach był mniejszy niż w kontrolnym DNA (rysunek 17). Zerwanie wiązania wodorowego między zasadami w parze GC powodowało widoczną w zoptymalizowanych geometrycznych układach rotację tych zasad względem siebie dla wszystkich zoptymalizowanych struktur uszkodzonego DNA. To z kolei uniemożliwia wystąpienie oddziaływania warstwowego, jednego ze zjawisk odpowiedzialnych za utrzymanie stabilnej struktury DNA. Brak stabilności DNA może wyjaśniać zerwanie wiązań P–O w szkielecie DNA i zmianę kąta O–P–O. Przesunięcie tzw. pasma ułożenia zasad, odpowiadającego drganiu rozciągającemu C=O, można również wytłumaczyć przemieszczeniem zasad wywołanym ekspozycją na protony [74], co zaobserwowaliśmy zarówno w widmach eksperymentalnych, jak i obliczonych dla wszystkich trzech modeli uszkodzeń DNA.

W omawianej pracy wykazaliśmy, że obecność rodnika guaninowego w podwójnej nici DNA, a co za tym idzie zerwanie wiązania między zasadami azotowymi, które może być indukowane endogennie lub

egzogennie, np. przez promieniowanie protonowe, ma istotny wpływ na strukturę DNA. Konsekwencją może być zmiana konformacji DNA, a także pojedyncze lub podwójne przerwanie nici DNA. Dzięki wysokiej czułości spektroskopii Ramana wykryliśmy uszkodzenia radiacyjne DNA spowodowane ekspozycją na promieniowanie protonowe o energii kinetycznej 2 MeV. Połączenie podejścia teoretycznego i eksperymentalnego dowiodło, że niewielka zmiana w strukturze zasad budujących DNA, taka jak utlenianie azotu, lokalnie destabilizuje strukturę DNA. Ze względu na słabsze oddziaływanie między zasadami szkielet DNA może lokalnie zmieniać swoją konformację. Te zmiany konformacyjne determinują właściwości DNA i mogą wpływać na wrażliwość na promieniowanie, a więc na skuteczność radioterapii.

4.7. Podsumowanie wiodącego osiągnięcia naukowego

Opisane osiągnięcie naukowe stanowi przykład aplikacji wybranych narzędzi chemii obliczeniowej w badaniach dotyczących oddziaływań związków biologicznie aktywnych w układach modelujących układy żywe i wykorzystania tych obliczeń do interpretacji wyników uzyskiwanych z metod eksperymentalnych, co jest podejściem wpisującym się w najnowsze trendy dominujące w nauce. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły oddziaływań międzycząsteczkowych związków budujących błony komórkowe oraz cząsteczek biologicznie aktywnych wbudowywanych w te błony, a także oddziaływania DNA z przykładowym lekiem przeciwnowotworowym oraz z promieniowaniem protonowym. Wyniki moich obliczeń odnoszone były do eksperymentalnych modeli dwuwymiarowych, do badania których wykorzystano technikę monowarstw Lagmuira, pomiaru zmiany elektrycznego potencjału powierzchniowego, mikroskopie BAM i AFM, spektroskopie PM-IRRAS i AFM-IR oraz do modeli trójwymiarowych, gdzie zastosowano spektroskopie ATR-FTIR oraz Ramana.

Za najważniejsze rezultaty badań zrealizowanych w ramach opisanego osiągnięcia uważam:

1. Opracowanie uniwersalnej metodyki pozwalającej na teoretyczne wyznaczenie wartości parametru krytycznego upakowania (CPP) dowolnych biologicznie aktywnych związków amfifilowych, a także wyznaczenie po raz pierwszy wartości tego parametru dla oksysteroli [H1,H2].
2. Opisanie orientacji 25-OH w modelu błony komórkowej oraz oddziaływań tego oksysterolu z najważniejszymi lipidami budującymi błony biologiczne: fosfatydylocholiną, fosfatydyloetyloaminą, sfingolipidami i cholesterolem [H3,H4,H5].
3. Zbadanie oddziaływań oksysteroli 25-OH, 7 β -OH oraz 7-K z cholesterolem oraz ich wpływu na tratwy lipidowe [H6].

4. Opracowanie uniwersalnego modelu teoretycznego pozwalającego obliczyć wartości momentu dipolowego cząsteczek (o dowolnej budowie, zarówno amfifilowej, jak i nietypowej) budujących monowarstwę [H7,H9].
5. Wykazanie przydatności perfluoroheksyloktanu stosowanego jako substancja zwiększająca dostępność cyklosporyny A w wewnętrznej warstwie filmu lipidowego [H8].
6. Wyjaśnienie sposobu wiązania przeciwnowotworowego leku Pt-103 z cząsteczką DNA [H10].
7. Wskazanie szlaku uszkodzeń DNA poddanego działaniu promieniowania protonowego [H11].

Wykorzystanie metod chemii obliczeniowej w omówionych modelach biologicznych, w połączeniu z tak wieloma metodami eksperymentalnymi pokazuje, że jest to podejście o ogromnym potencjale, mogące być z powodzeniem stosowane w dyscyplinie nauki farmaceutycznej.

4.7. Omówienie pozostałego dorobku naukowego

Publikacje składające się na pozostały dorobek naukowy³

- D1. Lipiec E, Kaderli J, **Kobierski J**, Riek R, Skirlińska-Nosek K, Sofińska K, Szymoński M, Zenobi R
Nanoscale hyperspectral imaging of amyloid secondary structures in liquid
Angewandte Chemie 2021;133:1–7;[10.1002/ange.202010331](https://doi.org/10.1002/ange.202010331)
(IF: 16,823, MEiN: 200)
- D2. Seweryn S, Skirlińska-Nosek K, Sofińska K, Szajna K, **Kobierski J**, Awsiuk K, Szymoński M, Lipiec E
Optimization of tip-enhanced Raman spectroscopy for probing the chemical structure of DNA
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy
2022;281:121595;[10.1016/j.saa.2022.121595](https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121595)
(IF: 4,831, MEiN: 140)
- D3. Sofińska K, Lupa D, Chachaj-Brekiesz A, Czaja M, **Kobierski J**, Seweryn S, Skirlińska-Nosek K, Szymoński M, Wilkosz N, Wnętrzak A, Lipiec E
Revealing local molecular distribution, orientation, phase separation, and formation of domains in artificial lipid layers: Towards comprehensive characterization of biological membranes
Advances in Colloid and Interface Science 2022;301:102614;[10.1016/j.cis.2022.102614](https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102614)
(IF: 15,190, MEiN: 200)
- D4. Jawień W, **Kobierski J**
The non-compartmental steady-state volume of distribution revisited
Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 2020;47:69–75;
[10.1007/s10928-019-09669-w](https://doi.org/10.1007/s10928-019-09669-w)
(IF: 2,745, MEiN: 70)

