

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych”**

Promotor: dr hab. Sławomir Sęk, prof. ucz.

Antybiotyki są substancjami produkowanymi przez mikroorganizmy, których głównym zadaniem jest hamowanie działania drobnoustrojów, a także ich zabijanie. Z pewnością, odkrycie przez Alexandra Fleminga w 1928 roku pierwszego antybiotyku jakim była penicylina było przełomem w tej dziedzinie, a dalsze badania zaowocowały opracowaniem nowych metod syntezy tego typu związków. Wyróżnia się wiele rodzajów antybiotyków wśród których można wymienić oprócz wspomnianej już penicyliny, także cefalosporyny, tetracykliny, aminoglikozydy czy makrolidy. W grupie antybiotyków najnowszej generacji znalazły się glicylocykliny, oksazolidynony, lipiarmycyny oraz cykliczne lipopeptydy. Do ostatniej grupy należy m.in. daptomycyna – lipopeptyd dosyć dobrze już poznany i stosowany w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie gram-dodatnie. Jednym z największych problemów współczesnej medycyny jest nabywanie oporności przez niektóre bakterie na obecne stosowane antybiotyki. Wynika to przede wszystkim z ich nadużywania. Dlatego też, naukowcy poszukują nowych alternatywnych substancji przeciwbakteryjnych, które będą w stanie obejść problem antybiotykooporności dzięki odmiennym mechanizmom działania w porównaniu do aktualnie znanych leków.

Niniejsza praca doktorska dotyczy biomimetycznych filmów lipidowych oraz ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych. Do badań wykorzystałam przedstawicieli dwóch grup lipopeptydów: cykliczną daptomycynę oraz syntetyczne lipopeptydy stanowiące liniowe pochodne batacyny. Metody wykorzystujące filmy lipidowe na stałym podłożu bądź na granicy faz powietrze-woda były doskonałym narzędziem do zbadania oddziaływań wymienionych lipopeptydów z membranami lipidowymi o składzie reprezentatywnym dla bakterii gram-dodatnich oraz gram-ujemnych.

Najważniejszym celem mojej pracy doktorskiej było sprawdzenie czy oraz w jaki sposób lipopeptydy, takie jak daptomycyna bądź liniowe pochodne batacyny, oddziałują z biomimetycznymi filmami lipidowymi, oraz jaki jest ewentualny mechanizm ich działania.

Pierwszy etap badań obejmował analizę biomimetycznej membrany lipidowej zbudowanej z fosfatdyloetanoloamin (PE) i fosfatydylogliceroli (PG) pochodzących z bakterii *Escherichia coli*. Układ do badań wybrałam tak, aby możliwie jak najlepiej odzwierciedlał prosty model wewnętrznej błony bakterii gram-ujemnej (mieszanina PE:PG w stosunku molowym 8:2). Początkowo, film PE:PG został uformowany na granicy faz powietrze-woda przy wykorzystaniu metody Langmuira. Subfazą do badań był bufor fosforanowy o pH wynoszącym 7,4. Otrzymane izotermy, będące zależnością ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę, wykazały, że pojedyncze składniki PE oraz PG zajmują powierzchnię wynoszącą odpowiednio  $\sim 67 \text{ \AA}$  i  $\sim 103 \text{ \AA}$ , natomiast dla układu PE:PG wartość ta wynosi  $\sim 72 \text{ \AA}$ . Analiza wartości maksimum odwrotności współczynnika ściśliwości wykazała, że fosfolipid PE oraz mieszanina PE:PG znajdują się w fazie ciekłej skondensowanej, natomiast fosfolipid PG w fazie ciekłej rozprężonej. Następnie, sprawdziłam mieszalność składników monowarstwy PE:PG dzięki analizie zmian wartości nadmiarowej powierzchni mieszania ( $A^{exc}$ ) oraz nadmiarowej energii swobodnej mieszania ( $\Delta G^{exc}$ ) w funkcji ciśnienia powierzchniowego. Wyniki świadczą o tworzeniu się oddzielnych domen w monowarstwie PE:PG (8:2) w granicach ciśnienia powierzchniowego wynoszącego 30 – 35 mN/m (co potwierdziły również zdjęcia uzyskane dzięki mikroskopowi kąta Brewstera). W kolejnym etapie tej części badań, dwuwarstwę PE:PG (8:2) osadziłam na stałym podłożu (miki lub złocie) przez spontaniczne rozkładanie liposomów (SUVs). Wykazałam, że przy wykorzystaniu miki jako podłoża otrzymuje się membranę, gdzie można wyróżnić dwie domeny ( $L_\alpha$  i  $L_\beta$ ), które różnią się między sobą wartością modułu zginania oraz grubością, natomiast osadzenie na złocie powoduje otrzymanie jednorodnej dwuwarstwy PE:PG (8:2). Co więcej, wartość modułu Younga dla dwuwarstwy lipidowej PE:PG (8:2) osadzonej na złocie jest porównywalna z wartością uzyskaną dla fazy  $L_\beta$  gdy podłożem jest mika, jednakże uzyskałam niższą wartość modułu zginania. Z uzyskanych zależności można przypuszczać, że film osadzony na złocie wykazuje bardziej nieuporządkowany bądź ciekły charakter. Podsumowując pierwszy etap badań można wnioskować, że wybór podłoża będzie miał wpływ na morfologię membrany lipidowej, jak również na jej właściwości nanomechaniczne. Co więcej, na otrzymane różnice w budowie dwuwarstwy PE:PG (8:2) może mieć wpływ mechanizm rozkładania liposomów na podłożu: dla miki jest to proces jednoetapowy i bezpośredni, natomiast dla złota następuje on przez utworzenie struktury hemimicelarnej, a sam proces jest wieloetapowy.

