



Układy samoorganizujące na bazie surfaktantów  
polimerycznych i formułacji lipidowych, charakterystyka oraz  
zastosowanie do tworzenia stabilnych kompleksów  
z kwasami nukleinowymi

**Żaneta Polańska**

Promotor

Prof. Dr hab. Maciej Kozak

Promotor pomocniczy

Dr Zuzanna Pietralik-Molińska

Zakład Fizyki Biomedycznej

Wydział Fizyki i Astronomii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**Poznań 2024**



Niniejsza praca oraz prezentowane w niej badania wykonane zostały  
przy wsparciu finansowym

**Narodowego Centrum Nauki**  
**grant numer 2014/15/N/ST5/02003**



*Serdeczne podziękowania kieruję do mojego promotora prof. dr. hab. Macieja Kozaka, za inspirację, wyrozumiałość i pomoc przy realizacji tej pracy, a także ogromny optymizm i wiarę w powodzenie tego przedsięwzięcia.*

*Dziękuję także dr Zuzannie Pietralik-Molińskiej za wprowadzenie w fascynujący świat surfaktantów i lipidów, za wspólny czas spędzony w laboratorium, za kreatywność oraz wzbudzenie we mnie pasji i pokazanie, że nauka może również dostarczać wiele radości.*

*Chciałabym również gorąco podziękować dr Darii Wojciechowskiej, dr inż. Roksanie Markiewicz oraz dr Michałowi Taube, których wsparcie i pomoc szczególnie na „finiszu” była nieoceniona. Dziękuję Wam za wszelkie cenne sugestie, za inny punkt widzenia, za dobre słowo i racjonalizm we wszelkich „kryzysach”.*

*Dziękuję również prof. dr. hab. Ewie Banachowicz za wiele interesujących rozmów i dyskusji nie tylko na tematy naukowe.*

*Prof. dr. hab. Zbigniewowi Fojudowi, prof. dr. hab. Kosmie Szutkowskiemu, dr Marii Dobies, dr inż. Markowi Weissowi, prof. dr. hab. Arkadiuszowi Ptakowi, prof. dr. hab. Hannie Kmicie, mgr Joannie Wolak oraz wszystkim pracownikom, doktorantom i studentom Zakładu Fizyki Biomedycznej UAM pragnę podziękować za przyjazną i twórczą atmosferę pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję do moim najbliższych: Rodziców, Dziadków, Męża oraz dzieci za wyrozumiałość, wsparcie i poświęcenie.*



*Pracę dedykuję:*

*Stasiowi, Rysiowi i Helenie*





# Spis treści

<b>Streszczenie .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>Cel pracy.....</b>	<b>15</b>
<b>Wstęp.....</b>	<b>17</b>
<b>1    Terapia genowa.....</b>	<b>19</b>
1.1   Podstawy terapii genowej.....	20
1.2   Systemy do transportu transbłonowego kwasów nukleinowych.....	23
1.2.1   Wirusowe wektory .....	23
1.2.2   Niewirusowe wektory.....	25
1.3   Mechanizm transportu transbłonowego niewirusowych wektorów .....	29
<b>2    Surfaktanty oligomeryczne.....</b>	<b>35</b>
2.1   Budowa surfaktantów oligomerycznych.....	36
2.2   Surfaktanty oligomeryczne w roztworach wodnych .....	38
2.2.1   Rozpuszczalność surfaktantów.....	38
2.2.2   Proces samoorganizacji surfaktantów.....	39
2.2.3   Adsorpcja na granicy faz.....	42
2.3   Potencjalne zastosowania surfaktantów oligomerycznych.....	43
<b>3    Lipopleksy na bazie surfaktantów oligomerycznych i lipidów .....</b>	<b>45</b>
3.1   Oddziaływania surfaktantów z kwasami nukleinowymi.....	45
3.2   Układy surfaktant/lipid.....	48
3.3   Układy trójskładnikowe surfaktant/lipid/DNA.....	52
<b>4    Przegląd wybranych metod badawczych stosowanych do charakterystyki lipopleksów.....</b>	<b>53</b>
4.1   Metody eksperymentalne wykorzystywane do charakterystyki surfaktantów .....	53
4.1.1   Spektroskopia UV-Vis.....	57
4.1.2   Spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera .....	58
4.1.3   Spektroskopia fluorescencyjna .....	61
4.1.4   Konduktometria .....	63
4.1.5   Dynamiczne rozpraszanie światła .....	64
4.2   Metody stosowane do oceny stabilności kompleksów DNA.....	66
4.2.1   Elektroforeza żelowa w obecności bromku etydyny.....	66
4.2.2   Potencjał zeta .....	67
4.3   Ocena konformacji DNA.....	69
4.3.1   Dichroizm kołowy.....	69
4.3.2   Pasma charakterystyczne dla form DNA w widmach FTIR .....	70
4.4   Testy cytotoksyczności.....	71
4.5   Przemiany fazowe w układach fosfolipidów.....	73
4.5.1   Różnicowa kalorymetria skaningowa.....	73
4.5.2   Pasma charakterystyczne w analizie przemian fazowych fosfolipidów na podstawie FTIR.....	75

4.6	Badania strukturalne lipopleksów .....	76
4.6.1	Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego .....	76
4.6.2	Mikroskopia sił atomowych .....	81
<b>5</b>	<b>Materiały i metody eksperymentalne .....</b>	<b>83</b>
5.1	Badane związki.....	83
5.2	Preparatyka próbek.....	86
5.2.1	Przygotowanie roztworów wyjściowych.....	86
5.2.2	Przygotowanie kompleksów DNA.....	87
5.3	Aparatura pomiarowa.....	88
<b>6.</b>	<b>Prezentacja i analiza wyników .....</b>	<b>93</b>
6.1.	Charakterystyka zastosowanych surfaktantów trimerycznych .....	93
6.1.1.	Budowa chemiczna badanych surfaktantów trimerycznych .....	93
6.1.2.	Krytyczne stężenie micelizacji i agregacji surfaktantów trimerycznych .....	94
6.1.3.	Liczba agregacji.....	101
6.2.	Ocena właściwości biologicznych układów surfaktant/DNA oraz surfaktant/lipid/DNA.....	103
6.2.1.	Proces kompleksowania .....	103
6.2.2.	Proces uwalniania materiału genetycznego .....	110
6.2.3.	Ocena zmian konformacyjnych DNA w kompleksie z surfaktantem.....	112
6.2.4.	Cytotoksyczność surfaktantów i układów surfaktant/fosfolipid .....	120
6.3.	Ocena właściwości fizycznych układów surfaktant/fosfolipid i surfaktant/lipid/DNA .....	125
6.3.1	Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach fosfolipidowych ..	125
6.3.2	Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach surfaktant/fosfolipid.....	137
6.3.3	Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach trójskładnikowych.....	152
6.3.4	Zmiany stopnia hydratacji części polarnych fosfolipidów w układach dwuskładnikowych .....	157
6.4	Określenie parametrów strukturalnych wybranych układów za pomocą techniki SAXS.....	163
6.5	Określenie topografii wybranych układów surfaktant/DNA oraz surfaktant/lipid/DNA przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych .....	175
<b>7</b>	<b>Dyskusja i podsumowanie wyników .....</b>	<b>185</b>
7.1	Charakterystyka surfaktantów trimerycznych.....	185
7.2	Charakterystyka formulacji lipidowych.....	188
7.3	Wpływ surfaktantów trimerycznych na formulacje lipidowe.....	194
7.4	Układy lipid/surfaktant/DNA .....	198
7.5	Dalsze plany badawcze .....	206
<b>8</b>	<b>Wnioski końcowe .....</b>	<b>209</b>
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>213</b>

### **Układy samoorganizujące na bazie surfaktantów polimerycznych i formułacji lipidowych, charakterystyka oraz zastosowanie do tworzenia stabilnych kompleksów z kwasami nukleinowymi**

Terapia genowa to szczególna gałąź współczesnej medycyny, pozwalająca na leczenie chorób na poziomie genów, a kluczem do jej skuteczności jest opracowanie wydajnych i bezpiecznych nośników (tzw. wektorów) materiału genetycznego. W ostatnim czasie dużym zainteresowaniem cieszą się niewirusowe wektory w szczególności otrzymywane na bazie kationowych surfaktantów, lipidów czy polimerów. Mają one istotną przewagę nad stosowanymi od lat wirusowymi wektorami (np. opartymi na retro- i adenowirusach), którym zarzuca się, że mogą wywoływać efekty uboczne w postaci np. cytotoksyczności, silnej odpowiedzi immunologicznej czy onkogenności. Niewirusowe wektory do transfekcji efektywnie wiążą się z materiałem genetycznym, mają niemal nieograniczoną pojemność, są łatwe i tanie w produkcji, a przy tym są bezpieczne dla organizmu (niska immunogenność). Niewirusowym nośnikiem, zarzuca się natomiast niską wydajność transfekcji, jednak problem ten można łatwo rozwiązać poprzez odpowiednią modyfikację nośnika.

Dobrym kandydatem na niewirusowy nośnik są kationowe surfaktanty trimeryczne, które ze względu na zwielokrotniony ładunek elektryczny i liczbę łańcuchów alkilowych, wykazują zdecydowanie lepsze właściwości od swoich monomerycznych odpowiedników np. kompleksują materiał genetyczny przy niższym stężeniu, tym samym można obniżyć potencjalne efekty cytotoksyczne.

Innym sposobem redukcji potencjalnych efektów cytotoksycznych nośników na bazie surfaktantów trimerycznych może być wprowadzenie do systemu lipidów, które naturalnie występują w błonach biologicznych. Oprócz obniżenia efektów cytotoksycznych i zwiększenia biokompatybilności nośnika, dodatek lipidów może również poprawić wydajność transfekcji do komórek żywych.

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie i charakterystyka systemów na bazie kationowych surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako niewirusowych nośników do terapii genowej. W pracy badano układy na bazie surfaktantów trimerycznych (różniących się częścią polarną), formułacji lipidowych (DMPC – oznaczony jako L1, DMPC/DOPE – L2, DMPC/DPPC/DOPE – L3) i DNA o różnej długości.

Ze względu na innowacyjność badanych w pracy surfaktantów trimerycznych, w pierwszej kolejności zdecydowano się przeprowadzenie badań pod kątem ich zdolności do agregacji i micelizacji. W tym celu zastosowano metody pomiarowe: konduktometrię, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fluorescencji, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS). Badane surfaktanty trimeryczne różniły się budową części polarnej, w której skład wchodziła czwartorzędowa sól amoniowa, ugrupowanie imidazoliowe lub benzimidazoliowe. Wyniki pomiarów krytycznego stężenia agregacji *CAC* oraz krytycznego stężenia micelizacji *CMC*, wykazały, że uzyskane wartości są znacznie niższe niż dla monomerycznych analogów surfaktantów, a istotny wpływ na wartość *CMC* i *CAC* ma obecność struktur aromatycznych w budowie surfaktantu.

Na podstawie wyników badań przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), wyznaczono parametry termodynamiczne przemian fazowych badanych fosfolipidów, takie jak: temperatura przejścia fazowego, zakres przemiany fazowej, entalpia przemiany. Badania DSC oraz FTIR wykazały, że w wieloskładnikowych układach lipidowych wzrasta płynność błony lipidowej, co może poprawiać właściwości fuzyjne nośnika z żywą komórką.

W układach typu lipid/surfaktant trudno wskazać jednoznaczną tendencję, jednak dla większości układów na termogramach DSC obserwowano separację fazową na regiony błony lipidowej ubogie i bogate w surfaktanty. Na podstawie wyników FTIR stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia surfaktantów w układzie wzrasta płynność błony lipidowej.

Krzywe SAXS dla badanych mieszanin lipidowych wskazują na obecność kanałów wodnych, które są szczególnie cenione w projektowaniu nośników leków. W układach typu lipid/surfaktant – surfaktant zaburza lamelną strukturę DMPC, indukując powstawanie i/lub współistnienie struktur unilamelarnych np. biceli. Wbudowywanie się cząsteczek DNA zaburza dodatkowo strukturę fosfolipidów w układach trójskładnikowych. Dochodzi do zwiększenia grubości dwuwarstwy lipidowej i przejścia łańcuchów alkilowych w konformację *gauche*.

Na podstawie testów elektroforetycznych w żelu agarozowym oraz elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS), dla układów typu lipid/surfaktant/DNA określono warunki tworzenia stabilnych kompleksów z DNA o różnej długości. Dowiedziono, że wielkość części polarnej surfaktantu ma wpływ na zdolności do kompleksowania DNA. Co więcej dodatek fosfolipidów w układach znacząco obniża  $p/n$  wymagane do utworzenia kompleksu z DNA. Otrzymane wyniki wykazały, że sztywność cząsteczki DNA wpływa na proces kompleksowania – długie fragmenty kompleksują przy niższych wartościach stosunku  $p/n$ . Dowiedziono, że siła wiązania materiału genetycznego wzrasta wraz ze stężeniem surfaktantu w układzie, a dodatek lipidów w układzie dodatkowo go stabilizuje.

Konformację kwasu nukleinowego w utworzonych kompleksach zbadano przy użyciu spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). W układach surfaktant/DNA, obserwowano kondensowanie się struktury DNA, ale pozostawała ona w formie B-DNA, a jedynie dla jednego układu obserwowano silną kondensację - fazę psi. Natomiast w układach lipid/surfaktant/DNA – DNA nie zmienia swojej formy, pozostaje prawoskrętną helisą.

Do badań cytotoxycywności proponowanych układów zastosowano testy cytotoxycywności MTT i analizy żywotności komórek przy użyciu błękitu trypanu. Surfaktanty trimeryczne wykazują wysoką cytotoxycywność, ale efekty te zostają silnie zredukowane po dodaniu fosfolipidów do układu. Największą redukcję cytotoxycywności obserwowano dla układów na bazie formułacji L2. Choć układy na bazie L3 nie wykazywały takiego spadku cytotoxycywności, to ze względu na zróżnicowanie długości łańcuchów alkilowych w tym układzie mogą uzyskać wysoką wydajność transfekcji.

Wykorzystano też mikroskopię sił atomowych (AFM) do oceny topografii kompleksów DNA, a uzyskane wyniki korespondowały z wynikami badań spektroskopowych.

Reasumując, otrzymane wyniki potwierdziły potencjał aplikacyjny proponowanych systemów na bazie surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych jako niewirusowych nośników, także pozwoliły wytypować najbardziej obiecujące układy do dalszych badań pod kątem ich zastosowania.

## Abstract

---

### **Self-assembling systems based on polymeric surfactants and lipid formulations, characterization, and application for forming stable complexes with nucleic acids**

Gene therapy is a novel form of modern medicine that allows the treatment of diseases at the gene level. The key to its effectiveness lies in the development of efficient and safe carriers of genetic material. Recently, non-viral vectors, particularly those based on cationic surfactants, lipids, or polymers have gained popularity. They hold significant advantages over viral vectors (e.g. those based on retro- and adenoviruses), which have been used for years but are associated with side effects such as cytotoxicity, strong immune response, or oncogenicity. Non-viral transfection vectors effectively bind to genetic material, offer almost unlimited capacity, are easy and inexpensive to produce, and are safe for the body due to their low immunogenicity. While non-viral carriers have been criticized for low transfection efficiency, this issue can be resolved through appropriate carrier modifications.

A promising candidates for a non-viral carriers are cationic trimeric surfactants, which, due to their multiplied electric charge and the number of alkyl chains, exhibit far better properties than their monomeric counterparts. For instance, they complex with genetic material at lower concentrations, reducing potential cytotoxic effects.

Another approach to minimizing the cytotoxic effects of carriers based on trimeric surfactants is to add lipids that naturally occur in biological membranes. This not only reduces cytotoxic effects and increases the biocompatibility of the carrier but also enhances the efficiency of transfection into living cells.

The primary goal of this study was to obtain and characterize systems based on cationic trimeric surfactants and lipid formulations for their potential use as non-viral carriers in gene therapy. In this research, systems consisting of trimeric surfactants (differing in their polar parts), lipid formulations (DMPC – marked as L1, DMPC/DOPE – L2, DMPC/DPPC/DOPE – L3), and DNA of various lengths were studied.

Given the innovative nature of the trimeric surfactants explored in this study, initial research focused on their aggregation and micellization abilities. To achieve this, the following measurement techniques were employed, including conductometry, UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and small-angle X-ray scattering (SAXS). The trimeric surfactants studied varied in the structure of their polar parts, which included a quaternary ammonium salt, an imidazolium, or benzimidazolium moiety. The results of measurements of the critical aggregation concentration *CAC* and the critical micellization concentration *CMC* showed that the obtained values were much lower than those of monomeric surfactant analogs. Additionally, the presence of aromatic structures in the surfactant significantly impacted *CMC* and *CAC* values.

Based on the results from Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC), the thermodynamic parameters of the phase transitions in the phospholipids were determined, such as the phase transition temperature, phase transition range, and transformation enthalpy. The DSC and FTIR studies revealed that, in multicomponent lipid systems, the fluidity of the lipid membrane increases, which may enhance the fusion properties of the carrier with a living cell.

In lipid/surfactant systems, identifying a clear trend was difficult. However, phase separation into regions of the lipid membrane that were poor and rich in surfactants was observed in most DSC thermograms. FTIR results showed that as the concentration of surfactants in the system increased, the fluidity of the lipid membrane also increased.

SAXS curves for the studied lipid mixtures indicated the presence of water channels, which are especially valued in drug carrier design. In lipid/surfactant systems, the surfactant disrupted the lamellar structure of DMPC, inducing in some cases, the formation of coexistence of unilamellar structures, such as bicells. The incorporation of DNA molecules further disrupted the phospholipid structure in ternary systems. The thickness of the lipid bilayer increased, and the alkyl chains transitioned into gauche conformation.

Based on electrophoretic tests in agarose gel and electrophoretic light scattering (ELS) studies, conditions for the formation of stable DNA complexes of varying lengths were determined in lipid/surfactant/DNA systems. It was demonstrated that the size of the surfactant's polar part affected its ability to complex DNA. Furthermore, the addition of phospholipids to the systems significantly lowered the  $p/n$  ratio required to form a complex with DNA. Results indicated that the rigidity of the DNA molecule influenced the complexation process, with longer fragments forming complex at lower  $p/n$  values.

Circular dichroism spectroscopy (CD) was used to study the nucleic acid conformation in the formed complexes. In surfactant/DNA systems, condensation of the DNA structure was observed, although it remained in the form of B-DNA. Strong condensation, forming the psi phase, was noted only in one system. Whereas, in lipid/surfactant/DNA systems – DNA does not change its form, it remains a right-handed helix.

MTT cytotoxicity assays and cell viability analysis using trypan blue were conducted to assess the cytotoxicity of the proposed systems. Trimeric surfactants exhibited high cytotoxicity, but these effects are significantly reduced with the addition of phospholipids. The greatest reduction in cytotoxicity was observed in systems based on L2 formulations. Although L3-based systems did not show as pronounced a decrease in cytotoxicity they demonstrated high transfection efficiency due to the variation in alkyl chain lengths. Atomic force microscopy (AFM) was also used to evaluate the topography of the DNA complexes, and the results were consistent with spectroscopic findings.

In conclusion, the results confirmed the potential application of the proposed systems, based on trimeric surfactants and lipid formulations, as non-viral carriers. The study also identified the most promising systems for further investigation regarding their practical use.

## Cel pracy

---

Głównym celem, który postawiono sobie podczas przygotowywania niniejszej dysertacji było opracowanie metod otrzymywania i charakterystyka układów do transfekcji kwasów nukleinowych na bazie kationowych surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych oraz zweryfikowanie ich potencjalnego zastosowania jako niewirusowych nośników do terapii genowej. Do badań właściwości proponowanych układów zastosowano metody pomiarowe takie jak: testy elektroforetyczne w żelu agarozowym, elektryczne rozpraszanie światła (ELS), testy cytotoksyczności MTT, analiza żywotności komórek przy użyciu błękitu trypanu, spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), spektroskopię podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS) oraz mikroskopię sił atomowych (AFM).

Cele szczegółowe realizowane w pracy to:

- określenie warunków tworzenia stabilnych kompleksów surfaktant/DNA oraz kompleksów fosfolipid/surfaktant/DNA,
- zbadanie konformacji kwasu nukleinowego w utworzonych kompleksach,
- wyznaczenie parametrów fazowych fosfolipidów w układach mieszanych fosfolipid/surfaktant oraz w układach fosfolipid/surfaktant/DNA,
- wyznaczenie parametrów strukturalnych badanych układów,
- ocena cytotoksyczności proponowanych nośników.

Ze względu na innowacyjność badanych w pracy surfaktantów trimerycznych, zdecydowano się przeprowadzenie badań pod kątem ich zdolności do agregacji i micelizacji. W tym celu zastosowano metody pomiarowe: konduktometrię, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fluorescencji, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS).

Do badań wybrano kationowe surfaktanty trimeryczne o tej samej długości łańcucha alkilowego, ale różniące się częścią polarną, złożoną odpowiednio z IV-rzędowego kationu amoniowego, imidazoliowego lub benzimidazoliowego:

- trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloamoniowy) – oznaczony jako TRI\_N,
- trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloimidazoliowy) – oznaczony jako TRI\_IMI,
- trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecylobenzimidazoliowy) – oznaczony jako TRI\_BEN.

W pracy zbadano formułacje lipidowe na bazie fosfolipidów:

- 1,2-dimyristylo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina – DMPC,
- 1,2-dimyristylo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina – DOPE,
- 1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfatydyloetanolamina – DPPC.

Do badań przygotowano roztwory wodne układów referencyjnych: surfaktantów, badanych formułacji lipidowych, kwasów nukleinowych oraz mieszanych układów typu: fosfolipid/surfaktant, surfaktant/DNA oraz fosfolipid/surfaktant/DNA o różnym składzie.





## Wstęp

---

Współczesna medycyna coraz częściej decyduje się na leczenie chorób, sięgając do ich podstaw molekularnych, aby leczyć przyczynę a nie wyłącznie wywołane przez nią efekty niepożądane. Taką możliwość zapewnia terapia genowa, która polega na wprowadzeniu do organizmu prawidłowej kopii genu, który poprzez zamianę, naprawę lub wyciszenie ekspresji wadliwego genu, złagodzi objawy chorobowe (np. mukowiscydozy, stwardnienia rozsianego, nowotworów, choroby Alzheimera, artretyzmu czy mukopolisacharydozy). Kluczem do sukcesu terapii genowej jest opracowanie nośników (wektorów), które w sposób efektywny (wysokie stężenie terapeutyczne, celowe dostarczenie) i bezpieczny (minimalna toksyczność dla organizmu, ochrona materiału genetycznego przed czynnikami zewnętrznymi) dostarczy transgen do komórek docelowych. Choć od lat znane i stosowane są wektory wirusowe (głównie oparte na retro- i adenowirusach), to ze względu na potencjalne efekty uboczne (silna odpowiedź immunologiczna, potencjalna onkogenność czy cytotoksyczność), poszukuje się nowych niewirusowych nośników.

Wektory niewirusowe oparte są przede wszystkim na kationowych polimerach, lipidach lub surfaktantach. Ich dodatni ładunek elektryczny pozwala efektywnie łączyć się z materiałem genetycznym. Wykazują one niemal nieograniczoną pojemność, przy zachowaniu niskiej immunogenności. Dodatkowo są łatwe i tanie w produkcji. Często jednak niewirusowym nośnikom zarzuca się małą wydajność transfekcji, co zniwelować można stosując odpowiednie metody modyfikacji nośników.

Obiecujące wyniki uzyskano dla niewirusowych wektorów na bazie kationowych surfaktantów gemini (dimerycznych). Wykazują one znacznie lepsze właściwości w porównaniu do ich monomerycznych odpowiedników. Jednak, o ile surfaktanty gemini są dość intensywnie badane pod kątem potencjalnego zastosowania jako wektory, to rzadko stosuje się surfaktanty o wyższym stopniu oligomeryczności. W ich przypadku zwielokrotniony ładunek elektryczny, jak również występowanie większej ilości łańcuchów alkilowych może dodatkowo zwiększyć efektywność łączenia się z transgenem. Wyższy stopień oligomeryczności surfaktantu wiąże się potencjalnie również z wyższą cytotoksycznością. Problem ten można rozwiązać wprowadzając do systemu neutralne lipidy, które naturalnie występują w błonach biologicznych. Zabieg ten oprócz obniżenia efektów cytotoksycznych i zwiększenia biokompatybilności układu, może poprawić wydajność transfekcji. Co więcej zróżnicowanie lipidów pod względem długości łańcucha alkilowego i stopnia jego nasycenia może mieć korzystny wpływ na wydajność terapii genowej.

Głównym celem pracy było otrzymanie i charakterystyka systemów na bazie kationowych surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako niewirusowych nośników do terapii genowej.

Rozdział pierwszy części teoretycznej przybliży podstawowe zagadnienia z zakresu terapii genowej. Zawarte w tym rozdziale informacje o systemach do transportu transbłonowego oraz o mechanizmach, jakie rządzą tym transportem, pozwala zrozumieć, czym należy się kierować projektując niewirusowe nośniki. W kolejnym rozdziale szeroko przedstawiona zostaje budowa i właściwości surfaktantów oligomerycznych, które czynią je wyjątkowymi. Dodatkowo przedstawiono wybrane potencjalne zastosowania surfaktantów oligomerycznych, podkreślając ich przewagę nad ich monomerycznymi odpowiednikami. Rozdział trzeci to przedstawienie krok po kroku koncepcji projektowania

niewirusowego wektora na bazie surfaktantów i fosfolipidów. Zawarto w nim informacje o dotychczasowych osiągnięciach, jak i właściwościach rozważanych systemów: od oddziaływania kwasów nukleinowych z surfaktantami, poprzez wpływ surfaktantów na fosfolipidy aż po właściwe kompleksy, czyli układy trójskładnikowe fosfolipid/surfaktant/DNA. W rozdziale czwartym przedstawiono metody pomiarowe wykorzystane do charakterystyki badanych układów. Zestawiono je według problemu, który mają wyjaśnić.

Część eksperymentalna otwiera przedstawienie badanych związków wraz z wyjaśnieniem czym się kierowano w ich doborze. Omówiono również preparatykę próbek oraz aparaturę pomiarową. Następnie przystąpiono do prezentacji wyników. W pierwszej kolejności przedstawiono wyniki badań właściwości kationowych surfaktantów trimerycznych. Surfaktanty różniły się częścią polaną (IV-rzędowa sól amoniowa, imidazoliowa lub benzimidazoliowa), dzięki czemu możliwe było uzyskanie zróżnicowanych właściwości. Wyznaczono zatem jak zmiana budowy części polarnej wpływa na wartość krytycznego stężenia agregacji oraz micelizacji, liczbę agregacji oraz wielkość miceli surfaktantów (rozdział 6.1). Następnie proponowane systemy do transfekcji zbadano pod kątem wiązania i uwalniania materiału genetycznego, wpływu na konformację DNA oraz cytotoksyczności (rozdział 6.2). W kolejnym rozdziale scharakteryzowano formułacje lipidowe, układy fosfolipid/surfaktant oraz układy fosfolipid/surfaktant/DNA o różnym składzie pod kątem właściwości termodynamicznych, dynamiki konformacyjnej oraz zmian hydratacyjnych (rozdział 6.3). Ostatnim etapem części eksperymentalnej była charakterystyka strukturalna przy pomocy badań SAXS (rozdział 6.5) oraz obrazowanie AFM topografii (rozdział 6.6) wybranych układów.

Rozdział siódmy to podsumowanie i dyskusja otrzymanych wyników, choć wiele kwestii było już wstępnie omawianych w trakcie analizy wyników, co w dużej mierze wynikało to z wyjaśnienia sposobu analizy danych. Główne wnioski zestawiono w rozdziale ósmym.

# 1 Terapia genowa

---

Za początki genetyki, jako dziedziny nauki zajmującej się dziedzicznością, przyjmuje się badania Grzegorza Mendla nad krzyżowaniem osobników i otrzymywaniem u nich pożądaných cech na przykładzie groszku zwyczajnego *Pisum sativum*, których wyniki się w II połowie XIX wieku. Sam termin „genetyka” wprowadził William Bateson w 1906 roku, rozwinął on także prawa Mendla, wprowadzając terminy takie jak: allele, heterozygota czy homozygota, a także wykazując, że prawa te mają słuszność dla wszystkich organizmów rozmnażających się płciowo [1]. Choć definicja genu, jako czynnika dziedziczenia, ewoluowała wraz z kolejnymi odkryciami m. in. z zakresu mikrobiologii (transformacja, transdukcja, koniugacja bakterii), dopiero od 1953 roku dzięki pracy nad strukturą DNA Francisca Cricka i Jamesa Watsona, w pełni została sformułowana w formie, którą obecnie znamy [1, 2]. Ogromny wkład w rozwój genetyki również wnieśli Marshall W. Nirenberg i Johann H. Matthaei, którzy w latach 1961 - 1966 rozszyfrowali kod genetyczny, czyli określili sekwencję nukleotydową kodonów, odpowiadających poszczególnym aminokwasom w łańcuchu polipeptydowym. Tym samym udowodnili, że materiał genetyczny jest uniwersalny dla wszystkich organizmów żywych [3 - 5].

Przełom w biologii molekularnej to także badania Wacława Szybalskiego, który w 1962 roku przeprowadził pierwszy udokumentowany transfer genów na ssaczych liniach komórkowych. Badania te pokazały, że defekt genetyczny (w tym przypadku brak genu) może zostać naprawiony przez transfer danego genu z zewnętrznego źródła. Co więcej, zmiany takie mogą być dziedziczne w kolejnych pokoleniach [2, 6]. Tak ważne odkrycie stało się punktem wyjścia dla terapii genowej – dziedziny medycyny mającej na celu leczenie chorób na poziomie materiału genetycznego, której koncepcję w 1972 roku rozwinęli Theodore Friedmann i Richard Roblin [7].

Pierwsze próby kliniczne terapii genowej na ludziach przeprowadzono już w 1988 roku. Natomiast pierwszym zarejestrowanym i komercyjnie dostępnym lekiem był Gendicine™ (Chiny, 2003) – stosowany do leczenia raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi związanego z mutacją genu *TP53* [2,8]. Do sierpnia 2019 roku zarejestrowano 22 leki genetyczne z czego 8 przeciwko chorobom monogenetycznym, 6 – przeciw nowotworom, 4 – przeciw chorobom układu sercowo-naczyniowego i innym [7]. Według Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków, obecnie zatwierdzonych jest 38 leków do terapii komórkowej i genowej (stan na 17.09.2024) [9].

Na etapie badań jest wiele nowych terapii genowych i zgodnie z bazą danych Gene Therapy Clinical Trials Worldwide ich liczba ciągle rośnie: od 1989 roku do 2017 liczba zarejestrowanych badań wynosiła 2597, natomiast do marca 2023 roku - 3900 (stan na maj 2023 roku). Badania te nacelowane są w głównej mierze na terapię przeciwnowotworowe (ok. 68% badań), terapię przeciwko monogenetycznym chorobom (ok. 13%), chorobom zakaźnym (ok. 6%), chorobom układu sercowo-naczyniowego (ok. 6%) oraz chorobom neurologicznym (w tym neurodegeneracyjnym) - ok. 2% [10, 11].

## 1.1 Podstawy terapii genowej

---

Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) określa preparaty stosowane w terapii genowej jako produkty lecznicze, zawierające substancję czynną stosowaną w celu regulacji, naprawy, zastępowania, dodawania lub usuwania sekwencji genetycznej; a jej działanie terapeutyczne, efekt profilaktyczny lub diagnostyczny jest bezpośrednim wynikiem zawartego w niej kwasu nukleinowego bądź produktu ekspresji genetycznej tej sekwencji [2]. Celem terapii genowej jest uzyskanie długotrwałej ekspresji genu na poziomie wystarczającym do złagodzenia lub zminimalizowania niepożądanych efektów chorobowych [12].

Transgen to materiał genetyczny przeniesiony między dwoma różnymi komórkami w obrębie tego samego organizmu lub między komórkami różnych organizmów. Transgenem może być zarówno kwas deoksyrybonukleinowy DNA, jak i kwas rybonukleinowy RNA. Główną funkcją kwasów nukleinowych jest przechowywanie, przekazywanie i ekspresja informacji genetycznej, ale biorą one również udział w rozmaitych procesach, jako cząsteczki transportowe (tRNA), katalityczne (rRNA) czy regulatorowe (np. siRNA, miRNA) [13].

Ze względu na specyfikę komórek organizmu, które mogą zostać poddane terapii genowej, czyli mogą przyjąć terapeutyczny transgen, wyróżnia się terapię genową:

- somatyczną, która dotyczy wszystkich rodzajów komórek organizmu poza gametami (komórki rozrodcze),
- germinálną, która obejmuje wprowadzanie materiału genetycznego do komórek rozrodczych. Jednak modyfikacja materiału genetycznego komórek rozrodczych budzi tak wiele kontrowersji moralnych i etycznych, że jest zabroniona prawnie [2]. Nieliczne badania nad liniami zarodkowymi *in vitro* prowadzone się w Chinach np. nad nukleazami z motywem palca cynkowego (ang. *zinc-finger nucleases*, ZFNs) [14] lub krótkimi powtórzeniami palindromowymi (ang. *clustered regularly inter-spaced short palindromic repeats*, CRISPRs) [15].

Aby osiągnąć wysoką wydajność stosowanej terapii genowej, należy przede wszystkim dostosować procedurę do wybranej jednostki chorobowej. Do najważniejszych czynników wpływających na efektywność terapii genowej należą:

### A. Rodzaje transgenów

- **sekwencje kodujące białka** – ze względu na ograniczoną pojemność dostępnych nośników w terapii genowej, nie jest możliwe dostarczenie do komórki całej kopii genu kodującego dane białko (średnio 27 kpz), dlatego z matrycy mRNA na zasadach odwrotnej transkrypcji otrzymuje się dwuniciową cząsteczkę cDNA, zawierającą wyłącznie sekwencję kodującą dane białko (bezintronową) o długości średnio 2,5 kpz. Mimo, że w części intronowej zawarte są informacje o obróbce potranslacyjnej danego białka, utrata ich przy całkowitym braku lub dysfunkcji białka jest nieistotna [16].

Sekwencje mogą kodować:

- białka zastępujące zmutowane lub niewystępujące w komórce białka (np. dostarczenie prawidłowej kopii genu *CFTR* w leczeniu mukowiscydozy [17]),

- białka regulujące funkcje komórki (np. białko RevM10, które blokuje syntezę białek wirusa HIV i tym samym hamuje jego namnażanie [18]),
- cytokiny i czynniki wzrostu np. czynnik wzrostu komórek nerwowych, wykorzystywany w próbach leczenia choroby Alzheimera [19],
- białka regulujące apoptozę np. gen *BCL-2* – hamujący apoptozę komórek nerwowych w stwardnieniu zanikowym bocznym [20],
- przeciwciała np. przeciwko patologicznym białkom prionowym PrP<sup>Sc</sup> [16],
- antygeny tzw. szczepionki genetyczne, po wprowadzeniu do organizmu, produkują dany antygen, który następnie służy do tego, aby układ odpornościowy nauczył się go rozpoznawać i neutralizować. W ten sposób nabywa się odporność na patogen, z którego pochodzi dany antygen [21], np. białko S kolca koronawirusa SARS-CoV-2 w szczepionkach mRNA;
- podjednostki receptorów komórek T – modyfikacja części odpowiedzialnych za rozpoznawanie patogenów, pozwala kontrolować i dostroić odpowiedź immunologiczną [16];
- **sekwencje niekodujące białek** – krótkie fragmenty DNA lub RNA, np.:
  - oligonukleotydy i ich modyfikacje – to zwykle jednoniciowy odcinek kwasu nukleinowego o długości ok. 15 - 100 nukleotydów, jego funkcje to blokowanie ekspresji genów lub transkrypcji oraz kontrolowanie procesu składania (ang. *splicing*) pre-mRNA. Przykładem jest oligonukleotyd OGX-427 hamujący ekspresję genu kodującego białko szoku cieplnego Hsp27 - w konsekwencji hamuje rozwój raka prostaty [22];
  - rybozymy – małe cząsteczki RNA zdolne do katalizowania pewnych reakcji chemicznych np. do hamowania ekspresji receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGFR-1, a tym samym hamowania angiogenezy w wielu typach nowotworów [23];
  - małe regulatorowe RNA – w żywych komórkach interferencja RNA (RNAi) reguluje potranskrypcyjną ekspresję genów poprzez selektywne blokowanie translacji mRNA lub jego degradację. RNAi aktywuje cząsteczki takie jak: microRNA (miRNA) czy krótkie interferujące RNA (siRNA) [16];
    - miRNA – jednoniciowe RNA o długości ok. 22 nukleotydów, wiążą się z docelowym mRNA w kompleksie z białkami Ago, co powoduje zahamowanie jego translacji np. miR-34, miR-122 znalazły zastosowanie jako supresory nowotworów [24];
    - siRNA – dwuniciowy krótki fragment RNA o długości od 20 do 23 nukleotydów, wiążący się z kompleksem wyciszającym RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Kompleks RISC składa się z białka Argonaut (Ago-2) zdolnego do odczepiania i usuwania jednej z nici siRNA, do której następnie przyłączane jest komplementarne docelowe mRNA. Białko Ago-2 łączy mRNA w miejscu wiązania się siRNA do mRNA, wyciszając tym samym ekspresję danego genu [25]. siRNA stosuje się w leczeniu m. in. astmy - docelowy gen *SYK* lub wirusowego zapalenia wątroby typu B - docelowy gen *HBsAg* [26];
  - pułapki oligonukleotydowe (ang. *decoy*) – dwuniciowe sekwencje DNA lub RNA wiążące białka, odpowiedzialne za aktywację translacji [16], np. pułapka oligonukleotydowa dla przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3

- (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, STAT3) hamuje namnażanie komórek nowotworu płuc [27];
- aptamery – krótkie odcinki RNA lub DNA oddziaływujące z molekułami na zasadzie komplementarności kształtu (zamek-klucz), blokując funkcje takiej molekule, np. aptamery przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) hamują rozwój nowych naczyń krwionośnych w zmianach zwyrodnieniowych plamki żółtej [28].
- B. Droga podania transgeny
- *ex vivo* – transfer nowego genu do komórek pacjenta odbywa się poza jego organizmem. Określone komórki (limfocyty, komórki macierzyste itp.) są pobierane i izolowane z organizmu pacjenta, następnie hodowane *in vitro*, gdzie dochodzi do transferu nowego genu i ponownie wprowadzane do organizmu. Metoda ta redukuje możliwość wystąpienia reakcji immunologicznej organizmu, jednak jest droga, pracochłonna i musi być spersonalizowana dla każdego pacjenta [16, 29].
  - *in vivo* – terapeutyczny gen zostaje podany bezpośrednio do organizmu pacjenta. Metoda ta jest dużo prostsza i uniwersalna, jednak jej skuteczność może być ograniczona ze względu na brak specyficznej celowości, brak efektywnego transportu przez bariery np. krew-mózg, degradację terapeutycznego genu przed dotarciem do docelowych komórek, czy wywoływanie odpowiedzi immunologicznej [16, 29].
- C. Nośnik do transportu materiału genetycznego – istotny wpływ na efektywność transfekcji mają czynniki, dzięki którym możliwe jest dostarczenie terapeutycznego kwasu nukleinowego do komórki. Wpływ nośnika jest szeroko opisany w rozdziale 1.2.
- D. Celowe dostarczanie – punkt ten jest niezmiernie ważny w terapii *in vivo*, docelowe dostarczenie transgeny może zostać zrealizowane na etapie przygotowania genu lub przygotowania nośnika. Gen może zostać tak zmodyfikowany, aby jego ekspresja następowała jedynie w obecności specyficznych promotorów tkankowych. Natomiast przygotowanie nośnika polega na dołączaniu do niego specyficznych ligandów dla receptorów na powierzchni docelowych komórek [16].
- E. Trwałość transgeny – osiągnięcie efektu terapeutycznego zależy również od trwałości materiału genetycznego – czy „zdąży” on dotrzeć do komórek docelowych zanim ulegnie degradacji w organizmie pacjenta. Trwałość można kontrolować na poziomie materiału genetycznego (modyfikacja reszt fosforanowych, cukrów) lub dołączając do transgeny specyficzne cząsteczki takie jak cholesterol, glikol polietylenowy PEG lub kationowe lipidy [16] – tzw. wektory niewirusowe (rozdział 1.3).
- F. Kontrola ekspresji terapeutycznego genu – ekspresja genu musi przebiegać w sposób kontrolowany. Nadmierna ekspresja może prowadzić do tworzenia się złożeń białek i w efekcie śmierci komórek [16].
- G. Indukowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu – aby terapia była skuteczna, należy wykluczyć efekty immunologiczne, które mogą obniżyć efektywność leczenia (poprzez naturalizację transgeny lub nośnika) lub wywołać reakcje zagrażające życiu pacjenta [30].