³ po uzyskaniu stopnia dra

- D5. Adamiak-Giera U, Jawień W, Pierzchlińska A, Białecka M, **Kobierski J**, Janus T, Gawrońska-Szklarz B
Pharmacokinetics of levodopa and 3-o-methyldopa in parkinsonian patients treated with levodopa and ropinirole and in patients with motor complications
Pharmaceutics 2021;13:1395;[10.3390/pharmaceutics13091395](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091395)
(IF: 6,525, MEiN: 100)
- D6. Chachaj-Brekiesz A, Wnętrzak A, **Kobierski J**, Petelska AD, Dynarowicz-Łątka P
Site of the hydroxyl group determines the surface behavior of bipolar chain-oxidized cholesterol derivatives - Langmuir monolayer studies supplemented with theoretical calculations
The Journal of Physical Chemistry B 2023;127:2011–21;[10.1021/acs.jpccb.2c08629](https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c08629)
(IF: 3,466, MEiN: 140)
- D7. Nizioł J, Nowak P, **Kobierski J**, Harańczyk H
Temperature evolution of hydration shells in solid DNA didecyldimethylammonium chloride complex studied by ¹H NMR spectroscopy
European Polymer Journal 2015;66:301–306;[10.1016/j.eurpolymj.2015.02.037](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.037)
(IF: 3,485, MEiN: 35)
- D8. Nizioł J, **Kobierski J**, Harańczyk H, Zalicz D, Hebda E, Pielichowski J
Hydratacja wybranych lipidowych kompleksów DNA
Polimery 2015;60:18–25;[10.14314/polimery.2015.018](https://doi.org/10.14314/polimery.2015.018)
(IF: 0,718, MEiN: 15)
- D9. Jaros P, **Kobierski J**, Hałdaś, Mateusz Gąszcz K, Krzystek J
[WZW typu C. Konieczność zmian w organizacji systemu ochrony zdrowia](#)
HTA Consulting, Kraków 2014
- D10. **Kobierski J**, Hałdaś M, Władysiuk M
Hepatitis C – the implications and the need for change in the health care system in Poland
Journal of Health Policy & Outcomes Research 2014;2:26–34;[10.7365/JHPOR.2014.2.4](https://doi.org/10.7365/JHPOR.2014.2.4)

Podsumowanie cyklu publikacji [D1] – [D10]:

- Suma IF: 53.783
- Suma punktów MEiN : 900

Streszczenia zjazdowe⁴

- K1. Seweryn S, **Kobierski J**, Sofińska K, Szajna K, Lipiec E, Szymoński M
Tuning plasmonic interactions by nanoengineering of AFM tip-surface gap junctions

⁴ po uzyskaniu stopnia dra

[XI Workshop on Applications of Scanning Probe Microscopy](#), Zakopane, 30 listopada - 4 grudnia 2022, s. 80

K2. **Kobierski J**

Badanie wymiany chemicznej w roztworach leków pod kątem zastosowania techniki obrazowania CEST ^1H MRI w ocenie ich dystrybucji in vivo

[XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego: Farmacja w Polsce perspektywy nauki i zawodu](#), Kraków, 19-22 września 2017, s. 261

K3. **Kobierski J**, Jasiński K, Węglarz WP

Investigation of exchange process in water solution of mexiletine by chemical exchange saturation transfer (CEST)

[The 3rd International Conference: Innovative Technologies in Biomedicine](#), Kraków, 22-24 października 2018, s. 47.

K4. **Kobierski J**, Jasiński K, Jawień W, Węglarz WP

The influence of pH and Na^+ on chemical exchange processes in aqueous solutions of mexiletine

[10th Kraków Workshop on Novel Applications of Imaging and Spectroscopy in Medicine, Biology and Material Sciences](#), Kraków, 23-25 września 2019, s. 45–46

K5. **Lipiec E**, Benadiba C, Borkowska AM, Chachaj-Brekiesz A, Deacon GB, Dietler G, Dynarowicz-Łątka P, **Kobierski J**, Kulik A, Kwiatek WM, Miszczyk J, Ruggeri FS, Szymoński M, Wnętrzak A, Wood BR

Infrared nano-spectroscopy in studies of lipids and nucleic acids

[Seminar Nano and Fast Vibrational Spectroscopy](#), Kraków, 17-18 czerwca 2019, s. 6

K6. **Chachaj-Brekiesz A**, Wnętrzak A, Dynarowicz-Łątka P, **Kobierski J**, Lipiec E

AFM-IR application to determine molecular orientation in ultrathin films prepared with the Langmuir-Blodgett technique

[Seminar Nano and Fast Vibrational Spectroscopy](#), Kraków, 17-18 czerwca 2019, s. 16

Dane naukometryczne

Liczba publikacji	ogółem	23
	po uzyskaniu stopnia doktora	20
Suma <i>Impact Factor</i>		106,929
Suma punktów MEiN		2205
Liczba cytowań wg <i>Web of Science</i>	ogółem	125
	bez autocytaowań	112
Indeks Hirscha H		8
Autor korespondencyjny w publikacjach		4

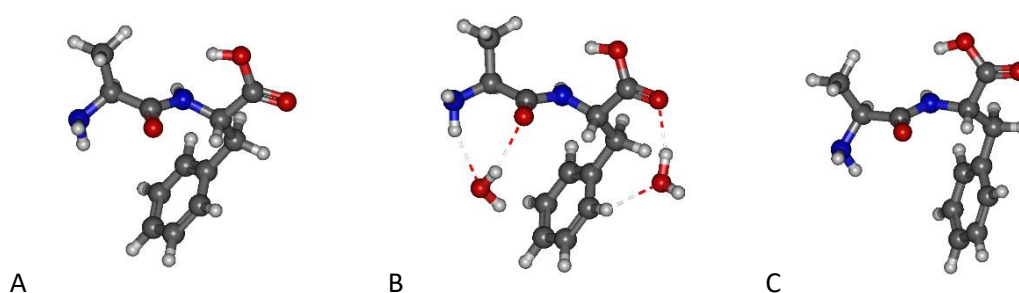
Staże zagraniczne		2
Liczba projektów badawczych	kierownik projektu	1
	wykonawca	1
Współautorstwo wystąpień konferencyjnych	ogółem	21
	po uzyskaniu stopnia doktora	6
Recenzje publikacji naukowych		1

