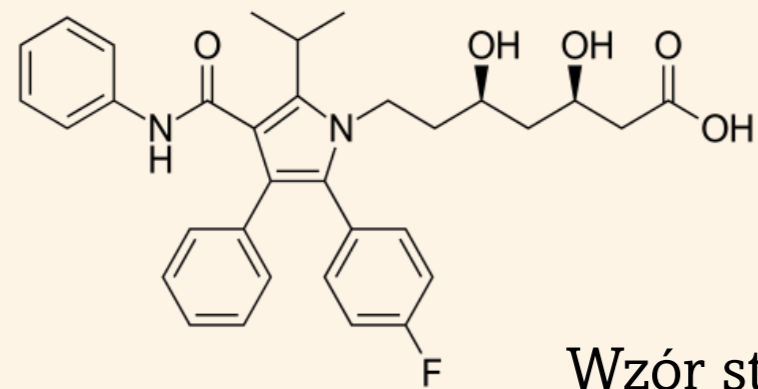


# Wpływ leku z grupy statyn – atorwastatyny – na organizację modelowej błony komórek HeLa

Anna Zakrzewska, prof. dr hab. Renata Bilewicz, mgr Elżbieta Jabłonowska

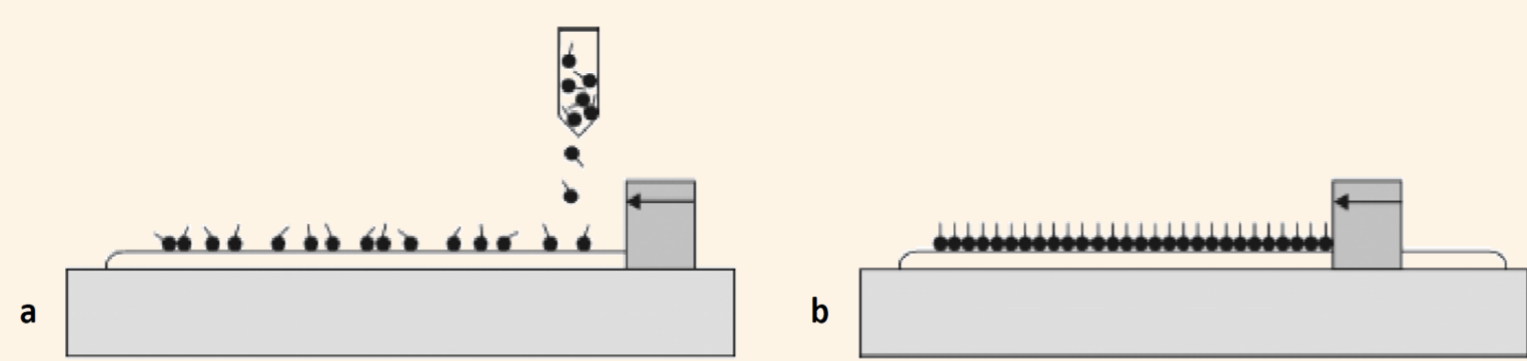
Celem przedstawianych badań jest określenie oddziaływania atorwastatyny, hydrofobowego leku z grupy statyn będących inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A i obniżającymi poziom cholesterolu LDL, na modelową błonę komórek HeLa. Wnioskuje się, że selektywne hamowanie wspomnianego enzymu może mieć także istotne znaczenie w chemioterapii chorób nowotworowych, co stało się podstawą do przeprowadzenia niniejszych badań.