## 1.2 Systemy do transportu transbłonowego kwasów nukleinowych

---

Metody z wykorzystaniem wektorów do dostarczania materiału genetycznego do komórek pacjenta są najbardziej wydajne, uniwersalne i powszechne. Ponad 70% badań w kierunku nowych [10] i ponad 60% dostępnych już terapii genowych opiera się o wykorzystanie w tym celu nośników [7]. Dobry nośnik materiału genetycznego powinien charakteryzować się dużą pojemnością, wysoką efektywnością transfekcji, celowym tropizmem komórkowym, niską lub brakiem genotoksyczności i cytotoksyczności, oraz nie powinien wywoływać odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Ze względu na pochodzenie nośnika możemy wyróżnić wektory wirusowe i niewirusowe. Zgodnie z bazą danych Gene Therapy Clinical Trials najintensywniej badane są wektory wirusowe, bo ok. 95% wszystkich badań pod kątem nowych terapii genowych z wykorzystaniem nośników oparty jest o wirusowe wektory – stan na maj 2023 roku [10].

### 1.2.1 Wirusowe wektory

Projektując wirusowe nośniki dla terapii genowej, wykorzystano zdolność wirusów do efektywnego wnikania do komórek gospodarza i łatwość łączenia się z jego genomem (transdukcja). Wirusy to małe infekcyjne cząstki składające się z materiału genetycznego (RNA bądź DNA) zamkniętego w białkowej osłonce (tzw. kapsydzie), wymagają jednak dostosowania na potrzeby terapii genowej. Genom wirusa zostaje odpowiednio przygotowany poprzez usunięcie genów kodujących białka wirusowe – w szczególności białka patogenne mogące wywołać reakcję immunologiczną organizmu, i wprowadzenie genów terapeutycznych. Wektory wirusowe można podzielić na te, których genom integruje się z genomem pacjenta (retrowirusy, lentiwirusy) i wektory wirusowe bez integracji z genomem np. adenowirusy lub wirus opryszczki pospolitej (ang. *Herpes Simplex Virus*, HSV). Wektory wirusowe np. na bazie lentiwirusów lub wirusów zależnych od adenowirusów (ang. *Adeno-Associated Virus*, AVV) ze względu na zdolność do przenikania bariery krew-mózg znalazły potencjalne zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak np. choroba Parkinsona czy Alzheimerera [31]. Najważniejsze rodzaje wirusowych wektorów i ich własności zestawiono w tabeli 1 [16, 32, 33].

Tabela 1. Najpowszechniejsze wektory wirusowe stosowane w terapii genowej.

Wektor wirusowy	Pojemność (kpz)	Cechy	Zalety	Wady
Adenowirusy	~8-30	wirus z dwuniciowym DNA, brak integracji z genomem biorcy, najbardziej popularne wektory wirusowe	duża pojemność, wydajna ekspresja	ekspresja ograniczona czasowo, wysoka cytotoksyczność, wysoka immunogenność
	Zastosowanie: Gendicine™ - lek na bazie rekombinowanego adenowirusa typu 5 i genu <i>p53</i> (AdRSV-p53) stosowany w leczeniu nowotworów [34]			
AAV	~ 4,5	wirus z jednociowym DNA, bardzo rzadka integracja z genomem biorcy	niska immunogenność, wydajna transdukcja, ekspresja również w komórkach dzielących się	ekspresja ograniczona czasowo, mała pojemność
	Zastosowanie: Zolgensma® - lek na bazie wirusa AAV9 i sekwencji genu <i>a</i> stosowany w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni [7]; AAV2 z sekwencją kodującą białko neurturyny (NRTN) wspomagające dopaminergiczne neurony w leczeniu choroby Parkinsona [35]			
Retrowirusy	~9	wirus RNA, integracja z genomem biorcy	długotrwała ekspresja	duże prawdopodobieństwo mutacji insercyjnych
	Zastosowanie: Invossa® - wyizolowane chondrocyty pacjenta transdukowane są retrowirusem typu C z sekwencją czynnika wzrostu TGF-β1 w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów [36]			
Lentiwirusy	~10	wirus z jednociowym RNA, integracja z genomem biorcy	długotrwała i stabilna ekspresja, ekspresja również w komórkach dzielących się, transdukcja do komórek różnicujących się, zdolność przenikania do jądra komórkowego,	może dochodzić do mutacji insercyjnych
	Zastosowanie: Zynteglo® - komórki macierzyste szpiku kostnego pacjenta transdukowane są lentiwirusem BB305 z sekwencją kodującą β <sup>A-T87Q</sup> globinę stosowaną w leczeniu β-talazemii [7,37]; Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) z genem kodującym leptyny LEP w leczeniu choroby Alzheimer'a [38]			
HSV	>30	wirus z dwuniciowym DNA, integracja z genomem biorcy	duża pojemność, wysoka infekcyjność	ekspresja ograniczona czasowo, wysoka immunogenność
	Zastosowanie: Imlygic® - lek na bazie HSV-1 i sekwencji GM-CSF w leczeniu czerniaka [39]			

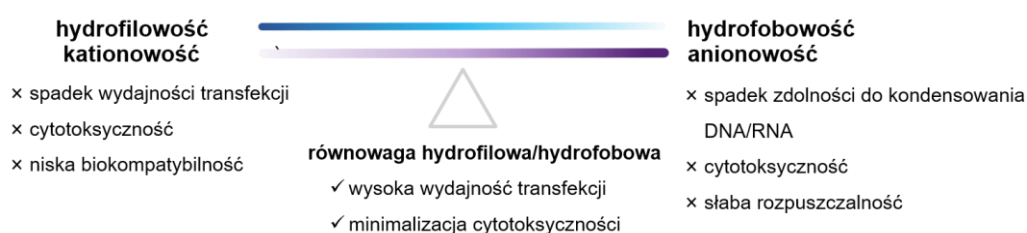


### 1.2.2 Niewirusowe wektory

Terapia genowa na bazie wirusowych wektorów mimo początkowych licznych sukcesów w 1999 roku poniosła porażkę – pierwszą śmiertelną ofiarą był chłopiec, który po kilku dniach od podania terapii zmarł na skutek silnej reakcji immunologicznej organizmu wywołanej wirusowym wektorem na bazie adenowirusa [2,40]. Na pewien czas osłabiło to entuzjazm związany z terapią genową oraz skłoniło do szukania innych – niewirusowych systemów do dostarczania materiału genetycznego.

Wektory niewirusowe charakteryzują się niemal nieograniczoną pojemnością (teoretycznie mogą przenosić transgen o każdej wielkości/liczbie par zasad), niską immunogennością, są łatwe i tanie w produkcji, a przy tym można osiągnąć stabilną ekspresję transgenów. Niestety wektory te są mało wydajne i wymagają pewnych modyfikacji [32], dlatego przy projektowaniu niewirusowych wektorów należy rozważyć kilka kwestii:

- Materiał bazowy, z którego składa się wektor. Zazwyczaj są to kationowe surfaktanty, kationowe lipidy, kationowe polimery lub nieorganiczne cząstki w tym metaliczne nanocząstki, które na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych efektywnie łączą się z materiałem genetycznym [14].
- Powierzchnia nośnika z obecnymi grupami funkcyjnymi (np.  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OCH_3$ ), dołączonymi ligandami (przeciwciała, cukry, białka albo małe cząsteczki) lub polimerami np. PEG (tzw. pegylacja); na powierzchni mogą znajdować się grupy naładowane zarówno dodatnio jak i ujemnie, jak również grupy o różnej hydrofobowości. Modyfikacja powierzchni nośnika ułatwia docieranie i łączenie się z docelowymi komórkami, zmniejsza rozpoznawanie przez układ odpornościowy i przedłuża czas krążenia nośnika w organizmie [14, 41].
- Kształt wektora wpływa bezpośrednio na wydajność transfekcji - np. wektory na bazie nanocząstek o ostrych krawędziach akumulują się we wnętrzu komórek, są gorzej wydalane, tym samym wydajność transfekcji wzrasta [42].
- Wektor powinien charakteryzować się również odpowiednią gęstością ładunku elektrycznego (wraz ze wzrostem gęstości ładunku rośnie cytotoksyczność nośnika) oraz równowagą hydrofobowo/hydrofilową (hydrofilowe nośniki wydajniej wiążą się z materiałem genetycznym, jednak osiągają niższą wydajność transfekcji w porównaniu z hydrofobowymi nośnikami) – rysunek 1. [43].



Rysunek 1. Równowaga hydrofilowa/hydrofobowa niewirusowych nośników i ich właściwości.

#### Lipopleksy

Lipofekcja to niezwykle prosta i atrakcyjna metoda kompleksowania kwasów nukleinowych, bazująca na zastosowaniu lipidowych nośników jako systemów do dostarczania transgenów, którą w 1980 roku jako pierwsza zaproponowała grupa Felgnera [44]. Lipidy to pochodne kwasów tłuszczowych. Są związkami amfifilowymi

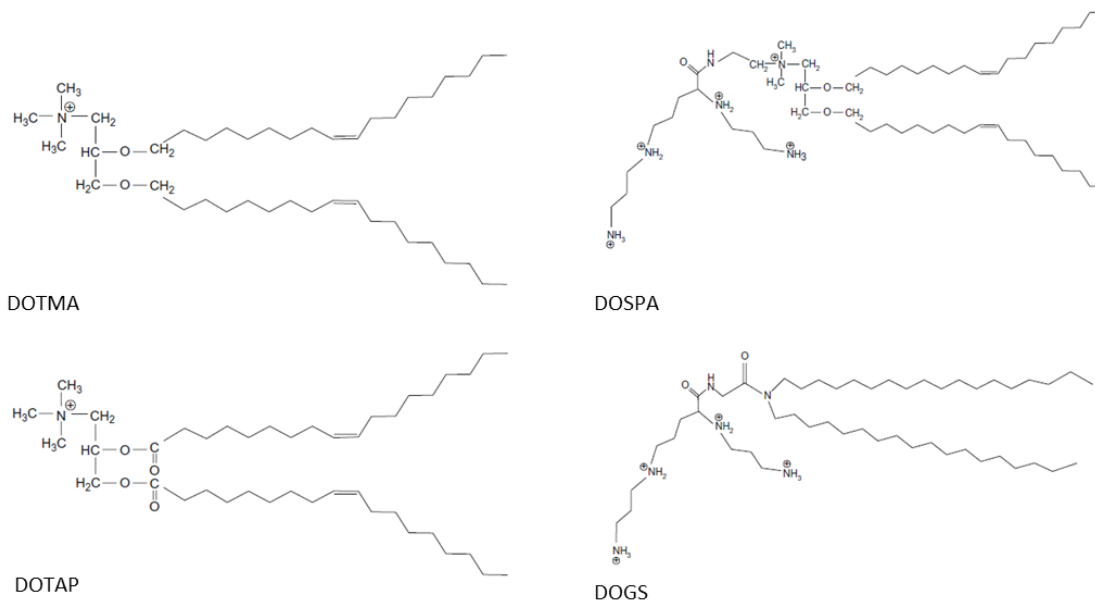
składającymi się z części hydrofilowej - głowy i części hydrofobowej - ogona (jeden lub dwa łańcuchy węglowodorowe). Cechą charakterystyczną dla cząsteczek amfifilowych jest zdolność do samoorganizacji – lipidy w środowisku wodnym dążąc do osiągnięcia minimum energii swobodnej Gibbsa, tworzą m. in. kuliste dwuwarstwowe struktury zwane liposomami [13]. W terapii genowej stosuje się zazwyczaj lipidy o długości 8-18 atomów węgla w ogonie. Zazwyczaj są to łańcuchy nasycone. Co więcej zastosowanie różnych typów lipidów jako składników wektora zwiększa wydajność transfekcji. Badania wykazały, że dla mieszanin lipidów o niesymetrycznych łańcuchach uzyskuje się lepsze wyniki transfekcji, np. układ lipidów o krótkich nasyconych łańcuchach i lipidów o długich łańcuchach, w których występuje wiązanie podwójne [45]. Do tworzenia nośników stosuje się zazwyczaj dwa rodzaje lipidów: kationowe i neutralne. Kationowe lipidy oddziałują z ujemnie naładowanym materiałem genetycznym, mogą tworzyć liposomy, micelle lub bicele, w środku których znajduje się materiał genetyczny, co gwarantuje ochronę przed nukleazami [44].

Lipidy neutralne pełnią rolę pomocniczą - poprawiają fuzję z błoną komórkową nośników, zwiększając wydajność transfekcji przy jednoczesnym obniżeniu efektów cytotoksycznych. Powszechnie stosowane lipidy neutralne to fosfolipidy: DOPE (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfatydyloetanolamina), DOPC (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina) oraz cholesterol. Dodatek DOPE w liposomach promuje formowanie się odwróconej fazy heksagonalnej, która ułatwia uwolnienie się kompleksu z endosomu po wchłonięciu do komórki. Dodatkowo DOPE może wpływać na stopień wiązania się kationowych lipidów z materiałem genetycznym [45]. Cholesterol zwiększa stabilność lipopleksów [44].

Do najczęściej stosowanych kationowych lipidów w kompozycji nośników materiału genetycznego do komórek należą (rysunek 2.):

- **DOTMA** – chlorek N-[1-(2,3-dioleilooksy)-propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy; jednokationowy lipid, w skład którego wchodzi IV-rzędowa sól amoniowa i glicerol (w obrębie hydrofilowym) oraz 18-węglowy łańcuch węglowodorowy z wiązaniem podwójnym przy 9 atomie węgla. Część hydrofilowa i hydrofobowa DOTMA połączone są ze sobą wiązaniem estrowym. Komercyjnie dostępny jako czynnik do transfekcji - Lipofectin® (DOTMA/DOPE, 1:1) [45].
- **DOTAP** – metylosiarczan N-[1-(2,3-dioleilooksy)-propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy; Budowa DOTAP odpowiada DOTMA, ale wiązanie estrowe w DOTAP jest niestabilne, ulega degradacji [46,47]. Pierwotnie wysunięto hipotezę, że wiązania estrowe, które ulegają hydrolizie, mogą powodować biodegradację lipidów i tym samym zmniejszać cytotoksyczność. Zastosowanie nośników zbudowanych wyłącznie z DOTAP jest nieskuteczne ze względu na dużą gęstość ładunku powierzchniowego utworzonego lipopleksu. W pH 7,4 DOTAP ulega protonacji (co nie ma miejsca w przypadku innych lipidów kationowych), tak więc potrzeba więcej energii do oddzielenia materiału genetycznego od lipopleksu po dostarczeniu do wnętrza komórki. Dodatek lipidu pomocniczego - DOPE powoduje, więc że część kationowych surfaktantów łączy się z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi DOPE, tym samym transgen może być łatwiej uwolniony z kompleksu [45].
- **DOSPA** – trifluoroocetan 2,3-dioleilooksy-N-[2-(sperminokarboksyamido)-etylo]-N,N-dimetylo-1-propanoaminy; wielokationowy lipid o budowie analogicznej do DOTMA z tą różnicą, że do głowy przyczepiona jest cząsteczka sperminy, dzięki której lipid uzyskuje dodatkowe 4 ładunki dodatnie, a tym samym może wydajniej wiązać się

z materiałem genetycznym. Mieszanina DOSPA i DOPE w proporcji 3:1 znana jest jako LipofectAMINE™ [45].



Rysunek 2. Wzory strukturalne kationowych lipidów, stosowanych jako nośniki materiału genetycznego.

- **DOGS** – spermino-5-karboksyglicylo-dioktadecyloamid, wielokationowy lipid składający się ze sperminy, grupy karboksylowej i glicyny w części hydrofilowej i dwóch 18-węglowych łańcuchów. Łańcuchy w DOGS są nasycone i połączone z głową wiązaniem peptydowym. DOGS jest dostępny na rynku pod nazwą Transfectam®. Podobnie jak DOSPA ze względu na zwielokrotniony ładunek dodatni, wydajnie łączy się z materiałem genetycznym [45].

Lipopleksy na bazie lipidów i/lub surfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych stanowią alternatywę dla mało wydajnych nośników lipidowych, a szczególnie ich oligomeryczne formy efektywnie kompleksujące z materiałem genetycznym, przy niskich efektach cytotoksycznych (co zostało przeze mnie omówione w rozdziale 3.).

### Polipleksy

Są to nośniki na bazie polimerów, charakteryzują się niższą wrażliwością na degradację przez enzymy zewnątrzkomórkowe w porównaniu do nośników na bazie lipidów, są także stabilniejsze i można łatwiej manipulować ich właściwościami fizycznymi [44]. Poniżej zestawiono kilka najpopularniejszych przykładów polimerów stosowanych jako nośniki transgenów.

- Polietylenoimina, PEI – w skład monomeru wchodzi grupa aminowa i łańcuch  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ , PEI może być w formie liniowej (ang. *linear*, lPEI) lub rozgałęzionej (ang. *branched*, bPEI) [43]. Budowa PEI wpływa na efektywność transfekcji, z tym, że większą wydajność uzyskują formy liniowe [48]. Polietylenoimina jest najpopularniejszym i najefektywniejszym niewirusowym nośnikiem [15]. PEI po dostaniu się do endosomu, ma zdolność do wywoływania tzw. efektu gąbki protonowej, oznacza to, że woda dostaje się do wnętrza endosomu, endosom pęka, uwalniając do cytoplazmy transgen – właściwość ta zwiększa efektywność

transfekcji [49]. PEI wykazuje silne właściwości bakteriobójcze (depolaryzację błony) i przeciwwirusowe (utrudnia wiązanie wirionów do komórek docelowych), jednak toksyczna jest również dla ludzkich komórek, dlatego poprzez dołączenie np. kwasu hialuronowego, chitozanu, mannozy itp. zwiększa się biokompatybilność nośników otrzymanych na jej bazie [43].

- Polilizyna, PLL – w pH fizjologicznym PLL zawiera kationowe reszty lizyny, tym samym ma zdolność do oddziaływania elektrostatycznego z ujemnie naładowanymi grupami cząsteczek DNA. Jednak duża gęstość ładunku dodatniego PLL ogranicza ucieczkę endosomalną i zwiększa cytotoksyczność, aby to zniwelować do polipleksu na bazie PLL dołącza się chlorochinę lub inny polimer np. PEG [44].
- Poliamidoamina, PAMAM – kationowy polimer w formie dendrymerów, czyli silnie rozgałęzionych polimerów, o przybliżonym kształcie kuli. Odchodzące od rdzenia ramiona (tzw. dendrony) tworzą jamy - wolne przestrzenie, w których mogą być transportowane cząsteczki aktywne. Dendrymery PAMAM łatwo przenikają przez błony komórkowe, ale wykazują przy tym wysoką toksyczność. Ze względu na obecność grup funkcyjnych na zakończeniach dendronów, możliwe jest łatwe dołączenie np. przeciwciał czy ligandów dla receptorów docelowych komórek [50]. Początkowo dendrymery PAMAM używano jako nośniki jonów gadolinu  $Gd^{3+}$  w czynnikach kontrastujących do rezonansu magnetycznego [51]. Komercyjnie dostępnym czynnikiem transfekującym na bazie dendrymerów PAMAM jest SuperFect® (Qiagen) [52].
- Chitozan – naturalny polisacharyd powstały z alkalicznej deacetylacji chityny, biodegradowalny, biokompatybilny. Chitozan pęcznieje i rozrywa endosom, uwalniając transgen do cytoplazmy [45]. Zdolność tych cząsteczek do wiązania wody wykorzystana jest do tworzenia opatrunków wspomagające gojenie ran [53]. Podawany myszom doustnie kompleks chitozanu i sekwencji alergenu pCMVArh2, skutecznie hamował alergię pokarmową na orzeszki ziemne u myszy [54].

### **Nanopleksy**

Nanopleksy, czyli nośniki na bazie nieorganicznych nanomateriałów (struktury rzędu 1-100 nm) charakteryzują się łatwością funkcjonalizacji, wysoką stabilnością chemiczną i termiczną, niską cytotoksycznością, szerokim zakresem dostępnych kształtów i wielkości [43,55]. Najpowszechniejsze nanomateriały to nanocząstki metaliczne (złota [56], srebra [57], tlenku cynku [58], tlenku miedzi [59]), nanorurki węglowe, grafen, kropki kwantowe, nanocząstki krzemowe [55].

### **Nośniki peptydowe:**

Peptydy wnikające do komórki CPPs (ang. *cell penetrating peptides*) to krótkie peptydy biorące udział w transporcie substancji przez błonę komórkową (hydrofobowa sekwencja oddziałująca z lipidami błonowymi) [60]. CPPs może się wiązać elektrostatycznie z DNA, ale choć jest to wiązanie silne to niestety niestabilne, dlatego chcąc wykorzystać CPPs jako nośniki, odpowiednio przygotowuje się koniugaty CPPs-DNA, które połączone są ze sobą kowalencyjnie za pomocą dodatkowego środka sieciującego (ang. *cross-linker*) [60, 61]. CPPs ze względu na dodanie ładunek elektryczny, zmieniają lokalnie krzywiznę błony komórkowej, dzięki czemu mogą na drodze endocytozy wnikać do wnętrza komórki gospodarza. Jako nośnik leków i biomolekuł bardzo często stosowany jest peptyd TAT wyizolowany z wirusa HIV-1 [62,63],

### 1.3 Mechanizm transportu transbłonowego niewirusowych wektorów

---

Aby zastosowana terapia genowa była skuteczna, transgen musi w dużym uproszczeniu najpierw pokonać bariery zewnątrzkomórkowe, następnie przejść przez błonę komórkową oraz w końcowym etapie – wywołać ekspresję danego genu, czyli innymi słowy dotrzeć do cytoplazmy lub jądra komórkowego i/lub zintegrować się z genomem [44].

Pokonanie barier zewnątrzkomórkowych wiąże się z obecnością endonukleaz i komórek fagocytarnych – makrofagów, w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, które mogą uszkodzić lub całkowicie zniszczyć transgen [14]. Obecność w układzie krwionośnym kompleksów transgen-wektor wiąże się też z możliwością wywołania odpowiedzi immunologicznej organizmu, która nie tylko obniża wydajność transfekcji, ale także jest niebezpieczna dla organizmu. Dlatego pokonanie barier zewnątrzkomórkowych może przebiegać drogą *ex vivo* – gdzie „pomija się” te przeszkody i terapii poddane są docelowe komórki (pobrane z ciała pacjenta) lub *in vivo* – poprzez bezpośrednie podanie transgeny do docelowych tkanek lub odpowiednie przygotowanie transgeny (przy użyciu wektora) w przypadku, gdy będzie podany dożylnie lub doustnie (pośrednie podanie).

*Bezpośrednie podanie transgeny do komórek* – w formie domięśniowego zastrzyku transgen w roztworze soli fizjologicznej zostaje podany do komórek. Metoda ta charakteryzuje się prostotą, zarówno pod względem produkcji jak i użycia, jednak ogranicza ją niska efektywność, krótka trwałość transgeny i może być stosowana wyłącznie domięśniowo [16]. Przykładami dostępnych komercyjnie leków w takiej formie są: Neovasculgen®, Collategene® – leki na bazie nagich plazmidów, stosowane w leczeniu chorób niedokrwiennych (np. w tzw. stopie cukrzycowej) poprzez indukcję angiogenezy; Kynamro® – na bazie „nagich” (ang. *naked*) oligonukleotydów DNA wiążących się z mRNA odpowiedzialnym za syntezę lipoproteiny o niskiej gęstości LDL (ang. *low density lipoprotein*) w homozygotycznej rodzinnej hipercholesterolemii, dzięki czemu zredukowany jest poziom tzw. „złego cholesterolu” [7].

Metody pośrednie terapii to zazwyczaj podanie leku do układu krwionośnego lub doustnie. Transgen musi zostać odpowiednio zabezpieczony przed czynnikami degradującymi, a dodatkowo poprzez dołączenie specyficznych ligandów dotrzeć do docelowych komórek.

W procesie transfekcji, czyli wprowadzania transgeny do docelowej komórki, ogromne znaczenie ma błona plazmatyczna. Nie tylko oddziela ona wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego (błona komórkowa), ale także buduje (np. siateczkę śródplazmatyczną) i oddziela inne organelle komórkowe (np. jądro komórkowe, mitochondria), uczestniczy w przekazywaniu informacji oraz transporcie substancji chemicznych, w tym transgeny czy kompleksu transgen-wektor [13].

Błona komórkowa zgodnie z zaproponowanym w 1972 roku przez Jonathana Singera i Gartha Nicolsona, modelem płynnej mozaiki składa się z dwuwarstwy lipidowej i białek: przenikających lub wnikaających w dwuwarstwę (białek integralnych) lub luźno z nią związanych (białek peryferyjnych) [64]. Na przestrzeni lat model ten był udoskonalany (dynamika błon, tratwy lipidowe, asymetria, dwuwarstwy itp.) i ostatecznie uwzględnia najważniejsze właściwości błon takie jak: półpłynność (ciągły ruch lipidów i białek w obrębie błony), selektywną przepuszczalność (błony biologiczne kontrolują

przenikanie substancji), asymetryczność (różnice w budowie i składzie monowarstw) i zdolność do fuzji błony komórkowej [13].

Selektywna przepuszczalność stanowi podstawę transportu przez błonę komórkową, oznacza, że niektóre cząsteczki przechodzą przez błonę swobodnie (np. woda), lub też z udziałem białek transportujących lub kanałów białkowych np. w przypadku wody są to akwaporyny, natomiast dla innych substancji błona komórkowa jest zupełnie nieprzepuszczalna i wymagane jest opracowanie pewnych mechanizmów umożliwiających przejście przez błonę.

W przypadku związków małych cząsteczkowych ich transport może zachodzić w sposób bierny (bez nakładu energii), gdzie cząsteczki przenikają przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężeń lub w sposób aktywny – zachodzi wbrew gradientowi stężeń, konieczne jest dostarczenie energii w celu przeniesienia cząsteczki [13].

Aby przewidzieć, czy dana cząsteczka lub jon będzie przechodzić przez błonę komórkową na zasadzie transportu biernego czy aktywnego, należy zbadać zmianę energii swobodnej Gibbsa  $\Delta G$  cząsteczki. Dla transportu aktywnego  $\Delta G$  jest dodatnia, natomiast dla transportu biernego  $\Delta G$  jest ujemna. Zależność (1) została wyprowadzona dla cząsteczki naładowanej (jonu), w przypadku cząsteczek nienaładowanych drugi człon w równaniu zostaje pominięty, gdyż wynosi 0.

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} + qF\Delta V \quad (1)$$

Zmiana energii swobodnej cząsteczki wynika z przeniesienia jej z jednej strony błony, gdzie jej stężenie wynosi  $C_1$ , na drugą stronę błony, gdzie jej stężenie wynosi  $C_2$ . Cząsteczki naładowane o ładunku elektrycznym  $q$ , muszą pokonać dodatkowo potencjał transbłonowy  $\Delta V$  (różnica potencjałów pomiędzy stroną zewnętrzną a wewnętrzną błony). W zależności (1) występuje stała gazowa  $R$  oraz stała Faradaya  $F$ , a cały proces jest zależny od temperatury  $T$  [65].

Transport bierny to m. in. [66]:

- dyfuzja prosta, gdzie cząsteczki przenikają przez błonę komórkową samoistnie,
- dyfuzja ułatwiona – transport cząsteczek odbywa się dzięki występującym w błonie specyficznym transbłonowym białkom, które mogą pełnić rolę kanału (np. kanały sodowe, potasowe) lub przekaźnika (np. transporter glukozy);
- osmoza, jest szczególnym rodzajem dyfuzji prostej, ponieważ dotyczy wyłącznie przemieszczania się cząsteczek wody przez błonę komórkową bezpośrednio.

W tym miejscu warto wspomnieć, że z fizycznego punktu widzenia dyfuzja to swobodny ruch cząsteczek rozpuszczonych w ośrodku, przebiegający zgodnie z ich gradientem stężeń, tj. od wyższego stężenia do niższego. Zjawisko dyfuzji opisuje m. in. I prawo Ficka w postaci zależności (2). Prawo to określa związek między strumieniem dyfundujących cząsteczek substancji rozpuszczonej  $J$  (czyli liczba cząsteczek przepływających w jednostce czasu), a gradientem jej stężenia  $\frac{dC}{dx}$ , gdzie:  $x$  – to grubość błony komórkowej, przez którą dyfundują cząsteczki substancji rozpuszczonej,  $C$  – stężenie substancji. Parametr  $A$  oznacza pole powierzchni płaszczyzny prostopadłej do strumienia,

przez którą ten strumień przepływa. Natomiast współczynnik dyfuzji  $D$  określa zdolność cząsteczek do dyfuzji. Pierwsze prawo Ficka nie zakłada lokalnych zmian stężenia na skutek przemieszczenia się cząsteczek [66,67].

$$J = -AD \frac{dC}{dx} \quad (2)$$

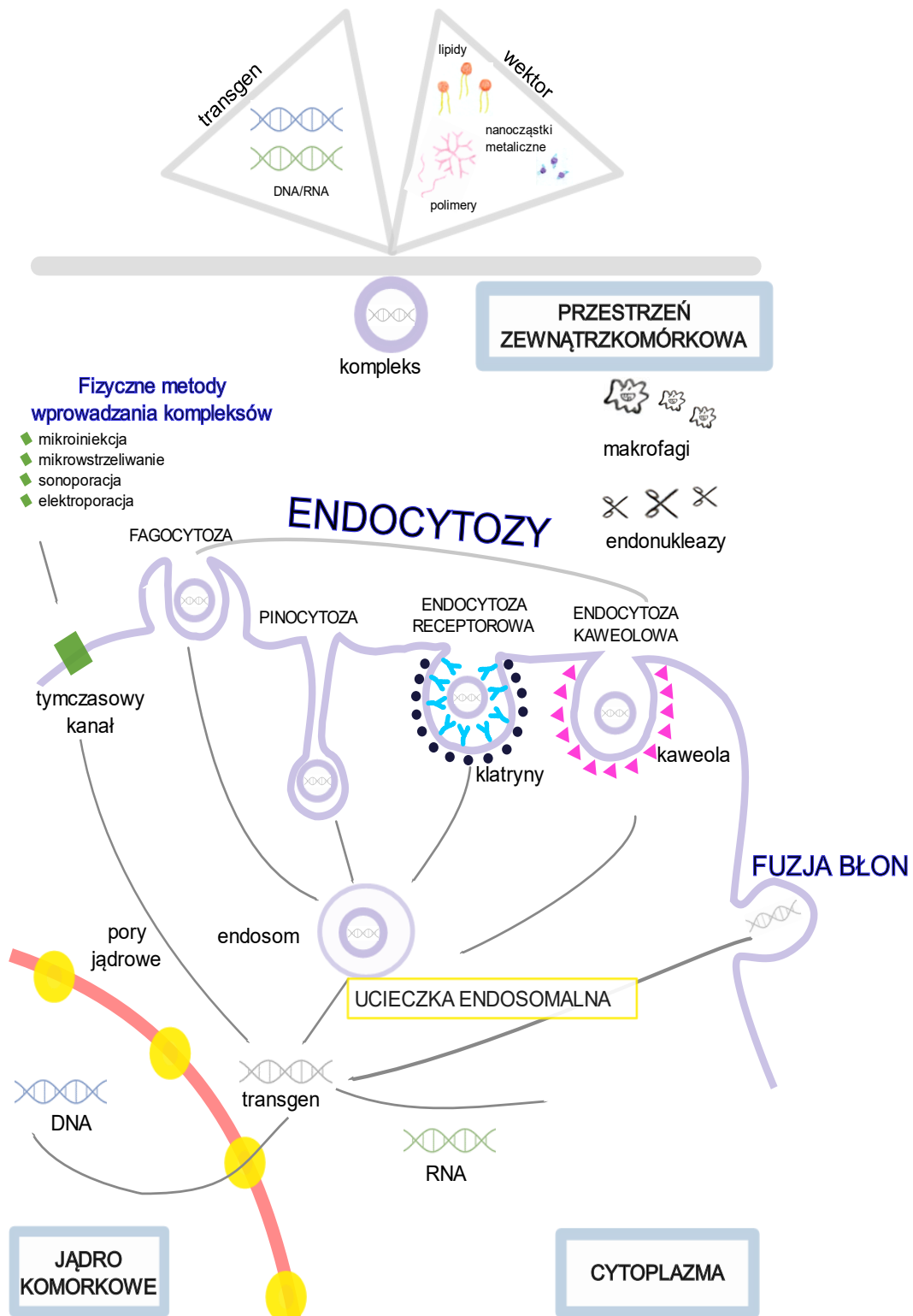
W transporcie aktywny uczestniczą wyspecjalizowane struktury, do których działania wymagane jest dostarczenie energii zazwyczaj w postaci adenozy-5'-trifosforanu (ATP), aby przenieść cząsteczki przez błonę komórkową wbrew gradientowi stężeń [66]. Przykładem takiej wyspecjalizowanej struktury jest pompa sodowo-potasowa, transportująca kationy sodu (na zewnątrz komórki) i potasu (do wnętrza komórki) przez błonę komórkową. Składa się ona z dwóch podjednostek  $\alpha$  i dwóch podjednostek  $\beta$ , tworzących tetramer  $\alpha_2\beta_2$ . Na podjednostce  $\alpha$  od strony cytozolu znajduje się miejsce wiązania ATP, a po przeciwnej stronie - miejsce wiązania inhibitora steroidowego, który hamuje działanie pompy sodowo-potasowej. Hydroliza ATP dostarcza energii koniecznej do zmian konformacji pompy, dzięki czemu możliwy jest transport kationów przez błonę komórkową [65].

W przypadku transportu makrocząsteczek przez błonę komórkową niezmiernie istotna jest zdolność błony do fuzji. Transport ten może odbywać się na zewnątrz komórki (egzocytoza) jak i do wnętrza (endocytoza). Do najważniejszych rodzajów endocytoz należą: fagocytoza, pinocytoza, endocytoza receptorowa, endocytoza kaweolowa [16]:

- fagocytoza – po zetknięciu błony i cząsteczki transportowanej, dochodzi do uwypuklenia błony komórkowej i zamknięcia cząsteczki w pęcherzyku – fagosomie.
- pinocytoza – cząsteczki wraz z medium wgłębiają błonę komórkową do środka komórki, tworząc tzw. kanalik pinocytarny, z końca, którego odłączają się małe pęcherzyki pinocytarne.
- endocytoza receptorowa – receptory na powierzchni błony komórkowej rozpoznają i łączą się z wybranymi cząsteczkami (np. transferyną, lipoproteiną o niskiej gęstości, czynnikami wzrostu lub przeciwciałami). W obszarze aktywnych receptorów błona komórkowa ulega wgłębieniu, a formujący się pęcherzyk od wewnętrznej strony zostaje otoczony białkiem klatryną. Takie pęcherzyki następnie łączą się w większe struktury tzw. wczesne endosomy, gdzie na skutek niższego pH receptory oddysocjują i wracają na powierzchnię błony, a cząsteczka w endosomie późnym łączy się z lizosomami.
- endocytoza kaweolowa (ang. *caveolar endocytosis*) – kaweole to niepokryte klatryną butelkowate wgłębienia w błonie komórkowej głównie adipocytów, mięśni gładkich czy fibroblastów. Tworzą się w miejscach występowania białka kaweoliny i tzw. tratw lipidowych (region błony plazmatycznej o innym składzie lipidowym i właściwościach, np. o mniejszej płynności). W przeciwieństwie do pozostałych typów endocytoz, kawelosom wędruje do siateczki śródplazmatycznej, gdzie oddaje w stanie nienaruszonym pobraną cząsteczkę [68].

*Metody biologiczne* wprowadzania transgenu do komórek docelowych dotyczą głównie endocytozy. Jedynie nieliczne wektory na bazie kationowych lipidów np. DOGS mogą przekazywać transgen do komórki poprzez fuzję błon [44]. Na rysunku 3 przedstawiono schemat procesu transfekcji. Należy wspomnieć, że metoda bezpośredniego

podawania „nagiego” transgenu do komórek jest trudna. Ze względu na duży ujemny ładunek i wielkość transgenu niechętnie jest on przyjmowany przez błonę komórkową na drodze endocytozy, a dodatkowo transgen narażony jest na trawienie przez nukleazy, dlatego lepszym rozwiązaniem jest stosowanie nośników (rozdział 1.3) [43].