4.7.1. Agregacja amyloidu β

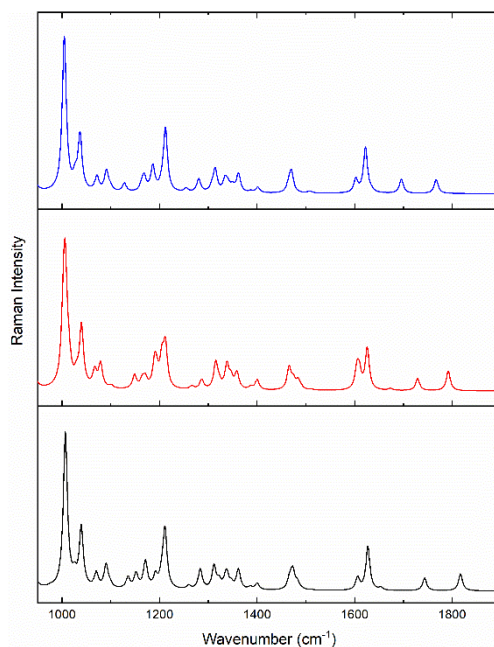
Poza wiodącym osiągnięciem naukowym, najważniejszym elementem mojego dorobku naukowego jest udział w badaniach dotyczących agregacji amyloidu β [D1], będącej według hipotezy amyloidowej, jedną z przyczyn choroby Alzheimera. Badania te wykonywane były we współpracy z Zakładem Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych IFJ PAN oraz Zakładem Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii UJ. Agregacja amyloidu β prowadzi do gromadzenia się złogów białkowych w mózgu pacjenta. Ze względu na ograniczenia metodologiczne szlak agregacji wciąż nie jest w pełni poznany. W omawianym badaniu po raz pierwszy przedstawiliśmy metodologię kompletnej rekonstrukcji struktury drugorzędowej pojedynczych agregatów amyloidu- β za pomocą spektroskopii Ramana wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej (ang. *tip-enhanced Raman spectroscopy*, TERS) w środowisku ciekłym. TERS jest innowacyjną metodą umożliwiającą otrzymywanie widm spektroskopowych z nanometryczną rozdzielczością przestrzenną nawet pojedynczych cząsteczek unieruchomionych na powierzchni [76]. Jest techniką łączącą w sobie zdolność rozdzielczą AFM lub skaningowej mikroskopii tunelowej (ang. *scanning tunneling microscopy*, STM) z chemiczną selektywnością spektroskopii Ramana. Metoda ta wykorzystuje ostrze próbnika STM lub pokryte metalicznymi nanostrukturami ostrze AFM. Dzięki kolektywnym ruchom elektronów (tj. plazmonom) akumulowanym na ostrzu, możliwa jest modyfikacja pola elektromagnetycznego światła laserowego, która prowadzi do wzmocnienia rozpraszania ramanowskiego. TERS to niezwykle czuła metoda, do tej pory rzadko stosowana w badaniach próbek biologicznych.

Uzyskane w omawianym badaniu widma TERS w cieczy dały lepszą odtwarzalność, a także wyższy stosunek sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*, SNR) niż dane TERS zebrane w suchych warunkach. Główną różnicą widmową było wyraźnie widoczne w środowisku ciekłym I pasmo amidowe, nieobecne w widmach uzyskanych w powietrzu. Aby zweryfikować, czy to obecność cieczy wpływa na przekrój czynny rozpraszania ramanowskiego dla I pasma amidowego, obliczyłem widma ramanowskie L-alanino-L-feniloalaniny (Ala-Phe). Obliczenia były wykonane w trzech wariantach: Ala-Phe w próżni, Ala-Phe w obecności dwóch cząsteczek wody i Ala-Phe w obecności wody modelowanej jako ośrodek ciągły o zadanej wartości stałej dielektrycznej (PCM, ang. *polarizable continuum model*). Zoptymalizowane układy widoczne są na rysunku 18. W widmach teoretycznych (rysunek 19) nie

zaobserwowałem znaczących różnic w intensywności I pasma amidowego. Na tej podstawie wywnioskowaliśmy, że oddziaływanie z cząsteczkami wody nie wpływa na obecność tego pasma w widmach eksperymentalnych. Jedną z hipotez braku I pasma amidowego w widmach TERS jest dysocjacja szkieletu peptydowego indukowana przez plazmon [77], co wynika z lokalnie wysokiej temperatury. Prawdopodobieństwo uszkodzeń wywołanych przez elektrony wzbudzone wibracyjnie (termicznie) jest większe niż dla stanu podstawowego. Dzięki ciektemu środowisku odprowadzanie ciepła z końcówki sondy skanującej jest wydajniejsze, co skutkuje niższą temperaturą struktury plazmonicznej powierzchni i utrudnia reakcje plazmonowe. W efekcie sygnał Ramana jest stabilniejszy, co umożliwia obserwację I pasma amidowego w widmach amyloidu- β .



Rysunek 18. Geometrycznie zoptymalizowane struktury A) Ala-Phe w próżni, B) Ala-Phe w obecności cząsteczek wody (linie przerywane reprezentują wiązania wodorowe) oraz C) Ala-Phe w rozpuszczalniku wodnym.



Rysunek 19. Obliczone widma Ramana dla Ala-Phe w próżni (panel dolny), Ala-Phe w próżni z cząsteczkami wody (panel środkowy) i Ala-Phe w wodnym rozpuszczalniku (panel górny).