Wzór strukturalny cząsteczki atorwastatyny

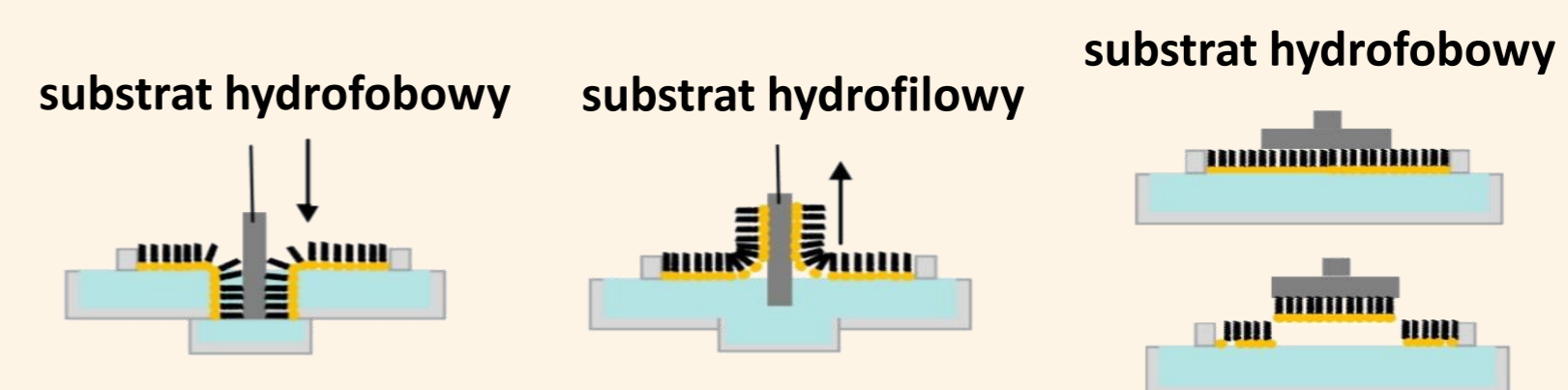
W trakcie badań modele błon biologicznych przygotowywane były metodą Langmuira w obecności atorwastatyny rozpuszczonej w subfazie (bufor PBS, pH 7,4), a następnie przekładane na stałe podłoże tj. szklane płytki pokryte przewodzącą warstwą tlenku indowocynowego (ITO). Ze względu na elektroaktywność atorwastatyny, a także jej adsorpcyjny charakter możliwe jest przeprowadzenie oznaczenia leku w dwuwarstwach lipidowych przy użyciu technik woltamperometrycznych. Ponieważ prąd pikowy reakcji elektrodowej jest wprost proporcjonalny do stężenia depolaryzatora, otrzymane wyniki pozwolą dalej na określenie stopnia wbudowywania się atorwastatyny do struktur biomimetycznych w stosunku do błon lipidowych.

## Otrzymywanie monowarstw Langmuira



Monowarstwy powstające na granicy faz roztwór-powietrze z amfifilowych cząsteczek substancji nierozpuszczalnych w wodzie nazywane są warstwami Langmuira. Dobór odpowiednich substancji do ich przygotowania pozwala na stworzenie modelu pojedynczej okładki wybranej błony biologicznej. Naniesione na powierzchnię subfazy cząsteczki (a) zbliżają się do siebie na skutek stopniowego zmniejszania dostępnej dla nich powierzchni tworząc dobrze zorganizowaną monowarstwę (b).