Rysunek 3. Schemat procesu transfekcji transgenu z uwzględnieniem różnych rodzajów transportu błonowego.



*Metody fizyczne* dostarczania transgenów do komórek, bazujące na czynnikach fizycznych (ultradźwięki, pole elektryczne, itp.), stosowane są w przypadku terapii *ex vivo* i dotyczą procesów, które czasowo dezintegrują błonę komórkową, tak aby transgen mógł wnikać do wnętrza komórki. Do najważniejszych z nich należą:

- Elektroporacja, gdzie seria impulsów elektrycznych zwiększa tymczasowo przepuszczalność błony komórkowej, w efekcie czego tworzą się hydrofilowe pory, umożliwiające wnikanie naładowanych cząsteczek transgenów do środka komórek. Po ustaniu bodźca błona komórki wraca do swojej pierwotnej formy [69];
- Sonoporacja – mikropory umożliwiające wnikanie transgenów powstają na skutek oddziaływania ultradźwięków na błonę komórkową [70];
- Mikroiniekcja – DNA lub RNA jest podawane bezpośrednio do komórki przy pomocy szklanej mikropipety [71];
- Mikrowstrzeliwanie – metalowe mikrocząsteczki np. złota, zostają opłaszczane transgenem, by następnie zostać wstrzelone do komórki przy użyciu tzw. „strzelby genowej” (ang. *gene gun*) [72].

We wnętrzu komórki nośnik nie może dopuścić do degradacji transgenów przez lizosomy. Materiał genetyczny musi pozostać w stanie nienaruszonym i dotrzeć do cytozolu, a w drugiej kolejności do jądra komórkowego (w przypadkach nośników DNA). Ucieczka endosomalna możliwa jest np. na skutek obniżonego pH, niektóre substancje zmieniają swoją konformację, co umożliwia przenikanie przez pory w błonie endosomu, innym sposobem jest wywoływanie efektu gąbki protonowej lub tworzenia odwrotnej fazy heksagonalnej przez niektóre lipidy. W przypadku endocytozy kawolowej transgen wędrując przez aparat Golgiego do siateczki śródplazmatycznej przez pory uwalniany jest do cytoplazmy komórkowej.

Z cytozolu DNA dostaje się do jądra na dwa sposoby: pasywny – podczas mitozy, kiedy otoczka jądrowa zanika czy w sposób aktywny: na skutek fuzji błon (w przypadku niektórych lipopleksów) [73] lub przez pory w błonie jądrowej przy pomocy białek transportujących makrocząsteczki do jądra. Często stosuje się DNA z krótkim peptydem sygnałowym NLS (ang. *nuclear localization signal*), który rozpoznaje białka transportujące (tzw. importyny) i umożliwia transport przez kompleksy pora jądrowego [16].



## 2 Surfaktanty oligomeryczne

---

Surfaktanty (związki powierzchniowo czynne, ang. *Surface Active Agents*) to organiczne związki amfifilowe składające się z części hydrofobowej i hydrofilowej. Ze względu na swoją budowę, wykazują szereg specyficznych właściwości m. in. cechują się zdolnością do samoorganizacji czy gromadząc się na granicy faz (ciecz/gaz, ciecz/ciecz, czy ciecz/ciało stałe), zmianą ich właściwości powierzchniowe. Tym samym surfaktanty znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, spożywczym, chemicznym czy farmacji.

W ostatnim czasie dużym zainteresowaniem badaczy cieszą się oligomeryczne formy surfaktantów, które wykazują zdecydowanie lepsze właściwości w porównaniu do ich monomerycznych homologów.

Jako początek historii surfaktantów oligomerycznych, można przyjąć opisany przez Buntona i współpracowników [74] kationowy surfaktant dimeryczny (inaczej bliźniaczy, gemini) – tzw. bis-surfaktant, powstały na bazie czwartorzędowych surfaktantów amoniowych. Co ciekawe, celem wspomnianej pracy nie była synteza nowej grupy związków, a znalezienie sposobu na zwiększenie skuteczności katalizy micelarnej poprzez modyfikację powszechnie stosowanego surfaktantu, którym był CTAB (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy). Prace nad bis-surfaktantami były dalej kontynuowane i w 1985 roku ukazała się praca Devinsky'ego i współpracowników [75], w której przeanalizowano dużą grupę nowych, oligomerycznych związków powierzchniowo czynnych pod kątem ich aktywności powierzchniowej i zdolności do micelizacji. W 1990 roku Okahara otrzymał pierwszy anionowy surfaktant gemini [76]. Od lat 90. XX wieku zainteresowanie tą grupą związków nie słabnie, a wręcz obserwuje się wzmożony rozwój badań nad nowymi strukturami, które pozwalają osiągnąć unikalne i pożądane właściwości materiałów.

Prace dotyczące surfaktantów gemini wykazały, że charakteryzują się one znacząco niższymi wartościami krytycznego stężenia micelizacji (co opisano dokładniej w rozdziale 2.2.2) oraz wydajniej obniżają napięcie powierzchniowe niż ich monomeryczne odpowiedniki. Co więcej roztwory wodne surfaktantów gemini charakteryzują się wysoką sprężystością, a nawet lepkością. Ponadto surfaktanty dimeryczne wykazują lepsze właściwości solubilizujące, zwilżające i pieniące [77]. W świetle przytoczonych doniesień dla surfaktantów dimerycznych, można sądzić, że zwiększenie stopnia oligomeryzacji surfaktantu tj. dodania kolejnego monomeru, pozwoli na otrzymanie związków o równie interesujących właściwościach, a co ważniejsze, osiągnięcie lepszej skuteczności i poszerzenie zakresu ich zastosowań [78, 79].

## 2.1 Budowa surfaktantów oligomerycznych

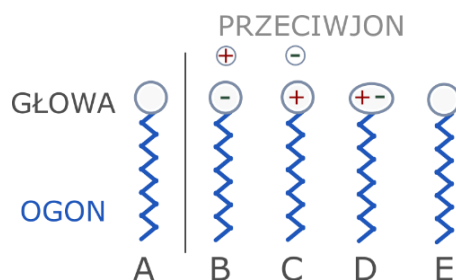
---

Właściwości surfaktantów oligomerycznych, a więc także ich potencjalne zastosowanie, powiązane są ściśle ze strukturą tych związków. Z tego powodu tak ważne jest poznanie budowy surfaktantów, by móc lepiej wykorzystać ich potencjał. W pierwszej kolejności zostanie omówiona budowa form monomerycznych, gdyż to z niej wynika, większość podstawowych cech surfaktantów oligomerycznych.

Monomeryczna cząsteczka surfaktantu składa się z [80]:

A. części hydrofilowej tzw. „głowy”, która wykazuje powinowactwo do rozpuszczalników polarnych jak woda, co przekłada się na rozpuszczalność w tych rozpuszczalnikach. Odpowiedzialne za to są najczęściej reszty kwasowe (np. grupa karboksylowa  $\text{COOH}$ , sulfonowa  $\text{SO}_3\text{H}$ , siarczanowa  $\text{O-SO}_3\text{-H}$ , fosforanowa  $\text{O-PO(OH)}_2$ ) lub zasadowe (np. pierwszo-, drugo- lub trzeciorzędowa grupa aminowa, odpowiednio  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}$ ,  $\text{NR}_2$ , lub czwartorzędowa grupa amoniowa  $[\text{NR}_3]^+$ ). W „głowie” surfaktantu mogą również występować grupy hydrofilowe (np. grupa hydroksylowa  $\text{OH}$ , tiolowa  $\text{SH}$ , reszty cukrów prostych i złożonych), które podobnie jak poprzednie zwiększają rozpuszczalność surfaktantu w roztworach polarnych. Ze względu na charakter części hydrofilowej surfaktanty można podzielić na (rysunek 4.):

- anionowe – część hydrofilowa zawiera grupy o ujemnym ładunku elektrycznym, występuje też dodatnio naładowany przeciwjon np. kation sodu  $\text{Na}^+$ . Surfaktanty anionowe w rozpuszczalnikach polarnych są wrażliwe na zmiany pH oraz obecność innych jonów, których działanie również ma na celu zwiększenie ich rozpuszczalności. Do tej grupy należą związki o dobrych właściwościach myjących, zwilżających i pianotwórczych [80].
- kationowe – część hydrofilowa zawiera grupy o dodatnim ładunku elektrycznym, obecny jest również ujemnie naładowany przeciwjon, np. anion chlorkowy  $\text{Cl}^-$ , który zwiększa rozpuszczalność w wodzie i znacząco obniża temperaturę Kraffta (rozdział 2.2.1) [77]. Surfaktanty z tej grupy często wykazują silne właściwości biologiczne np. bakterio- i grzybobójcze.
- niejonowe – nie posiadają jonów w części polarnej, jednak zawierają grupy zwiększające polarność cząsteczki (np.  $\text{OH}$ ), dzięki którym uzyskują dobrą rozpuszczalnością w roztworach wodnych, np. komercyjny Triton X-100 [81].
- zwitterjonowe (amfoteryczne) – w części hydrofilowej występują zarówno grupy o dodatnim jak ujemnym ładunku elektrycznym [80].



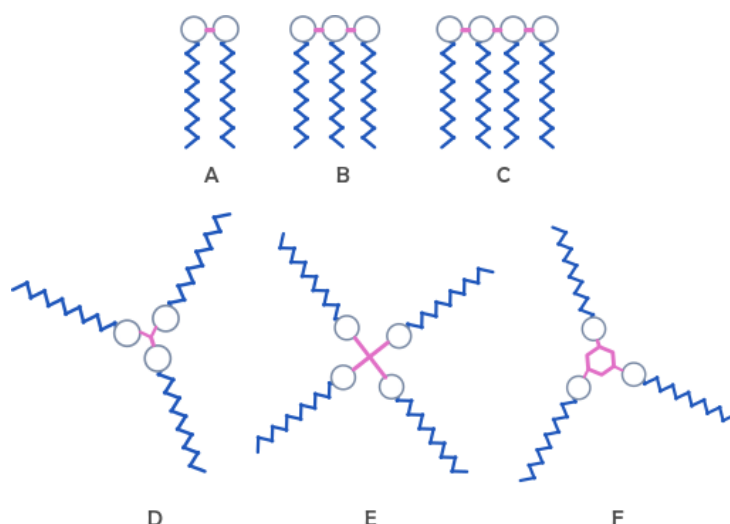
Rysunek 4. Schematyczna reprezentacja budowy monomerycznych surfaktantów (A), z uwzględnieniem podziału pod względem charakteru części hydrofilowej: surfaktanty anionowe (B), kationowe (C), zwiterjonowe (D) oraz niejonowe (E).

- B. części hydrofobowej tzw. „ogona” – obszar cząsteczki surfaktantu o właściwościach niepolarnych. Jest to zazwyczaj alifatyczny łańcuch węglowodorowy składający się najczęściej z 8 do 18 atomów węgla, który może występować formie nierozgałęzionej bądź rozgałęzionej, ale również może zawierać wiązania nienasycone lub struktury cykliczne. W cząsteczce surfaktantu może występować wielokrotna ilość części hydrofobowych.

Surfaktanty oligomeryczne to surfaktanty składające się z co najmniej dwóch monomerów połączonych ze sobą dodatkową grupą tzw. łącznikiem (ang. *spacer*). Rodzaj łącznika silnie przekłada się na właściwości surfaktantu.

Surfaktanty oligomeryczne można również sklasyfikować ze względu na:

- A. Stopień oligomeryzacji, czyli liczbę monomerycznych podjednostek surfaktantu: dimeryczne (inaczej gemini) –  $j = 2$ , trimeryczne –  $j = 3$ , tetrameryczne –  $j = 4$ , itp., gdzie  $j$  – oznacza stopień oligomeryzacji [77]:
- B. Strukturę łącznika (rysunek 5.):
- liniowe – opisywane jako  $m-s-(m-s)_x-m$  gdzie  $m$  to liczba atomów węgla w łańcuchu hydrofobowym,  $s$  liczba atomów węgla w łączniku, a  $x$  oznacza, stopień oligomeryzacji pomniejszony o 2. Jest to najszerzej badana grupa surfaktantów oligomerycznych, ponieważ są stosunkowo łatwe w otrzymywaniu, a co za tym idzie poprzez zmianę długości łańcucha hydrofobowego lub łącznika zmienić można jego właściwości użytkowe, np. wartość stężenia micelizacji [77];
  - pierścieniowe (ang. *ring-type*) – obecność struktury cyklicznej np. 1,4-dioksan zwiększa sztywność surfaktantu, powoduje również spadek rozpuszczalności w danym rozpuszczalniku. [77]. Struktury pierścieniowe mogą być wielokrotnie co dodatkowo usztywni całą cząsteczkę surfaktantu, co przekłada się na wyższą lepkość [82].
  - gwiazdziste (ang. *star-shaped*) – przy niskich stężeniach w roztworze surfaktanty gwiazdziste tworzą olbrzymie „sieci” pre-miceleryczne, dopiero w wyższym stężeniu dochodzi do utworzenia sferycznych micel [79].



Rysunek 5. Graficzna reprezentacja podziału surfaktantów oligomerycznych: liniowe dimeryczne (A), trimeryczne (B), tetrameryczne (C); gwiazdziste: potrójne (D), poczwórne (E) oraz pierścieniowe (F). Różowym kolorem zaznaczono łącznik.

## 2.2 Surfaktanty oligomeryczne w roztworach wodnych

Surfaktanty wykazują szereg wyjątkowych cech, które nadają im unikatowy charakter. Choć zdolność do samoorganizacji czy do gromadzenia się na granicy faz jest domeną wszystkich surfaktantów, to oligomeryczność tych struktur sprawia, że układy na ich bazie zyskują nowe, lepsze właściwości, zwiększające ich możliwości aplikacyjne.

### 2.2.1 Rozpuszczalność surfaktantów

Rozpuszczalność surfaktantów w wodzie wynika bezpośrednio z obecności grup hydrofilowych. Surfaktanty jonowe w środowisku wodnym ulegają dysocjacji na jony, które następnie są hydratowane. W przypadku surfaktantów niejonowych ich rozpuszczalność wynika z tworzenia wiązań wodorowych między specyficznymi ich grupami np. atomami tlenu eterowego w łańcuchu polioksyetylenowym, a cząsteczkami wody [80].

W roztworach wodnych surfaktantów występuje szereg oddziaływań, które w konsekwencji przekładają się na ich właściwości. Do najważniejszych należą: oddziaływania elektrostatyczne, siły van der Waalsa, procesy związane z hydratacją, siły osmotyczne, oddziaływania steryczne oraz hydrofobowe. Szczególne znaczenie mają oddziaływania hydrofobowe determinujące organizowanie się surfaktantów w specyficzne struktury m. in. micelle. Oddziaływania te mają charakter sił przyciągających i dotyczą niepolarnych części cząsteczek surfaktantów, narzucając lokalne porządkowanie się struktury wody.

Rozpuszczalność surfaktantów jonowych skorelowana jest bezpośrednio z temperaturą otoczenia – wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, co wynika z energii sieci krystalicznej i entalpii hydratacji surfaktantów [77]. Zależność tą można opisać przy pomocy krzywej rozpuszczalności, która jednocześnie wyznacza równowagę między pojedynczymi cząsteczkami, a fazą stałą surfaktantu w roztworze. Na wykresie fazowym surfaktantów przy stężeniu  $C_K$  i temperaturze  $T_K$  obserwujemy tzw. punkt Kraffa. Obecność rozgałęzionych łańcuchów hydrofobowych bądź występowanie w nich wiązań

wielokrotnych obniża wartość temperatury Kraffta. Nie wykazano jednak jednoznacznego wpływu oligomeryzacji surfaktantu na jego temperaturę Kraffta. Na przykład dla DTAB (bromek dodecylotrimetyloamoniowy)  $T_k$  wynosi 0°C, dla jego dimeru (12-2-12) wzrasta do 15°C, dla trimeru (12-2-12-2-12) spada do 0°C, a dla tetrametu (12-2-12-2-12-2-12)  $T_k$  wynosi 32°C [77]. Temperatura Kraffta poniżej 0°C jest obserwowana dla wielu anionowych surfaktantów dimerycznych oraz trimerycznych. Takie parametry wskazują, że możliwe jest zastosowanie tych związków jako środków piorących nawet w niskich temperaturach [83].

### 2.2.2 Proces samoorganizacji surfaktantów

Wraz ze wzrostem temperatury i stężenia surfaktantu, w roztworze zaczynają się tworzyć agregaty zwane micelami. Równowagę między pojedynczymi cząsteczkami surfaktantu, a micelami opisuje krzywa krytycznego stężenia micelnego. Natomiast równowagę micle-ciało stałe wyznacza krzywa rozpuszczalności micelarnej. Stężenie, przy którym powstają micle nazywamy krytycznym stężeniem micelizacji (ang. *Critical Micelle Concentration, CMC*). W roztworach wodnych agregaty surfaktantów mogą przyjąć różną postać: miceli kulistej, miceli cylindrycznej, struktury pęcherzykowej lub struktury lamelarnej. Przyjmowanie konkretnych struktur uzależnione jest od tzw. krytycznego parametru upakowania (ang. *Critical Packing Parameter, CPP*). Parametr *CPP* określa stosunek objętości części hydrofobowej  $V$  do ilorazu pola powierzchni części hydrofilowej  $a$  i długości łańcucha alifatycznego surfaktantu  $l$  [80]. Dodatkowo każdą micelę można scharakteryzować poprzez podanie jej rozmiaru oraz ilości cząsteczek surfaktantu wchodzącej w jej skład – tzw. liczba agregacji  $N_{ag}$  [84]. Dodatkowo dla niektórych surfaktantów obserwuje się tworzenie agregatów pre-micelarnych dla stężeń niższych niż *CMC*, stężenie to nazywane jest krytycznym stężeniem agregacji (ang. *Critical Aggregation Concentration, CAC*).

U podstaw zjawiska tworzenia micel leży proces asocjacji hydrofobowej i dążenie części apolarnej surfaktantu do zminimalizowania kontaktu z cząsteczkami wody. Siłami działającymi przeciwko micelizacji są natomiast oddziaływania odpychające między naładowanymi głowami surfaktantów jonowych, działanie osmotyczne czy oddziaływania steryczne [77].

W oparciu o model rozdziału pseudo-fazowego oraz model „działania mas” możliwe jest opisanie procesu micelizacji i wyznaczenie parametrów termodynamicznych takich jak: energia swobodna, entalpia oraz entropia micelizacji.

Energia swobodna micelizacji jest sumą energii związanej z odpychającymi oddziaływaniami elektrostatycznymi oraz energii związanej z przyciąganiem między łańcuchami hydrofobowymi [85]. Energia swobodna micelizacji przypadająca na jeden łańcuch hydrofobowy  $\Delta G_{mic/\lambda\lambda\lambda}$  dla jonowych surfaktantów oligomerycznych o liniowej strukturze przyjmuje postać zależności:

$$\Delta G_{mic/\lambda\lambda\lambda} = \left(\frac{1}{j} + \beta\right) \ln CMC - \left(\frac{RT}{j}\right) \ln j \quad (3)$$

gdzie:  $j$  – stopień oligomeryzacji,  $\beta$  – współczynnik wiązania przeciwjonów do miceli,  $R$  – stała gazowa,  $T$  – temperatura otoczenia.

Druga część równania (3) jest zanedbywalnie mała, tak więc w przypadku rozważnych w pracy surfaktantów trimerycznych, przy uwzględnieniu liczby łańcuchów alkilowych, energia swobodna micelizacji wynosi [83, 86, 87]:

$$\Delta G_{mic} = 3 \left( \frac{1}{3} + \beta \right) \ln CMC \quad (4)$$

Na entalpię micelizacji  $\Delta H_{mic}$  składa się ciepło procesu egzotermicznego (siły dyspersji części hydrofobowej) oraz ciepło endotermiczne (wytworzenie podwójnej warstwy elektrycznej wokół miceli) [85]. Entalpię micelizacji surfaktantów trimerycznych można opisać zależnością:

$$\Delta H_{mic} = -3 \left( \frac{1}{3} + \beta \right) RT^2 \frac{d \ln CMC}{dT} \quad (5)$$

a entropię micelizacji zależnością [88,89]:

$$\Delta S_{mic} = \frac{\Delta H_{mic} - \Delta G_{mic}}{T} \quad (6)$$

Na wartość CMC mają wpływ następujące czynniki:

- A. długość łańcucha alkilowego surfaktantu – wraz z wydłużaniem się łańcucha hydrofobowego maleje wartość *CMC* [90], np. w przypadku surfaktantów trimerycznych z głową alkilotrimetyloamoniową i łączniku złożonym z dwóch atomów węgla, o łańcuchu oktylowym (8-2-8-2-8) *CMC* wynosi 14 mM, decylowym (10-2-10-2-10) - 0,95 mM, a o dodecylowym (12-2-12-2-12) - 0,065 mM [91].
- B. rodzaj grupy hydrofilowej surfaktantu – wraz ze wzrostem masy molowej części hydrofilowej wzrasta liniowo wartość *CMC* [92]. Lokalizacja grup hydroksylowych w części polarnej również wpływa na wartości *CMC* – np. dla surfaktantów z IV-rzędową solą amoniową w części polarnej, im większa odległość grup OH· względem czwartorzędowego amoniaku tym większa wartość *CMC* surfaktantu [93].
- C. rodzaj przeciwjonów w przypadku surfaktantów jonowych np. w danej temperaturze *CMC* surfaktantów maleje (silniejsze oddziaływania między surfaktantami) ze względu na rodzaj ich przeciwjonu zgodnie z przebiegiem serii Hofmeistera w kolejności  $Li^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow K^+ \rightarrow Cs^+$  [94] lub  $ClO_3^- \rightarrow NO_3^- \rightarrow Br^- \rightarrow Cl^- \rightarrow F^-$  [95, 96].
- D. stopień oligomeryzacji surfaktantu – wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji surfaktantów spada wartość *CMC*, np. w przypadku DTAB i jego oligomerycznych odpowiedników: *CMC* dla monomeru wynosi 15,1 mM, dimeru (12-3-12) – 0,96 mM, trimeru (12-3-12-3-12) – 0,16 mM, tetrameru (12-3-12-4-12-3-12) – 0,06 mM [97]. Podobną zależność obserwuje się dla homologów DeTAB (bromek decylotrimetyloamoniowy): *CMC* dla monomeru wynosi 67 mM, dimeru (10-2-10) - 6,5 mM, a dla trimeru (10-2-10-2-10) - 0,95 mM [91].
- E. rodzaj łącznika w przypadku surfaktantów oligomerycznych [98].
- F. siła jonowa roztworu – wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu wartość *CMC* się obniża [99].
- G. pH roztworu – dla niskich wartości pH obserwuje się obniżenie *CMC* [100].



- H. ciśnienie – przebieg tej zależności jest niejednoznaczny, jednak obserwuje się nieznaczny wzrost *CMC* przy zwiększającym się ciśnieniu [101, 102].
- I. temperatura – wartość *CMC* rośnie wraz ze wzrostem temperatury np. dla CTAB w temperaturze 20°C *CMC* wynosi 0,95 mM; w 30°C -1,08 mM, a w 40°C - 1,18 mM [103].

Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w roztworze obserwuje się oddziaływania między micelami, prowadzące do tworzenia się specyficznych struktur - tzw. liotropowej fazy ciekłokrystalicznej, charakteryzującej się właściwościami zarówno typowymi dla ciał stałych jak i cieczy.

W roztworach wodnych surfaktantów najczęściej występujące mezofazy to [80, 104]:

- micelarna  $L_1$  – izotropowy roztwór miceli kulistych, cylindrycznych lub dyskoidalnych.
- heksagonalna  $H_1$  – faza optycznie anizotropowa, wydłużone micelle w formie pałeczek ułożonych heksagonalnie z hydrofobowym rdzeniem.
- regularna – faza optycznie izotropowa, gdzie regularne są rozmieszczone agregaty micelarne o centrowaniu przestrzennym lub powierzchniowym. Faza regularna występuje w postaci dwóch typów: micelarnej, nieciągłej (ang. *discontinuous*) oznaczanej jako  $I_1$  lub dwuciągłej (ang. *bicontinuous*) oznaczanej jako  $V_1$ . Typ micelarny charakteryzuje się regularnie rozmieszczonymi i przylegającymi do siebie małymi kulistymi micelami, natomiast fazę regularną dwuciągłą tworzy trójwymiarowa porowata struktura utworzona z pałeczkowatych micel lub dwuwarstw.
- lamelarna  $L_\alpha$  – faza optycznie anizotropowa, utworzona z jednowymiarowo ułożonych dwuwarstw, inaczej nazywana fazą smektyczną.

Dla bardzo wysokich stężeń surfaktantów w roztworze może dojść do tworzenia się form odwróconych fazy heksagonalnej ( $H_2$ ) lub regularnej ( $I_2, V_2$ ). Przy stałej temperaturze w układach surfaktant-woda obserwuje się występowanie wymienionych mezofaz zgodnie ze wzrostem stężenia surfaktantu w kolejności:  $L_1 \rightarrow H_1 \rightarrow I_1/V_1 \rightarrow L_\alpha \rightarrow I_2/V_2 \rightarrow H_2$  [80]. Granice mezofaz są nieostre, występują obszary przejściowe, gdzie współistnieją oba rodzaje graniczących ze sobą mezofaz. Występowanie wszystkich rodzajów mezofaz dla jednego związku jest bardzo rzadkie, ale możliwe np. dla surfaktantu BDHAB (bromek benzylodimetyloheksadecyloamoniowy) w roztworze wodnym przy stałej temperaturze ze wzrostem stężenia surfaktantu otrzymano szereg  $L_1 \rightarrow H_1 \rightarrow V_1 \rightarrow L_\alpha$  [105]. W przypadku wyższych oligomerów surfaktantów liczba rodzajów obserwowanych mezofaz często jest niższa niż w przypadku monomerycznych odpowiedników, np. dla DTAB zarejestrowano fazy: heksagonalną  $H_1$ , regularną  $V_1$  oraz lamelarną  $L_\alpha$  [106]; dla dimeru DTAB 12-2-12: heksagonalną  $H_1$  oraz lamelarną  $L_\alpha$ , natomiast dla trimeru 12-2-12-2-12 i tetrameru 12-2-12-2-12-2-12 wyłącznie fazę heksagonalną [107]. Surfaktanty oligomeryczne wykazują tendencję do tworzenia wydłużonych agregatów nawet przy niskich stężeniach. Jest to spowodowane konkurencją między działaniem sił odpychających występujących pomiędzy naładowanymi głowami surfaktantów, które sprzyjają tworzeniu agregatów o dużych krzywiznach powierzchni, a siłami odpychającymi między hydrofobowymi ogonami, które powodują powstawanie agregatów o mniejszym promieniu krzywizny [108].

### 2.2.3 Adsorpcja na granicy faz

Ze względu na swoją amfifilową budowę surfaktanty mają zdolność do gromadzenia się i porządkowania na granicy faz np. woda/powietrze obniżając tym samym tzw. napięcie powierzchniowe  $\gamma$ . Zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego zależy od budowy surfaktantu, a w szczególności stopnia oligomeryzacji, długości i rodzaju łącznika, długości łańcucha hydrofobowego oraz rodzaju przeciwjonu [77].

Do opisu aktywności powierzchniowej surfaktantów posłużyć mogą dwa parametry [109]:

- wydajność adsorpcji  $pC20$  – jest to ujemny logarytm ze stężenia substancji rozpuszczonej, wymaganego do obniżenia napięcia powierzchniowego czystego rozpuszczalnika o 20 mN/m. Im wyższa jego wartość, tym wyższa wydajność adsorpcji na powierzchni, a co za tym idzie, wyższa skuteczność obniżania napięcia powierzchniowego.
- Wielkość adsorpcji  $\Pi$  – jest to maksymalne stężenie surfaktantu w warstwie powierzchniowej wyrażane, jako liczba moli na jednostkę powierzchni międzyfazowej Gibbsa.

Napięcie powierzchniowe wody wynosi 72,8 mN/m, natomiast dla niektórych surfaktantów monomerycznych wartość napięcia powierzchniowego mieści się w granicach 30-40 mN/m (np. dla DTAB przy stężeniu równym  $CMC$ :  $\gamma_{CMC} = 40$  mN/m). Wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji, kolejne oligomery DTAB uzyskują następujące wartości napięcia powierzchniowego: dimer (12-2-12-2): 31,4 mN/m, trimer (12-2-12-2-12): 36,4 mN/m, tetramer (12-2-12-2-12-2-12): 29,7 mN/m [77,110]. Dla DeTAB w formie monomerycznej napięcie powierzchniowe wynosiło 40 mN/m, dla jego dimeru (10-2-10): 32 mN/m, a dla trimeru (10-2-10-2-10): 25,8 mN/m [91].

Większa aktywność powierzchniowa surfaktantów oligomerycznych wynika ze zwielokrotnienia grup hydrofobowych w cząsteczce, które silniej zaburzają strukturę wody, jednocześnie tworząc, poprzez ściślejsze upakowanie, spójniejszą warstwę między fazami woda/powietrze [84]. Na skuteczność obniżania napięcia powierzchniowego ma również wpływ długość łańcucha alkilowego surfaktantów – zgodnie z regułą Traube'go zwiększając liczbę grup metylenowych w łańcuchu hydrofobowym o jeden, możliwe jest uzyskanie takich wydajności adsorpcji, co w przypadku homologów o krótszym łańcuchu, redukując wymagane do tego stężenie trzykrotnie [80].

Aktywność powierzchniowa surfaktantów zależy także od stopnia ich upakowania na powierzchni i jest odwrotnie proporcjonalna do powierzchni zajmowanej przez cząsteczkę surfaktantu  $a_{min}$ . Własność ta sugerowałaby, że dla liniowych surfaktantów oligomerycznych np. DeTAB i jego analogów, wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji wzrasta wartość  $a_{min}$ , a tym samym są one bardziej aktywne powierzchniowo. W przypadku wyższych oligomerów, może dochodzić do większego upakowania cząsteczki surfaktantu, co zaniża przewidywaną wartość  $a_{min}$  i podwyższa napięcie powierzchniowe, co było obserwowane np. dla trimeru DeTAB. Niemniej jednak surfaktanty oligomeryczne wykazują wyższą aktywność powierzchniową niż ich monomery, ale większe różnice obserwuje się między aktywnością monomer-dimer niż dimer-wyższe oligomery [77].

### 2.3 Potencjalne zastosowania surfaktantów oligomerycznych

---

Właściwości powierzchniowe surfaktantów oligomerycznych są często lepsze niż ich monomerycznych homologów. Jednakże ze względu na trudność w syntezie w ilościach wystarczających dla przemysłu, obecnie surfaktanty oligomeryczne są wykorzystywane jedynie na małą skalę. Dodatkowo ze względu na swoją toksyczność surfaktanty oligomeryczne, aby mogły być wykorzystywane na szeroką skalę (komercyjnie), muszą mieć wyznaczone normy użytkowania. Surfaktanty oligomeryczne potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie jako:

- a) środki pianące, gdyż wykazują silniejsze i trwalsze własności pianotwórcze niż ich monomeryczne odpowiedniki [111]. Laschewsky [98] zauważył, że wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji rosną zdolności pianotwórcze surfaktantów, z tym że największa różnica obserwowana jest pomiędzy dimerami a trimerami, natomiast między trimerami a tetramerami różnice są nieznaczące.
- b) emulgatory, ponieważ niektóre z nich wydajnie tworzą emulsje nawet przy stężeniach znacząco niższych od *CAC* [77].
- c) środki zwilżające – Lagleize [112] w swoich badaniach dowiódł, że surfaktanty oligomeryczne znacząco poprawiają własności zwilżające badanych kopolimerów, z tym, że różnice między dimerami a wyższymi oligomerami były zaniedbywalne w porównaniu do wyników uzyskanych dla monomerycznych homologów.
- d) do modyfikacji powierzchni mineralnych, gdzie zdolność surfaktantów trimerycznych do adsorpcji na powierzchniach mineralnych (np. krzemionkowych w przypadku DTAB), i tworzeniu regularnych struktur dwuwarstwowych na powierzchni podłoża, może w przyszłości być wykorzystana do funkcjonalizowania podłoża poprzez tworzenie na nim pożądanych wzorów [113].
- e) Komponenty/matryce do syntezy zaawansowanych materiałów, takich jak mezoporowate materiały krzemionkowe [114] oraz kropki kwantowe na bazie tlenku cynku [115], gdzie zastosowanie oligomerycznych surfaktantów pozwoliło na uzyskanie struktur z wysoką wydajnością.
- f) środki biobójcze – surfaktanty mają zdolność przenikania przez ściany komórkowe, powodując następnie dezintegrację błony komórkowej i degradację białek oraz materiału genetycznego patogenu, co prowadzi do lizy i śmierci komórek [116]. Badania nad kationowymi oligomerycznymi surfaktantami wykazały, że wzrost aktywności antybakteryjnej surfaktantów skorelowany jest ze wzrostem liczby części hydrofilowych i hydrofobowych w surfaktantach [117].
- g) składniki preparatów leczniczych (np. odkażających rany, przeciwzapalnych, płynach do soczewek kontaktowych) [118] i szczepionek czy innych preparatów do iniekcji - stosowany jest np. polisorbate 80, który ułatwia rozpuszczanie białek w podawanym roztworze [119]. Surfaktanty o wyższym stopniu oligomeryczności są rozważane jako potencjalne nośniki leków czy środki wspomagające dostarczanie np. w preparatach dermatologicznych surfaktanty gemini zwiększają przepuszczalność skóry i ułatwiają wnikanie substancji aktywnych w głębsze warstwy [120].
- h) nośniki w terapii genowej (temat omówiono szerzej w rozdziale 3.).



### 3 Lipopleksy na bazie surfaktantów oligomerycznych i lipidów

---

Odpowiednio upakowany materiał genetyczny o zredukowanym ładunku elektrycznym jest podstawą efektywnego dostarczenia materiału genetycznego do komórek żywych (transfekcji) [121]. Spełnienie tych wymogów zapewnia zastosowanie kationowych surfaktantów, które ze względu na oddziaływania elektrostatyczne neutralizują ujemny ładunek DNA, a dzięki oddziaływaniom hydrofobowym przyczyniają się do zwijania cząsteczki kwasu nukleinowego. Niestety ze względu na cytotoksyczność surfaktantów i niestabilność kompleksów w zmiennych warunkach, wydajność transfekcji dla tych nośników jest niska. Aby zachować wysoką skuteczność terapeutyczną jednocześnie zmniejszając efekty cytotoksyczne, stosuje się układy o niskich stężeniach surfaktantów w obecności lipidów pomocniczych, które ułatwiają transfekcję i zwiększają dodatkowo biokompatybilność takich układów.

#### 3.1 Oddziaływania surfaktantów z kwasami nukleinowymi

---

DNA w organizmach żywych występuje w stanie skondensowanym, natomiast w czystych roztworach wodnych w formie wydłużonej. Kondensowanie DNA zachodzi w obecności tzw. środków kondensujących, którymi są wielowartościowe kationy (np. poliaminy, kationy nieorganiczne, kationy metali, kationowe polipeptydy, białka histonowe czy kationowe surfaktanty). Upakowanie DNA uwidocznione może być metodami fizycznymi na przykład poprzez obserwację zmian skręcalności optycznej [122].

Pierwsze obserwacje kompleksów surfaktant/DNA oparte były o układy DNA z CTAB w obecności lub braku nieelastycznego polielektrolitu (polipeptyd lub jednoniciowy RNA) [123]. Ghirlando ustalił, że rozmiar agregatów zależy od stężenia surfaktantu - im wyższe stężenie surfaktantu tym większe kompleksy [123]. Dodatkowo dalsze badania nad kompleksami CTAB/DNA wykazały, że w zależności od stężenia surfaktantu w roztworze DNA występowało w formie kłęбка statycznego lub globuli, albo obserwowano współistnienie obu tych struktur [124].

Wiązanie surfaktantów kationowych do cząsteczki kwasu nukleinowego wynika z oddziaływań elektrostatycznych między ładunkami o przeciwnym znaku. DNA to polielektrolit zbudowany z dwóch łańcuchów polinukleotydowych (nici) połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi, występującymi pomiędzy zasadami azotowymi nukleotydów. Nukleotyd składa się z cukru pięciowęglowego, reszty fosforanowej oraz zasady azotowej (tyminy, adeniny, cytozyny lub guaniny) [13]. To właśnie reszty fosforanowe nadają ujemny ładunek DNA i umożliwiają przyłączanie dodatnio naładowanych cząstek [125].

Przyłączanie cząsteczek surfaktantu do DNA zachodzi niezależnie od jego stężenia w roztworze. Oznacza to, że mimo stężenia dużo niższego od wartości *CAC* występują oddziaływania elektrostatyczne między naładowanymi grupami, tj. dochodzi do związania między surfaktantami a DNA, czyli tworzą się kompleksy. Mała liczba tych oddziaływań nie doprowadza jednak do zmian konformacji DNA ani zwiększenia stopnia jego upakowania. Przy stężeniach surfaktantu powyżej *CAC*, w roztworze pojawiają się również agregaty pre-micelarne, które poprzez zwiększający się udział oddziaływań hydrofobowych w tworzeniu kompleksu, dodatkowo stabilizują układ surfaktant/DNA. Za punkt utworzenia stabilnego kompleksu surfaktant/DNA, niektórzy badacze przyjmują

odpowiednio wysokie stężenie surfaktantu, dla którego dochodzi do wytrącania DNA z roztworu. Oddziaływania między DNA i surfaktantami kationowymi charakteryzują się wysoką kooperatywnością, świadczyć o tym mogą: gwałtowny spadek ruchliwości elektroforetycznej w wąskim zakresie stężeń surfaktantu oraz występowanie wytrąceń kompleksów nawet przy bardzo małych stężeniach surfaktantu [122, 126].

Podobnie jak micelizacja, tak i proces łączenia się surfaktantów z cząsteczkami DNA jest procesem spontanicznym i endotermicznym, a jego siłą napędową jest entropia (tzw. *entropy-driven*) [127, 128].

Proces upakowania DNA (będącego w formie wydłużonej) przez kationowe surfaktanty może być opisany energią swobodną, będącą sumą energii: energii swobodnej elastycznej deformacji DNA, energii swobodnej wynikającej z oddziaływań elektrostatycznych między DNA i surfaktantami, energii swobodnej wynikającej z interakcji między DNA, a rozpuszczalnikiem oraz energii oddziaływań hydrofobowych surfaktantów.