Ponadto w widmach teoretycznych zaobserwowałem, że drgania rozciągające wiązań C=O w próżni przy $\tilde{\nu}=1817\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1743\text{ cm}^{-1}$ odpowiednio dla fenyloalaniny i alaniny, w obecności cząsteczek wody

przesuwają się odpowiednio do $\tilde{\nu}=1791\text{ cm}^{-1}$ i $\tilde{\nu}=1729\text{ cm}^{-1}$. W wyniku geometrycznej optymalizacji układu, cząsteczki wody znalazły się w pobliżu grup karbonylowych peptydu, w konsekwencji czego powstały wiązania wodorowe. To z kolei tłumaczy przesunięcie w stronę mniejszej wartości liczby falowej [78–80]. Przesunięcie to było jeszcze większe, gdy zastosowałem model wodnego rozpuszczalnika. Dodatkowo zaobserwowałem wzrost częstości drgań nożycowych NH_2 w alaninie z $\tilde{\nu}=1653\text{ cm}^{-1}$ do $\tilde{\nu}=1673\text{ cm}^{-1}$ po dodaniu do modelu cząsteczek wody, co również można wytłumaczyć wpływem wiązania wodorowego [80]. Ani dodanie cząsteczek wody, ani wykorzystanie modelu rozpuszczalnika nie spowodowały z kolei znaczących przesunięć w częstotliwościach drgań rozciągających i nożycowych w pierścieniu aromatycznym fenyloalaniny.

Nasze badania pokazały, że technika TERS w cieczy jest skuteczną metodą bezpośredniego śledzenia agregacji amyloidu- β . Metoda ta pozwoliła na obserwację I pasma amidowego, które zwykle nie jest widoczne w widmach TERS zebranych z suchych próbek białek i lipidów, a moje obliczenia pozwoliły na wyjaśnienie tego zjawiska. Artykuł, w którym opisaliśmy wyniki badań, został wyróżniony przez redakcję czasopisma *Angewandte Chemie* jako *Hot Paper*.

4.7.2. Inne osiągnięcia naukowe

Ze spektroskopią Ramana wzmocnioną na ostrzu sondy skanującej związany był również przyznany mi przez Narodowe Centrum Nauki grant w ramach konkursu Miniatura-5. Projekt pt. „Optymalizacja techniki TERS do obrazowania tratw lipidowych w błonach biologicznych” o numerze 2021/05/X/ST4/00264, realizowany był w latach 2021-2022 we współpracy z Zakładem Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii UJ. Jednym z zadań wykonanych w ramach tego projektu była optymalizacja parametrów próbników wykorzystywanych w metodzie TERS. Wykorzystałem w tym celu modele krzemowych próbników AFM pokrytych warstwą srebra i złota o różnej grubości. Badanie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej pozwoliło stwierdzić powstawanie jednorodnej warstwy srebra oraz niejednorodności w postaci ziaren, w przypadku nanoszenia na sondę warstwy srebra i złota. Umożliwiło to zbudowanie modelu teoretycznego i wykonanie symulacji komputerowych w celu ustalenia optymalnej grubości warstw metali. Wykorzystując program COMSOL Multiphysics obliczyłem wzmocnienie pola elektromagnetycznego w układzie próbnik-próbka-podłoże. Podobne obliczenia, dla układu o innej geometrii, opisałem w artykule [D2]. Zostały one także zreferowane na zjeździe konferencyjnym [K1]. Dzięki tym symulacjom możliwe było zoptymalizowanie grubości nanoszonych na próbnik warstw, co pozwoliło uzyskać możliwie optymalne wzmocnienie sygnału TERS oraz zwiększyć SNR w otrzymywanych danych spektralnych.

Ważnym elementem mojego dorobku naukowego jest również współautorstwo przeglądu [D3] omawiającego obecny stan wiedzy na temat struktury i składu molekularnego, a także przestrzennego

rozmieszczenia lipidów i ich organizacji w biologicznych błonach lipidowych oraz wpływu na te układy związków aktywnych biologicznie.

Efektom pracy naukowej realizowanej w obrębie Zakładu Biofizyki Farmaceutycznej UJ CM była publikacja [D4], w której dokonaliśmy wyprowadzenia i omówienia wzoru na objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym w ramach farmakokinetyki niezależnej od modelu, wskazując na brak poprawnego wyprowadzenia w literaturze. Dodatkowo, w ramach współpracy z Zakładem Farmakokinetyki i Terapii Monitorowanej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego opublikowaliśmy artykuł na temat badań populacyjnych farmakokinetyki lewodopy stosowanej wraz z ropinirolem w leczeniu choroby Parkinsona osób z zaburzeniami motorycznymi [D5].

W ostatnim czasie opublikowany został artykuł opisujący nasze dalsze badania nad wpływem struktury oksysteroli na ich aktywność biologiczną [D6].

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej

W 2009 roku wyjechałem na dwumiesięczny staż na Uniwersytet Waterloo w Kanadzie, gdzie zostałem zatrudniony w grupie profesora Hartwiga Peemoellera jako *research assistant*. Zajmowałem się tam badaniem wymiany chemicznej protonów w roztworach nadtlenu wodoru wykorzystując techniki spektroskopowe i relaksacyjne NMR. Uzyskane wyniki zaprezentowałem na dwóch konferencjach naukowych [81,82] oraz wykorzystałem podczas pracy nad doktoratem. Wiedza i umiejętności, które zdobyłem badając ten prosty układ modelowy, pozwoliły na dalszym etapie kariery naukowej zastosować wymianę chemiczną do zobrazowania dystrybucji leków *in vitro*.

W październiku 2014 roku skorzystałem z możliwości zatrudnienia na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, na stanowisku asystenta z doktoratem w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej. Początkowo w pracy naukowej korzystałem z tych samych technik, co w trakcie badań związanych z moją pracą magisterską oraz doktorską, to jest ze spektroskopowych i relaksacyjnych metod NMR. Tym razem wykorzystywałem je do obrazowania dystrybucji leków. Pomysł opierał się na zastosowaniu nowatorskiej metody obrazowania CEST (ang. *chemical exchange saturation transfer*), wykorzystującej transfer nasycenia pomiędzy protonami z grup OH, NH lub NH₂ a protonami wody otaczającej cząsteczkę zawierające te grupy funkcyjne, co można użyć do tzw. naturalnego znakowania związków chemicznych. Projekt realizowałem w ramach współpracy z Zakładem Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej Instytutu Fizyki Jądrowej PAN. Badania które tam wykonałem zaowocowały trzema doniesieniami konferencyjnymi [K2-K4]. W międzyczasie we współpracy z Zakładem Radiospektroskopii UJ opublikowaliśmy dwa artykuły [D7,D8]

związane tematycznie z moją rozprawą doktorską [83]. Dotyczyły one zastosowania relaksometrii NMR do badań uwodnienia kompleksów DNA z lipidami.