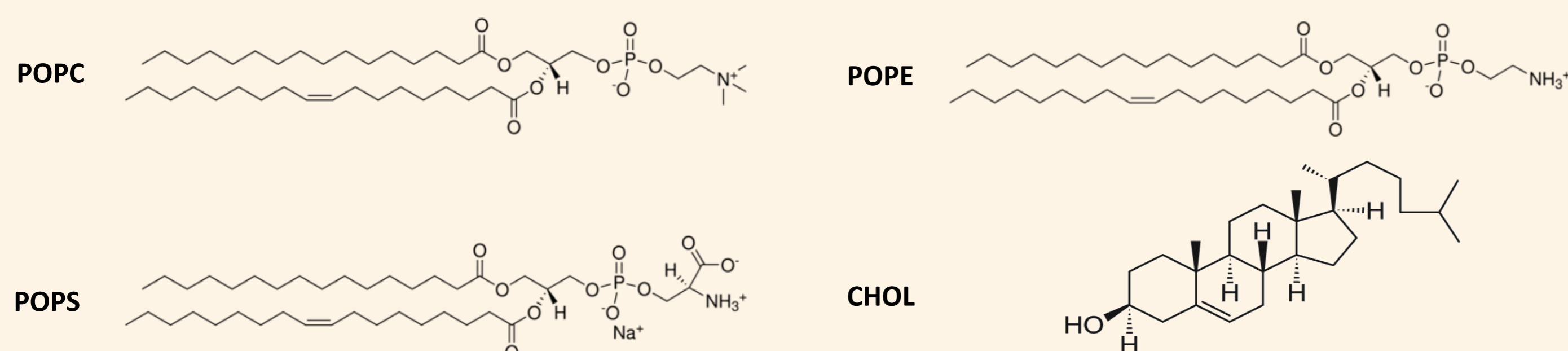
## Techniki Langmuira-Blodgett i Langmuira-Schaefera



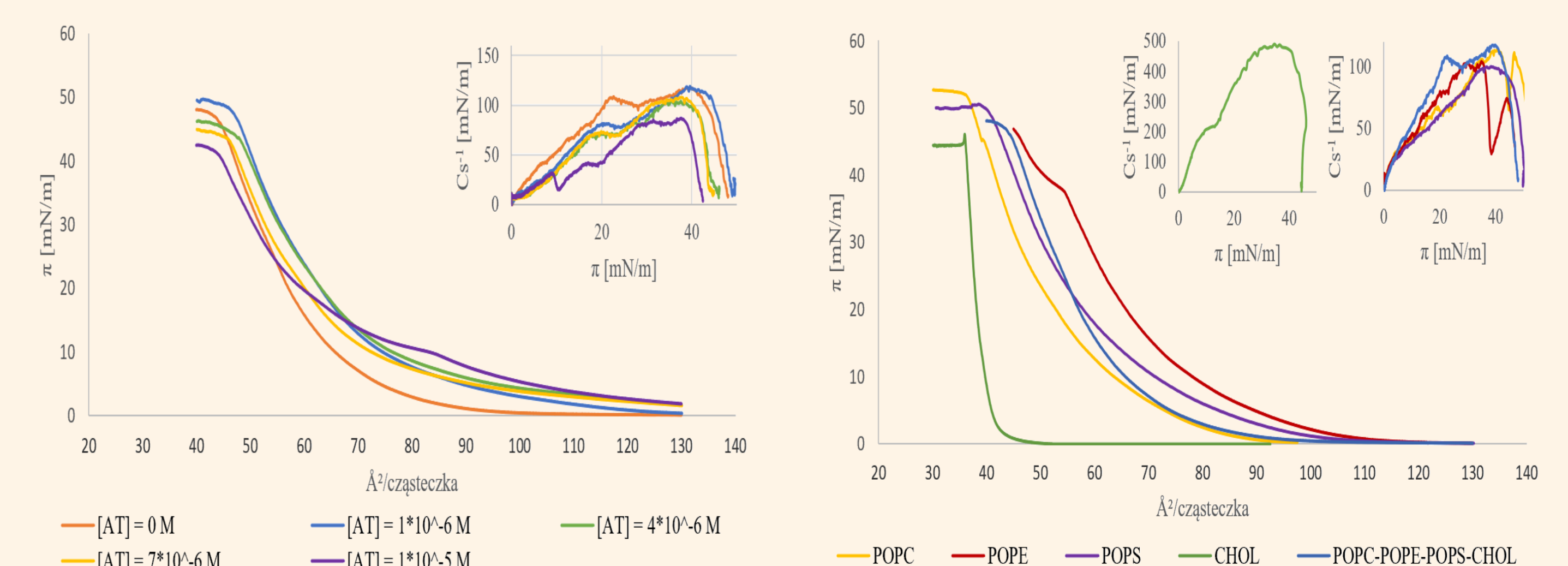
Techniki Langmuira-Blodgett i Langmuira-Schaefera pozwalają na przełożenie warstwy lipidowej z subfazy na stałe podłoże. Pierwsza z nich polega na wertykalnym wynurzeniu i/lub zanurzeniu substratu w subfazie, a wybór metody zależy od jego charakteru. W metodzie Langmuira-Schaefera transfer odbywa się poprzez przyłożenie poziomo usytuowanego podłoża do monowarstwy, której niepolarne ogony zorientowane są w kierunku powietrza.