Przy rozważaniach nad wiązaniem surfaktantów z DNA stosuje się współczynnik  $p/n$ , określający stosunek ładunków dodatnich pochodzących od cząsteczek surfaktantów do ładunków ujemnych pochodzących od cząsteczki DNA. Pożądane jest otrzymanie układów, dla których ładunek DNA został zneutralizowany ( $p/n > 1$ ) lub jest nieznacznie wyższy. Istotne jest jednak, żeby zachować równowagę między otrzymaniem silnie kationowych struktur, które mogą być toksyczne dla komórek, a dodatnio naładowanym kompleksem, który ułatwia oddziaływania elektrostatyczne lipopleksów z ujemnie naładowaną błoną komórkową [129].

Poza stężeniem surfaktantu olbrzymi wpływ na proces wiązania z DNA ma sama budowa surfaktantu, m.in. charakter głowy, kontrolujący wiązanie i uwalnianie DNA [122]. Duże znaczenie ma również w tej kwestii ma długość łańcucha hydrofobowego surfaktantu. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że wraz ze wzrostem jego długości wzrasta wydajność łączenia z DNA, a najlepsze wyniki otrzymano dla surfaktantów o  $m \geq 12, 14, 16, 18$  [129, 130]. Z badań Grueso i Sancheza nad monomerycznymi surfaktantami o różnej długości łańcucha hydrofobowego wynika, że energia swobodna zależy liniowo od długości ogona surfaktantu (dla liczby atomów węgla w łańcuchu  $m \geq 4$ ). Wyznaczono, że na jedną grupę  $\text{CH}_2$  łańcucha hydrofobowego surfaktantu, przypada energia swobodna w wysokości  $-0,36$  kJ/mol. Otrzymane wartości energii swobodnych odpowiadają energii oddziaływań elektrostatycznych surfaktant-DNA, natomiast dla odpowiednio długich ogonów zwiększa się wkład oddziaływań hydrofobowych [131]. Co więcej, asymetria łańcuchów sprawia, że cząsteczka DNA jest silniej i wydajniej kondensowana przez surfaktanty, a sam proces jest bardziej spontaniczny [132].

Badania nad surfaktantami gemini pokazują, że olbrzymi wpływ na przebieg wiązania z DNA ma charakter łącznika surfaktantu [133]. Surfaktanty o długości łącznika powyżej 4 i poniżej 10 atomów węgla, wykazują bardzo dobre właściwości wiążące DNA. Ponadto mogą przyczyniać się do zwiększania upakowania DNA w kompleksach i zmian parametrów strukturalnych (form DNA). Również modyfikacje łącznika i/lub głowy surfaktantów poprzez wprowadzenie określonych grup funkcyjnych (cholesterolu, sperminy, pH-wrażliwych grup amidowych, guaniny, analogów kardiolipiny, itp.) mogą wpływać na kondensację DNA [129].

Liczne prace nad kationowymi surfaktantami gemini udowodniły, że zwielokrotniając ładunek dodatni i liczbę łańcuchów hydrofobowych, zwiększa się wydajność kompleksowania z materiałem genetycznym. To między innymi powód,

dla którego w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie kationowymi surfaktantami o wyższym stopniu oligomeryzacji.

Badania nad heksamerycznym surfaktantem na bazie czwartorzędowej soli amoniowej [134] wykazały, że w zależności od jego stężenia skompleksowane DNA może przyjmować różne struktury przechodząc z formy wydłużonego zwoju (dla niskich stężeń surfaktantu) poprzez częściowo skondensowane agregaty w formie klastrów i form „koralików na łańcuszku” do całkowicie skondensowanej formy globularnej (dla wysokomolekularnego DNA, o długości 3 000 pz, punkt ten było nieco powyżej punktu zneutralizowania ładunków) [121]. Co więcej, oddziaływania z surfaktantami to nie tylko kondensowanie DNA, ale surfaktanty mogą również przyczyniać się do rozwijania nici DNA (destabilizują helisę DNA, przerwany zostaje kontakt między zasadami azotowymi, przez co może dochodzić do interkalacji surfaktantów między nici DNA) [135] lub do zmian konformacji DNA z formy B na C [136] w zależności od rodzaju i stężenia surfaktantu w układzie.

Badania nad cytotoksycznością surfaktantów oligomerycznych zawierających grupy amidowe wykazały, że przejawiają właściwości bakteriobójcze dla bakterii Gram ujemnych (np. *Escherichia coli*) nawet przy niskich stężeniach, a właściwości te rosną wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji, ale przy tym są nietoksyczne dla komórek ssaków. Prace nad *E. coli* wykazały, że proces ten przebiega w dwóch etapach pierwszy dotyczy naruszenia integralności błony w skutek oddziaływań elektrostatycznych (zaburzenie funkcji bariery), następnie dezintegracji błony w skutek oddziaływań hydrofobowych i wycieku cytoplazmy [117].

Choć nie ma bezpośrednich wytycznych, co do morfologii kompleksu surfaktant/DNA przyjmuje się, że struktura odwróconej fazy heksagonalnej jest korzystniejsza niż faza lamelarna, pod względem wydajności transfekcji [129]. Co ciekawe, polimery kationowe i lipidy kationowe również są stosowane jako nośniki DNA, jednak tworzą duże polidispersyjne agregaty, które mimo wydajnej transfekcji w hodowlach komórkowych, nie dyfundują w żywej tkance, przez co skuteczność takiego leczenia spada [126]. Dlatego zakłada się, że struktury poniżej 200 nm umożliwią bardziej wydajny transport kompleksu [129].

## 3.2 Układy surfaktant/lipid

---

Każdą żywą komórkę otacza błona komórkowa, zapewniająca selektywną barierę ochronną dla organelli komórkowych. Zbudowana jest ona głównie z dwuwarstwy lipidowej i białek błonowych. Lipidy, podobnie jak surfaktanty są cząsteczkami amfifilowymi, posiadającymi zdolność do samoorganizacji i tworzenia podwójnych warstw, dążących w roztworach wodnych do zamykania się w kuliste pęcherzykowate struktury - liposomy. Rodzaj liposomów otrzymywanych w warunkach laboratoryjnych często wynika z zastosowanej metody preparatywnej. Przykładowo, poprzez homogenizację ultradźwiękową w roztworach lipidów powstają bardzo małe (średnica < 100 nm) jednowarstwowe pęcherzyki (ang. *Small Unilamellar Vesicles, SUV*), natomiast wytrząsanie roztworu lipidów skutkuje otrzymaniem dużych, wielowarstwowych pęcherzyków (ang. *Multilamellar Vesicles, MLV*) [137]. Najliczniej występującym rodzajem lipidów w błonie komórkowej są fosfolipidy, takie jak fosfatydylocholino (popularnie zwane lecytynami). W skład części polarnej fosfatydylocholino wchodzi: cholina, fosforan oraz glicerol, do którego przyłączone są dwa łańcuchy hydrofobowe (grupy acylowe pochodzące od kwasów tłuszczowych) [13]. W skład błon plazmatycznych wchodzi wiele rodzajów lipidów, a ich rozmieszczenie w warstwach jest asymetryczne [138].

Ważną cechą błon plazmatycznych, o czym wcześniej pisałam jest ich płynność. Odpowiada ona za przepuszczalność błony, dyfuzję białek błonowych (w tym przekazywanie i odbieranie sygnałów przez komórkę), umożliwia fuzję błon – endocytozę, itp. Płynność błony bezpośrednio wynika z układu i charakteru lipidów w dwuwarstwie. Do czynników wpływających na płynność błony należą:

- rozmieszczenie lipidów w dwuwarstwie, bowiem im większe upakowanie lipidów, tym sztywniejsza i mniej płynna błona;
- długość łańcuchów hydrofobowych lipidów wchodzących w skład dwuwarstwy, gdyż im krótsze łańcuchy tym mniejsza tendencja do oddziaływań hydrofobowych ogonów ze sobą i mniejsza płynność błony;
- niesymetryczne łańcuchy hydrofobowe lipidów – zaburzają one rozmieszczenie lipidów w błonie, przez co zmniejsza się ich upakowanie i wzrasta płynność błony;
- wiązania wielokrotne w łańcuchach hydrofobowych lipidów – powodują one zgięcia łańcuchów węglowodorowych, przez co dochodzi do odpychania między nimi, w konsekwencji spada upakowanie (bariera steryczna) i wzrasta płynność błony [138];
- obecność cholesterolu, który dodatkowo porządkuje błonę lipidową (ang. *liquid-ordered bilayer*) przez co jest ona bardziej sztywna [13, 138];
- temperatura – im wyższa temperatura tym większa płynność błony (jednak w obecności cholesterolu płynność błony maleje ze wzrostem temperatury) [138].

Podobnie jak surfaktanty, lipidy w roztworach wodnych mogą występować w różnych mezofazach: lamelarnej, micelarnej, heksagonalnej, odwróconej heksagonalnej, regularnej, itp. Najczęściej lipidy błonowe formują fazę lamelarną, w różnych odmianach (rysunek 6.). Poniżej pokrótce omówiono typowe fazy lamelarne:

$L_C$  – faza krystaliczna, łańcuchy hydrofobowe występują w konformacji *trans* (rozciągnięte, proste, sztywne), lipidy są ściśle upakowane, zredukowana jest dyfuzja boczna lipidów [139]. Faza ta występuje przy niskich temperaturach w warunkach bezwodnych lub poniżej temperatury zamrażania wody [140], a jej odmianą jest faza subżelowa  $L_C$ , w której łańcuchy hydrofobowe lipidów są nachylone pod pewnym kątem do płaszczyzny błony (co oznacza się symbolem ' przy nazwie fazy) [141].



$L_{\beta}$  – faza żelowa, gdzie łańcuchy hydrofobowe lipidów występują w konformacji *trans*, jednak w porównaniu do  $L_C$  głowa lipidów jest bardziej uwodniona. W przypadku wielu nasyconych fosfatydylocholin łańcuchy hydrofobowe są nachylone w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy (faza  $L_{\beta}'$ ).

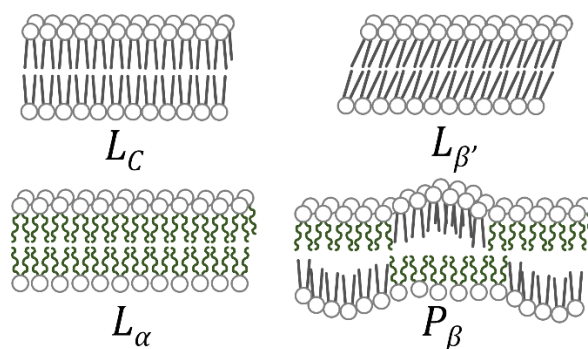
$L_{\alpha}$  – faza ciekłokrystaliczna, występuje przy wyższych temperaturach, gdzie dochodzi do dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej lipidów w błonie. Łańcuchy hydrofobowe przyjmują wówczas konformację *gauche* (występują liczne zagięcia łańcuchów, która zmniejsza upakowanie lipidów w błonie przez co wzrasta jej płynność) [142, 143].

$P_{\beta}$  – faza żelowa pofałdowana – powierzchnia dwuwarstwy jest pofałdowana na skutek występowania regionów o mniejszym stopniu upakowania. Faza ta jest rzadko spotykana, ponieważ większość fosfolipidów przechodzi wraz ze wzrostem temperatury przemianę  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ . Występuje na przykład w strukturach tworzonych przez DPPC (dipalmitoilofosfatydylocholina), gdzie poniżej 35°C występuje faza  $L_{\beta}'$ , powyżej 41°C – faza  $L_{\alpha}$ , a zakresie temperatur 35 - 41°C – faza  $P_{\beta}'$  [142].

$L_o$  – dla dwuwarstw fosfolipidów z cholesterolem wyróżnia się tzw. fazę płynną uporządkowaną (ang. *liquid ordered phase*). W tej fazie cząsteczki lipidów mają swobodę dyfuzji bocznej, ale rotacja wokół wiązań -C-C- łańcucha węglowodorowego jest ograniczona przez cząsteczki cholesterolu [142, 144].

Lipidy w zależności od temperatury mogą przechodzić przez następujące przemiany fazowe: **subprzejście** (ang. *subtransition*)  $L_C \leftrightarrow L_{\beta}$  w temperaturze  $T_s$ , **przedprzejście** (ang. *pretransition*)  $L_{\beta} \leftrightarrow P_{\beta}$  w temperaturze  $T_p$  oraz **główne przejście fazowe** (ang. *main transition*)  $P_{\beta} \leftrightarrow L_{\alpha}$  lub  $L_{\beta} \leftrightarrow L_{\alpha}$  w temperaturze  $T_m$  [145]. Przemiana główna przebiega stosunkowo szybko, jest w dużej mierze odwracalna i charakteryzuje się wysoką kooperatywnością, o czym świadczy wyraźny/ostry sygnał na krzywej kalorymetrycznej DSC [146].

Przejścia te nie są jednak obligatoryjne dla każdego rodzaju lipidów, np. DHPC (1,2-di-O-heksadecyl-sn-glicero-3-fosfatydylocholina) w niskich temperaturach przyjmuje fazę żelową naprzemienną (ang. *interdigitated gel phase*)  $L_{\beta i}$ , a wraz ze wzrostem temperatury przechodzi przemiany  $L_{\beta i} \rightarrow P_{\beta}' \rightarrow L_{\alpha}$ . [146]. Fosfatydyloetanoloaminy jak np. DOPE w temperaturze  $T_h$  przyjmują fazę odwróconą heksagonalną  $H_{II}$  z fazy ciekłokrystalicznej (przemiany DOPE:  $L_{\beta} \leftrightarrow L_{\alpha} \leftrightarrow H_{II}$ ) [147,148]. Warto wspomnieć, że kształt cząsteczki lipidów takich jak DPPC czy DMPC (1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina) można wpisać w cylinder, a DOPE w odwrócony stożek, co w dużej mierze przekłada się na tworzone przez nie fazy [149].



Rysunek 6. Schematyczna reprezentacja faz lamelarnych fosfolipidów:  
 $L_C$  – faza krystaliczna,  $L_{\beta}'$  – faza żelowa pochyłona,  $L_{\alpha}$  – faza ciekłokrystaliczna,  
 $P_{\beta}$  – faza żelowa pofałdowana.

W zależności od stężenia surfaktantu według Lichtenberga można wyróżnić trzy etapy oddziaływań między surfaktantami a lipidami [150, 151]:

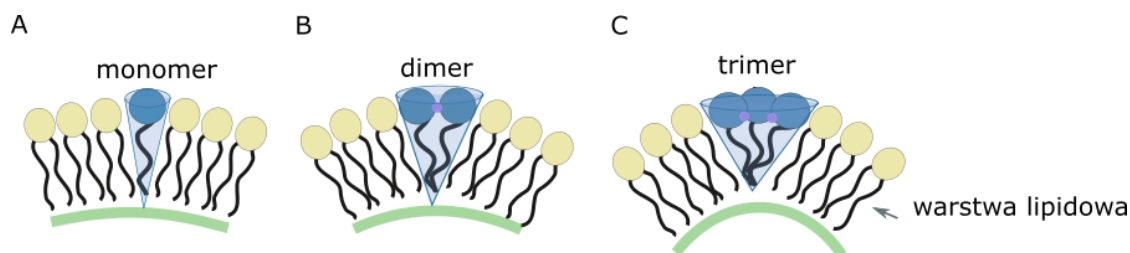
1. Przy niskim stężeniu surfaktantu w mieszaninie z lipidami – pojedyncze cząsteczki surfaktantów wbudowują się w dwuwarstwę lipidową, aż do osiągnięcia wysycenia przy tzw. stężeniu nasycenia  $D_{sat}$ . Takie wbudowywanie się surfaktantów może powodować powiększanie się liposomów.
2. W miarę wzrostu stężenia surfaktantu w roztworze, wzrasta jego udział w pęcherzykach liposomalnych, stopniowo rozrywając dwuwarstwę lipidową. Zaczynają powstawać micide mieszane o wydłużonym kształcie. Na tym etapie w roztworze współistnieją micide mieszane i liposomy.
3. Po osiągnięciu stężenia solubilizacji  $D_{sol}$  w roztworze powstają jedynie mniejsze micide mieszane o wyższym stosunku surfaktant:lipid, dwuwarstwy lipidowe ulegają całkowitemu rozpadowi/rozpuszczeniu – tzw. solubilizacja.

Yao Chen i jego grupa [152], badali wpływ surfaktantów anionowych i kationowych o różnym stopniu oligomeryzacji na dwuwarstwy DOPC (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina). Zauważyli oni, że stosunek surfaktantów wbudowanych w dwuwarstwę lipidową do surfaktantów pozostających w objętości roztworu, tzw. parametr podziału  $P$ , wzrasta wraz ze wzrostem stopnia oligomeryzacji surfaktantu. Ponadto surfaktanty o wyższym stopniu oligomeryzacji wykazują silniejszą zdolność zmiany przepuszczalności liposomów DOPC.

Badania nad DTAB i jego homologami (dimer i trimer o tej samej długości łańcucha hydrofobowego  $m$ ) wykazały, że parametr  $CPP$  surfaktantów oligomerycznych maleje wraz ze stopniem oligomeryzacji. Zjawisko to wynika z dwóch zależności. Dla dimeru DTAB obserwowana powierzchnia części polarnej ( $a_{dimer}$ ) jest zdecydowanie większa niż zakładana teoretycznie równowartość dwukrotności powierzchni części polarnej dla monomeru ( $a_{monomer}$ ) -  $a_{dimer} \gg 2 \cdot a_{monomer}$ . Wkład w wartość  $a_{dimer}$  ma obecność łącznika, ale również występowanie odpychających oddziaływań elektrostatycznych między częściami polarnymi. Natomiast objętość części hydrofobowej dimeru  $V_{dimer}$  jest znacznie mniejsza niż zakładana równowartość dwukrotności objętości ogona dla monomeru DTAB -  $V_{dimer} \ll 2 \cdot V_{monomer}$ . Stąd obserwowana wartość  $CPP_{dimer}$  jest mniejsza niż  $CPP_{monomer}$ . Analogicznie wnioski uzyskano dla trimeru DTAB [152], stąd zależność  $CPP$  od stopnia oligomeryczności można zapisać w następujący sposób:

$$CPP_{monomer} = \frac{V_{monomer}}{a_{monomer} \cdot m} > CPP_{dimer} = \frac{V_{dimer}}{a_{dimer} \cdot m} > CPP_{trimer} = \frac{V_{trimer}}{a_{trimer} \cdot m} \quad (7)$$

Tak więc, surfaktanty oligomeryczne silniej niż ich monomeryczne odpowiedniki zakrzywiają dwuwarstwę lipidową, co bardziej destabilizuje ją i prowadzi do szybszego rozpadu liposomu tj. przy niższym stężeniu surfaktantu niż dla jego homologów niższego stopnia [152]. Na rysunku 7 przedstawiono uproszczony schemat upakowania w błonie lipidowej surfaktantów o różnym stopniu oligomeryczności, wraz z efektem zakrzywiania powierzchni błony lipidowej.



Rysunek 7. Uproszczony schemat upakowania w błonie lipidowej surfaktantów: monomerycznych (A), dimerycznych (B), trimerycznych (C). Dla lepszej wizualizacji efektu na czerwono zaznaczono krzywiznę błony lipidowej.

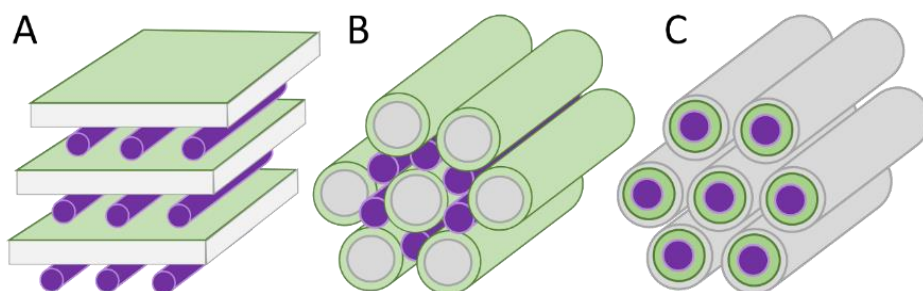
Badania Yao Chen'a wykazały, że w pierwszej kolejności surfaktanty wiążą się elektrostatycznie z liposomami DOPC, a następnie, w wyniku oddziaływań hydrofobowych, dochodzi do wbudowywania się surfaktantów w dwuwarstwę DOPC. Gdy obserwowana entalpia wynosi zero, osiągnięte zostaje nasycenie dwuwarstwy lipidowej surfaktantami [152].

Należy wspomnieć iż, obecność surfaktantów znacząco wpływa na obserwowane w lipidach przejścia fazowe. W czystych wodnych roztworach dla DPPC wraz ze wzrostem temperatury zaobserwowano następujące przejścia:  $L_C \rightarrow L_{\beta'}$  w  $T_s = 18^\circ\text{C}$ ,  $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$  w  $T_p = 34^\circ\text{C}$ ,  $P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$  w  $T_m = 41,5^\circ\text{C}$  [26], natomiast w obecności kationowego surfaktantu gemini  $T_m$  ulega przesunięciu w kierunku niższych temperatur, entalpia przemiany głównej maleje, a co więcej poszerzeniu ulega sam zakres przemiany, co świadczy o zmniejszeniu kooperatywności przemiany [153]. Dodatkowo w układach lipid/surfaktant (na przykładzie układu DMPC/kationowy surfaktant gemini) zaobserwowano zanik przedprzejścia, co może być związane z wbudowywaniem się cząsteczek surfaktantu do dwuwarstwy lipidowej [154].

### 3.3 Układy trójskładnikowe surfaktant/lipid/DNA

Głównym zadaniem lipidów w kompleksach surfaktant/DNA jest zwiększenie skuteczności procesu terapeutycznego, co bezpośrednio wynika ze wzrostu efektywności transfekcji. Wzrost ten związany jest z wydajniejszą i szybszą fuzją błon między komórką a nośnikiem poprzez zwiększenie ich płynności [128], ułatwioną zmianą konformacji lipidów i destabilizacją błony endosomu (ucieczka endosomalna) [155], lub nadaniem odpowiedniej morfologii układowi (np. DOPE indukuje powstawanie fazy odwróconej heksagonalnej lipopleksu [128] lub w układach surfaktant gemini/DOPE/DPPC współistnieją faza lamelarna i odwrócona heksagonalna [105]). Zwiększona skuteczność transfekcji na skutek obecności lipidów może również wynikać z wysokiej kondensacji DNA w tych lipopleksach (np. w układzie zawierającym plazmidowe DNA, surfaktant gemini i DOPE prawdopodobnie DNA zostaje silnie skondensowane do tzw. formy  $\psi$ ) [129].

Roztwory wodne układów trójskładnikowych surfaktant/lipid/DNA mogą występować w fazie lamelarnej, regularnej, heksagonalnej lub odwróconej heksagonalnej (rysunek 8.) w zależności od wzajemnych proporcji składników układu. Dodatkowo występują warunki, gdzie współistnieją dwie lub nawet trzy fazy [156]. Faza lamelarna jest bardzo często spotykana wśród układów trójskładnikowych, występują w niej naprzemiennie dwuwarstwy lipidowe z wbudowanymi surfaktantami oraz „warstwy” z cząsteczkami DNA. Zaobserwowano, że surfaktanty chętnie gromadzą się w pewnych obszarach dwuwarstwy, gdzie mają bezpośredni kontakt z DNA [154].



Rysunek 8. Uproszczony schemat struktur obserwowanych w lipopleksach: fazy lamelarnej (A), heksagonalnej (B) oraz odwróconej heksagonalnej (C).

Dla prezentowanych układów trójskładnikowych surfaktant/lipid/DNA zaznaczono obszar występowania części hydrofilowych (kolor zielony) i części hydrofobowych (szary) formowanych przez surfaktanty i lipidy oraz umiejscowienie cząsteczek DNA (fioletowy).

## 4 Przegląd wybranych metod badawczych stosowanych do charakterystyki lipopleksów

---

### 4.1 Metody eksperymentalne wykorzystywane do charakterystyki surfaktantów

---

Parametrami charakterystycznymi dla surfaktantów są krytyczne stężenie micelizacji *CMC* oraz krytyczne stężenie agregacji *CAC*. Do ich wyznaczenia wykorzystuje się najczęściej miareczkowanie konduktometryczne, reakcje tautomeryzacji benzoiloacetanu, dynamiczne rozpraszanie światła i spektroskopię fluorescencyjną.

Surfaktanty w odpowiednich warunkach tworzą micelle, do zbadania rozmiaru powstałych miceli stosuje się m. in. dynamiczne rozpraszanie światła, a liczbę agregacji można wyznaczyć metodą wygaszania fluorescencji w stanie ustalonym. Budowę chemiczną surfaktantu określa się w oparciu o widma spektroskopii podczerwieni z transformacją fourierowską, jądrowy rezonans magnetyczny NMR lub spektrometrię mas.

Spektroskopia to zespół metod pomiarowych wykorzystujących zdolność promieniowania elektromagnetycznego do oddziaływania z materią. Rozpraszanie, odbicie, absorpcja, emisja to przykłady oddziaływań, wynikających bezpośrednio z właściwości korpuskularno-falowych fal elektromagnetycznych [157, 158]. Promieniowanie elektromagnetyczne to rozchodzące się w przestrzeni drganie pola elektrycznego z towarzyszącym mu drganiem pola magnetycznego w płaszczyznach prostopadłych do siebie i do kierunku propagacji fali. Drgania pola elektrycznego i magnetycznego jako zmiany pola elektrycznego  $E$  (8) i magnetycznego  $H$  (9) w funkcji czasu można zapisać następująco:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (8)$$

$$H = H_0 \cos 2\pi\nu t \quad (9)$$

gdzie:  $E$  – natężenie pola elektrycznego,  $E_0$  – amplituda pola elektrycznego,  $\nu$  – częstotliwość drgań,  $t$  – czas,  $H$  – natężenie pola magnetycznego,  $H_0$  – amplituda pola magnetycznego.

Równania (8, 9) podsumowują falową naturę promieniowania elektromagnetycznego, a na ich podstawie można wyznaczyć zależność:

$$\lambda \cdot \nu = c \quad (10)$$

gdzie:  $\lambda$  – długość fali,  $c$  – prędkość fali elektromagnetycznej.

Fala elektromagnetyczna w ujęciu korpuskularnym to wiązka porcji energii (fotonów), rozchodzących się w kierunku promieniowania, a wielkość energii pojedynczego kwantu promieniowania (fotonu) określa zależność:

$$E_f = h \cdot \nu \quad (11)$$

gdzie:  $E_f$  – energia fotonu,  $h$  – stała Plancka równa  $6,62 \cdot 10^{-34}$  J·s [159]

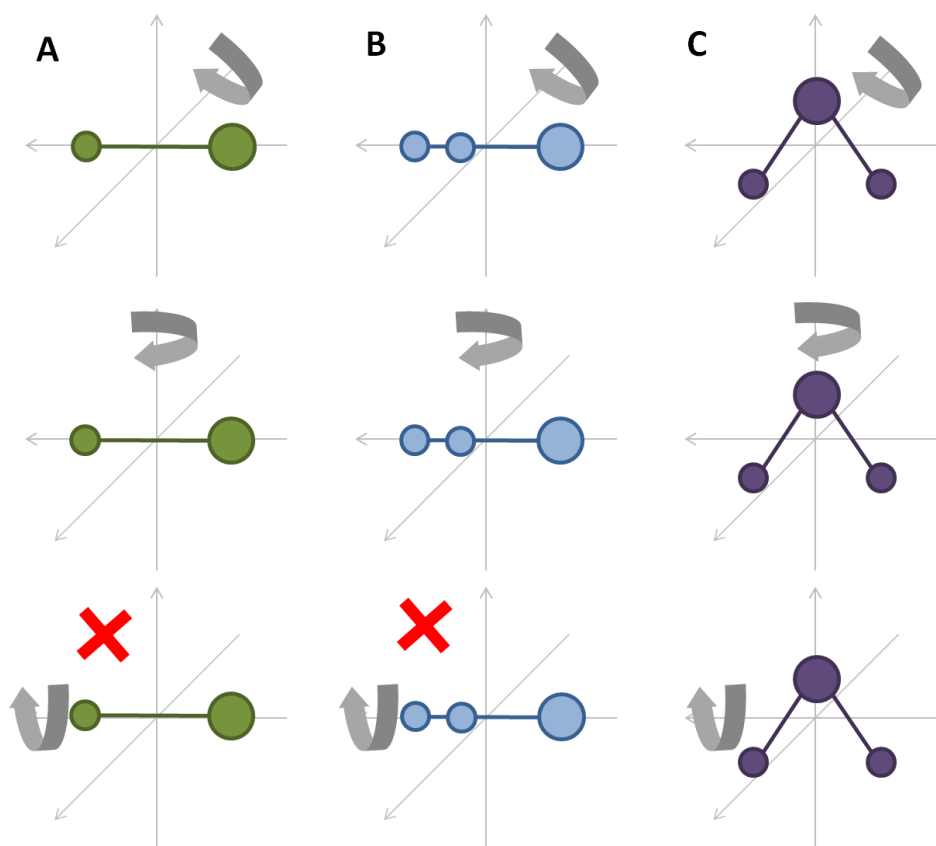
Każda molekula posiada pewien zasób energii wewnętrznej, na którą składają się różne rodzaje energii i związane z tym ruchy:

1. Energia translacyjna: w fazie ciekłej i gazowej związana jest z nieuporządkowanym przemieszczaniem się cząsteczek w przestrzeni i zależy od temperatury ośrodka zgodnie ze wzorem:

$$E_{trans} = \frac{3}{2} k_B T \quad (12)$$

gdzie:  $T$  – temperatura ośrodka,  $k_B$  – stała Boltzmana wynosząca  $1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K.

2. Energia rotacyjna: związana jest z wirowaniem cząsteczki wokół własnej osi i jest rozłożona między tzw. stopnie swobody, określające możliwe osie obrotu wzajemnie do siebie prostopadłe. Dla cząsteczek liniowych liczba stopni swobody wynosi 2, natomiast dla wszystkich cząsteczek nieliniowych – 3 (rysunek 9.).



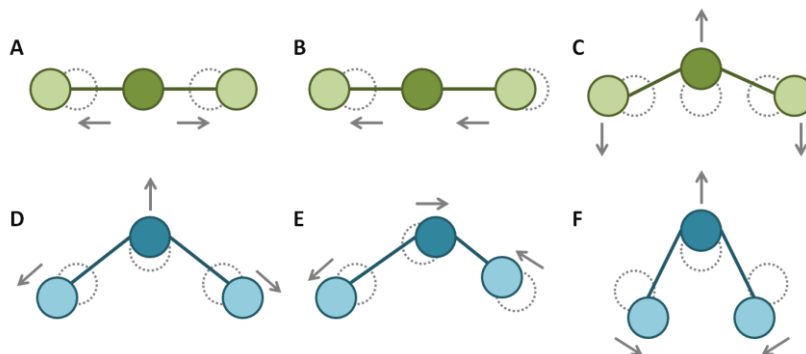
Rysunek 9. Przykłady drgań rotacyjnych cząsteczek liniowych (A, B) oraz cząsteczki nieliniowej (C) z zaznaczeniem osi obrotu.

3. Energia oscylacyjna: drgania zrębów atomowych (jądra atomowe wraz z nietworzącymi wiązań powłokami elektronowymi) wokół położenia równowagi. Podczas nich zmieniają się długości i kąty wiązań chemicznych w molekułe.

W cząsteczkach zbudowanych z wielu atomów rozważa się tzw. drgania normalne, są to jednoczesne drgania wszystkich zrębów atomowych w cząsteczce z tą samą częstotliwością i będące w tej samej fazie [159]. Drgania normalne nie powodują zmian położenia środka ciężkości cząsteczki [160].

Ze względu na charakter drgań wyróżniamy drgania rozciągające  $\nu$ , gdzie zmieniają się długości wiązań oraz drgania zmieniające kąty wiązań – drgania zginające lub inaczej deformacyjne (nożycowe  $\delta$ , wahadłowe  $\rho$ , wachlarzowe  $\omega$ ,

skręcające  $\tau$ ). Drgania mogą odbywać się w płaszczyźnie lub poza płaszczyzną, a ze względu na symetrię wychyleń wyróżniamy drgania symetryczne (oznaczone indeksem  $s$ ) i asymetryczne (oznaczone indeksem  $as$ ) [159 – 161]. Wybrane przykłady omawianych drgań zestawiono na rysunku 10.



Rysunek 10. Wybrane rodzaje drgań oscylacyjnych cząsteczek liniowych (A, B, C) oraz cząsteczek nieliniowych (D, E, F); A, D - drgania rozciągające symetryczne, B, E - drgania rozciągające asymetryczne, C, F - drgania zginające.

4. Energia elektronowa: suma energii kinetycznej ruchu elektronów w cząsteczce i energii potencjalnej elektronów związanej z przyciąganiem przez jądro i odpychaniem przez inne elektrony sąsiadujące.
5. Energia wewnątrzjądrowa: energia nukleonów tworzących jądra atomowe cząsteczki.

Opisane powyżej rodzaje energii, zgodnie z zasadami mechaniki kwantowej są skwantowe, a więc tylko określone „porcje” mogą oddziaływać z molekułą i tym samym zmieniać obsadzenie poziomów energetycznych cząsteczki [159].

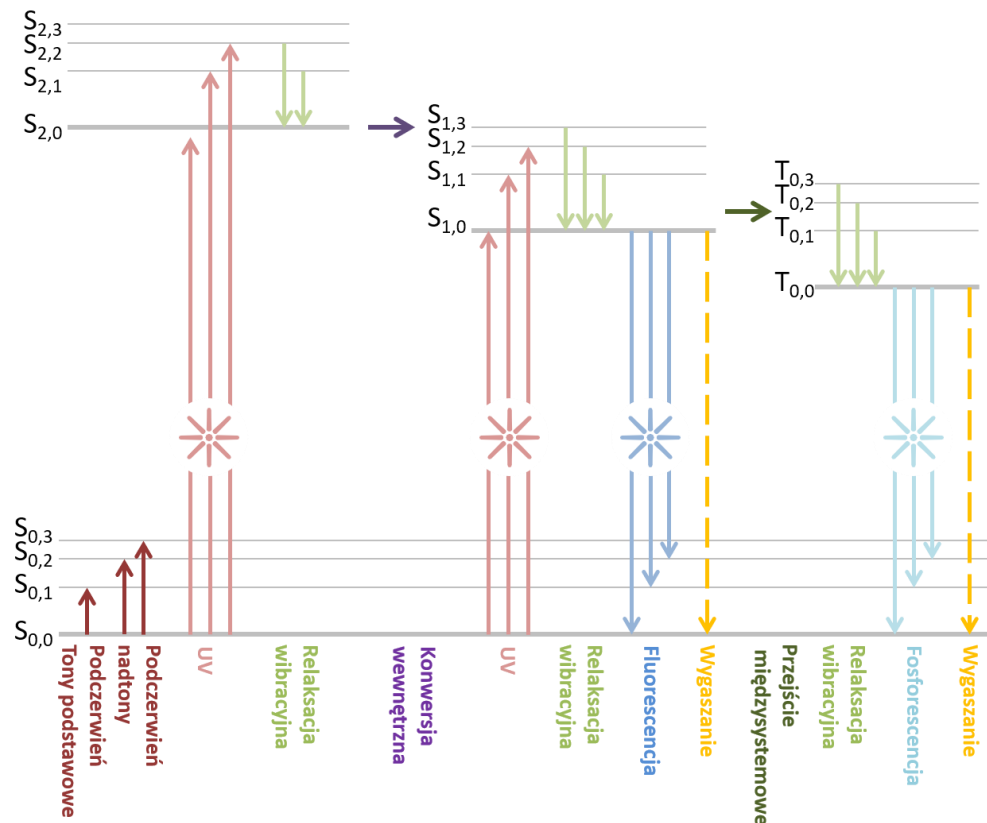
Ze względu na rodzaj oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z materią istnieje wiele metod spektroskopowych wykorzystujących dany rodzaj oddziaływania do badań, dlatego tylko wybrane metody spektroskopowe, zastosowane w pracy, zostaną przedstawione poniżej.

Do pierwszej grupy technik spektroskopowych, ze względu na charakter oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z materią, zaliczyć możemy spektroskopię absorpcyjną i emisyjną, polegające odpowiednio na pochłanianiu lub emisji fotonów przez próbkę w wyniku oddziaływań z promieniowaniem elektromagnetycznym [159]. Zjawisko absorpcji i emisji fal elektromagnetycznych przez materię prezentuje diagram Jabłońskiego (rysunek 11) [158, 162].

W wyniku absorpcji energii fali elektromagnetycznej, molekuła przechodzi na odpowiednio wyższe poziomy energetyczne, odpowiadające energii fali zaabsorbowanej. Jeżeli molekuła w stanie podstawowym  $S_{0,0}$  zaabsorbuje energię pozwalającą osiągnąć wyższy stan elektronowy ( $S_1, S_2, \dots, S_n$ ), to zakres energii absorbowanej odpowiada falam z zakresu ultrafiolet - światło widzialne. Jeżeli natomiast porcje energii zaabsorbowanej będą mniejsze, i będą odpowiadać zakresowi podczerwieni, to molekuła ze stanu podstawowego  $S_{0,0}$  przejdzie na wyższe poziomy wibracyjne  $S_{0,1}, S_{0,2}, \dots, S_{0,n}$ . Między wyższymi stanami wibracyjnymi wzbudzonych poziomów energetycznych dochodzi do tzw. relaksacji wibracyjnej, natomiast przejście z najniższego poziomu

wibracyjnego wyższego poziomu energetycznego na najwyższy poziom wibracyjny niższego poziomu energetycznego np.  $S_{2,0} - S_{1,4}$  nazywa się konwersją wewnętrzną. Przejścia te zachodzą bezpromieniście, na skutek dążenia układu do stanu o najniższej energii.

Z poziomu  $S_{1,0}$  cząsteczka może wyemitować porcję energii świetlnej (fluorescencja) wracając do stanu  $S_{0,0}$  lub w wyniku przejścia międzysystemowego przejść na poziom trypletowy  $T_1$  i dopiero wtedy wrócić do stanu podstawowego (fosforescencja).



Rysunek 11. Diagram Jabłońskiego.