W roku 2016 ponownie wyjechałem na Uniwersytet Waterloo, gdzie w tej samej grupie badawczej zatrudniono mnie na 6 miesięcy jako *postdoctoral fellow*. Tym razem zajmowałem się badaniem nanostożków węglowych, które mogą być wykorzystane jako DDS np. leków przeciwnowotworowych [84]. Wykorzystując techniki NMR skupiłem się na badaniu dynamiki uwodnienia tych układów, co jest zagadnieniem istotnym z punktu widzenia na przykład optymalizacji ich hydrofobowości.

Po powrocie do Polski ponownie rozpocząłem pracę na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM, tym razem w nowo powstałym Zakładzie Biofizyki Farmaceutycznej, gdzie w lutym 2019 roku zostałem awansowany na stanowisko adiunkta. Moje zainteresowania naukowe skierowały się w stronę zagadnień teoretycznych i zastosowań metod obliczeniowych w naukach farmaceutycznych. Po rozpoczęciu współpracy z Zakładem Chemii Ogólnej UJ oraz Zakładem Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych IFJ PAN, a następnie Zakładem Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii UJ otrzymywałem granty obliczeniowe w ramach Polskiej Infrastruktury Gridowej PI-Grid, co umożliwiło mi uzyskanie wyników składających się na omówione wcześniej osiągnięcie naukowe. W 2017 zostałem zatrudniony w Instytucie Fizyk Jądrowej PAN w Krakowie jako wykonawca w projekcie realizowanym w ramach grantu NCN o numerze 2014/13/D/NZ1/01014. Moim zadaniem było teoretyczne zbadanie struktury DNA z różnymi typami uszkodzeń. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w artykule [H11] włączonym do przedstawionego wcześniej osiągnięcia.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

Z Wydziałem Farmaceutycznym UJ CM jestem związany od 2011 roku, kiedy to zacząłem prowadzić na ćwiczenia z biofizyki dla studentów farmacji oraz ćwiczenia i seminaria z biofizyki medycznej dla studentów analityki medycznej. W 2014 opracowałem i prowadziłem wykład i ćwiczenia z matematyki dla studentów analityki medycznej. Od 2017 roku prowadzę ze studentami tego kierunku ćwiczenia z przedmiotu statystyka z elementami matematyki, a od 2021 roku jestem jego koordynatorem. Jestem także współautorem skryptu z tego przedmiotu, a także skryptu do ćwiczeń z biostatystyki dla doktorantów. W 2015 i 2016 roku prowadziłem ćwiczenia z farmakokinetyki i byłem współautorem materiałów dydaktycznych dla studentów. Prowadziłem również ćwiczenia z przedmiotów informatyka dla studentów farmacji oraz technologie informacyjne i statystyka medyczna dla studentów analityki medycznej. W 2017 uczestniczyłem w opracowaniu sylabusu nowego kursu zjawiska fizyczne w

kosmetologii dla studentów kosmetologii i do dzisiaj prowadzę seminaria z tego przedmiotu. Byłem promotorem dwóch prac magisterskich z analityki medycznej, pt.:

- „Perspektywy wykorzystania techniki ^1H MRI do obrazowania dystrybucji leków”,
- „Zastosowanie spektroskopii Ramana w diagnostyce medycznej”

i 1 pracy magisterskiej z kosmetologii, pt.:

- „Zastosowanie metod fizycznych do redukcji tkanki tłuszczowej”.

Podczas pobytu na stażu podoktorskim na Uniwersytecie Waterloo w Kanadzie uczestniczyłem w kilkudniowych warsztatach pt. „*Teaching Development Seminar Series*” organizowanych przez *Centre of Teaching Excellence* Uniwersytetu Waterloo. Wygłosiłem tam również gościnny wykład w ramach cyklu „*Electricity and magnetism for life and medical physics*”. W 2018 roku ukończyłem organizowane przez Biuro Doskonalenia Kompetencji UJ warsztaty dydaktyczne pt. „Podstawy dydaktyki akademickiej”.

7. Inne informacje dotyczące jego kariery zawodowej

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk fizycznych, w lutym 2014 roku rozpocząłem pracę w HTA Consulting, firmie specjalizującej się w ocenie skuteczności leków, wyrobów medycznych oraz metod diagnostycznych. Pracując na stanowisku młodszego analityka, brałem udział w tworzeniu metaanaliz poświęconych skuteczności leków. Miałem okazję uczestniczyć w szkoleniach poświęconych ocenie technologii medycznych i poznać z bliskiej perspektywy procesy rejestracji i aplikacji o refundację leków. Byłem także jednym z autorów raportu poświęconego sytuacji osób chorych na WZW typu C (wirusowe zapalenie wątroby typu C), standardom leczenia oraz profilaktyce zakażeń wirusem powodującym tę chorobę w ówczesnej Polsce [D9]. Pozycja ta była elementem szerszej kampanii mającej na celu zwiększenie świadomości niebezpieczeństwa zakażenia HCV (ang. *hepatitis C virus*), oraz potrzebie wprowadzenia refundacji nowoczesnych terapii bezinterferonowych, charakteryzujących się wysoką skutecznością i niepowodujących uciążliwych skutków ubocznych. W tamtym czasie w Polsce wykrywalność WZW typu C była na niskim w porównaniu z innymi krajami europejskimi poziomie, a refundacja (poza wąskimi grupami pacjentów) obejmowała jedynie leczenie polegające na podawaniu pegylowanego interferonu w połączeniu z rybawiryną. Praca nad raportem zaowocowała późniejszą publikacją o tej samej tematyce [D10].