## Komórki HeLa

Linia komórkowa HeLa jest najstarszą, najbardziej rozpowszechnioną, trwałą linią komórkową człowieka, która wywodzi się z komórek biopsji raka szyjki macicy pobranej od Henrietty Lacks w połowie XX w. Komórki te są w stanie przeżyć w warunkach *in vitro*, a tempo ich namnażania jest niezwykle szybkie, dlatego znajdują zastosowanie w licznych badaniach naukowych, w tym również badaniach służących do określania wpływu leków przeciwnowotworowych (także statyn) na metabolizm lipidów, ponieważ dowiedziono, że istnieje korelacja między funkcjonowaniem komórek nowotworowych, a składem lipidowym ich błon plazmatycznych.



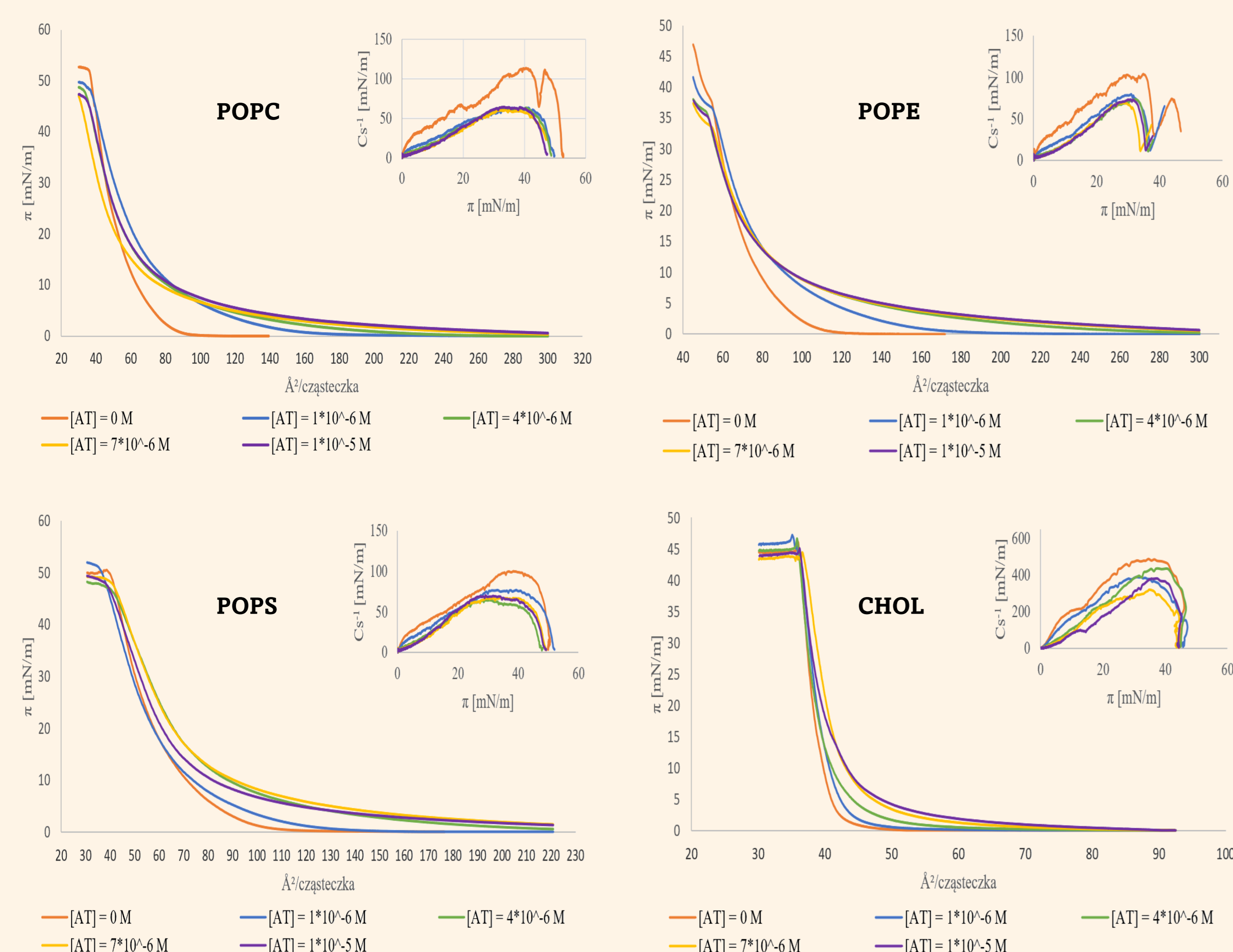
Botet-Carreras A. *et al.* [5] opracowali modelową dwuwarstwę lipidową naśladującą błonę plazmatyczną komórek HeLa. W jej skład wchodzi fosfolipidy z najistotniejszymi grupami głowy tj. 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina (POPC), 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryna (POPS) oraz cholesterol (CHOL) w stosunku molowym **0,29:0,31:0,06:0,34**.