Aby doszło do promienistego przejścia między poszczególnymi poziomami musi być spełniona zależność [163]:

$$|E_2 - E_1| = \Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (13)$$

gdzie:

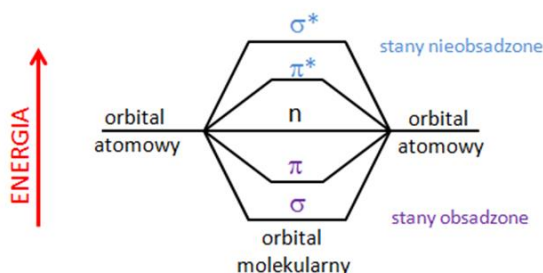
- $E_2$  – energia wyższego poziomu energetycznego,
- $E_1$  – poziomu niższego poziomu energetycznego,
- $\Delta E$  – różnica energii między poziomami,
- $h$  – stała Plancka,
- $\nu$  – częstotliwość fali elektromagnetycznej,
- $c$  – prędkość światła,
- $\lambda$  – długość fali elektromagnetycznej.



#### 4.1.1 Spektroskopia UV-Vis

Spektroskopia w zakresie światła widzialnego i bliskiego nadfioletu UV-Vis, polega na absorpcji światła przez tzw. chromofory, czyli atomy, jony lub grupy atomów w cząsteczce, a następnie przeniesieniu ich elektronów walencyjnych ze stanu podstawowego na wzbudzony [159].

Absorpcja energii i przejście na wyższy poziom energetyczny w związkach organicznych wiąże się z przejściem elektronu z obsadzonego orbitalu molekularnego (niewiążącego  $n$  lub wiążącego  $\pi$  albo  $\sigma$ ) na nieobsadzony orbital molekularny (antywiązący  $\pi^*$  lub  $\sigma^*$ ) [163]. Każdy orbital ma określoną energię, a ich zależność przedstawiono na rysunku 12. Możliwe przejścia między orbitalami molekularnymi  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  (wysokoenergetyczne przejście),  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  (niskoenergetyczne przejście) [159].



Rysunek 12. Reprezentacja schematyczna orbitali molekularnych.

Najbardziej prawdopodobne są przejścia HOMO – LUMO, czyli przejścia między najwyższym obsadzonym orbitalem molekularnym (ang. *Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) na najniższy, nieobsadzony orbital molekularny (ang. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) [163].

Po przejściu światła o intensywności  $I_0$  przez próbkę o stężeniu molowym  $C$  i molowym współczynniku absorpcji  $\varepsilon$ , na drodze optycznej  $l$ , intensywność wiązki światła ulegnie osłabieniu. Na każdym odcinku drogi  $dl$  intensywność promieniowania maleje o  $-dI$ , w wyniku absorpcji przez molekuly próbki:

$$-dI = \varepsilon C dl \quad (14)$$

Po scałkowaniu w granicach długości drogi optycznej, czyli grubości warstwy absorbującej, otrzymujemy prawo Lamberta-Beera:

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \varepsilon C \int_0^l dl \quad (15)$$

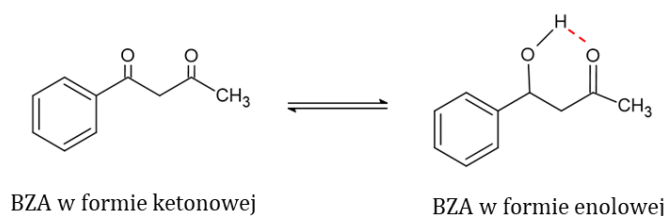
$$\ln \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl \quad (16)$$

Miarą absorpcji jest absorbancja wyrażona wzorem:

$$A = \varepsilon Cl \quad (17)$$

### Metoda spektrofotometryczna wyznaczania CMC na bazie reakcji tautomerizacji bezoiloacetonu

Metoda spektrofotometryczna wyznaczania CMC oparta o reakcję tautomerizacji bezoiloacetonu (1-fenyl-1,3-butadionu, BZA) w roztworach wodnych polega na zmianie BZA z formy ketonowej w formę enolową w wyniku zmiany środowiska na hydrofobowe (rysunek 13). Wskutek utworzenia miceli, cząsteczki BZA zostają zamknięte w hydrofobowym wnętrzu miceli, zmieniając formę na enolową.



Rysunek 13. Reakcja tautomerizacji bezoiloacetonu.

BZA w środowisku wodnym występuje w obu formach tautomerycznych, jednak z przewagą formy ketonowej. Rejestracja zmian składu form tautomerycznych możliwa jest przy użyciu spektroskopii UV-Vis, gdzie pasmo zlokalizowane przy długości fali 250 nm (przejście  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) odpowiada formie ketonowej, natomiast pasmo przy 310 nm (przejście  $n \rightarrow \pi^*$ ) formie enolowej [164, 165]. Analizując stosunek wartości absorbancji dla formy enolowej ( $A_{310nm}$ ) do absorbancji dla formy ketonowej ( $A_{250nm}$ ), w zależności od stężenia surfaktantu w roztworze można wyznaczyć CMC bądź CAC.

#### 4.1.2 Spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera

Zgodnie z diagramem Jabłońskiego spektroskopia podczerwieni obejmuje przejścia na wyższy poziom wibracyjny na skutek absorpcji promieniowania z zakresu podczerwieni. Zakres podczerwieni to obszar od ok. 14 000  $\text{cm}^{-1}$  do 200  $\text{cm}^{-1}$ , jednak pod względem zastosowania największe znaczenie w badaniach związków organicznych ma obszar tzw. podczerwieni środkowej (ang. *Mid Infrared, MIR*), czyli zakres od 4 000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ . Obszar ten odpowiada drganiom grup funkcyjnych związków chemicznych [160].

Aby mogło dojść do absorpcji promieniowania muszą być spełnione tzw. reguły wyboru dla przejść oscylacyjnych. Oscylacje zębów atomowych mogą być opisywane na modelu fizycznym oscylatora harmonicznego z uwzględnieniem skwantowania energii jako układ dwóch mas połączonych sprężyną o stałej sprężystości  $k$ . Stała siłowa zależy od wielokrotności wiązań i ich długości. Oscylator harmoniczny spełnia prawo Hooke'a, mówiące o tym, że siła jest proporcjonalna do wychylenia. Częstotliwości drgań  $\nu$  oscylatora harmonicznego można opisać zależnością:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_{red}}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad (18)$$

gdzie  $m_{red}$  – masa zredukowana,  $m_1, m_2$  – masy poszczególnych atomów [159].

Model oscylatora harmonicznego zakłada równoodległe poziomy wibracyjne o energiach określonych wzorem:

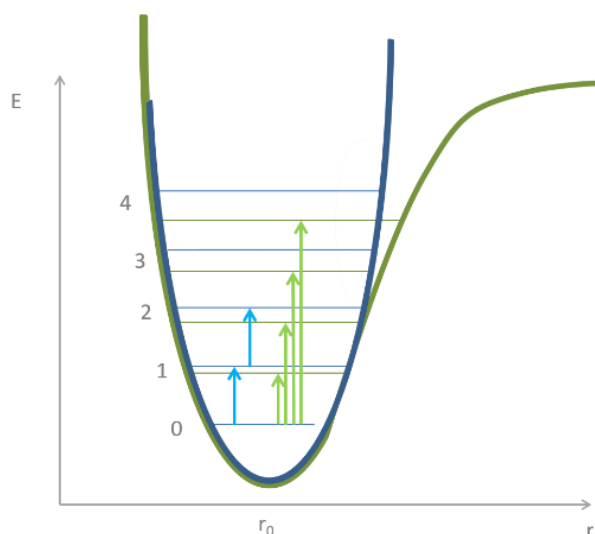
$$E_{osc} = h\nu \left( n + \frac{1}{2} \right) \quad (19)$$

gdzie  $n$  to numer poziomu wibracyjnego,  $n = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$ , a możliwe są jedynie przejścia pomiędzy sąsiadującymi poziomami oscylacyjnymi  $\Delta n = \pm 1$ . Przejścia dla oscylatora harmonicznego zaznaczono na niebiesko na rysunku 14.

W rzeczywistych molekułach wraz ze wzrostem odległości między drgającymi atomami spada wartość stałej siłowej, czego nie uwzględnia model harmoniczny. Tym samym siła sprężystości nie jest proporcjonalna do wychylenia i nie jest spełnione prawo Hooke'a. Energię oscylatora anharmonicznego można opisać równaniem Schrödingera, uwzględniającym współczynnik anharmoniczności  $\chi$ , określający odstępstwo od prawa Hooke'a:

$$E_{osc} = h\nu \left[ \left( n + \frac{1}{2} \right) - \chi \left( n + \frac{1}{2} \right)^2 \right] \quad (20)$$

Ze względu na anharmoniczność reguły wyboru dla przejść oscylacyjnych ulegają rozszerzeniu  $\Delta n = \pm 1, 2, 3, \dots$ ; w związku z tym możliwe są przejścia nie tylko między sąsiadującymi poziomami. Przejścia o  $\Delta n = \pm 1$  nazywają się tonami podstawowymi, natomiast  $\Delta n = \pm 2, 3, \dots$  są to nadtony. Przejścia dla oscylatora anharmonicznego zaznaczono na rysunku 14 kolorem zielonym, warto zaznaczyć, że odległości między kolejnymi poziomami energetycznymi się zmniejszają.



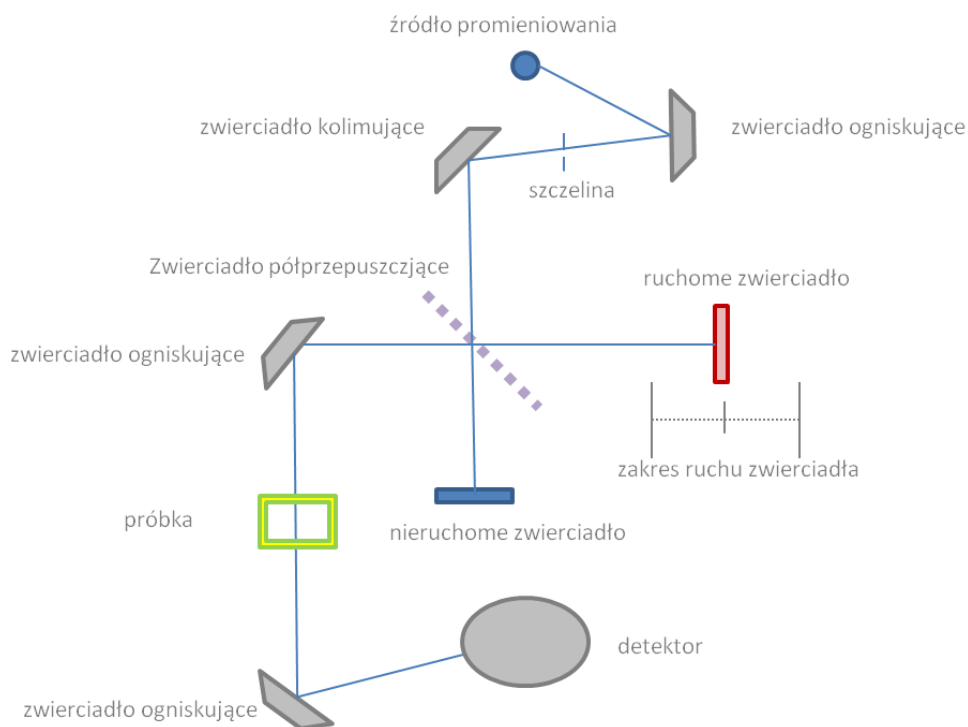
Rysunek 14. Przejścia absorpcyjne w oscylatorze harmonicznym (niebieski) i anharmonicznym (zielony) -  $r_0$  to położenie równowagi,  $r$  - odległość między zębami atomów.

Aby drgania mogły być obserwowane w zakresie podczerwieni, musi być spełniony warunek (21) tj. drgania oscylacyjne, które wykonuje cząsteczka muszą zmieniać jej moment dipolowy, gdzie  $\mu$  - moment dipolowy,  $r$  - współrzędna drgania w molekułe. Im większa jest zmiana momentu dipolowego tym silniejszą intensywność pasma jest obserwowana.

$$\frac{d\mu}{dr} \neq 0 \quad (21)$$

Spektroskopia podczerwieni jest jedną z podstawowych metod do identyfikacji związków organicznych. Na podstawie otrzymanego widma można określić skład danego związku – częstości drgań można przypisać konkretnym grupom funkcyjnym. Jednak teoretyczna liczba drgań normalnych danej grupy funkcyjnej nie odpowiada tej otrzymanej w spektroskopii IR, ponieważ występują zjawiska zwiększającą liczbę drgań (nadtony, drgania złożone) oraz zjawiska zmniejszające liczbę drgań (drgania poza obszarem rejestracji, zbyt słabe drgania, aby je zarejestrować, zbyt bliskie częstości – trudne do rozróżnienia – drgania zdegenerowane albo drgania niepowodujące zmiany momentu dipolowego) [160].

Spektrometr podczerwieni z transformatą Fouriera umożliwia badanie oddziaływania promieniowania z próbką jednocześnie w całym zakresie widmowym, co możliwe jest dzięki zastosowaniu interferometru Michelsona. Zasada jego działania opiera się na rozdzieleniu skolimowanej polichromatycznej wiązki na półprzepuszczalnym zwierciadle (ang. *beam splitter*, BS) na dwie wiązki: jedna z wiązek odbija się od BS i pada na nieruchome lustro, druga wiązka przechodzi przez BS i pada na poruszające się jednostajnie lustro, a następnie obie wracają na BS, gdzie dochodzi do ich interferencji. Następnie wiązka przechodzi przez próbkę i dociera do detektora (rysunek 15.). Generowany jest interferogram, czyli zależność intensywności światła docierającego do detektora w funkcji położenia ruchomego lustra (czyli zmiany drogi optycznej wiązki światła lasera). W spektrometrach FTIR transformata Fouriera pozwala na zmianę zależności intensywności w domenie czasowej w domenę długości fali - liczby falowej (widmo IR). Zastąpienie monochromatora interferometrem zwiększa szybkość i dokładność pomiarów [159, 160].



Rysunek 15. Schemat budowy spektrometru FTIR z interferometrem Michelsona.

W badaniach cieczy oraz ciał stałych wykorzystuje się tzw. przystawki ATR (ang. *attenuated total reflection*), wykorzystujące zjawisko osłabionego całkowitego odbicia. Na granicy ośrodków próbka – kryształ (materiał o wyższym współczynniku załamania) dochodzi do zjawiska załamania promieniowania pod odpowiednimi kątem, w wyniku czego jego nieznaczna część wchodzi w próbkę i z nią oddziałuje (absorpcja). Aby zwiększyć intensywność widm stosuje się wielokrotne wewnętrzne odbicie [160]. Najpopularniejszymi kryształami wykorzystywanymi w przystawkach ATR są: diament, selenek cynku i german.

#### 4.1.3 Spektroskopia fluorescencyjna

Po zaabsorbowaniu promieniowania elektromagnetycznego cząsteczki dążą do stanu równowagi termicznej na dwa sposoby: w sposób bezpromienisty (relaksacja wibracyjna, konwersja wewnętrzna) lub w sposób promienisty (fotoluminescencja). Wyróżnia się dwa typy fotoluminescencji: fluorescencję oraz fosforescencję. Różnicę między nimi wyjaśnia diagram Jabłońskiego (rysunek 11). Pierwszą z różnic między fluorescencją a fosforescencją jest multipletowość poziomu wzbudzonego, z którego zachodzi emisja energii. Fosforescencja charakteryzuje się mniejszą energią w stosunku do fluorescencji – przypada na wyższe długości fali, a także jej czas trwania jest dłuższy. Ze względu na zastosowanie w badaniach związków organicznych większe znaczenie ma fluorescencja [159].

Podstawowymi prawami opisującymi zjawisko fluorescencji są [162, 166]:

1. Prawo Stokes'a

Maksimum widma emisji jest przesunięte w stosunku widma absorpcji i przypada na większe długości fali (niższa energia). Straty energii wynikają z przejść na najniższy poziom wibracyjny  $S_{1,0}$  w wyniku relaksacji bezpromienistej. Różnica położenia maksimumów  $\Delta\lambda$  nazywa się przesunięciem Stokes'a.

2. Reguła Kasy-Wawiłowa

Widmo emisji nie zależy (w większości przypadków) od energii wzbudzenia, ponieważ emisja zachodzi z najniższego poziomu singletowego  $S_{1,0}$  do którego cząsteczka wzbudzona dąży, oddając bezpromieniście do otoczenia „nadmiar” energii w procesie relaksacji wibracyjnej i konwersji wewnętrznej.

Wyróżnia się dwa sposoby pomiaru fluorescencji:

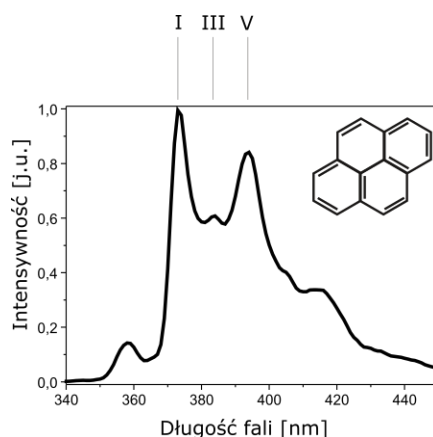
- spektroskopia fluorescencyjna w stanie ustalonym (ang. *steady-state fluorescence spectroscopy*, SSFS) – próbka naświetlana jest stałym i ciągłym światłem, po czym rejestrowane jest widmo emisji. Stan ustalony osiąga się praktycznie natychmiast po ekspozycji próbki na światło.
- czasowo-rozdzielcza spektroskopia fluorescencyjna (ang. *time-resolved fluorescence spectroscopy*) – rejestruje się zanik i anizotropię zaniku fluorescencji w czasie. Próbkę naświetla się bardzo krótkimi impulsami – krótszymi od czasu zaniku fluorescencji próbki.

Fluorofory to cząsteczki lub części cząsteczki zdolne do fluorescencji – emisji światła [166]. Fluorofory podzielić można na dwie główne grupy wewnętrzne (naturalnie

występujące w cząsteczce np. grupa indolowa w tryptofanie) i zewnętrzne (dodane, np. DPH difenyloheksatrien, który wbudowuje się w błony lipidowe) [162,167].

#### Wyznaczanie CMC w oparciu o fluorescencję pirenu

Jednym z najpopularniejszych fluoroforów wykorzystywanych w badaniach procesów agregacji związków amfifilowych jest piren. Jest to związek policykliczny zbudowany z czterech pierścieni benzenowych (rysunek 16.) o masie cząsteczkowej 202,25 g/mol. To właśnie dzięki swojej budowie (symetria, cykliczność 16 elektronów  $\pi$ ) w formie monomerycznej w roztworach wodnych, piren ma widmo wibracyjne fluorescencji z pięcioma maksimumami (rysunek 16.) [168]. Intensywność pasm silnie uzależniona jest od użytego rozpuszczalnika, gdyż piren jest cząsteczką niepolarną [164, 169]. Piren w wyższym stężeniu ma zdolność do tworzenia ekscymerów – dimerów mających silne pasmo emisji w okolicy 470 nm [162].



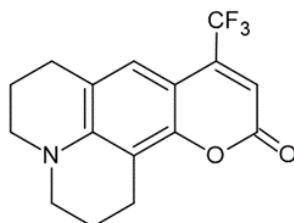
Rysunek 16. Wzór półstrukturalny pirenu i jego widmo emisji przy wzbudzeniu 320nm.

W rozważaniach nad wyznaczaniem CMC surfaktantów istotna jest wrażliwość pirenu na jego otoczenie. We wnętrzach tworzących się micel powstaje hydrofobowy rdzeń, który „wciąga” cząsteczki pirenu do środka [164, 170]. Na zmiany hydrofobowości ośrodka szczególnie czułe jest I pasmo pirenu (ok. 372 nm), III pasmo (385 nm) natomiast nie wykazuje tej wrażliwości [168]. Analizując stosunek tych pasm w zależności od stężenia surfaktantu, można wyznaczyć jego CMC [171].

#### Wygaszanie fluorescencji w stanie ustalonym SSFQ

Wygaszanie fluorescencji w stanie ustalonym (ang. *steady-state fluorescence quenching*, SSFQ) to zjawisko polegające na spadku intensywności fluorescencji fluoroforu w wyniku jego dezaktywacji na skutek obecności czynnika wygaszającego (ang. *quencher*) [162]. Istnieją dwa główne mechanizmy wygaszania fluorescencji: zderzeniowy (ang. *collisional quenching*), w którym w wyniku dyfuzji, molekule fluoroforu i wygaszacza zderzają się, tym samym dochodzi do transferu energii – fluorofor przechodzi do stanu podstawowego bez emisji promieniowania, a wygaszacz absorbuje energię wzbudzenia fluoroforu; oraz statyczny (ang. *static quenching*), w którym nie dochodzi do zderzeń molekuł, a fluorofor i wygaszacz tworzą kompleks bez właściwości fluorescencyjnych [162]. Aby w układach micelarnych doszło do wygaszenia fluorescencji, cząsteczka wygaszacza musi zbliżyć się do cząsteczki pirenu na odległość mniejszą od 7 Å (możliwość transferu energii) [169].

Jednym z najczęściej stosowanych wygaszaczy w *SSFQ* jest kumaryna 153 (c153), która dobrze wnika do wnętrza miceli [172]. Kumaryna 153 (2,3,6,7-tetrahydro-9-(trifluorometylo)-1H,5H,11H-[1]-benzopirano-[6,7,8,ij]chinolizyn-11-on) jest związkiem heterocyklicznym o wzorze przedstawionym na rysunku 17 [173].



Rysunek 17. Wzór półstrukturalny kumaryny 153.

Wygaszanie fluorescencji jest jedną z technik stosowanych do wyznaczania średniej liczby agregacji surfaktantów  $N_{ag}$ , czyli liczby cząsteczek surfaktantu przypadających na jedną micelę:

$$N_{ag} = \frac{C - CMC}{C_{mic}} \quad (22)$$

gdzie  $C$  – stężenie całkowite surfaktantu,  $C_{mic}$  – stężenie miceli w roztworze [174].

Zgodnie z metodą zaproponowaną przez Turro i Yekta [174] znając intensywność emisji próbki bez obecności czynnika wygaszającego ( $I_0$ ) i w jego obecności ( $I_q$ ) oraz jego stężenie ( $C_q$ ) zgodnie z zależnością (23) uwzględniając zależność (22) otrzymujemy zależność (24), którą następnie traktujemy jak zależność liniową o współczynniku załamania  $a$  (25).

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_q}\right) = \frac{C_q}{C_{mic}} \quad (23)$$

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_q}\right) = \frac{N_{agg}}{C - C_{cmc}} C_q \quad (24)$$

$$a = \frac{N_{agg}}{C - C_{cmc}} \quad (25)$$

#### 4.1.4 Konduktometria

Wyznaczenie  $CMC$  surfaktantów przy użyciu metody konduktometrycznej, polega na pomiarze przewodności elektrycznej roztworów surfaktantu w różnych stężeniach. Metoda ta przeznaczona jest wyłącznie dla surfaktantów jonowych, ponieważ wykazują one inny stopień jonizacji poniżej i powyżej  $CMC$  [164]. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w roztworze rośnie liniowo przewodność elektryczna  $\kappa$ , ponieważ rośnie liniowo stężenie jonów – w roztworze wodnym surfaktanty dysocjują. Po osiągnięciu  $CMC$ , tworzą się micelle złożone z jonów surfaktantów wraz z otoczką z przeciwjonów. Zależność  $\kappa(C)$  nadal rośnie liniowo, jednak wolniej, ponieważ część jonów staje się „niewidoczna” [164, 175].

Powstałą zależność  $\kappa(C)$  możemy przeanalizować w celu wyznaczenia wartości  $CMC$  przy użyciu dwóch metod: Williama i Phillipa [175]. Metoda zaproponowana przez Williama polega na znalezieniu punktu przecięcia dla dopasowanych funkcji liniowych

poniżej i powyżej  $CMC$  [175, 176]. Metoda Phillipsa polega natomiast na wyliczeniu drugiej pochodnej funkcji  $\kappa(C)$  i znalezieniu jej minimum jednoznacznego z wartością  $CMC$ . Powyższe metody sprawdzają się dla surfaktantów, dla których wyraźnie widać punkt przegięcia funkcji  $\kappa(C)$  [175, 177].

W przypadku surfaktantów, dla których zależność przewodności od stężenia nie przebiega w sposób liniowy, Carpena [178] zaproponował dopasowanie dla funkcji  $\kappa(C)$ :

$$F(x) = F(0) + A_1x + \Delta x(A_2 - A_1) \ln\left(\frac{1 + e^{(x-x_0)/\Delta x}}{1 + e^{-x_0/\Delta x}}\right) \quad (26)$$

gdzie  $x_0 = CMC$ ,  $\Delta x$  szerokość przemiany,  $A_2$  oraz  $A_1$  nachylenie prostych powyżej i poniżej  $CMC$ .

#### 4.1.5 Dynamiczne rozpraszanie światła

Dynamiczne rozpraszanie światła DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) zwane również spektroskopią korelacji fotonów, to metoda analityczna pozwalająca zbadać rozmiar, rozkład, a nawet określić przybliżony kształt cząsteczek. Cząsteczki w roztworze są w nieustannym ruchu (ruch Browna), który prowadzi do lokalnych fluktuacji stężenia, a to z kolei do fluktuacji natężenia światła rozproszonego na tych cząsteczkach. Ruchliwość cząsteczek jest zależna od ich rozmiaru, dlatego też analiza funkcji korelacji czasowych fluktuacji natężenia promieniowania rozproszonego zawiera informację o średnicy hydrodynamicznej i współczynnika dyfuzji cząsteczek w roztworze [179, 180].

Ze względu na obecność w roztworze wielu cząsteczek takie rozporoszone światło pochodzące od wielu molekuł, ulega interferencji (konstruktywnej lub destrukcyjnej), w związku z czym uzyskuje się informację o zmianach natężenia światła w funkcji czasu, która podana dalszej analizie daje informacje o rozmiarze cząsteczek.

Zanik wykładniczy funkcji autokorelacji fluktuacji natężenia światła  $G$  w czasie, opisuje wzór:

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt = B + Ae^{-2q^2D\tau} \quad (27)$$

gdzie  $B$  - tło,  $A$  - amplituda,  $D$  - współczynnik dyfuzji translacyjnej,  $\tau$  - przyrost czasu,  $t$  - czas.

Wektor rozpraszania  $q$  opisany wzorem (28), zależy od:  $n$  - współczynnika załamania światła rozpuszczalnika,  $\lambda_0$  - długości fali lasera w próżni oraz od kąta rozpraszania  $\theta$ .

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (28)$$

Współczynnik dyfuzji translacyjnej opisuje szybkość ruchów Browna cząsteczek w roztworze, a na jego podstawie zgodnie z równaniem Stokesa-Einsteina można wyznaczyć średnicę hydrodynamiczną cząsteczki [179]:

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (29)$$

gdzie:  $k_B$  - stała Boltzmanna,  $T$  - temperatura,  $\eta$  - lepkość rozpuszczalnika.



Aby wyznaczyć *CMC* surfaktantów przy zastosowaniu techniki DLS niezmiernie ważny jest prawidłowy dobór parametrów takich jak: stała temperatura pomiaru (znana lepkość ośrodka, ograniczenie konwekcji cieplnej), odpowiednia siła jonowa roztworu (wykluczenie efektów zależnych od stężenia soli) oraz zakres stężenia surfaktantów (ograniczenie tworzenia struktur nie-micelarnych).

W celu wyznaczenia *CMC* wykreśla się zależność średnicy hydrodynamicznej od stężenia surfaktantu  $d_H(C)$  oraz średniej intensywności od stężenia surfaktantu  $I(C)$ . W przypadku zależności  $I(C)$  obserwuje się nagły wzrost intensywności po przekroczeniu *CMC*, natomiast w przypadku zależności  $d_H(C)$  nie otrzymujemy wyników poniżej *CMC*, z uwagi na zbyt małe rozmiary cząsteczek surfaktantów (za słabe rozpraszanie).

Współczynnik dyfuzji, a więc także średnica hydrodynamiczna miceli zależy od temperatury, stężenia surfaktantu oraz stężenia soli. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu rośnie współczynnik dyfuzji, natomiast ze wzrostem stężenia soli w roztworze – współczynnik dyfuzji maleje. Jednak zgodnie z równaniem Stokesa-Einsteina dla bardzo niskich wartości stężenia soli w roztworze, średnica hydrodynamiczna miceli jest stała, a liniowy wzrost współczynnika dyfuzji wynika z oddziaływań van der Waalsa lub odpychania elektrostatycznego. Średnicę hydrodynamiczną dla zerowego stężenia soli w roztworze otrzymuje się poprzez ekstrapolacje do 0 zależności  $d_H(C)$  [181].

## 4.2 Metody stosowane do oceny stabilności kompleksów DNA

---

Do oceny zdolności lipopleksów do wiązania kwasów nukleinowych i badania stabilności powstałych kompleksów najczęściej stosowanymi metodami są elektroforeza żelowa oraz potencjał zeta.

### 4.2.1 Elektroforeza żelowa w obecności bromku etydyny

Rozdział elektroforetyczny prowadzony w żelu agarozowym w obecności bromku etydyny pozwala na wizualizację wolnych – nieskompleksowanych cząsteczek DNA, a tym samym pozwala ocenić, dla których układów kompleksowanie DNA z lipopleksami występuje.

Elektroforeza to rozdział cząsteczek naładowanych w polu elektrycznym na skutek przyłożonego napięcia. Prędkość przemieszczania się próbki w żelu zależy od właściwości samej makrocząsteczki (rozmiar, kształt, ładunek), jak i właściwości ośrodka (gęstość żelu, stopień usieciowania, siła jonowa, przyłożone napięcie). Parametrem opisującym zdolność cząstek do migracji w polu elektrycznym jest mobilność elektroforetyczna  $\mu_{el}$  wyrażana wzorem [182]:

$$\mu_{el} = \frac{q_e}{6\pi\eta R_H} \quad (30)$$

gdzie:  $q_e$  – ładunek elektryczny cząsteczki,  $\eta$  – lepkość ośrodka,  $R_H$  – promień hydrodynamiczny cząsteczki.

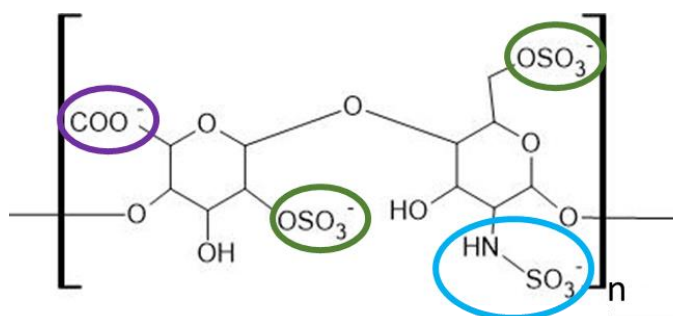
Elektroforeza żelowa jest podstawowym narzędziem w biologii molekularnej i biofizyce, pozwalającym na badanie własności białek (masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, procesy agregacji, oddziaływania z innymi strukturami), ich rozdział i oczyszczanie, a także badanie kwasów nukleinowych. Do tych ostatnich wykorzystuje się elektroforezę agarozową (na bazie agaru, czyli polisacharydu izolowanego z krasnorostów), gdzie stężenie agarozy jest dobrane do wielkości (długości, kształtu) badanego kwasu nukleinowego. Dla kwasów nukleinowych wysokomolekularnych stosuje się żele o niskiej zawartości agarozy ok. 0,5%, charakteryzujące się niskim stopniem usieciowania, umożliwiając swobodne przemieszczanie się kwasu nukleinowego w żelu. Dla cząsteczek niskomolekularnych stosuje się żele o stężeniu agarozy ok. 2%, gdzie usieciowanie jest wyższe, co zapobiega ucieczce próbki z żelu. W celu wizualizacji wyników dodaje się do żelu lub wybarwia po rozdziale – bromek etydyny, który interkaluje między parami zasad azotowych i fluoryzuje w świetle UV, dając różowo-pomarańczowy obraz prążków, zawierających rozdzielone w polu elektrycznym kwasy nukleinowe.

Gdy dojdzie do utworzenia stabilnego kompleksu, DNA zostaje otoczone surfaktantami, które ograniczają możliwość wniknięcia bromku etydyny do wnętrza DNA – dlatego nie obserwuje się dla kompleksów prążków w żelu agarozowym w świetle UV [183].

### **Uwalnianie DNA z lipopleksów**

W celu zbadania stabilności kompleksów, w tym oceny jak silne jest wiązanie lipopleksu z DNA, bada się proces uwalniania DNA z kompleksu pod wpływem dodanej do układu heparyny.

Heparyna to polisacharyd, powstały w efekcie polimeryzacji dwucukru przedstawionego na rysunku 18. Ze względu na obecność grup siarczanowych, amidosulfonowych i karboksylowych heparyna obdarzona jest ujemnym ładunkiem elektrycznym o dużej gęstości [184]. Polisacharyd ten naturalnie występuje w organizmach żywych, gdzie pełni wiele funkcji min. działa przeciwzakrzepowo poprzez łączenie się z antytrombiną, hamuje aktywację czynników Xa i IIa, a w konsekwencji blokuje dalszą kaskadę krzepnięcia [185]. Ze względu na swoje właściwości jest najpowszechniej stosowanym antykoagulantem w preparatach leczniczych [186].



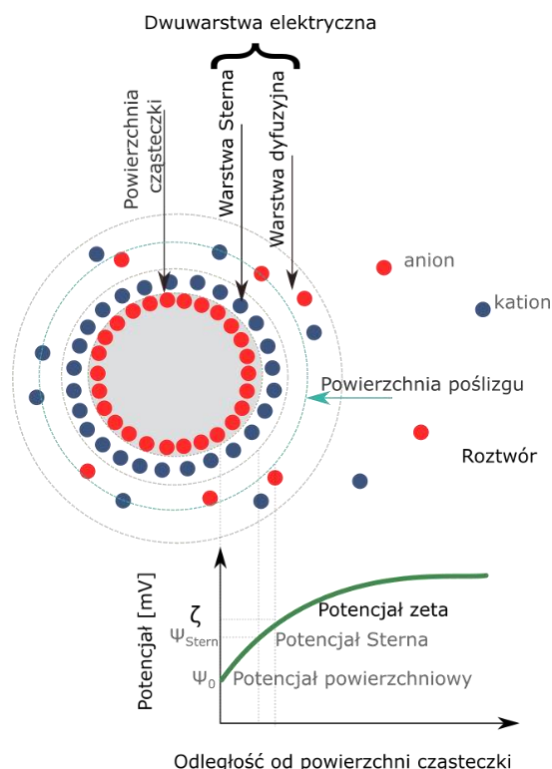
Rysunek 18. Monomer heparyny, w którym oznaczono grupy funkcyjne nadające ładunek ujemny.

W badaniach nad stabilnością kompleksów, heparyna z racji zwielokrotnionego ujemnego ładunku elektrycznego konkuruje z DNA o dodatnio naładowane cząsteczki surfaktantu, tym samym wypierając DNA z utworzonych kompleksów [187]. Uwolnione DNA obserwuje się podczas rozdzielania elektroforetycznego. O stabilności i sile wiązania w kompleksach mówi ilość heparyny wymaganej do uwolnienia DNA z kompleksu.

#### **4.2.2 Potencjał zeta**

Potencjał zeta (ang. *ζ-potential*) to potencjał występujący przy tzw. powierzchni poślizgu cząsteczek naładowanych w roztworach elektrolitów. Potencjał zeta dostarcza informacji o stabilności układów koloidalnych, oddziaływaniach międzycząsteczkowych, przepuszczalności np. przez błony lipidowe czy biokompatybilności [188].

Powierzchnię cząsteczek obdarzonych wypadkowym ładunkiem elektrycznym, otacza w roztworze tzw. warstwa Sterna, złożona ze ściśle upakowanych jonów o znaku przeciwnym. Wokół tej warstwy znajduje się warstwa luźno związanych jonów, które mogą swobodnie dyfundować w obrębie tej warstwy – warstwa dyfuzyjna. Jej zakres określa tzw. granica poślizgu, związana z potencjałem zeta, poza którą występują wolne jony w roztworze. Cząsteczka przemieszcza się wraz z jonami w warstwie Sterna jak i dyfuzyjnej [189]. Na rysunku 19 przedstawiono schemat rozkładu potencjałów z uwzględnieniem obszaru występowania potencjału zeta dla cząsteczki naładowanej ujemnie.



Rysunek 19. Schemat rozkładu potencjałów dla cząsteczki naładowanej ujemnie.

Potencjał zeta ściśle zależy od temperatury, pH, przewodności roztworu (siły jonowej) oraz lepkości roztworu. Nawet niewielkie zmiany tych parametrów znacząco wpływają na wartość potencjału zeta [188].

Wyznaczenie potencjału zeta opiera się na zjawisku rozpraszania światła przez naładowane cząsteczki poruszające się w polu elektrycznym  $E$  z prędkością  $v$ . Prędkość cząstek wyznacza się z przesunięcia Dopplera, czyli różnicy częstotliwości (lub faz) wiązki padającej i rozproszonej przez cząsteczki roztworu. Znając te dwa parametry można wyznaczyć mobilność elektroforetyczną zgodnie ze wzorem:

$$\mu_{el} = \frac{v}{E} \quad (31)$$

Mobilność elektroforetyczna jest proporcjonalna do potencjału zeta  $\xi$  zgodnie z równaniem Henry'ego [190]:

$$\mu_{el} = \frac{2\varepsilon\xi f(\kappa a)}{3\eta} \quad (32)$$

gdzie:  $\varepsilon$  – stała dielektryczna ośrodka,  $f(\kappa a)$  – funkcja Henry'ego,  $\eta$  – lepkość ośrodka w temperaturze pomiaru.

Odległość Debye'a  $\kappa$  oraz promień cząsteczki  $a$  i ich wzajemny stosunek określają grubość dwuwarstwy elektrycznej [188]. W przypadku badań nad lipopleksami stosuje się przybliżenie  $f(\kappa a) = 1,5$ . Cząsteczki o potencjale zeta mieszczącym się w przedziale od -10 mV do +10 mV uważa się za cząsteczki neutralne, natomiast powyżej -30 mV lub +30 mV jako cząsteczki odpowiednio silnie anionowe lub kationowe [189].

## 4.3 Ocena konformacji DNA

Do badania konformacji DNA w utworzonych kompleksach stosuje się spektroskopię dichroizmu kołowego i spektroskopię podczerwieni z transformacją Fouriera.