Piśmiennictwo

- [1] Jervis MA. Robert Hooke's Micrographia: an entomologist's perspective. *J Nat Hist* 2013;47:2531–73. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.780270>.
- [2] Gorter E, Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*

- 1925;41:439–44. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>.
- [3] Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737–8. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- [4] Ulam SM. *Science, Computers, and People*. Boston, MA: Birkhäuser Boston; 1986. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9819-0>.
- [5] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. *Gaussian 16 2016*.
- [6] Foresman JB, Frisch AE. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Wallingford: Gaussian, Inc.; 2015.
- [7] Gaussian: Basis Sets. <https://gaussian.com/basissets/> (dostęp 6 kwietnia 2023).
- [8] Li X, Frisch MJ. Energy-Represented Direct Inversion in the Iterative Subspace within a Hybrid Geometry Optimization Method. *J Chem Theory Comput* 2006;2:835–9. <https://doi.org/10.1021/ct050275a>.
- [9] Piela L. *Idee chemii kwantowej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2006.
- [10] Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry*, 3rd Edition. Wiley; 2017.
- [11] Michalska D, Wysokiński R. The prediction of Raman spectra of platinum(II) anticancer drugs by density functional theory. *Chem Phys Lett* 2005;403:211–7. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.12.096>.
- [12] Matta CF, Boyd RJ. *The quantum theory of atoms in molecules: from solid state to DNA and drug design*. Weinheim: Wiley; 2007.
- [13] AIMAll. Critical Point Properties. https://www.mit.edu/afs.new/athena/software/aimall_v14.11.23/AIMAll/manual/tutorials/tutorial6/tutorial6.html (dostęp 6 kwietnia 2023).
- [14] Keith TA. AIMAll 2019.
- [15] Case DA, Cerutti DS, Cheatham TEI, Darden TA, Duke RE, Giese TJ, et al. AMBER.
- [16] Dickson CJ, Madej BD, Skjevik ÅA, Betz RM, Teigen K, Gould IR, et al. Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *J Chem Theory Comput* 2014;10:865–79. <https://doi.org/10.1021/ct4010307>.
- [17] Dickson CJ, Walker RC, Gould IR. Lipid21: Complex Lipid Membrane Simulations with AMBER. *J Chem Theory Comput* 2022;18:1726–36. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c01217>.
- [18] Dickson CJ, Rosso L, Betz RM, Walker RC, Gould IR. GAFFlipid: A General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics simulation of phospholipid. *Soft Matter* 2012;8:9617–27. <https://doi.org/10.1039/c2sm26007g>.
- [19] Infrastruktura PLGrid – Wprowadzenie. <https://www.plgrid.pl/wprowadzenie> (dostęp 6 kwietnia 2023).
- [20] Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans 2 Mol Chem Phys* 1976;72:1525–68. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- [21] Sadeghpour A, Rappolt M, Misra S, Kulkarni C V. Bile Salts Caught in the Act: From Emulsification to Nanostructural Reorganization of Lipid Self-Assemblies. *Langmuir* 2018;34:13626–37. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02343>.
- [22] Madenci D, Salonen A, Schurtenberger P, Pedersen JS, Egelhaaf SU. Simple model for the growth behaviour of mixed lecithin-bile salt micelles. *Phys Chem Chem Phys* 2011;13:3171–8. <https://doi.org/10.1039/c0cp01700k>.
- [23] Arleth L, Bauer R, Øgdenal LH, Egelhaaf SU, Schurtenberger P, Pedersen JS. Growth behavior of mixed wormlike micelles: A small-angle scattering study of the lecithin-bile salt system. *Langmuir* 2003;19:4096–104. <https://doi.org/10.1021/la026808+>.
- [24] Salentinig S, Sagalowicz L, Glatter O. Self-assembled structures and pK a value of oleic acid in systems of biological relevance. *Langmuir* 2010;26:11670–9. <https://doi.org/10.1021/la101012a>.
- [25] Xu J, Sun S, Wang Z, Peng S, Hu S, Zhang L. pH-Induced evolution of surface patterns in micelles assembled from dirhamnolipids: Dissipative particle dynamics simulation. *Phys Chem Chem Phys* 2018;20:9460–70. <https://doi.org/10.1039/c8cp00751a>.
- [26] Helvacı SS, Peker S, Özdemir G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2004;35:225–33. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.01.001>.
- [27] Hartnett TE, Ladewig K, Oconnor AJ, Hartley PG, McLean KM. Size and phase control of cubic lyotropic liquid crystal nanoparticles. *J Phys Chem B* 2014;118:7430–9. <https://doi.org/10.1021/jp502898a>.
- [28] Fatouros DG, Deen GR, Arleth L, Bergenstahl B, Nielsen FS, Pedersen JS, et al. Structural development of self nano emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by Small-angle X-ray scattering. *Pharm Res* 2007;24:1844–53. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9304-6>.
- [29] Dyck M, Krüger P, Lösche M. Headgroup organization and hydration of methylated phosphatidylethanolamines in Langmuir monolayers. *Phys Chem Chem Phys* 2005;7:150–6. <https://doi.org/10.1039/b410863a>.