W kolejnym etapie podjęłam się scharakteryzowania modelowej błony lipidowej tym razem o składzie charakterystycznym dla bakterii gram-dodatniej *Staphylococcus aureus*. Układ do badań stanowiła mieszanina fosfatydylogliceroli POPG, DPPG oraz CL w stosunku molowym 1:1:2, a doświadczenia prowadzone były w roztworze zawierającym bufor HEPES, chlorek potasu oraz chlorek wapnia. Eksperymenty, które przeprowadziłam na granicy faz powietrze-woda wskazują, że monowarstwa POPG:DPPG:CL (1:1:2) jest w fazie ciekłej skondensowanej i po przekroczeniu ciśnienia powierzchniowego wynoszącego 20 mN/m otrzymuje się jednorodny układ. Następny krok polegał na unieruchomieniu dwuwarstwy POPG:DPPG:CL (1:1:2) na powierzchni elektrody złotej przez rozkładanie liposomów (SUVs). Elektrode złotą wstępnie zmodyfikowałam tioglukozą, co pozwoliło wyeliminować wpływ metalicznego podłoża na morfologię membrany. Następnie, dzięki wykorzystaniu szeregu różnych metod, przeprowadziłam pełną analizę badanej dwuwarstwy:

- QCM-D – potwierdziłam uzyskanie planarnej dwuwarstwy POPG:DPPG:CL (1:1:2) na powierzchni Au(111);
- AFM – potwierdziłam jednorodność badanej dwuwarstwy;
- SEIRAS – uzyskałam informację o utworzeniu rezerwuaru wodnego między dwuwarstwą lipidową a osadzoną monowarstwą tioglukozy, a rezerwuar ten ma wpływ na zmianę właściwości nanomechanicznych dwuwarstwy – po raz pierwszy zostało zaobserwowane, że utworzona „poduszka” wodna wpływa na wartość modułu Younga, który maleje wraz ze wzrastającą hydratacją dwuwarstwy; dodatkowo warto zaznaczyć, że obecność wody między zmodyfikowanym podłożem a polarnym regionem dwuwarstwy powoduje jej odsunięcie od powierzchni podłoża i zmniejszenie sztywności.

Następnie, do układu POPG:DPPG:CL (1:1:2) wprowadziłam daptomycynę. Uzyskane wyniki wskazują na wbudowywanie się lipopeptydu do badanej monowarstwy (metoda Langmuira), jak również na zwiększenie przepuszczalności filmu lipidowego pod wpływem działania daptomycyny (elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, EIS). Uzyskany rezultat potwierdza przedstawiany w literaturze efekt depolaryzacji błony bakteryjnej pod wpływem działania lipopeptydów. Należy również wspomnieć o wysokim wpływie potencjału przyłożonego do elektrody na możliwe wbudowywanie się daptomycyny (woltamperometria zmiennoprądowa, ACV) i formowanie napięciowo-zależnych porów/agregatów w dwuwarstwie. Dodatkowo, w Zakładzie Genetyki Bakterii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w grupie prof. dr. hab. Dariusza Bartosika zostały przeprowadzone badania biologiczne (wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego oraz wpływ daptomycyny na wzrost różnych szczepów

bakterii w czasie rzeczywistym), które potwierdziły działanie daptomycyny jedynie względem bakterii gram-dodatnich.

Ostatni etap badań opierał się na wykazaniu oddziaływania zsyntezowanych liniowych analogów batacyny z filmami lipidowymi reprezentującymi bakterie gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*) i gram-ujemne (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Syntetyczne lipopeptydy zbudowane były z kwasu 4-metyloheksanowego oraz różnych ilości kwasu L-2,4-diaminomasłowego. Zostały oznaczone jako: C7-xXXLfX, C7-xXLfX, C7-xLfX, a całkowity ładunek wynosił odpowiednio +5, +4, oraz +3. Również w tym przypadku zostały przeprowadzone badania biologiczne (minimalne stężenie hamujące, MIC), jednakże wyniki wskazują na niską lub znikomą aktywność względem różnych szczepów bakterii gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych. W celu zbadania wpływu badanych lipopeptydów względem membran lipidowych charakterystycznych dla różnych rodzajów bakterii, wykorzystałam metodę Langmuira. Dla każdego z badanych układów (POPE:DPPG:POPG; POPE:DPPG:POPG:CL; POPG:DPPG:CL w stosunkach molowych odpowiednio 8:1,5:0,5; 6:1,5:0,5:1; 1:1:2) zaobserwowałam efekt upłynniania filmu lipidowego w efekcie działania lipopeptydów. Wykazałam, że wielkość ładunku cząsteczki lipopeptydu ma wpływ na efektywność jego wbudowywania się w monowarstwę. Przeprowadziłam również doświadczenia mające za zadanie sprawdzić dynamikę oddziaływania zsyntezowanych lipopeptydów ze skompresowaną monowarstwą (charakterystyczną dla danego układu) do ciśnienia wynoszącego 35 mN/m. Eksperymenty te pozwoliły na stwierdzenie, że każdy z lipopeptydów będący liniową pochodną batacyny, nie penetrował badanej monowarstwy, a jedynie adsorbował się w okolicach jej głów polarnych fosfolipidów. Rezultat ten może wynikać z wysokiej bariery dla reorientacji cząsteczek badanych lipopeptydów, na co mają wpływ oddziaływania elektrostatyczne w okolicach głów polarnych filmu lipidowego.