### 4.3.1 Dichroizm kołowy

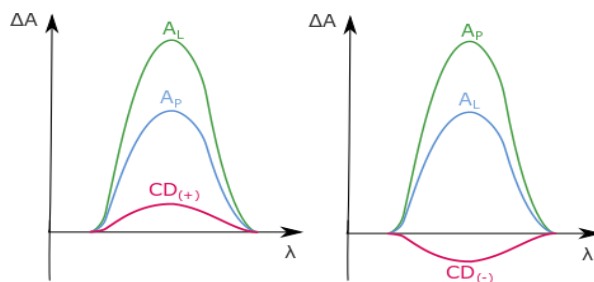
Zjawisko dichroizmu kołowego (ang. *Circular Dichroism*, CD) polega na różnym stopniu absorpcji składowych promieniowania spolaryzowanego kołowo przez cząsteczki chiralne (substancje optycznie czynne). W wyniku niejednorodnej absorpcji po przejściu przez badaną substancję otrzymuje się światło spolaryzowane eliptycznie [191].

Miarą dichroizmu kołowego substancji jest eliptyczność  $\theta$  [mdeg], jednak jest to wielkość zbyt mała, aby móc ją bezpośrednio zmierzyć. Dlatego w spektropolarymetrach CD przez próbkę naprzemiennie przepuszcza się światło o kołowej polaryzacji prawoskrętnej i lewoskrętnej, mierząc absorbancję dla poszczególnych składowych [192]. Sygnał CD, czyli różnicę absorbancji  $\Delta A$  można zapisać zgodnie z prawem Lamberta-Beer'a następująco:

$$CD = \Delta A = A_L - A_P = \varepsilon_L Cl - \varepsilon_P Cl = \Delta \varepsilon Cl \quad (33)$$

gdzie:  $A_L$ ,  $A_P$  – wartość absorbancji światła spolaryzowanego kołowo lewoskrętnie i prawoskrętnie dla próbki o molowych współczynnikach ekstynkcji odpowiednio  $\varepsilon_L$ ,  $\varepsilon_P$ ;  $C$  – stężenie badanej substancji,  $l$  – długość drogi optycznej.

Gdy w większym stopniu absorbowane jest światło spolaryzowane lewoskrętnie niż prawoskrętnie to  $\Delta A > 0$ , tym samym sygnał CD jest dodatni, zamiennie stosuje się pojęcie dodatniego efektu Cottona. W przeciwnym wypadku, gdy  $\Delta A < 0$  obserwowany jest ujemny efekt Cottona (rysunek 20).



Rysunek 20. Dodatni oraz ujemny efekt Cottona.

Między eliptycznością a różnicą absorbancji składowych światła spolaryzowanego kołowo przechodzących przez badaną substancję istnieje zależność [193]:

$$CD = \Delta A = \frac{4\pi\theta}{180 \ln 10} [\text{deg}] = \frac{\theta}{32982} [\text{mdeg}] \quad (34)$$

Warunkiem koniecznym do rejestracji efektu CD jest fakt, że obszar obserwacji CD musi się pokrywać z zakresem absorpcji promieniowania badanych cząsteczek. Drugim warunkiem jest chiralność cząsteczek, jednak od tej zasady jest wyjątek, kiedy to cząsteczki achiralne ze względu na swoje specyficzne ułożenie przestrzenne np. w kryształach wykazują aktywność optyczną [193].

Spektroskopię CD wykorzystuje się między innymi do badania struktury II-rzędowej białek (wpływu różnych czynników na nią), a także do badania konformacji kwasów nukleinowych. Obszar obserwacji CD dla DNA mieści się w zakresie absorpcji zasad azotowych tj. 180-300 nm [194], gdzie maksimum absorpcji dla DNA przypada na 260 nm (przejście  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) i dla większych cząsteczek DNA nie zależy od składu zasad azotowych [195].

Same zasady azotowe nie wykazują aktywności optycznej, chiralność „nabywają” przez przyłączenie się do szkieletu cukrowego, który wymusza helikalną strukturę DNA [193, 196].

Na podstawie kształtu widma CD i charakterystycznych dla niego parametrów można wyznaczyć formy DNA w następujący sposób [193]:

- B-DNA – maksimum pasma dodatniego przypada na długość fali 275 nm, minimum pasma ujemnego – 245 nm, przecięcie z osią Y – 260 nm, ok. 180-190 nm pasmo dodatnie o dużej intensywności;
- A-DNA – pasmo dodatnie przy 260 nm jest dużo bardziej intensywne niż w formie B-DNA, minimum pasma ujemnego - 210 nm, przy 190 nm obserwuje się pasmo dodatnie;
- Z-DNA – forma ta charakteryzuje się intensywnymi pasmami ujemnymi, dla których minima przypadają przy 290 nm oraz ok. 200 nm, występuje również dodatnie pasmo przy 260 nm, a przecięcie z osią Y przy 180 nm.

W zakresie powyżej 300 nm DNA nie powinno absorbować światła. Jeżeli jednak obserwowane są dodatkowe pasma w tym zakresie prawdopodobnie doszło do kondensacji DNA. Tworzy się wtedy tzw. forma *psi*  $\psi$ , charakteryzująca się ekstremalną amplitudą pasma (dodatniego bądź ujemnego) przy ok. 280 nm, wynikająca z chiralnej kondensacji DNA [194].

#### 4.3.2 Pasma charakterystyczne dla form DNA w widmach FTIR

Spektroskopia FTIR umożliwia zbadanie formy DNA zarówno niezwiązanego jak i w kompleksie, poprzez lokalizację pasm specyficznych (markerów) dla danej formy DNA. W tabeli 2. zestawiono liczby falowe, przy których występują pasma charakterystyczne dla danej struktury DNA [197,198].

Tabela 2. Pasma charakterystyczne w widmach FTIR dla różnych form DNA.

Charakterystyczne pasma	Forma DNA		
	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Drgania rozciągające $\nu_{C=O}$ , $\nu_{C=N}$ guaniny i tyminy	1715 $\text{cm}^{-1}$	1700-1695 $\text{cm}^{-1}$	1690 $\text{cm}^{-1}$
Drgania charakterystyczne dla deoksyrybozy	1425 $\text{cm}^{-1}$	1418 $\text{cm}^{-1}$	1408 $\text{cm}^{-1}$
Drgania rozciągające reszt fosforanowych $\nu_{PO_2^-}$	1226-1221 $\text{cm}^{-1}$	1241-1235 $\text{cm}^{-1}$	1216 $\text{cm}^{-1}$
Inne markery DNA	894 $\text{cm}^{-1}$	899 $\text{cm}^{-1}$	930 $\text{cm}^{-1}$
	836-810 $\text{cm}^{-1}$	825-800 $\text{cm}^{-1}$	800-780 $\text{cm}^{-1}$

## 4.4 Testy cytotoksyczności

---

Ocena wpływu substancji chemicznych (leków, surfaktantów, lipidów, itp.) na prawidłowy rozwój komórek, pozwala wykluczyć substancje, które wykazują toksyczność, tym samym zweryfikować czy projektowany nośnik nie wywoła niepożądanych reakcji (śmierci komórki).

Wśród metody stosowanych do oceny cytotoksyczności można wyróżnić: testy kolorymetryczne, testy fluorometryczne, testy luminometryczne oraz wybarwienie komórek [199].

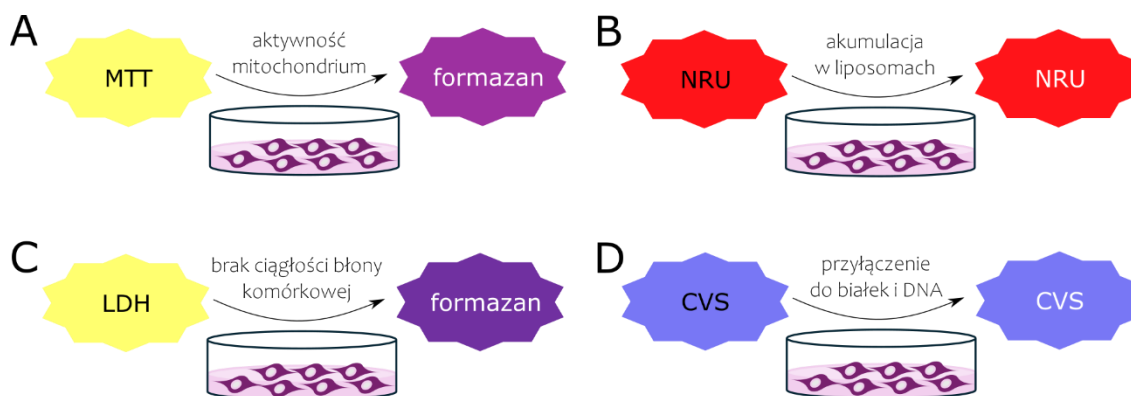
Metody oparte o wybarwienie komórek wykorzystują zdolność barwników do przenikania przez błonę komórkową i gromadzenia się w określonych organellach komórkowych. Metody te można podzielić w zależności od tego czy wybarwieniu ulegają żywe czy martwe komórki [200]. W sytuacji, gdy wybarwiane są:

- martwe komórki - barwniki mogą swobodnie wnikać do wnętrza komórki i gromadzić się w cytoplazmie (np. wybarwienie błękitem trypanu) lub wiązać się ze strukturami komórki np. DNA (np. wybarwienie bromkiem etydyny) lub przyłączać się do zdepolaryzowanej błony komórkowej (np. wybarwienie nigrozyną). Efekty te najczęściej związane są z naruszeniem integralności błony komórkowej.
- żywe komórki - barwnik wnika do komórki i gromadzi się w cytoplazmie (np. dwuocian fluoresceiny) lub wiąże się np. z DNA (np. oranż akrydyny). Efekty te najczęściej są związane z modyfikacją struktury barwnika w obecności innych cząsteczek.

Metody kolorymetryczne są szeroko stosowane do ilościowej oceny aktywności metabolicznej komórek. Najpopularniejszą tego rodzaju metodą jest test przeżywalności komórkowej MTT, który *de facto* opiera się na ocenie funkcji mitochondriów - tj. zdolności do redukcji soli tetrazoliowych do formazanu. Komórki z badanym czynnikiem inkubuje się przez określony czas, a następnie do układu dodaje się sól MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu). Rozpuszczalna w wodzie sól MTT (o barwie żółtej) rozkładana jest przez dehydrogenazę bursztynianową żywych komórek do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu (o barwie ciemno fioletowej). Ocena aktywności mitochondrium (równoznacznej z przeżywalnością komórek) oparta jest o pomiar absorbancji przy długości 570 nm.

Innymi powszechnie stosowanymi testami są: test LDH (ang. *lactate dehydrogenase*) - pozwalający sprawdzić czy dany czynnik powoduje przerwanie ciągłości błony komórkowej; test NRU (ang. *neutral red uptake*) - wykorzystujący zdolność żywych komórek do akumulowania czerwieni obojętnej w liposomach; oraz test CVS (ang. *crystal violet assay*) - polega na wybarwianiu komórek fioletem krystalicznym, który wiąże się do białek i DNA żywych komórek.

Na rysunku 21 zestawiono schematyczną reprezentację testów kolorymetrycznych, z zaznaczeniem substratów i produktów reakcji oraz aktywnością komórek, z jaką związana jest ta reakcja.



Rysunek 21. Graficzna reprezentacji testów kolorymetrycznych stosowanych do badań przeżywalności komórek: test MTT (A), NRU (B), LDH (C) oraz CVS (D).

Liniami komórkowymi często stosowanymi do badań m.in. cytotoxyczości są: linie nienowotworowe takie jak HEK 293 (ludzkie fibroblasty), MEF (mysie fibroblasty), czy miocyty, lub linie nowotworowe: HeLa (komórki raka szyjki macicy), PC12 (komórki guza chromochłonnego nadnercza szczura), czy Hep-G2 (komórki nowotworu wątroby) [201].

Linia komórkowa HeLa, to najczęściej stosowana do testów toksyczości hodowla komórek wywodząca się z komórek raka szyjki macicy, pobranych w 1951 roku od Henrietty Lacks [202]. Badania nad komórkami HeLa rozpoczęły nie tylko intensywny okres rozwoju badań komórkowych, ale też przyczyniły się do szeroko pojętego rozwoju medycyny (np. powstanie szczepionki przeciw polio), biotechnologii czy genetyki (klonowanie, badania *in vitro*). Komórki HeLa są łatwe w hodowli, przede wszystkim dlatego, że są to komórki praktycznie nieśmiertelne, szybko się dzielą i są stosunkowo wytrzymałe na warunki środowiska. Dodatkowo transfekcja prowadzona na linii HeLa jest łatwa i efektywna.

Parametrem charakteryzującym cytotoxyczość jest stężenie  $EC_{50}$  (ang. *effective concentration*) – średnie stężenie skuteczne danej substancji. Jest to stężenie substancji, które indukuje określony efekt u 50% komórek żywych w określonych warunkach. Wyznacza się go na podstawie zależności przeżywalności komórek od stężenia czynnika wywołującego efekt cytotoxyczny.



## 4.5 Przemiany fazowe w układach fosfolipidów

Charakterystyka przejść fazowych obserwowanych w układach lipidowych stanowi istotną część niniejszej pracy. Wyznaczanie parametrów termodynamicznych, charakteryzujących te procesy, takich jak: temperatura przejścia fazowego, zakres przemiany fazowej, entalpia przemiany, możliwe jest dzięki zastosowaniu takich technik jak spektroskopia podczerwieni oraz różnicowa kalorymetria skaningowa.

### 4.5.1 Różnicowa kalorymetria skaningowa

Różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) to metoda szeroko stosowana do badania przemian fazowych, kinetyki procesów krystalizacji, wyznaczania temperatury topnienia, przejść fazowych czy analizy termodynamicznej biomolekuł [203]. Metoda ta polega na rejestrowaniu różnic przepływu ciepła (strumienia ciepła) między badaną próbką a próbką referencyjną, które znajdują się w tych samych warunkach temperaturowych i pod tym samym ciśnieniem [204]. Kalorymetr DSC może występować w dwóch typach: z przepływem ciepła (ang. *heat-flux*) lub z kompensacją mocy (ang. *power-compensated*). W kalorymetrach DSC z przepływem ciepła, próbka badana i próbka referencyjna znajdują się w tym samym piecu, a mierzona jest różnica temperatur między próbką a referencją. W kalorymetrach DSC z kompensacją mocy próbka badana i próbka referencyjna znajdują się w osobnych piecach, układ rejestruje różnicę między mocą elektryczną dostarczoną do próbki a mocą elektryczną dostarczoną do próbki odniesienia, wymaganą, aby utrzymać zadaną temperaturę [205].

W efekcie pomiarów otrzymuje się termogram DSC, ilustrujący ilość ciepła wymienionego z otoczeniem przez próbkę w funkcji czasu lub funkcji temperatury. Na rysunku 22. przedstawiono przykładową krzywą kalorymetryczną z zaznaczonymi najważniejszymi parametrami pomiaru.

Z krzywych DSC można bezpośrednio odczytać wartości takich wielkości jak [204]:

- kalorymetryczna entalpia przemiany – jest to pole powierzchni pod pikiem przemiany  $\Delta H_{cal}$  (35), gdzie  $c_p$  to pojemność cieplna,

$$\Delta H_{cal} = \int c_p dT \quad (35)$$

- temperaturę początku  $T_{onset}$  oraz końca  $T_{end}$  przejścia termicznego,
- zakres temperatur  $\Delta T_{1/2}$ , jako szerokość w połowie wysokości piku przemiany fazowej,
- zmiana pojemności cieplnej układu  $\Delta c_p$ , po przemianie fazowej

Pośrednio wyznaczonymi wartościami uzyskanymi z krzywych DSC są [206,207]:

- entropia przejścia  $\Delta S$ :

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m} \quad (36)$$

- entalpia van't Hoffa  $\Delta H_{vH}$  (37), gdzie  $K$  – stała równowagi chemicznej.

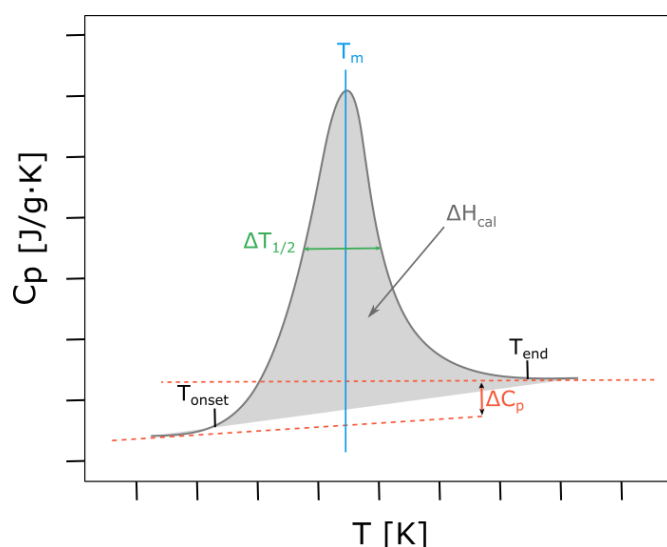
$$d \ln \frac{K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (37)$$

Wielkość  $\Delta H_{vH}$  jest stosowana do wyznaczenia stopnia kooperatywności przemiany jako stosunek  $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ : gdy stosunek ten wynosi 0 – świadczy

to o braku kooperatywności przemiany, gdy dąży do nieskończoności – to przemiana jest wysoce kooperatywna.

Warto jednak podkreślić, że ocena kooperatywności na podstawie zależności  $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$  jest obarczona dużym błędem. Wartość  $\Delta H_{vH}$  jest wrażliwa m.in. na szybkość skanowania (im większa prędkość skanowania tym niższe odczyty wartości entalpii przemiany, a większe odczyty szerokości połówkowej) [208]. Dlatego kooperatywność często oceniana jest wyłącznie na podstawie wartości  $\Delta T_{1/2}$ , która pozostaje w relacji z entalpią van't Hoffa zgodnie z zależnością:

$$\Delta H_{vH} = \frac{4RT_m^2}{T_{1/2}} \quad (38)$$



Rysunek 22. Reprezentacja schematyczna termogramu DSC z zaznaczeniem kluczowych parametrów do analizy przemian fazowych.

Główne przemiany fazowe fosfolipidów zazwyczaj charakteryzują się wysokim stopniem kooperatywności. Badania wykazały, że dla fosfatydylocholin oraz fosfatydyloetanolamin obserwowano przesunięcie w kierunku wyższych temperatur przemiany fazowej wraz z wydłużeniem części hydrofobowych, na skutek zwiększenia się oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami alifatycznymi. Zakres przemiany fazowej fosfolipidów może ulec poszerzeniu na skutek obecności cholesterolu i wzrastać wraz ze wzrostem jego stężenia w układzie.

W mieszaninach różnego rodzaju fosfolipidów, poprzez niedopasowanie łańcuchów hydrofobowych i osłabienie oddziaływania van der Waalsa, zaobserwowano obniżenie temperatury głównej przemiany fazowej, a co więcej w tych układach występowały regiony bogatsze w jeden rodzaj lipidów – taka separacja powoduje występowanie dwóch maksimum na termogramach DSC [207].

#### 4.5.2 Pasma charakterystyczne w analizie przemian fazowych fosfolipidów na podstawie FTIR

Spektroskopię poczerwieni FTIR można również zastosować do badań przemian fazowych w układach fosfolipidowych, analizując zmiany w drganiach wybranych grup funkcyjnych. Przemiany fazowe fosfolipidów i charakteryzujące je pasma można podzielić na trzy główne grupy [209]:

- A. Przemiana fazowa związana z topnieniem łańcucha węglowodorowego (przejście *trans-gauche*), gdzie analizie poddawane są pasma:
- $as\nu_{CH_2}$  asymetryczne drgania rozciągające grup metylenowych ok. 2920  $cm^{-1}$ ,
  - $s\nu_{CH_2}$  symetryczne drgania rozciągające grup metylenowych ok. 2850  $cm^{-1}$ ,
  - $as\nu_{CH_3}$  asymetryczne drgania rozciągające grup metylowych ok. 2962  $cm^{-1}$ ,
  - $s\nu_{CH_3}$  symetryczne drgania rozciągające grup metylowych ok. 2872  $cm^{-1}$ ,
  - $\gamma_{CH_2}$  drgania nożycowe grup metylenowych ok. 1470  $cm^{-1}$ ,
  - $\delta_{CH_2}$  drgania kołyszące grup metylenowych ok. 720  $cm^{-1}$ .
- B. Zmiany stopnia hydratacji części polarnych na podstawie analizy pasm:
- $\nu_{C=O}$  drgania rozciągające grup karbonylowych  $CH_2-COOR$  ok. 1750-1720  $cm^{-1}$ ,
  - $as\nu_{PO_2^-}$  asymetryczne drgania grup fosforanowych  $PO_2^-$  ok. 1260-1200  $cm^{-1}$ ,
  - $s\nu_{PO_2^-}$  symetryczne drgania grup fosforanowych  $PO_2^-$  ok. 1100-1050  $cm^{-1}$ .
- C. Przejście fazowe związane ze zmianą struktury krystalicznej i/lub pseudokrystalicznej lipidów – przejścia te wyznaczane są poprzez obecność specyficznych markerów, np. dla niektórych fosfatydylocholin podczas przejścia  $L_C \rightarrow L_\beta$  mocnemu przesunięciu ulega pasmo drgań nożycowych  $\gamma_{CH_2}$  (z 1473  $cm^{-1}$  na 1468  $cm^{-1}$ ), zanika słabe drganie rozciągające od grup karbonylowych, a dla pozostałych drgań grup łańcucha węglowodorowego nie zmienia się położenie maksimum, pasma są ostre, co sugeruje, że nie doszło do topnienia łańcuchów.

## 4.6 Badania strukturalne lipopleksów

---

Do badań strukturalnych lipopleksów możliwe jest wykorzystanie techniki małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego lub neutronów, dostarczającego zarówno informacji o wielkości jak i strukturze fazowej lipopleksów, oraz mikroskopii sił atomowych, która oprócz wiedzy o morfologii kompleksów może również dostarczyć informacji o ich właściwościach mechanicznych.

### 4.6.1 Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego

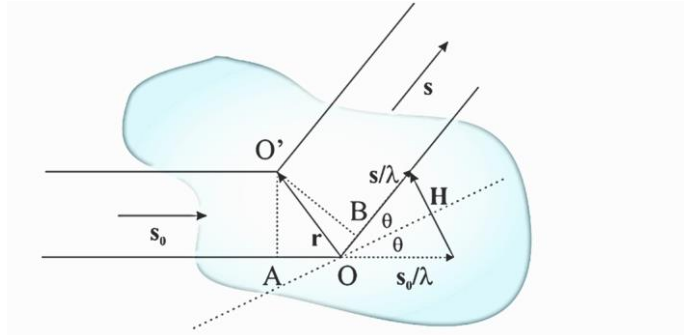
Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *small angle X-ray scattering*, SAXS) to metoda analizy rozproszonego promieniowania rentgenowskiego pod bardzo małym kątem (typowy zakres kąta  $2\theta$  to od  $0,1^\circ$  do  $2^\circ$ ) na strukturach rzędu nanometrów, dostarczająca informacji na temat rozmiaru, kształtu, stopnia polidispersyjności, orientacji cząsteczek, porowatości czy też krystaliczności badanego materiału. W przeciwieństwie do metod dyfrakcyjnych, metoda SAXS dostarcza informacji o niskiej rozdzielczości, ale umożliwia badanie układów o niskim uporządkowaniu, które charakteryzuje wiele układów w materii miękkiej.

Podstawą wszelakich technik eksperymentalnych związanych z użyciem promieniowania rentgenowskiego jest sposób, w jaki promieniowanie oddziałuje z materią. W przypadku techniki SAXS bada się promieniowanie rozproszone przez elektrony znajdujące się w atomach badanego przez nas materiału. Modelem rozpraszania promieniowania rentgenowskiego na naładowanej cząstce jest klasyczny model opracowany przez J.J.Thomsona. Ze względu na bardzo dużą częstotliwość promieniowania rentgenowskiego można elektrony związane w atomie traktować jak elektrony swobodne. Fala elektromagnetyczna działa na naładowaną cząstkę przyspieszając ją poprzez działanie pola elektrycznego fali padającej. Przyśpieszona cząstka naładowana jest źródłem fali rozproszonej o tej samej częstotliwości jak fala padająca, ale jest przesunięta w fazie o  $180^\circ$ . Dla światła niespolaryzowanego intensywność promieniowania rozproszonego przez elektron pod kątem  $2\theta$  dana jest wzorem:

$$I_e = I_o \left( \frac{e^2}{4\pi mc^2} \right)^2 (1 - \cos^2 2\theta) \quad (39)$$

gdzie  $e$  – ładunek elektronu,  $m$  – masa elektronu,  $c$  – prędkość światła w próżni,  $I_o$  – intensywność wiązki padającej.

Z powyższego wzoru wynika, że intensywność promieniowania jest odwrotnie proporcjonalna do kwadratu masy cząstki rozpraszającej. W związku z tym, że proton jest cięższy od elektronu ponad 1836 razy wkład do intensywności rozpraszania przez protony jest zanedbywalnie mały w większości przypadków.



Rysunek 23. Rozpraszanie przez dwa centra znajdujące się w obiekcie rozpraszającym:  
 $\vec{r}$  – wektor łączący dwa punkty O i O'. Różnica dróg przebytych przez promienie rozproszone wynosi:  $AO + BO = -\vec{r} \cdot \vec{s}_0 + \vec{r} \cdot \vec{s}$

Oczywiście poza najprostszym atomem wodoru atomy pierwiastków mają więcej niż jeden elektron. Fale rozproszone przez elektrony danego atomu ulegają interferencji. Można więc zapisać wzór amplitudy fali rozproszonej na atomie jako sumę fal rozproszonych przez poszczególne elektrony ( $N$  elektronów) znajdujące się w położeniu  $\vec{r}_j$ :

$$f(\vec{s}) = \sum_{j=1}^N A e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{s} - \vec{s}_0) \cdot \vec{r}_j} \quad (40)$$

gdzie:  $A$  – jest amplitudą rozpraszania przez elektron,  $\lambda$  – długość fali promieniowania,  $\vec{s}$  – wektor falowy fali rozproszonej,  $\vec{s}_0$  – wektor falowy fali padającej.

Jako że według mechaniki kwantowej nie można podać dokładnego położenia elektronów w atomie, a jedynie funkcję opisującą prawdopodobieństwo położenia elektronu, amplitudę rozpraszania można zapisać przyjmując ciągłą gęstość elektronową  $\rho(\vec{r})$  a sumę w powyższym wzorze zamienić na całkę po objętości atomu  $V$ . W ten sposób można otrzymać wzór na atomowy czynnik rozpraszania  $f_a$ , który przyjmuje następujący wzór:

$$f_a(\vec{q}) = f_e \int_V \rho(r) e^{i\vec{q}\vec{r}} dV \quad (41)$$

gdzie:  $\vec{q}$  – jest wektorem równym  $\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}_0$ ,  $|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$ ,  $f_e$  – amplituda rozpraszania przez elektron,  $V$  – objętość całkowania. Widać, więc że amplituda rozpraszania przez atom (a w ogólności ciągły rozkład centrów rozpraszania) jest transformatą Fouriera gęstości elektronowej.

Dla zbioru  $N$  atomów amplituda rozpraszania dana jest więc w ogólności wzorem:

$$F(\vec{q}) = \sum_{j=1}^N f_j e^{i\vec{q}\vec{r}_j} \quad (42)$$

W ogólności prawie zawsze mamy przypadek, gdy badamy więcej niż jedną cząsteczkę. Możemy zatem zapisać wzór na intensywność rozpraszania  $I(\vec{q})$  zbioru  $N$  cząsteczek w postaci wzoru:

$$I(\vec{q}) = N |F(\vec{q})|^2 \quad (43)$$

gdzie  $F(\vec{q})$  jest amplitudą rozpraszania przez pojedynczą cząsteczkę daną wzorem:

$$F(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} dV \quad (44)$$

gdzie  $\vec{r}$  – jest wektorem położenia, a  $\rho(\vec{r})$  jest gęstością elektronową w punkcie  $\vec{r}$ . Jeżeli nasze  $N$  cząsteczek zawieszonych jest w medium (np. roztworze), a przeważnie właśnie taki mamy przypadek, to wzór na  $F(\vec{q})$  należy zmodyfikować zamieniając wartość  $\rho(\vec{r})$  – tzw. kontrastem  $\Delta\rho(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) - \rho_m$ , gdzie  $\rho_m$  jest uśrednioną gęstością elektronową medium. Dla izotropowego ułożenia cząsteczek w medium, można zmodyfikowany wzór na  $F(\vec{q})$  przedstawić w postaci jednowymiarowej funkcji  $F(q)$ :

$$F(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} \Delta\rho(r) \frac{\sin qr}{qr} r^2 dr \quad (45)$$

gdzie:  $D_{max}$  jest maksymalnym rozmiarem cząsteczki. Okazują się, że wartość  $|F(q)|^2$  można zapisać w postaci:

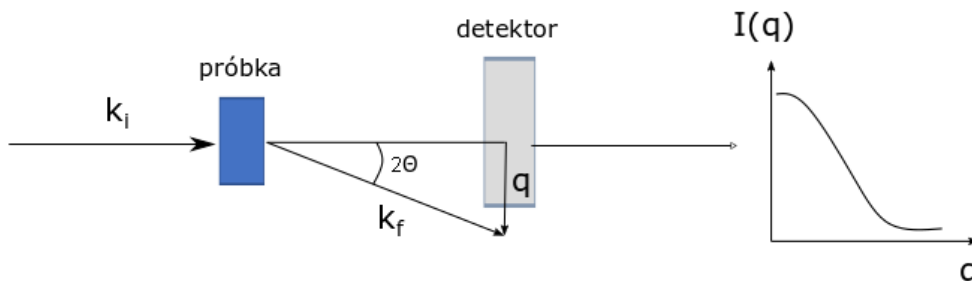
$$|F(q)|^2 = V^2 \Delta\rho^2 P(q) \quad (46)$$

gdzie:  $V$  – jest objętością cząsteczki,  $\Delta\rho$  jest uśrednioną gęstością elektronową cząsteczki, a funkcja  $P(q)$  jest funkcją nazywaną czynnikiem kształtu (ang. *form factor*) i jest zależna od kształtu cząsteczki. Dla kilku kształtów cząsteczek np. kuli, dysku czy walca, udało się znaleźć postać analityczną czynnika kształtu.

Na rysunku 24 przedstawiono schemat eksperymentu SAXS. Fotony wiązki promieniowania rentgenowskiego o wektorze falowym  $k_i$  docierają do próbki. Na skutek silnego uderzenia, powodują wytrącenie elektronów z położenia równowagi, przez co stają się one źródłem fal sferycznych o energii i długości fali jak wiązka padająca (rozpraszanie elastyczne Rayleigh'a), ale rozchodzącej się pod innym kątem - o wektorze falowym  $k_f$ . Różnica między wektorem falowym wiązki padającej i rozproszonej to wektor rozpraszania  $q$ , a kąt między wektorami falowymi wiązki padającej i rozproszonej to kąt rozpraszania  $2\theta$ . Wektor rozpraszania  $q$  można zdefiniować jako zależność:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (47)$$

gdzie  $\lambda$  – długość fali padającej.



Rysunek 24. Idea eksperymentu i pomiaru SAXS dla układu rozpraszającego izotropowo.

Intensywność rozpraszania cząsteczek w roztworze  $I(q)$  może być zdefiniowana jako iloczyn czynnika kształtu  $P(q)$  oraz czynnika struktury (ang. *structure factor*)  $S(q)$ :

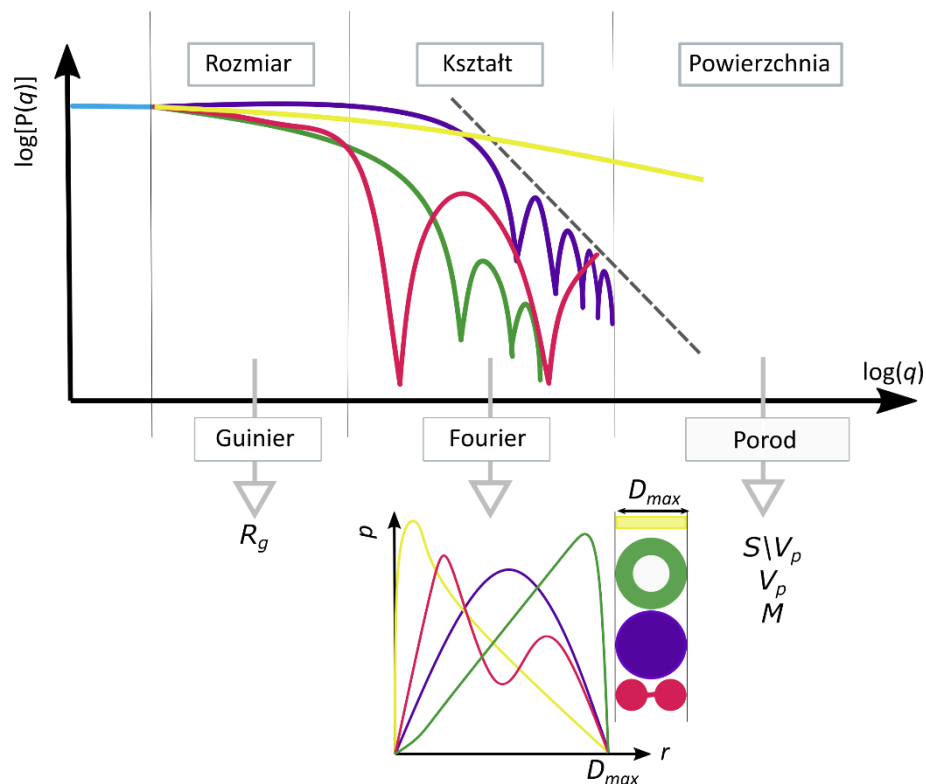
$$I(q) = P(q) \cdot S(q) \quad (48)$$

Czynnik kształtu opisuje oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe, dostarczając informacji o rozmiarze i kształcie cząsteczek. Czynnikiem struktury opisuje oddziaływania międzycząsteczkowe, gdzie fale rozpraszane przez pojedyncze cząsteczki oddziałują ze sobą. Skrajnym przypadkiem takiego układu jest kryształ a funkcja  $S(q)$  jest transformatą Fouriera sieci krystalicznej. Dla idealnych roztworów monodispersyjnych  $S(q) = 1$  – oznacza to, że nie występują oddziaływania międzycząsteczkowe.

Teoretyczną intensywność rozpraszania pojedynczej cząsteczki można również zapisać jako funkcję czynnika kształtu  $P(q)$ , kontrastu elektronowego  $\Delta\rho$ , który jest różnicą między gęstością elektronową cząsteczki  $\rho_p$  a tłem  $\rho_o$  oraz objętości cząsteczki  $V_p$  [210]:

$$I_p(q) = (\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q) \quad (49)$$

Analizując zależność czynnika kształtu od wektora rozpraszania można wyznaczyć pewne obszary na krzywej  $P(q)$ , opowiadające za dostarczenie konkretnych informacji o strukturze (rozmiar, kształt, powierzchnia) badanych obiektów (rysunek 25) [211].



Rysunek 25. Zależność czynnika kształtu od wektora rozpraszania z zaznaczeniem obszarów stosowanych do analizy rozmiaru, kształtu i powierzchni badanych obiektów (u góry) oraz wykres funkcji wewnętrznego rozkładu odległości międzycząsteczkowych  $p(r)$  dla przykładowych struktur (u dołu). Rysunek przygotowany na podstawie [210,212].

Obszar  $P(q)$  przy niskich wartościach  $q$ , dzięki przybliżeniu Guinier'a dostarcza informacji o rozmiarze cząsteczki, gdzie tzw. promień żyracji  $R_g$  określa rozkład atomów cząsteczki wokół środka jej masy. Dla cząsteczek kulistych (w roztworze rozcieńczonym i izotropowym) można zapisać  $R_g$  jako zależność (50), gdzie  $I_0$  to intensywność rozpraszania ekstrapolowana dla kąta zero [213].

$$I = I_0 e^{-R_g^2 q^2 / 3} \quad (50)$$

Poddając zależność  $P(q)$  dla układów monodispersyjnych transformacie Fouriera otrzymuje się tzw. wewnętrzny rozkład odległości międzycząsteczkowych  $p(r)$  (ang. *pair distance distribution function*, PDDF), który dostarcza informacji o kształcie cząsteczek:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty r q P(q) \sin(qr) dq \quad (51)$$

Gdy wartość funkcji  $p(r)$  przyjmuje wartość zero, możliwe jest znalezienie maksymalnej odległości (maksymalnego rozmiaru cząsteczek -  $D_{max}$ ), która w przypadku cząsteczek sferycznych określa ich średnicę, w przypadku cząsteczek cylindrycznych - wysokość [212]. Kształt funkcji  $p(r)$  jest charakterystyczny dla danego kształtu. Kształt funkcji  $p(r)$  dla wybranych cząsteczek modelowych przedstawione są na rysunku 25. Wewnętrzny rozkład odległości międzycząsteczkowych  $p(r)$  może zostać również wykorzystany do wyznaczenia promienia żyracji cząsteczek zgodnie ze wzorem (52), jest to tzw. drugi moment funkcji  $p(r)$  [213]:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty p(r) r^2 dr}{2 \int_0^\infty p(r) r dr} \quad (52)$$

Zgodnie z prawem Porod'a w trzecim rozważanym obszarze funkcji  $P(q)$  przy wysokich wartościach  $q$  - zanik intensywności jest proporcjonalny do  $q^{-4}$  (dla kulistych cząstek) [212]. Obszar Porod'a dostarcza informacji o powierzchni cząsteczek, które są dość ściśle zbite, ale o jednolitej gęstości. W przypadku materiałów porowatych szczególnie istotny jest stosunek powierzchni do objętości tzw. powierzchnia właściwa określaną wzorem (53), gdzie  $Q$  to stała Porod'a (ang. *Porod invariant*). Obszar ten dostarcza również informacji o objętości cząsteczki  $V_p$  rozpraszającej (inaczej zwanej objętość Porod'a) (54) czy masie cząsteczkowej [214].

$$\frac{S}{V_p} = \frac{\pi \left( \lim_{q \rightarrow \infty} I(q) q^4 \right)}{\int_0^\infty q^2 I(q) dq} = \frac{\pi \left( \lim_{q \rightarrow \infty} I(q) q^4 \right)}{Q} \quad (53)$$

$$V_p = \frac{2\pi^2 I(0)}{Q} \quad (54)$$

### Badania SAXS układów lipidów i układów lipidopodobnych

Charakterystyczną cechą układów lipidowych i lipidopodobnych jest występowanie faz strukturalnych będących następstwem procesu samoorganizacji. Dokładny opis faz strukturalnych znajduje się w rozdziale X. Charakterystyczną cechą tych układów jest występowanie dalekozasięgowego porządku sięgającego nawet kilku mikrometrów. Uporządkowanie to może być jednowymiarowe np. faza lamelarna, dwuwymiarowe np. cylindryczna faza heksagonalna czy trójwymiarowe np. faza regularna. Również charakterystyczne uprządkowanie np. odległości pomiędzy dwuwarstwami w fazie



lamelarnej są rzędu kilku nanometrów a to jest właśnie zakres typowo próbkowany w eksperymencie SAXS.