Lipidy POPC, POPE oraz POPS tworzą ciekłe monowarstwy, dla których współczynnik ściśliwości przyjmuje wartości w zakresie 90 – 100 mN/m. Monowarstwa cholesterolu jest natomiast warstwą stałą. Składnik ten znacząco wpływa na stan fazowy układu POPC-POPE-POPS-CHOL na co wskazuje wyższa wartość współczynnika ściśliwości warstwy mieszanej w porównaniu z jej czystymi składnikami – POPC, POPE i POPS.

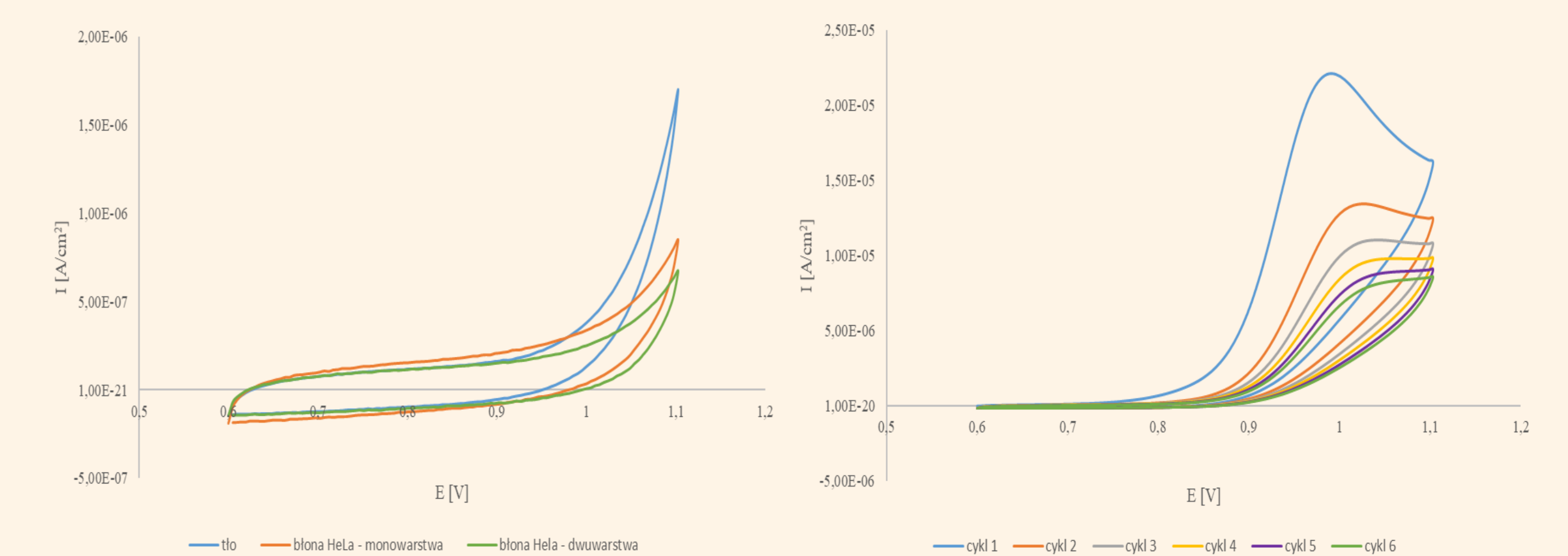
Wpływ atorwastatyny na warstwę mieszaną jest analogiczny, jak w przypadku jej czystych składników. Wraz ze zwiększaniem stężenia atorwastatyny w subfazie obserwuje się spadek wartości współczynnika ściśliwości otrzymanych monowarstw, a zatem wzrost ich ciekłości, a także obniżenie wartości ciśnienia powierzchniowego, przy którym występuje kolaps, a więc warstwa ulega zniszczeniu.