- [30] Sánchez-González J, Cabrerizo-Vilchez MA, Gálvez-Ruiz MJ. Chain dependence in phospholipid interactions: A thermodynamic study of mixed monolayers. *Colloid Polym Sci* 1998;276:239–46. <https://doi.org/10.1007/s003960050234>.
- [31] Harrison R, Lunt GG. *Błony biologiczne*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1980.
- [32] Hąc-Wydro K, Dynarowicz-Łątka P. Effect of edelfosine on tumor and normal cells model membranes - A comparative study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010;76:366–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.012>.
- [33] Tekpli X, Holme JA, Sergent O, Lagadic-Gossmann D. Role for membrane remodeling in cell death: Implication for health and disease. *Toxicology* 2013;304:141–57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.014>.
- [34] Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Janikowska-Sagan M, Dynarowicz-Latka P. Influence of 7 α -hydroxycholesterol on sphingomyelin and sphingomyelin/phosphatidylcholine films - The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2019;1861:861–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.01.020>.
- [35] Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res* 2008;47:391–404. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.04.002>.
- [36] Brzeska M, Szymczyk K, Szterk A. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. *J Food Sci* 2016;81:R2299–308. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13423>.
- [37] Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med* 2009;30:153–70. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006>.
- [38] Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Rog T, Vattulainen I. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chem Phys Lipids* 2016;199:144–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.03.001>.
- [39] Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med* 2009;30:111–22. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>.
- [40] Liu S-Y, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden MD, Smith JK, et al. Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* 2013;38:92–105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>.
- [41] Li C, Deng YQ, Wang S, Ma F, Aliyari R, Huang XY, et al. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* 2017;46:446–56. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.012>.
- [42] Wang S, Li W, Hui H, Tiwari SK, Zhang Q, Croker BA, et al. Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS - CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol. *EMBO J* 2020;39:1–13. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106057>.
- [43] Marcello A, Civra A, Milan Bonotto R, Nascimento Alves L, Rajasekharan S, Giacobone C, et al. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol inhibits SARS-CoV-2 and is markedly decreased in COVID-19 patients. *Redox Biol* 2020;36. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101682>.
- [44] Ghzaiei I, Sassi K, Zarrouk A, Nury T, Ksila M, Leoni V, et al. 7-Ketocholesterol: Effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2021;212:105939. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105939>.
- [45] Kouhpeikar H, Khosaravizade Tabasi H, Khazir Z, Naghipour A, Mohammadi Moghadam H, Forouzanfar H, et al. Statin Use in COVID-19 Hospitalized Patients and Outcomes: A Retrospective Study. *Front Cardiovasc Med* 2022;9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.820260>.
- [46] van Os NM, Kok R, Bolsman TABM. Alkylarylsulphonate: Beziehungen zwischen chemischer Struktur und ihren physikochemischen Eigenschaften / Alkylarenesulphonates: The Effect of Chemical Structure on Physico-chemical Properties. *Tenside Surfactants Deterg* 1992;29:175–89. <https://doi.org/10.1515/tsd-1992-290311>.
- [47] Olkkonen VM, Hynynen R. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol Aspects Med* 2009;30:123–33. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004>.
- [48] Lange Y, Ye J, Strebel F. Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells - PubMed. *J Lipid Res* 1995;36:1092–7.
- [49] Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* 1999;40:2264–70.
- [50] Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Björkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: Critical importance of the position of the oxygen function. *J*

- Lipid Res 2002;43:2130–5. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200293-JLR200>.
- [51] Dynarowicz-Łątka P, Kita K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. *Adv Colloid Interface Sci* 1999;79:1–17. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00064-5).
- [52] Matta CF, Hernández-Trujillo J, Tang TH, Bader RFW. Hydrogen - Hydrogen bonding: A stabilizing interaction in molecules and crystals. *Chem - A Eur J* 2003;9:1940–51. <https://doi.org/10.1002/chem.200204626>.
- [53] Demchak RJ, Fort T. Surface dipole moments of close-packed un-ionized monolayers at the air-water interface. *J Colloid Interface Sci* 1974;46:191–202. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(74\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(74)90002-2).
- [54] Dynarowicz P, Paluch M. Electrical properties of some adsorbed films at the water-air interface. *J Colloid Interface Sci* 1985;107:75–80. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(85\)90150-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(85)90150-X).
- [55] Uchino M, Schaumberg DA. Dry Eye Disease: Impact on Quality of Life and Vision. *Curr Ophthalmol Rep* 2013;1:51–7. <https://doi.org/10.1007/s40135-013-0009-1>.
- [56] Wilson SE, Perry HD. Long-term Resolution of Chronic Dry Eye Symptoms and Signs after Topical Cyclosporine Treatment. *Ophthalmology* 2007;114:76–9. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.05.077>.
- [57] Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical Ophthalmic Cyclosporine: Pharmacology and Clinical Uses. *Surv Ophthalmol* 2009;54:321–38. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.02.002>.
- [58] Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;117:14–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.03.006>.
- [59] Dutescu RM, Panfil C, Merkel OM, Schrage N. Semifluorinated alkanes as a liquid drug carrier system for topical ocular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.009>.
- [60] Gehlsen U, Braun T, Notara M, Krösser S, Steven P. A semifluorinated alkane (F4H5) as novel carrier for cyclosporine A: a promising therapeutic and prophylactic option for topical treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255:767–75. <https://doi.org/10.1007/s00417-016-3572-y>.
- [61] Steven P, Scherer D, Krösser S, Beckert M, Cursiefen C, Kaercher T. Semifluorinated Alkane Eye Drops for Treatment of Dry Eye Disease—A Prospective, Multicenter Noninterventive Study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;31:498–503. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0048>.
- [62] Steven P, Augustin AJ, Geerling G, Kaercher T, Kretz F, Kunert K, et al. Semifluorinated Alkane Eye Drops for Treatment of Dry Eye Disease Due to Meibomian Gland Disease. *J Ocul Pharmacol Ther* 2017;33:678–85. <https://doi.org/10.1089/jop.2017.0042>.
- [63] Kiemle DJ, Silverstein RM, Webster FX. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. Wydawnictwo Naukowe PWN; 2007.
- [64] Broniatowski M, Sandez Macho I, Miñones J, Dynarowicz-Łątka P. Langmuir Monolayers Characteristic of (Perfluorodecyl)-Alkanes. *J Phys Chem B* 2004;108:13403–11. <https://doi.org/10.1021/jp0402481>.
- [65] Sahle CJ, de Clermont Gallerande E, Niskanen J, Longo A, Elbers M, Schroer MA, et al. Hydration in aqueous NaCl. *Phys Chem Chem Phys* 2022;24:16075–84. <https://doi.org/10.1039/D2CP00162D>.
- [66] Oliveira ON, Riul A, Leite VBP. Water at interfaces and its influence on the electrical properties of adsorbed films. *Brazilian J Phys* 2004;34:73–83. <https://doi.org/10.1590/s0103-97332004000100011>.
- [67] Talarico T, Phillips DR, Deacon GB, Rainone S, Webster LK. Activity and DNA binding of new organoamidoplatinum (II) complexes. *Invest New Drugs* 1999;17:1–15. <https://doi.org/10.1023/A:1006263917610>.
- [68] Kumar A, Sevilla MD. *Theoretical Modeling of Radiation-Induced DNA Damage*. *Radic. Radic. Ion React. Nucleic Acid Chem.*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009, p. 1–40. <https://doi.org/10.1002/9780470526279.ch1>.
- [69] Steenken S, Jovanovic S V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 1997;119:617–8. <https://doi.org/10.1021/ja962255b>.
- [70] Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2017;59:82–105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.09.007>.
- [71] Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer* 2011;128:1999–2009. <https://doi.org/10.1002/ijc.25815>.
- [72] Dapprich S, Komáromi I, Byun KS, Morokuma K, Frisch MJ. A new ONIOM implementation in Gaussian 98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *J Mol Struct Theochem* 1999;461–462:1–21. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00475-8](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00475-8).
- [73] Rappe AK, Casewit CJ, Colwell KS, Goddard WA, Skiff WM. UFF, a full periodic table force field for

- molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* 1992;114:10024–35. <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
- [74] Sailer K, Viaggi S, Nüsse M. Radiation-induced structural modifications in dsDNA analysed by FT-Raman spectroscopy. *Int J Radiat Biol* 1996;69:601–13. <https://doi.org/10.1080/095530096145616>.
- [75] Nakamoto K, Tsuboi M, Strahan GD. *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*. vol. 51. 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470370612>.
- [76] Chen X, Liu P, Hu Z, Jensen L. High-resolution tip-enhanced Raman scattering probes sub-molecular density changes. *Nat Commun* 2019;10:2567. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10618-x>.
- [77] Szczerbiński J, Metternich JB, Goubert G, Zenobi R. How Peptides Dissociate in Plasmonic Hot Spots. *Small* 2020;16:1905197. <https://doi.org/10.1002/smll.201905197>.
- [78] Ryu IS, Liu X, Jin Y, Sun J, Lee YJ. Stoichiometric analysis of competing intermolecular hydrogen bonds using infrared spectroscopy. *RSC Adv* 2018;8:23481–8. <https://doi.org/10.1039/C8RA02919A>.
- [79] Ramaekers R, Pajak J, Lambie B, Maes G. Neutral and zwitterionic glycine.H₂O complexes: A theoretical and matrix-isolation Fourier transform infrared study. *J Chem Phys* 2004;120:4182–93. <https://doi.org/10.1063/1.1643735>.
- [80] Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG. Compounds Containing –NH₂, –NHR, and –NR₂ Groups. *Handb. Infrared Raman Charact. Freq. Org. Mol.*, Elsevier; 1991, p. 155–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057116-4.50016-X>.
- [81] Kobierski J, Peemoeller H, Blicharska B. Chemical exchange processes in hydrogen peroxide solutions observed by NMR methods. *Ampere NMR School*. Wierzba, 20-26 czerwca 2010.
- [82] Kobierski J, Peemoeller H, Blicharska B. Chemical exchange processes in hydrogen peroxide solutions observed by NMR relaxation. *XLII Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań*. Kraków, 1–2 grudnia 2009.
- [83] Kobierski J. *Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant*. Uniwersytet Jagielloński, 2013.
- [84] Moreno-Lanceta A, Medrano-Bosch M, Melgar-Lesmes P. Single-Walled Carbon Nanohorns as Promising Nanotube-Derived Delivery Systems to Treat Cancer. *Pharmaceutics* 2020;12:850. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090850>.

Wykaz skrótów

Związki chemiczne

24-OH – 24(S)-hydroksycholesterol
 25-OH – 25-hydroksycholesterol
 27-OH – 27-hydroksycholesterol
 7 α -OH – 7 α -hydroksycholesterol
 7 β -OH – 7 β -hydroksycholesterol
 7-K – 7-ketocholesterol
 A – adenina
 Ala-Phe – L-alanino-L-feniloalanina
 C – cytozyna
 CHOL – cholesterol
 CsA – cyklosporyna A
 DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
 DAPC – 1,2-diarachidooleilo-sn-glicero-3-fosfocholina
 DOPC – 2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina
 DPPC – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
 DPPE – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
 DPPS – 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoseryna
 DSPC – 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
 F₆H₈ – perfluoroheksyloktan: F(CF₂)₆(CH₂)₈H
 F₁₀H₁₀ – perfluorodecylodekane: F(CF₂)₁₀(CH₂)₁₀H
 F₁₀H₁₀COOH – kwas perfluorodecyloundekanoowy
 F₁₀H₁₀OH – perfluorodecylodekaneol

F₁₀H₁₀SH – perfluorodecylodekantioł
G – guanina
GM₁ – gangliozyd
PC – fosfatydylocholina
PE – fosfatydyloetanolamina
POPC – 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
POPE – 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
SM – sfingomielina
T – tymina

Pozostałe

AFM – mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*)
AFM-IR – nanospektroskopia w podczerwieni połączona z mikroskopią sił atomowych (ang. *atomic force microscopy-based infrared spectroscopy*)
ATR-FTIR – fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *attenuated total reflectance – Fourier-transform infrared spectroscopy*)
B3LYP – trójparametrowy funkcjonał Becke’go z członem korelacyjnym Lee-Yanga-Parra
BAM – mikroskopia kąta Brewstera (ang. *Brewster angle microscopy*)
BSSE – błąd superpozycji bazy (ang. *basis set superposition error*)
CEST – transfer nasycenia z wymianą chemiczną (ang. *chemical exchange saturation transfer*)
CP – poprawka wyrównująca (ang. *counterpoise correction*)
CPP – parametr krytycznego upakowania (ang. *critical packing parameter*)
cryo-EM – transmisyjna kriomikroskopia elektronowa (ang. *cryogenic electron microscopy*)
DDS – system dostarczania leków (ang. *drug delivery system*)
DFT – teoria funkcjonału gęstości (ang. *density functional theory*)
EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny (ang. *electron paramagnetic resonance*)
ESP – potencjał elektrostatyczny (ang. *electrostatic potential*)
FF – pole siłowe (ang. *force field*)
FTIR – spektroskopia fourierowska w podczerwieni (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)
GAFF – ang. *General Amber Force Field*
HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*)
HF – metoda Hartree’ego-Focka
MD – dynamika molekularna (ang. *molecular dynamics*)
NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)
PCM – model polaryzowalnego kontinuum (ang. *polarizable continuum model*)
PM-IRRAS - refleksyjno-absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. *polarization modulation – infrared reflection-absorption spectroscopy*)
RDF – funkcja rozkładu radialnego (ang. *radial distribution function*)
RESP – potencjał elektrostatyczny z więzami (ang. *restrained electrostatic potential*)
SNR – stosunek sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*)
STM – skaningowa mikroskopia tunelowa (ang. *scanning tunneling microscopy*)
UFF – ang. *Universal Force Field*
QTAIM – kwantowa teoria atomów w cząsteczkach (ang. *quantum theory of atoms in molecules*)
WZW typu C – wirusowe zapalenie wątroby typu C

06.04.2023

Jan Kobierski