Krzywa rozpraszania  $I(q)$  może więc posiadać również wyraźne maksima, tzw. piki Bragg'a, które występują, gdy badane cząsteczki tworzą wysoce uporządkowane struktury. Prawo Bragg'a wyprowadzone dla struktur krystalicznych określa wzajemną relację między położeniem maksimum  $q_{max}$  a odległościami międzypłaszczyznowymi cząsteczek  $d_{Bragg}$  [211]:

$$d_{Bragg} = \frac{2\pi}{q_{max}} [\text{nm}] \quad (55)$$

Fosfolipidy ze względu na zróżnicowaną gęstość elektronową (wysoką w obszarze głów, średnią – łańcuchów hydrofobowych i niską – w centrum dwuwarstwy), są dobrym materiałem do badań SAXS. Układy surfaktant/lipid/DNA mogą występować w fazie lamelarnej, regularnej, heksagonalnej, itp. [156]. Pozycje pików Bragg'a obserwowane dla fazy lamelarnej występują względem siebie w stosunku: 1:2:3:4:..., heksagonalnej:  $\sqrt{3}:2:\sqrt{6}:3:\sqrt{12}:...$  lub regularnej np. 1a3d:  $\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{14}:4:...$ , itd. [215]. Metoda SAXS pozwala więc na identyfikację i dania strukturalne faz występujących w układach lipidowych. Bardzo często układy lipidopodobne mogą tworzyć struktury typu miceli, pęcherzyki czy bicele. Ze względu na ich wielkość rzędu kilkunastu nanometrów można je badać za pomocą metody SAXS. Porównując kształt krzywej rozpraszania  $I(q)$  czy krzywej odległości międzycząsteczkowych  $p(r)$  jesteśmy w stanie dostarczyć informacji na temat kształtu struktur, ale również określić ich promień żyracji  $R_g$  czy maksymalny rozmiar  $D_{max}$ .

#### 4.6.2 Mikroskopia sił atomowych

Mikroskop sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscope*, AFM) to rodzaj mikroskopu z sondą skanującą (ang. *Scanning Probe Microscopy*, SPM), wykorzystujący zmiany wychylenia elastycznej mikrobekki z igłą skanującą (ostrzem), na skutek oddziaływań (elektrostatycznych, magnetycznych, kapilarnych, sił van der Waalsa, tarcia, adhezji. itp.) między ostrzem a próbką. Pomiar wychyleń sondy stanowią informację, na bazie której trójwymiarowy obraz powierzchni badanej próbki jest budowany. W ten sposób bada się topografię próbki (informacja o wysokości obiektów), ale mikroskopię AFM można stosować także do badań właściwości: elastycznych, elektrostatycznych, magnetycznych czy termicznych [216].

Charakter oddziaływań próbka-ostrze opisuje potencjał Lennarda-Jonesa. Jeżeli chmury elektronowe atomów ostrza i próbki pozostają w bliskiej odległości, ale nie nakładają się na siebie – między sondą a próbką występują siły przyciągające, uginające w efekcie mikrobekkę. Jeżeli w wyniku kontaktu dojdzie do nałożenia się orbitali atomowych – ostrze zostaje odepchnięte od próbki, również powodując ugięcie mikrobekki, ale w przeciwnym kierunku.

Tym samym system AFM może pracować w trybach:

- kontaktu – ostrze pozostaje w kontakcie z powierzchnią próbki, w obszarze sił odpychających. Dzięki zastosowaniu pętli sprzężenia zwrotnego utrzymane jest ugięcie sondy przy ustalonej sile nacisku i odpowiedź sprzężenia zwrotnego wykorzystywana jest do wygenerowania obrazu topograficznego.
- bezkontaktowy – sonda wprawiona w oscylacje o niewielkiej amplitudzie przemieszcza się w niewielkiej odległości nad próbką (pojedyncze Angstremy)

w obszarze sił przyciągających, topografia rejestrowana jest na bazie modulacji amplitudy oscylacji częstotliwości.

- tryb przerywanego kontaktu (ang. *tapping mode*, TM), znany też jako tryb AC (ang. *Air Contact Mode*). Sonda oscyluje w pobliżu swojej podstawowej częstotliwości rezonansowej tak że końcówka ostrza będzie w kontakcie z powierzchnią próbki przy maksymalnej, ujemnej amplitudzie drgań. Pętla sprzężenia zwrotnego będzie utrzymywać stałą amplitudę oscylacji mikrobilki, a zatem stałą siłę oddziaływania. Metoda ta jest odpowiednia do badania miękkich i delikatnych struktur, ponieważ nie uszkadza ich powierzchni, przez co minimalizuje możliwość zabrudzenia ostrza badanym materiałem, a przy tym pozwala na badanie materiałów biologicznych w warunkach wysokiej wilgotności [217].
- tryb QI (ang. *quantitative imaging*), opracowany przez firmę JPK (obecnie Bruker), który stanowi alternatywę dla trybów pracy standardowych mikroskopów AFM. W trybie, poza informacją o wysokości obiektów, zbierane są informacje o sile tarcia, adhezji, elastyczności w każdym punkcie próbki (tworzy się mapa krzywych siłowych), bez wprowadzania poprzecznych sił, które mogłyby uszkodzić badaną powierzchnię. Dzięki temu w jednym czasie zbierane są informacje o właściwościach mechanicznych badanej próbki jednocześnie otrzymując obraz topograficzny próbki. Tryb ten nadaje się do badania zarówno próbek kruchych, luźnych, miękkich, lepkich czy stromych, przez co staje się uniwersalnym narzędziem zapewniającym dostarczenie w krótkim czasie danych z wysoką rozdzielczością.

Mikroskopia AFM znalazła szerokie zastosowanie w badaniach układów biologicznych, takich jak badanie adhezji patogenów do komórek, mikrostruktury komórek nowotworowych i komórek macierzystych, diagnostyki i leczenia chorób, procesów starzenia komórek, oddziaływań kwasów nukleinowych z różnymi strukturami biologicznymi oraz szeroko pojętej analizy komórek i tkanek. Ciągły rozwój technik SPM umożliwił pomiary wewnątrzkomórkowe tzw. technika *unroofing*, polegającą na badaniu wnętrza komórki dzięki rozerwaniu błony komórkowej [218]. Badania membran lipidowych często dotyczą rozkładu domen lipidowych [219], własności mechanicznych jak lepkość [220], lub badania procesów wbudowywania się białek błonowych w struktury dwuwarstw oraz pełnionych przez nich funkcji [221].

## 5 Materiały i metody eksperymentalne

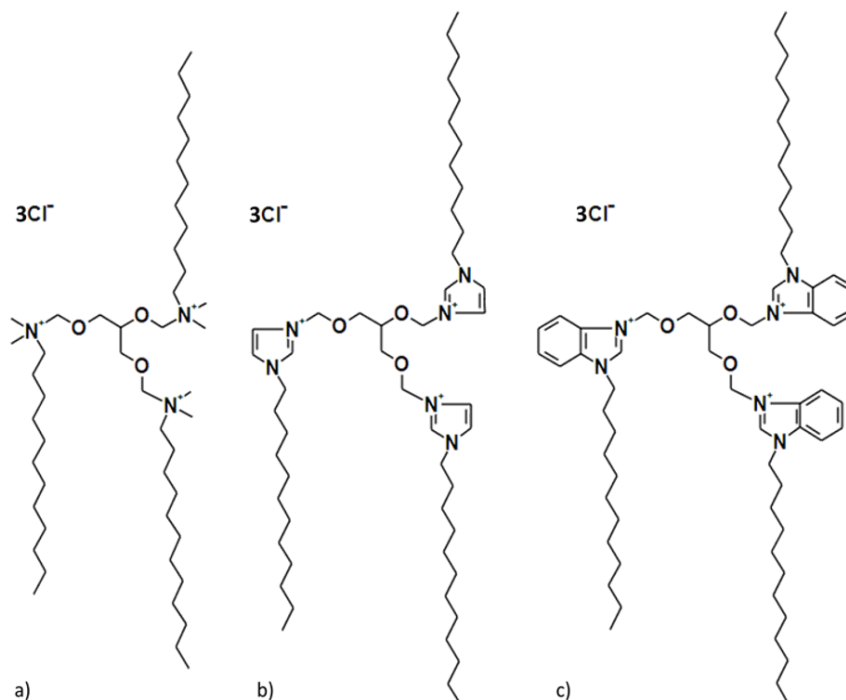
Badane w pracy lipopleksy jako wieloskładnikowe niewirusowe układy do wiązania i transfekcji kwasów nukleinowych, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie do wprowadzania materiału genetycznego do żywych komórek, zostały zgłoszone do Urzędu Patentowego RP i zarejestrowane pod numerem PL241612, którego to zgłoszenia jestem współautorem.

### 5.1 Badane związki

#### Surfaktanty trimeryczne

Surfaktanty trimeryczne będące przedmiotem badań, zostały otrzymane i udostępnione dzięki uprzejmości dr hab. Andrzeja Skrzypczaka z Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Do badań wybrane zostały trimeryczne kationowe surfaktanty różniące się budową części polarnej. Wyższy stopień oligomeryzacji pozwala sądzić, że surfaktanty te stanowiąc będą wydajne nośniki dla terapii genowej. Na rysunku 26 zestawiono wzory strukturalne badanych surfaktantów trimerycznych wraz z ich pełnymi nazwami i skróconymi oznaczeniami przyjętymi w pracy.

Surfaktanty zostały otrzymane w reakcji czwartorzędowania N,N-dimetylododecyloaminy lub 1-dodecyloimidazolu lub 1-dodecylobenzimidazolu z 1,2,3-trichlorometoksypropanem zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Juliusza Pernaka [222]. Surfaktant te zostały zgłoszone do Urzędu Patentowego RP i zarejestrowane pod numerem PL202540.



Rysunek 26. Wzory strukturalne badanych surfaktantów trimerycznych:  
a) trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloamoniowy) – TRI\_N,  
b) trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloimidazoliowy) – TRI\_IMI,  
c) trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecylobenzimidazoliowy) – TRI\_BEN.

W przypadku badanych surfaktantów trimerycznych do czynienia mamy z częścią polarną opartą na azocie o stopniu hybrydyzacji  $sp^3$  (klasyczne czwartorzędowe sole amoniowe) – surfaktant oznaczony jako TRI\_N, oraz z atomów azotu wbudowanych w aromatyczne struktury heterocykliczne - imidazoliowe (TRI\_IMI) i benzimidazoliowe (TRI\_BEN).

Zróżnicowanie związków tworzących części polarne surfaktantów związane jest z ich właściwościami i potencjalnym wpływem na proces kompleksowania DNA. Różna budowa części hydrofilowej, pozwala kontrolować płynność utworzonych struktur/kompleksów, tak jak ma to miejsce w przypadku cholesterolu, występującego w naturalnych błonach komórkowych [223]. Pod względem biologicznym związki te (tj. czwartorzędowe sole amoniowe, imidazoliowe, benzimidazoliowe o odpowiedniej długości łańcucha alkilowego) charakteryzują się silnymi właściwościami antybakteryjnymi i przeciwgrzybiczymi [224 – 226].

Aby zwiększyć biokompatybilność surfaktantów, długość łańcucha bocznego surfaktantów jest zbliżona do długości łańcuchów bocznych lipidów naturalnie budujących błony biologiczne - łańcuchy alkilowe badanych surfaktantów trimerycznych składały się z 12 atomów węgla [227, 228].

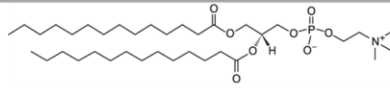
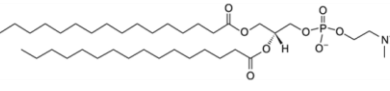
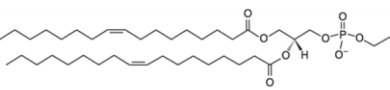
Badane surfaktanty mają ten sam rodzaj łącznika, w którego skład wchodzi grupa oksymetylenowe, nadające mu hydrofilowy charakter.

Należy wspomnieć, że surfaktanty trimeryczne tj. TRI\_N i TRI\_IMI zostały już wcześniej wykorzystane do badań jako nośniki materiału genetycznego w Zakładzie Fizyki Biomedycznej UAM. Dr Andrzejewska w swojej pracy skupiła się nad badaniami układów binarnych (bez fosfolipidów) na bazie dwóch powyższych surfaktantów i tylko krótkich fragmentów (21 pz) DNA lub RNA [229]. Przyniesione badania wskazują na możliwe zastosowanie surfaktantów jako niewirusowych nośników. Wstępne badania dr Andrzejewskiej nie odpowiadają na wiele pytań chociażby, czy surfaktanty te równie efektywnie będą kompleksowały cząsteczki kwasów nukleinowych o większej długości lub jaki wpływ mogą wywierać na błonę lipidową. Co więcej prezentowane przeze mnie wyniki uwzględniają również surfaktant TRI\_BEN - rozszerzenie grupy badanych surfaktantów, pozwala lepiej dostrzec tendencję, jaką na kompleksowanie ma wpływ rodzaj części polarnej zastosowanego surfaktantu. Ostatnią kluczową różnicą w stosunku do wspomnianych badań, jest obecność fosfolipidów w rozpatrywanych przeze mnie układach, ich obecność w układzie niebywale polepsza właściwości takich nośników.

## **Fosfolipidy**

Drugim składnikiem badanych lipopleksów były wybrane fosfolipidy, naturalnie budujące błony komórkowe. Ich wzory, pełne nazwy oraz temperatury przejść fazowych zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie badanych lipidów [230].

Oznaczenie	Nazwa i wzór strukturalny	Masa cząsteczkowa	Temperatura przejścia
DMPC	 1,2-dimyrystylo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina	677,933 g/mol	$T_m = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$
DPPC	 1,2-dipalmitoilo- sn-glicero-3-fosfatydylocholina	734,039 g/mol	$T_m = 41\text{ }^{\circ}\text{C}$
DOPE	 (1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfatydyloetanoloamina	744,034 g/mol	$T_m = -16\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T_h = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$

DMPC oraz DPPC są pochodnymi fosfatydylocholiny, czyli w części polarnej zawierają resztę kwasu ortofosforowego (kwasu fosforowego (V) oraz cząsteczkę choliny, a DOPE jest pochodną fosfatydyloetanoloaminy – hydrofilowa głowa składa się z reszty kwasu ortofosforowego oraz cząsteczki etanoloaminy. DMPC oraz DPPC to fosfolipidy zawierające nasycone reszty kwasów tłuszczowych w części niepolarniej, o długości odpowiednio 14 i 16 atomów węgla. DOPE z kolei składa się z dwóch nienasyconych łańcuchów bocznych o długości 18 atomów węgla (wiązanie podwójne między C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>).

Zastosowane mieszaniny lipidów w badanych układach miały następujący skład:

- 10% DMPC (w pracy oznaczono jako L1)
- 9% DMPC + 1% DOPE (L2)
- 4,5% DMPC + 4,5% DPPC + 1% DOPE (L3)

Według doniesień literaturowych dodatek lipidów znacząco wpływa na tworzenie kompleksów DNA, obecność lipidów nienasyconych może wpływać na płynność powstałej błony, a tym samym przekładać się na efektywność kompleksowania i transfekcji, co więcej różnorodność lipidów w wektorach zwiększa biokompatybilność, tym samym zwiększając wydajność transfekcji materiału genetycznego do komórek.

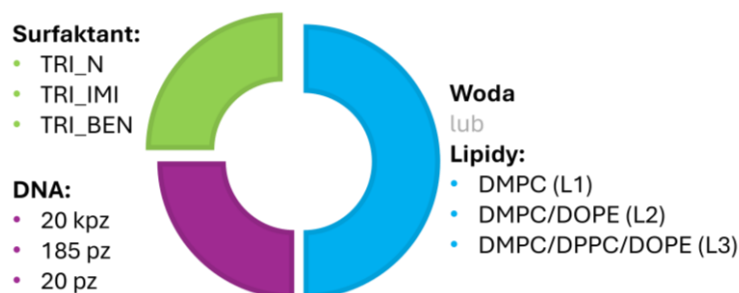
Lipidy zostały zakupione z firmy Avanti Polar Lipids (USA). Ze względu na wysoką czystość (powyżej 99%), nie zastosowano dodatkowych procedur oczyszczania.

### Kwasy nukleinowe

Do badań procesu kompleksowania zastosowano kwasy nukleinowe o różnej liczbie par zasad: 20 kpz (Sigma Aldrich, USA), 185 pz (Sigma Aldrich, USA) oraz 21 pz (Future Synthesis, Polska).

## 5.2 Preparatyka próbek

Układy do badań składały się z DNA o określonej długości (20 kpz, 185 pz, 21 pz), surfaktantu (TRI\_N, TRI\_IMI, TRI\_BEN) o stężeniu odpowiednim do uzyskania zakładanego stosunku  $p/n$  oraz wody (H<sub>2</sub>O lub D<sub>2</sub>O) lub mieszaniny lipidów (L1, L2, L3), przygotowanych w stosunku objętościowym 1:1:2. Schemat składu próbek przedstawiono na rysunku 27.



Rysunek 27. Schemat składu badanych próbek.

### 5.2.1 Przygotowanie roztworów wyjściowych

Roztwory surfaktantów przygotowano tak, aby stężenie wyjściowe wynosiło 21,4 mM. Roztwory poddano homogenizacji ultradźwiękami w 50°C do czasu ich całkowitego rozpuszczenia (ok. 30 minut). Następnie sporządzono ciąg rozcieńczeń (10-minutowa homogenizacja ultradźwiękowa w 50°C), aby osiągnąć określone wartości  $p/n$ , zgodnie z zależnością:

$$\frac{p}{n} = \frac{3 \cdot C_{surf}}{k \cdot C_{DNA}} \quad (56)$$

gdzie  $C_{surf}$  – stężenie molowe surfaktanty,  $C_{DNA}$  – stężenie molowe DNA,  $k$  – liczba ładunków ujemnych przypadająca na cząsteczkę DNA (np. dla DNA o długości 185 pz,  $k = 370$ ), 3 – liczba ładunków dodatnich na cząsteczkę surfaktantu.

Roztwory surfaktantów przygotowano dla wartości  $p/n$ : 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, co w próbce odpowiadało stężeniu: 5,35 mM dla  $p/n = 20$ , 0,13 mM dla  $p/n = 0,5$ .

Roztwory wodne lipidów o stężeniu ok. 300 mM poddano 10-krotnym cykлом naprzemiennej homogenizacji ultradźwiękami w 50°C przez 30 minut i mrożenia w -20°C przez 15 minut. Homogenizacja w temperaturze wyższej niż temperatura głównego przejścia fazowego badanych fosfolipidów, miała na celu skuteczniejsze rozbitcie struktur formowanych przez fosfolipidy do pojedynczych jednostek lub możliwie jak najmniejszych struktur.

W kolejnym kroku sporządzono wodne roztwory surfaktantów oraz mieszaniny surfaktant/lipidy, które ponownie homogenizowano ultradźwiękowo przez 10 minut w 25°C.

Roztwór roboczy DNA sporządzono w 20 mM buforze fosforanowym o pH 6,8, a stężenia wyjściowe dla DNA o wielkości 21pz wynosiło 76 μM, dla 185pz – 8,6 μM, a dla 20kpz – 0,08 μM.

Do większości badań zastosowano roztwory na bazie wody deuterowanej, natomiast w przypadku badań FTIR również na bazie zwykłej wody H<sub>2</sub>O, tak aby uwidocznić kluczowych pasma drgań grup funkcyjnych fosfolipidów, które mogły być zakryte drganiami od D<sub>2</sub>O.

### **5.2.2 Przygotowanie kompleksów DNA**

Do przygotowanych wcześniej roztworów surfaktantów i mieszanin surfaktant/lipidy dodano roztwór DNA o określonej liczbie par zasad i podano inkubacji przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

## 5.3 Aparatura pomiarowa

---

### Spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera FTIR

Widma podczerwieni zarejestrowano za pomocą spektrometru Tensor 27 (Bruker Optics, USA), w którym źródłem promieniowania podczerwonego jest globar (pręt z węgla krzemu). Do pomiarów wykorzystano przystawkę ATR Platinum – jednodobiciową z diamentowym okienkiem, na które nakładano 10  $\mu\text{l}$  próbki. Do kontroli temperatury zastosowano kontroler temperatury Haake DC-30 w zakresie temperatur od 2 – 50°C z krokiem pomiarowym 2°C. Próbki inkubowano przez 2 minuty przed pomiarem w danej temperaturze. Widma rejestrowano w zakresie 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$  z rozdzielczością 4  $\text{cm}^{-1}$ . Każde widmo stanowi transformatę Fouriera z 256 zarejestrowanych interferogramów. Do analizy widm FTIR wykorzystano programy Opus 7.5 (Bruker Optics, USA) - korekta linii bazowej; oraz PeakFit v 4.12 (Systat Software, USA) – wyznaczenie położenia pasm absorpcyjnych na podstawie drugiej pochodnej).

### Spektroskopia UV-Vis

Widma UV-Vis w zakresie 220 - 360 nm zarejestrowano przy użyciu spektrofotometru V-650 (JASCO, Japonia). Pomiary przeprowadzono z prędkością skanowania 100 nm/min i szerokością szczeliny 1 nm. Zastosowano kwarcową kuwetę o drodze optycznej 1 cm. Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . BZA (Sigma Aldrich, Niemcy) rozpuszczono w dioksanie w stężeniu 5 mg/ml (co odpowiada stężeniu BZA równym 30,8 mM), a następnie roztwór BZA rozcieńczono w wodzie do stężenia 140  $\mu\text{M}$ . Roztwór BZA i roztwór surfaktantu o danym stężeniu mieszano w stosunku 1:1. Ostateczne stężenie w próbce BZA wynosiło 70  $\mu\text{M}$ , a dioksanu ok. 1%.

### Spektroskopia fluorescencyjna

Widma fluorescencji rejestrowano przy użyciu spektrofluorymetru FP-6300 (ABL&E-JASCO, Japonia). Dobrano następujące parametry pomiaru: prędkość skanowania 200 nm/min, szerokość szczeliny 2,5 nm, długość fali wzbudzenia 320 nm, zakres pomiaru emisji 340 – 450 nm. Zastosowano kwarcowe kuwety jednocentymetrowe. Pomiary przeprowadzono w temperaturze  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Piren (Sigma Aldrich, Niemcy) i kumarynę 153 (Sigma Aldrich, Niemcy) rozpuszczono w etanolu, a następnie rozcieńczono wodą do stężenia roboczego. Stężenie pirenu w próbce wynosiło 10  $\mu\text{M}$ , a stężenie kumaryny w próbach 50  $\mu\text{M}$  lub 25  $\mu\text{M}$ . Roztwory surfaktantów przygotowano odpowiednio stężone.

W celu wyznaczenia CMC badanych surfaktantów roztwór pirenu i surfaktantu mieszano w stosunku 1:1.

W przypadku pomiarów wygaszania fluorescencji w stanie ustalonym zastosowano następującą kolejność: do roztworu surfaktantu dodawano najpierw roztwór pirenu, a następnie roztwór kumaryny.

Ostateczne stężenie etanolu w próbkach było zaniedbywalnie małe (< 2%), dlatego zakłada się, że obecność etanolu nie wpływała na proces agregacji surfaktantów.



## **Konduktometria**

Pomiary przewodności elektrycznej roztworów surfaktantów przeprowadzono przy użyciu konduktometru CO 3100L (VWR International, USA). Urządzenie wyposażone jest w dwubiegunową sondę grafitową, pozwalającą na pomiary w zakresie przewodnictwa od 0,001  $\mu\text{S}/\text{cm}$  do 1000  $\text{mS}/\text{cm}$ . Do określonej objętości wody dodawano stężony roztwór wodny surfaktantu tak, aby pomiar przewodności był przeprowadzony dla stężeń z zakresu 0 – 5 mM. Pomiary były przeprowadzone w temperaturze pokojowej, tj.  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## **Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła**

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła oraz elektroforetycznego rozpraszania światła zostały przeprowadzone na analizatorze cząstek Litesizer™ 500 (Anton Paar, Austria). Aparat ten wyposażony jest w laser o długości fali 658 nm z diody laserowej o jednej częstotliwości i mocy 40 mW. Pomiary wykonywano w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Podczas pomiaru kąt rozpraszania ( $15^\circ$ ,  $90^\circ$  lub  $175^\circ$ ) był dopierany w zależności od specyfiki próbki, natomiast pomiary ELS wykonywano pod kątem  $15^\circ$ . Do rejestracji pomiarów zastosowano oprogramowanie Kalliope™ (Anton Paar, Austria).

Do pomiarów DLS zastosowano kuwety kwarcowe jednocentymetrowe. Do kontroli procesu agregacji surfaktantów wybrano bromek sodu o stężeniu 0,1 mM oraz 0,1 M. Próbkę przed pomiarem w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza były odwirowywane przez 10 minut w 10 000 rpm przy użyciu wirówki Centrifuge 5418 (Eppendorf, Niemcy). Próbkę o objętości 1 ml przed pomiarem były inkubowane przez 10 minut w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ .

Do pomiarów elektroforetycznego rozpraszania światła zastosowano kuwety Omega Z (Anton Paar, Austria) o objętości 350  $\mu\text{l}$ . Dodatkowo, aby ograniczyć efekty rozproszeniowe, układy były rozcieńczone 100-krotnie. Pomiary prowadzono w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ .

## **Testy elektroforetyczne**

W zależności od długości badanego DNA stosowano żel agarozowy o określonym stężeniu: dla wysokomolekularnego DNA o długości 20 kbp przygotowano 0,8% żel agarozowy, dla DNA 185 bp – 1,5%, natomiast dla niskomolekularnego DNA o długości 20 bp – 2% żel agarozowy. Zastosowano bufor TBE o pH 8, w skład którego wchodziło: 90 mM Tris-base, 90 mM kwas borowy, 2 mM kwas wersenowy EDTA. Przed nałożeniem na żel agarozowy (zawierający bromek etydyny o stężeniu 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) próbki zostały zawieszony w buforze obciążającym stanowiącym 1/5 objętości próby.

Buforu obciążający w objętości 10 ml sporządzono z: 6 ml glicerolu, 0,3 ml 1% błękitu bromofenolowego, 3 ml 1% Orange G, 0,6 ml 1M EDTA oraz 0,1 ml 1M Tris-HCl.

Do kieszonek żelu nakładano 15  $\mu\text{l}$  próbki. Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 120 V, a efekty rozdziału obserwowano w transiluminatorze UV wykorzystującym fale o długości 300nm.

## **Spektroskopia dichroizmu kołowego**

Widma elektronowego dichroizmu kołowego zostały zarejestrowane przy użyciu spektropolarymetru J-815 (Jasco, Japonia). Widma CD rejestrowano w zakresie 220-340 nm, z prędkością skanowania 100 nm/min, częstością próbkowania 1 nm oraz czasem integracji 2 s. Widma uśredniono z 5 przebiegów. Do pomiaru wykorzystano kwarcowe kuwety pomiarowe o długości drogi optycznej 0,5 mm, objętość wymagana do pomiaru to około 100  $\mu\text{l}$ . Pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej, tj.

25 ± 1°C. Jako tło zmierzono 5 mM bufor fosforanowy, którego widmo następnie odjęto od widm badanych układów. Wszystkie widma wygładzono funkcją Savitzky-Golay (9 punktów).

Do analizy i obróbki widm CD zastosowano oprogramowanie Spectra Manager II (Jasco, Japonia) oraz oprogramowanie Origin.

### **Testy cytotoksyczności**

Hodowlę komórek HeLa (raka szyjki macicy) prowadzono w butelkach z filtrem w inkubatorze CytoGROW™ GLP (Sanyo, USA) w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, do osiągnięcia konfluencji około 90%. Do weryfikacji konfluencji zastosowano mikroskop optyczny z kontrastem fazowym Axiovert 40 CFL (Zeiss, Niemcy). Do hodowli użyto standardową pożywkę Eagle'a zmodyfikowaną przez Dulbecco (DMEM) z 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 2 mM L-glutaminą, roztworem penicyliny i streptomycyny. Komórki wysiewano na płytkę wielodołkową i inkubowano ok. 16h do osiągnięcia 80% konfluencji.

Komórki HeLa w obecności czystej pożywki DMEM inkubowano z badanymi układami w proporcji 100:1 przez jedną godzinę. Zmiany morfologiczne w komórkach HeLa po inkubacji oceniano za pomocą mikroskopu Observer.Z1 (ZEISS, Niemcy).

Test MTT: Po godzinnej inkubacji do każdego dołka dodano 10 µl MTT (o stężeniu 5 mg/ml w PBS) i inkubowano przez 3 godziny. Po tym czasie rozpuszczono powstały formazan dodając do każdego dołka po 100 µl izopropanolu (z dodatkiem 0,04 M HCl). Pomiar absorbancji przy długości 570 nm wykonano przy użyciu czytnika płytek Tecan Infinite 200 pro (Tecan, Szwajcaria). Wykonano 6 powtórzeń.

Barwienie błękitem trypanu: po godzinnej inkubacji z badaną substancją, dodawano w stosunku 1:1 do objętości pożywki 0,4% błękit trypanu (PBS) i inkubowano przez 5 min. Efekt barwienia sprawdzano mikroskopem optycznym BIOLUX AL (Bresser, Niemcy).

### **Różnicowa kalorymetria skaningowa**

Pomiary kalorymetryczne przeprowadzono przy użyciu kalorymetru skaningowego DSC-204 Phoenix (Netzsch, Niemcy). Przed przystąpieniem do wykonania właściwych pomiarów, sprzęt został skalibrowany przy użyciu standardów (rtęć, ind, bizmut, cyna, cykloheksan, bifenył). Do pomiaru wymagane było zastosowanie aluminiowych tygielków o średnicy 6 mm, do których nakładano 20 µl próbki, a następnie zamykano je hermetycznie. Pomiary przeprowadzono w zakresie temperatur 0 - 40°C (układy na bazie L1) oraz 0 - 50°C (układy na bazie L2, L3). Wykonano dwa cykle temperaturowe składające się z: grzania z tempem 1°C/min, 10-minutowego okresu izotermicznego, chłodzenia 5°C/min oraz 10-minutowego okresu izotermicznego. Próbkę referencyjną stanowiła pusta kapsułka. Pomiary przeprowadzono w atmosferze helu o przepływie 40 ml/min. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie PROTEUS TA (Netzsch, Niemcy) oraz PeakFit v 4.12 (Systat Software, USA).

### **Mikroskopia sił atomowych**

Pomiary topografii próbek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu sił atomowych NanoWizard® 4 (JPK, Niemcy) w trybie tryb przerywanego kontaktu. Do badań zastosowano mikrobilki NSC35 (MikroMasch, Niemcy) z ostrzem o promieniu < 8 µm. Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania JPK Data Processing software (version spm-6.1.42) oraz Gwyddion.

Do badań zastosowano mineralne podłoże – mikę, którą sfunkcjonalizowano chlorkiem magnezu o stężeniu 4  $\mu\text{M}$  lub 20  $\mu\text{M}$ . Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej na podłoże z  $\text{MgCl}_2$  nakładano badany roztwór i ponownie inkubowano przez 10 minut. Dla wybranych próbek podczas preparatyki zastosowano etap spłukiwania podłoża po inkubacji podłoża z  $\text{MgCl}_2$  i/lub po inkubacji z roztworem badanym. Pomiary AFM przeprowadzano po całkowitym wyschnięciu podłoża w temperaturze pokojowej.

Podczas badań testowano różne warianty preparatyki, w zależności od charakteru mierzonych próbek. Dokładny opis przygotowywania próbek do badań AFM wraz z wyjaśnieniem poszczególnych kroków zawarto w rozdziale 6.5.

### **Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego**

Badania strukturalne oparte o małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego przeprowadzono przy użyciu systemu SAXS/WAXS Xeuss 2.0. (Xenocs, Francja). System ten wyposażony jest w źródło promieni rentgenowskich MetalJet microfocus ( $\lambda = 0,134 \text{ nm}$ ) z anodą z ciekłego metalu (stop galu/indu) (Excillum AB, Szwecja), bezszumowy hybrydowy detektor 2D zliczający fotony PILATUS 3 R 1 M (Dectris AG, Szwajcaria) i lustra Fox 3D Ga o ultraniskiej dywergencji (XENOCSS, Francja).

Roztwory badanych układach umieszczono w cienkich kapilarach borokrzemowych (Hilgenberg GmbH, Niemcy) o średnicy 0,8 mm, które szczelnie zamknięto. Odległość próbki od detektora wynosiła 1686 mm. Dla każdej próbki zebrano 6 klatek (600 s/klatkę).

Pomiary przeprowadzono w temperaturach 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, tak aby być zarejestrować krzywe SAXS badanych układów przed i po przemianach fazowych lipidów, a do regulacji temperatury zastosowano przystawkę temperaturową Linkam (Linkam Scientific Instruments Ltd., Wielka Brytania).

Analizę krzywych SAXS przeprowadzono przy użyciu oprogramowania FOXTROT i Primus z pakietu ASTAS 3.0 [231]



## 6 Prezentacja i analiza wyników

Pierwszy etap badań obejmował charakterystykę wybranych surfaktantów: zbadanie składu chemicznego związków na podstawie widm FTIR (rozdział 6.1.1) oraz przy użyciu różnych technik wyznaczenie parametrów takich jak krytyczne stężenie micelizacji, krytyczne stężenie agregacji (rozdział 6.1.2) oraz liczba agregacji (rozdział 6.1.3).

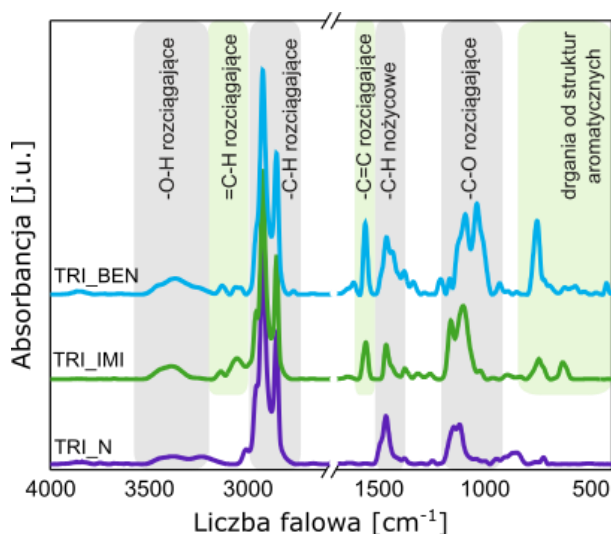
W kolejnym etapie badań oceniono dla układów surfaktant/DNA oraz surfaktant/lipid/DNA zdolność do kompleksowania (rozdział 6.2.1) i uwalniania materiału genetycznego (rozdział 6.2.2), wpływ surfaktantów i lipidów na konformację DNA (rozdział 6.2.3) oraz cytotoksyczność tych układów (rozdział 6.2.4). Zbadano również właściwości fizyczne takie jak przemiany fazowe układów (rozdział 6.3.), parametry strukturalne (rozdział 6.4) oraz topografię kompleksów (rozdział 6.5). Na poszczególnych etapach przeprowadzono wstępną dyskusję wyników.

Większość badań została przeprowadzona w Zakładzie Fizyki Biomedycznej, Wydziału Fizyki i Astronomii UAM. Testy cytotoksyczności zostały przeprowadzone w Zakładzie Bioenergetyki, Wydziału Biologii UAM dzięki uprzejmości dr Darii Wojciechowskiej oraz prof. dr hab. Hanny Kmity.

### 6.1 Charakterystyka zastosowanych surfaktantów trimerycznych

#### 6.1.1 Budowa chemiczna badanych surfaktantów trimerycznych

Na podstawie widm FTIR możliwa jest weryfikacja budowy chemicznej związków organicznych i nieorganicznych. Na rysunku 28 zestawiono widma podczerwieni badanych w pracy surfaktantów. Obszar ok.  $3400\text{ cm}^{-1}$  to zakres drgań rozciągających grupy hydroksylowych  $\nu_{OH}$ . Mimo iż, pomiar przeprowadzono na „suchych” próbkach, to w ich składzie na skutek wysokiej higroskopijności surfaktantów (a właściwie to pozostałości po syntezie), obecne są grupy -OH pochodzące od zaabsorbowanej przez nie wody.



Rysunek 28. Widma FTIR badanych surfaktantów trimerycznych.

W obszarze 3200-3000  $\text{cm}^{-1}$  zlokalizowane są drgania rozciągające grup =C-H. W surfaktancie TRI\_N nie występują wiązania podwójne, natomiast w TRI\_IMI i TRI\_BEN są one obecne w strukturach aromatycznych, co potwierdzają uzyskane widma FTIR. Podobnie z pasmem przy ok. 1630  $\text{cm}^{-1}$ , czyli pasmem pochodzącym od drgań rozciągających wiązania podwójnego między atomami węgla C=C.

Zakres 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  to obszar drgań rozciągających grup  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , a drgania nożycowe tych grup występują ok. 1460  $\text{cm}^{-1}$ . We wszystkich surfaktantach obecne są drgania grup karbonylowych C=O (ok. 1100  $\text{cm}^{-1}$ ), pochodzące od atomów tlenu występujących w łączniku.

Szczególnie ważny jest obszar poniżej 900  $\text{cm}^{-1}$ , w obszarze tym zlokalizowane są drgania od struktur cyklicznych, które obserwuje się dla TRI\_IMI i TRI\_BEN, z tym, że w TRI\_BEN pasmo to ma większą intensywność niż dla TRI\_IMI, ponieważ w głowach surfaktantów występuje podwójna struktura heterocykliczna - benzimidazol.

### 6.1.2 Krytyczne stężenie micelizacji i agregacji surfaktantów trimerycznych

Ze względu na zróżnicowany charakter badanych w pracy surfaktantów zastosowano szereg metod pomiarowych i analitycznych, aby w jak najdokładniejszy sposób scharakteryzować ich właściwości.

Pierwszą z zastosowanych techniką do wyznaczania *CMC* badanych związków była metoda konduktometryczna, dzięki której jednocześnie wyznaczono wartości *CAC*.