## Izotermy pi-A lipidów wchodzących w skład błony komórek HeLa na subfazie zawierającej atorwastatinę w zmiennym stężeniu



Atorwastatyna wbudowuje się we wszystkie warstwy lipidowe powodując wzrost ich ciekłości. Największe różnice w wartościach współczynników ściśliwości obserwuje się w przypadku lipidu POPC. Wyższe stężenia leku w subfazie zwiększają stopień wzbogacenia monowarstw o dodatkowy składnik, na co wskazuje przesunięcie kolejnych izoterm w kierunku wyższych wartości powierzchni przypadających na pojedynczą cząsteczkę. Punkty przecięcia krzywych uzyskanych w układzie z atorwastatiną i bez niej wskazują wartości ciśnienia powierzchniowego, powyżej którego lek przestaje się wbudowywać, a nawet wypływa ze struktury.

## Pomiary elektrochemiczne – woltamperometria cykliczna



Prądy pojemnościowe zarejestrowane w roztworze buforu cytrynianowego o pH 5,4 bez dodatku atorwastatyny – substancji elektroaktywnej – potwierdzają efektywne przełożenie warstw lipidowych na powierzchnię elektrod. Zgodnie z oczekiwaniem dwuwarstwa blokuje powierzchnię elektrody w większym stopniu niż monowarstwa, a utrudniona wymiana elektronów wiąże się ze spadkiem wartości rejestrowanego prądu.

Na woltamogramie atorwastatyny w buforze cytrynianowym o pH 5,4 obserwuje się pik utleniania przy potencjale ok. 1,0 V względem kalomelowej elektrody odniesienia. Spadek prądu pikowego w kolejnych cyklach świadczy o adsorpcyjnych właściwościach leku, który wiąże się z powierzchnią elektrody blokując wymianę elektronów w układzie. Reakcja elektrodowa ma charakter nieodwracalny.

## Wnioski

- ❖ Atorwastatyna wbudowuje się w błony lipidowe, co skutkuje zwiększeniem ich ciekłości, ale nie wpływa znacząco na ich strukturę;
- ❖ Wydaje się, że stopień wbudowywania atorwastatyny w warstwę lipidową jest tym większy im większe stężenie leku zostanie dodane do subfazy (w analizowanym zakresie stężeń);
- ❖ Pomiary elektrochemiczne mogą być wykorzystane w dalszej części badań do oznaczenia leku wbudowanego w modelową błonę biologiczną w różnych warunkach.