Zmiany przewodności właściwej roztworu ze wzrostem stężenia surfaktantu  $\kappa(C)$  (rysunek 29 A dla TRI\_N, C – TRI\_IMI, E – TRI\_BEN, zależność po prawej stronie) przebiegają w sposób łagodny, co wskazuje na stopniową i ciągłą agregację surfaktantów. W przeciwieństwie do monomerycznych form surfaktantów, nie ma skokowej zmiany przewodności elektrycznej, tym samym stosunkowo trudno jest określić jednoznacznie moment powstawania miceli – punktu *CMC*. Na wykresach zależności  $\kappa(C)$  zaznaczono dopasowania do funkcji (oznaczone jako fit 1, fit 2) według metody Williama, oraz ich punkt przecięcia określający *CMC*.

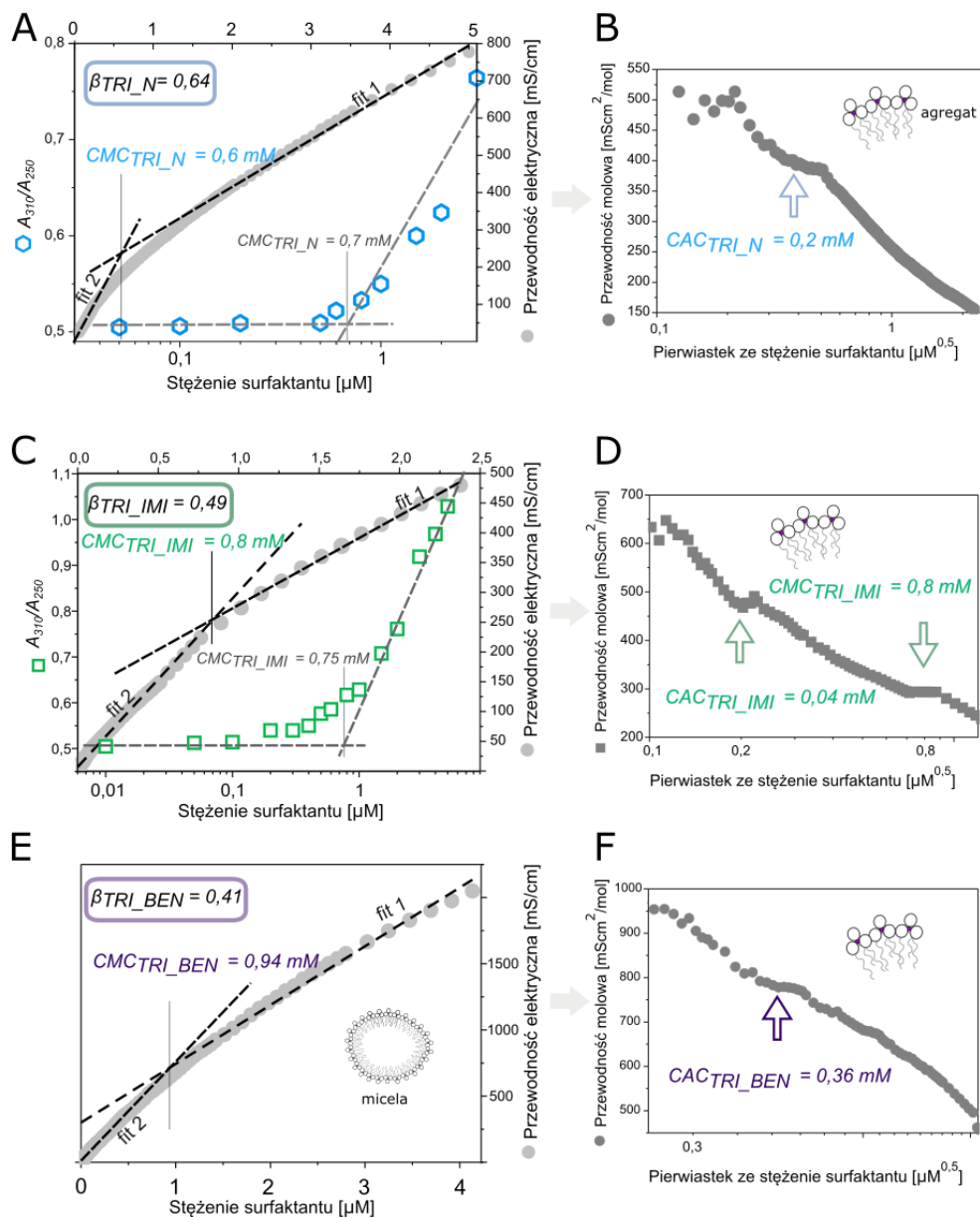
Metodą Phillipsa (bazując na drugiej pochodnej  $\kappa(C)$ ) otrzymano następujące wyniki – dla TRI\_N: 0,26 mM, dla TRI\_IMI wartości: 0,26 mM, 0,46 mM, 0,77 mM oraz 2 mM; natomiast dla TRI\_BEN – wiele minimów funkcji. Dlatego metoda ta nie jest odpowiednia dla surfaktantów, u których nie ma wyraźnej (skokowej) zmiany przewodności.

Metoda Carpena wydaje się najodpowiedniejsza i najdokładniejsza, a wyniki uzyskane przy jej zastosowaniu pokrywają się z tymi otrzymanymi metodą Williama (wyniki badań *CMC* zestawiono w tabeli 4).

Dzięki metodzie konduktometrycznej możliwe jest także wyznaczenie współczynnika wiązania przeciwjonów  $\beta$  oraz stopnia jonizacji miceli  $\alpha$ , gdzie  $\alpha = 1 - \beta = A_1/A_2$ .  $A_1$ ,  $A_2$  są to nachylenia prostej odpowiednio przed i po osiągnięciu *CMC*. Znaczenie parametru  $\beta$  jest na tyle istotne, że mówi o zdolności wiązania przeciwjonów do miceli [164, 232]. Tym samym może się przekładać na zdolność wiązania innych struktur z surfaktantem np. cząsteczek DNA. Uzyskano następujące wyniki współczynnika wiązania przeciwjonów dla: TRI\_N – 0,64, TRI\_IMI – 0,49, TRI\_BEN – 0,41.

Wyznaczenie *CAC* na podstawie zależności molowej przewodności  $\Lambda$  od pierwiastka kwadratowego ze stężenia surfaktantu  $c^{0.5}$ , przestawiono na rysunku 29: B dla TRI\_N, D – TRI\_IMI oraz F – TRI\_BEN. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w roztworze obserwuje się spadek molowej przewodności elektrycznej. Badania nad surfaktantami

gemini o grupach imidazoliowych w części polarnej wykazały, że minimum występujące przy niskich wartościach stężenia surfaktantu, odpowiada punktowi tworzenia się agregatów pre-mielarnych typu dimer, natomiast dalszy wzrost stężenia surfaktantów powoduje wzrost przewodnictwa, a maksimum odpowiada tworzeniu agregatów surfaktantów. Co więcej podobne zależności obserwowano dla surfaktantów o wyższym stopniu oligomeryzacji [232]. Dla niektórych surfaktantów można zarejestrować dodatkowy punkt przegięcia zależności odpowiadający wartości  $CMC$  [232]. Za punkt krytycznego stężenia agregacji przyjęto pierwsze minimum zależności  $\Lambda(C^{0,5})$ . Choć przytoczona metoda została opisana dla surfaktantów z grupą cykliczną, to na podstawie wyników uzyskanych dla surfaktantu TRI\_N prawdopodobnie możliwe jest wyznaczenie wartości  $CAC$ , równego w tym przypadku 0,2 mM.



Rysunek 29. Wyznaczanie  $CMC$  (A, C, E) i  $CAC$  (B, D, F) dla badanych surfaktantów przy użyciu spektroskopii UV/Vis i konduktometrii.

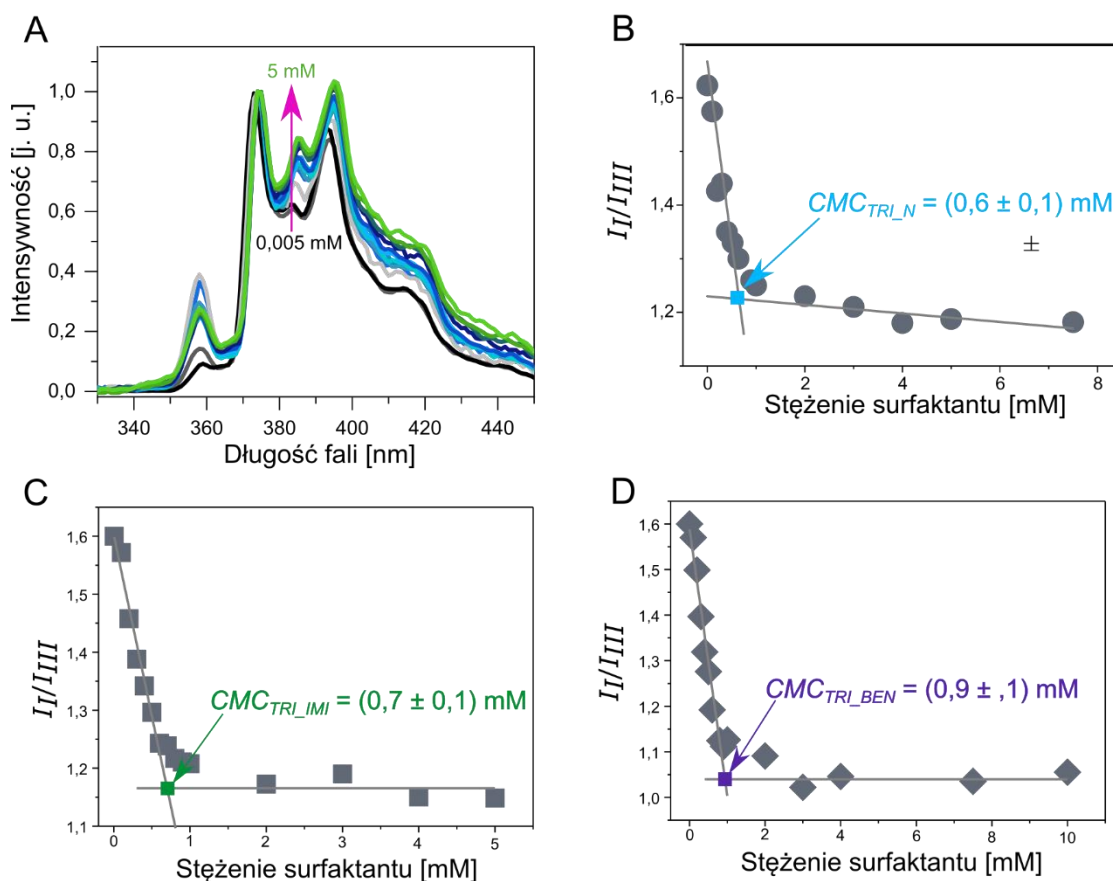
Dla surfaktantu TRI\_IMI wartość  $CAC$  oszacowano na 0,04 mM, natomiast przy stężeniu 0,60 mM obserwowano kolejne miejsce zmiany przebiegu zależności, które przypisano wartości  $CMC$ . Podobnie dla surfaktantu TRI\_BEN zarejestrowano punkt  $CAC$  równy 0,03 mM oraz  $CMC$  równy 0,32 mM. Wartości krytycznego stężenia agregacji dla surfaktantu TRI\_IMI oraz TRI\_BEN są do siebie porównywalne, jednak znacząco niższe niż dla TRI\_N. Natomiast dla surfaktantu TRI\_IMI oraz TRI\_BEN wartości krytycznego stężenia micelizacji są niższe w porównaniu z  $CMC$  wyznaczonym z zależności  $\kappa(C)$ .

Wyznaczenie  $CMC$  przy zastosowaniu metody spektrofotometrycznej na bazie reakcji tautomerizacji beznoiloacetonu było możliwe dla surfaktantu TRI\_N (rysunek 29 A, zależność po lewej stronie) oraz TRI\_IMI (rysunek 29 C, zależność po lewej stronie), ponieważ roztwór TRI\_BEN w niektórych stężeniach był nieprzezroczysty, a tym samym niemożliwy był pomiar absorbancji. Gdy w roztworze surfaktantu nie występują micelle to stosunek  $A_{310}/A_{250}$  jest na poziomie stosunku dla czystego BZA, czyli ok. 0,5. W momencie utworzenia miceli, stosunek ten zaczyna wzrastać.

Podobnie jak w przypadku metody konduktometrycznej, tak w tej metodzie dla surfaktantów trimerycznych nie obserwujemy skokowej i drastycznej zmiany w stosunku  $A_{310}/A_{250}$  tak jak dla ich monomerycznych odpowiedników. Dla lepszej wizualizacji zastosowano skalę logarymiczną stężenia surfaktantu. Delikatny wzrost  $A_{310}/A_{250}$  może sugerować tworzenie agregatów pre-micelarnych. W hydrofobowym wnętrzu takiego agregatu BZA ulega zmianie z formy ketonowej na enolową. Zwiększając stężenie surfaktantu w roztworze zależność  $A_{310}/A_{250}(C)$  przyjmuje charakter liniowy. Aby wyznaczyć  $CMC$  zastosowano metodę przecięcia się dwóch prostych utworzonych na podstawie regresji liniowej dla początku i końca zależności  $A_{310}/A_{250}(C)$ , których punkt przecięcia określa wartość  $CMC$ . Dla TRI\_N otrzymano wartość 0,7 mM, a dla TRI\_IMI – 0,75 mM. Jednak zauważalny wzrost stosunku  $A_{310}/A_{250}$  był obserwowany już przy 0,6 mM dla TRI\_N oraz przy 0,2 mM dla TRI\_IMI. Początkowo przypisywano go tworzeniem agregatów pre-micelarnych, jednak w świetle wyników zależności  $\Lambda(C^{0.5})$ , być może rzeczywiste wartości  $CMC$  są niższe, a metoda przecięcia prostych nie do końca słuszna w przypadku surfaktantów oligomerycznych.

Wyniki  $CMC$  bazujące na pomiarach fluorescencji zestawiono na rysunku 30. Podobnie jak w wcześniejszych metodach nie obserwowano nagłej zmiany badanej zależności [8], dlatego wyniki opracowano zgodnie z procedurą Milanović [233], która wydaje się być odpowiedniejsza dla surfaktantów tworzących agregaty pre-micelarne – tj. wyznaczono wartości  $CMC$  na podstawie przecięcia dwóch krzywych dopasowanych do zależności  $I_f/I_m(C)$  przed i po punkcie  $CMC$ . Otrzymane wartości  $CMC$  to: 0,6 mM dla TRI\_N, 0,7 mM dla TRI\_IMI, 0,9 mM dla TRI\_BEN.





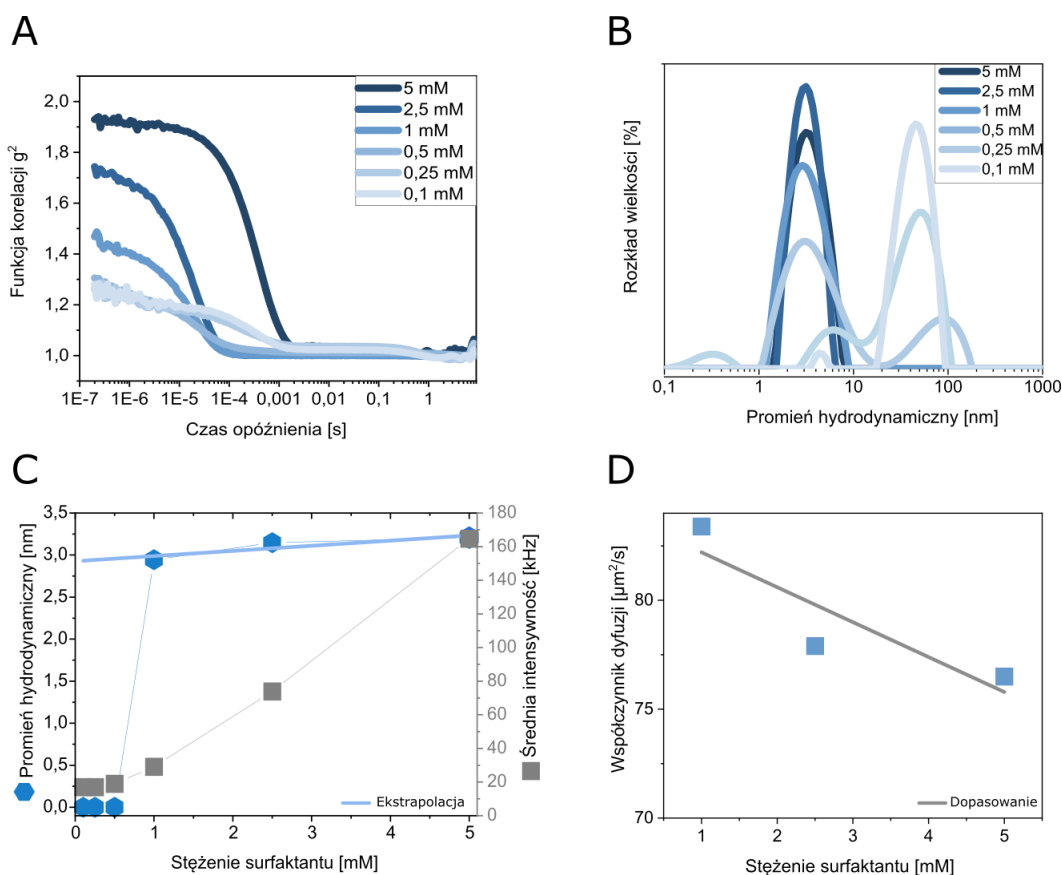
Rysunek 30. Wyniki  $CMC$  przy zastosowaniu metody fluorescencyjnej: A – widma emisji pirenu dla różnych stężeń surfaktantu TRI\_N, zależność  $I_I/I_{III}(C)$  wraz z wyznaczonymi wartościami  $CMC$  dla surfaktantu TRI\_N (B), TRI\_IMI (C) oraz TRI\_BEN (D).

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła wymagają stosowania dodatkowo soli w badanych roztworach. Aniony soli gromadzą się w okolicy dodatnio naładowanych głów surfaktantów, neutralizując ich ładunek elektryczny (ekranują ładunek) tym samym ograniczają oddziaływania dalekozasięgowe (oddziaływania elektrostatyczne przyciągające lub odpychające), które mogłyby zafałszować wynik mierzonej dyfuzji swobodnej (bez obecności soli mierzona byłaby dyfuzja pozorna). Wzrost siły jonowej badanych roztworów, może skutkować również ułatwieniem procesu micelizacji surfaktantów jonowych, które ze względu na zekranowany ładunek elektryczny części polarnych nie odpychają się między sobą, a w konsekwencji mogą lepiej upakować się tworząc micelę przy niższej wartości  $CMC$  [234, 235].

Zgodnie z założeniami metody wyznaczania  $CMC$  surfaktantów na bazie pomiarów DLS, stężenie dla którego możliwa jest rejestracja sygnału funkcji korelacji oraz obserwuje się wzrost intensywności określa się jako wartość  $CMC$ . W badaniach DLS należy pamiętać o odpowiednim doborze stężenia soli w badanych roztworach. Dlatego aby obniżyć możliwe efekty stężeniowe wynikające ze wzrostu siły jonowej roztworu, początkowo zastosowano niskie stężenie soli tj. 0,1 mM NaBr.

Na rysunku 31 przedstawiono wyniki badań DLS dla surfaktantu TRI\_N. Można zauważyć jak amplituda funkcji korelacji rośnie wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu. Dla stężeń poniżej i równych 0,5 mM funkcje korelacji się pokrywają. Rozkład wielkości promienia hydrodynamicznego (rysunek 31 B) dla stężeń  $\leq 0,5 \text{ mM}$  ma dwie a nawet trzy

składowe, mówiące o dużej niejednorodności próbki, dla wartości powyżej 0,5 mM wykazuje mały rozrzut wielkości  $R_H$ .

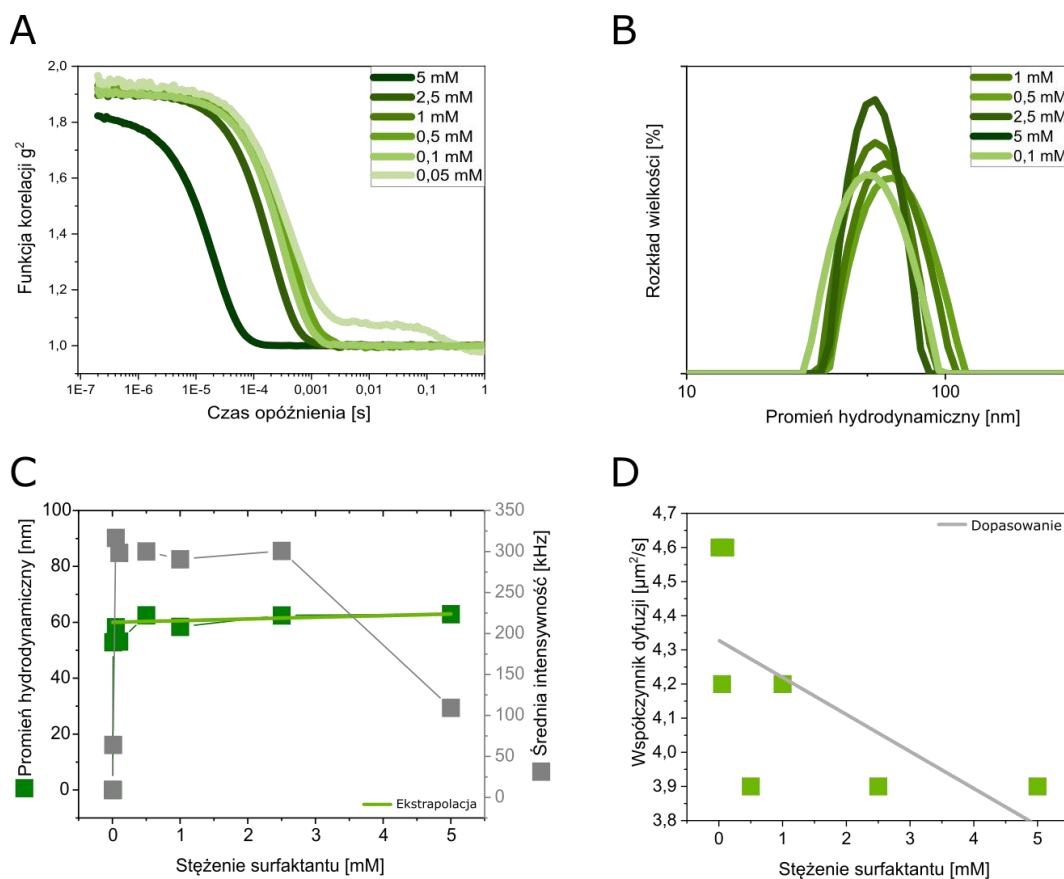


Rysunek 31. Wyniki pomiarów DLS dla surfaktantu TRI\_N w obecności 0,1 mM NaBr: A – zestawienie funkcji korelacji dla różnych stężeń surfaktantu, B – zestawienie rozkładu wielkości promienia hydrodynamicznego dla różnych stężeń surfaktantu, C – zależność promienia hydrodynamicznego i średniej intensywności od stężenia surfaktantu, D – zależność współczynnika dyfuzji od stężenia surfaktantu.

Analizując zależność średniej intensywności od stężenia surfaktantu (rysunek 31 C) można zauważyć, że dla stężeń  $\leq 0,5$  mM intensywność jest na poziomie średniej intensywności tła i niemożliwe jest prawidłowe wyznaczenie promienia hydrodynamicznego. Dopiero od stężeń większych niż 0,5 mM, obserwujemy wzrost średniej intensywności wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu. Na tej podstawie można wywnioskować, że wartość  $CMC$  dla surfaktantu TRI\_N jest większa niż 0,5 mM. Dodatkowo wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu rośnie promień hydrodynamiczny (rysunek 31 C) i maleje współczynnik dyfuzji (rysunek 31 D), co wskazuje na tworzenie się większych miceli. Aby określić rzeczywisty rozmiar miceli, ekstrapoluje się zależność  $R_H(C)$  (rysunek 31 C) do stężenia surfaktantu równego 0 i dla surfaktantu TRI\_N wyznaczono promień hydrodynamiczny równy 2,92 nm.

W przypadku surfaktantu TRI\_IMI (rysunek 32) nie obserwowano zaniku funkcji korelacji wraz ze spadkiem stężenia surfaktantu (wyjątkiem jest największe stężenie 5 mM, wtedy też spada średnia intensywność, być może związane jest to z tworzeniem większych agregatów lub wytrąceniem surfaktantów z roztworu). Dopiero dla bardzo małych wartości

stężenia surfaktantu ( $\leq 0,05$  mM) funkcja korelacji przybiera nieregularny poszarpany kształt, a średnia intensywność znacząco spada. Podobnie jak w przypadku TRI\_N obserwujemy wzrost promienia hydrodynamicznego i spadek wartości współczynnika dyfuzji dla wyższych stężeń surfaktantu. Promień hydrodynamiczny agregatów surfaktantu TRI\_IMI wynosi 60 nm. Niemożliwe było wyznaczenie wartości *CMC*, ponieważ uniemożliwiała to silna agregacja surfaktantu już przy bardzo niskich stężeniach.



Rysunek 32. Wyniki pomiarów DLS dla surfaktantu TRI\_IMI w obecności 0,1 mM NaBr: A – zestawienie funkcji korelacji dla różnych stężeń surfaktantu, B – zestawienie rozkładu wielkości promienia hydrodynamicznego dla różnych stężeń surfaktantu, C – zależność promienia hydrodynamicznego i średniej intensywności od stężenia surfaktantu, D – zależność współczynnika dyfuzji od stężenia surfaktantu.

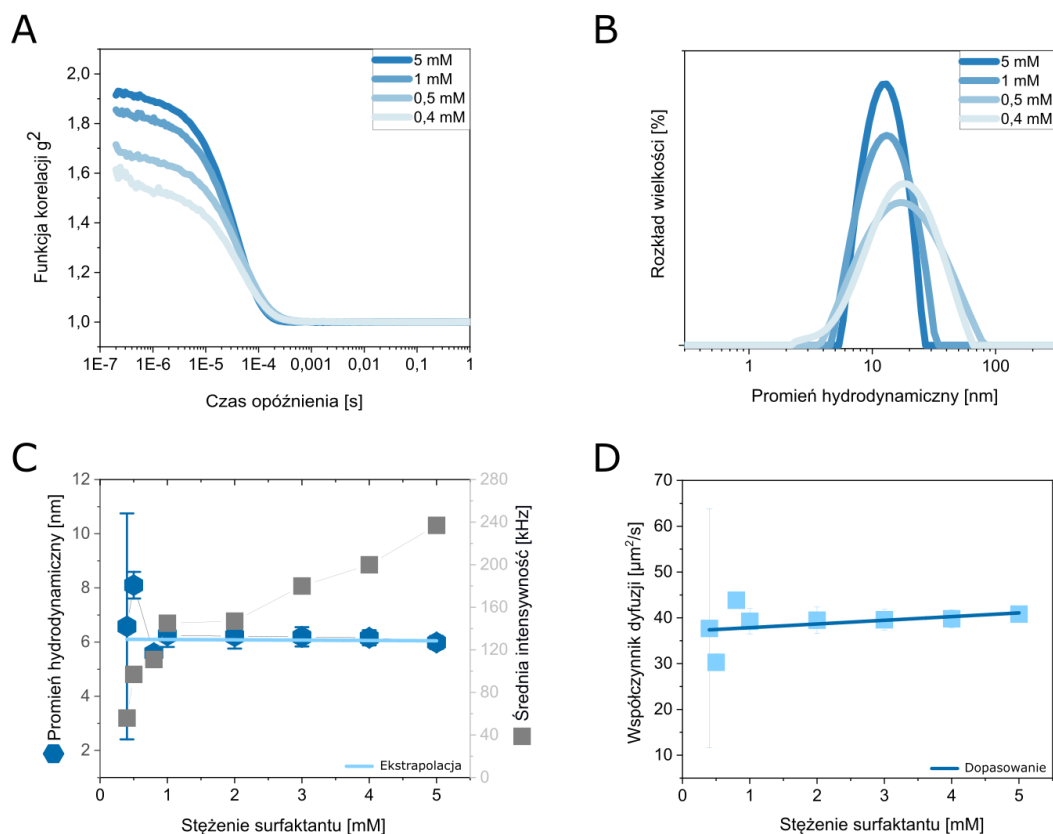
Dla surfaktantu TRI\_BEN nie było możliwe wyznaczenie promienia hydrodynamicznego i współczynnika dyfuzji miceli, a także wartość *CMC*, ponieważ dodatek soli powodował mętnienie roztworu.

Tak duża różnica wartości pomiędzy promieniami hydrodynamicznymi wyznaczonymi dla surfaktantów TRI\_N i TRI\_IMI, skłoniła mnie do sprawdzenia wpływu stężenia soli na proces micelizacji tych surfaktantów. W przypadku surfaktantów TRI\_IMI i TRI\_BEN wysokie stężenie NaBr – 0,1 M, powodowało wytrącanie się surfaktantów z roztworu.

Dla surfaktantu TRI\_N w obecności 0,1 M NaBr (rysunek 33) obserwujemy micelle o dwukrotnie większym promieniu – tj. ok. 6 nm. Jest to zgodne z teorią mówiącą o tym, że wraz ze wzrostem stężenia soli w roztworze powstają większe micelle [236], jednak w rozważaniach nad danym surfaktantem wpływ ten jest niewielki, ponieważ przy

tysięckrotnym wzroście stężenia soli, promień hydrodynamiczny nie zmienia nawet rzędu wielkości. Co więcej w wyższych stężeniach soli micelle mają tendencję do łączenia się w robakowate lub cylindryczne agregaty [235], choć tego zjawiska nie potwierdziły badania DLS.

Przewidywana wartość  $CMC$  ulega obniżeniu w obecności wysokiego stężenia soli, jednak jej jednoznaczne wyznaczenie jest trudne,  $CMC_{TRI\_N} \leq 0,4$  mM. Pomiar dla stężeń surfaktantu  $TRI\_N \leq 0,2$  mM ze względu na niską amplitudę funkcji korelacji, średnią intensywność na poziomie tła oraz wysoki stopień polidispersyjności  $R_H$ , odrzucono z dalszej analizy.



Rysunek 33. Wyniki pomiarów DLS dla surfaktantu TRI\_N w obecności 0,1 M NaBr: A – zestawienie funkcji korelacji dla różnych stężeń surfaktantu, B – zestawienie rozkładu wielkości promienia hydrodynamicznego dla różnych stężeń surfaktantu, C – zależność promienia hydrodynamicznego i średniej intensywności od stężenia surfaktantu, D – zależność współczynnika dyfuzji od stężenia surfaktantu.

Co ciekawe, wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu promień hydrodynamiczny nieznacznie maleje, a współczynnik dyfuzji nieznacznie rośnie, co wskazuje na „kondensowanie” się miceli przy stale wzrastającej ich liczbie.

W tabeli 4 zestawiono najważniejsze parametry ( $CMC$ ,  $CAC$ ,  $R_h$ ,  $\beta$ ) charakteryzujące badane surfaktanty. Wyniki otrzymane na podstawie pomiarów konduktometrycznych, a wyznaczonych za pomocą różnych metod analizy - uśredniono. Jak widać wartości  $CMC$ , w dużej mierze są do siebie zbliżone. Dlatego do dalszych badań przyjęto następujące wartości  $CMC$ : 0,6 mM dla TRI\_N, 0,8 mM dla TRI\_IMI, 0,9 mM dla TRI\_BEN.

Tabela 4. Zestawienie wyników charakterystycznych parametrów ( $CMC$ ,  $CAC$ ,  $R_h$ ,  $\beta$ ) badanych surfaktantów trimerycznych.

Parametr	$CMC$ [mM]					$CAC$ [mM]	$R_h$ [nm]	$\beta$
	$\kappa(c)^*$	$\Lambda(c^{0,5})$	BZA	DLS**	$I_I/I_{III}(c)$	$\Lambda(c^{0,5})$	DLS*	$\kappa(c)$
TRI_N	0,57	x	0,70	$\leq 0,50$	0,60	0,2	3	0,65
TRI_IMI	0,80	0,60	0,75	x	0,70	0,04	60	0,53
TRI_BEN	0,92	0,32	x	x	0,90	0,03	x	0,39

\* wyniki uśrednione, \*\* w obecności 0,1 mM NaBr, x – brak wyników,

### 6.1.3 Liczba agregacji

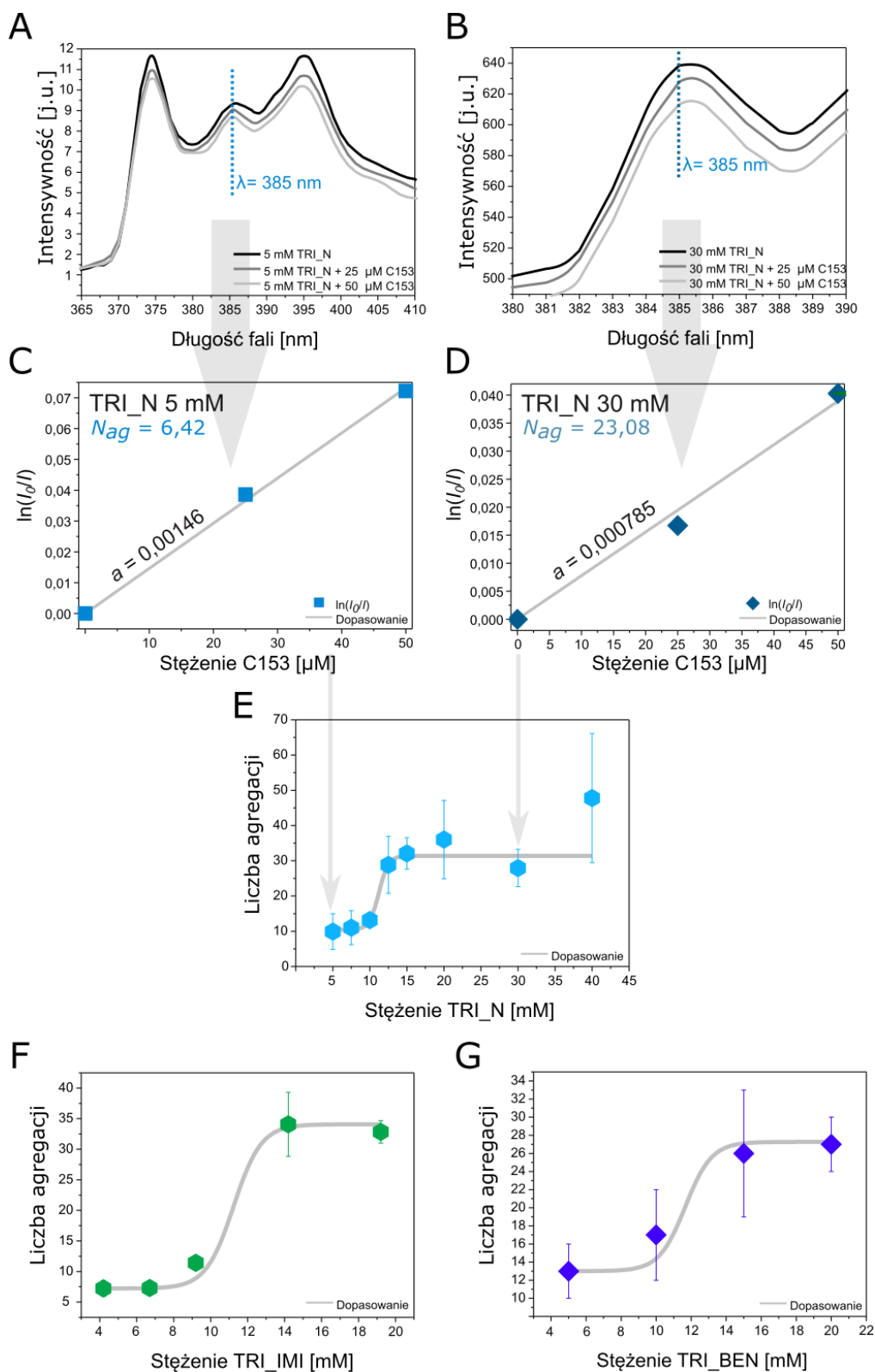
Liczbę agregacji  $N_{ag}$ , czyli ilość surfaktantów w miceli wyznaczono przy użyciu metody wygaszania fluorescencji w stanie ustalonym  $SFFQ$ . W obecności surfaktantów o różnych stężeniach (z zaznaczeniem, że stężenia te są powyżej wartości  $CMC$ ), zarejestrowano widma fluorescencyjne pirenu w zależności od stężenia czynnika wygaszającego - kumaryny c153. Widmem referencyjnym o intensywności  $I_0$  pasma przy długości 385 nm była próbka surfaktant/piren – bez czynnika wygaszającego. Następnie zmierzono próbki surfaktant/piren z różnym stężeniem c153. Spadek intensywności widm świadczył o wygaszaniu fluorescencji pirenu przez kumarynę (rysunek 34 A, B). Zanik ten uzależniony jest nie tylko od stężenia użytego czynnika wygaszającego, ale również od stężenia surfaktantu – dla wyższych stężeń surfaktantu, c153 wygasza silniej fluorescencje pirenu niż dla surfaktantu o niższym stężeniu przy tym samym stężeniu c153. Tym samym można przypuszczać, że wielkość (promień hydrodynamiczny) miceli zależy od stężenia surfaktantu.

Na podstawie otrzymanych wartości intensywności pasma 385 nm dla różnych stężeń kumaryny, wykreślono zależność  $\ln(I_0/I)$  od stężenia kumaryny c153 w układzie z surfaktantem (rysunek 34 C, D), a następnie wyznaczano współczynnik nachylenia prostej  $a$ , z którego możliwe było wyliczenie liczby agregacji  $N_{ag}$ . Pomiar i wyliczenia powtórzone dla różnych stężeń surfaktantów.

Dla wszystkich badanych surfaktantów otrzymano podobną zależność liczby agregacji od stężenia surfaktantu (rysunek 34 E, F, G). Przy niższych wartościach stężeń surfaktantu - liczba agregacji jest stała, lub nieznacznie/zaniedbywalnie wzrasta. Średnie wartości  $N_{ag}$  surfaktantów w tym obszarze stężeń wynoszą: 7 dla TRI\_IMI, 11 dla TRI\_N, oraz 13 dla TRI\_BEN.

Dla wyższych wartości odpowiednio dla TRI\_N od 7 mM, TRI\_IMI od 8 mM, TRI\_BEN od 9 mM zależność ta zaczyna wzrastać ze wzrostem stężenia [110].

Zwiększając stężenie surfaktantu osiąga się kolejne plateau, przypadające dla wszystkich surfaktantów ok. 15 mM. Średnie wartości  $N_{ag}$  surfaktantów w tym obszarze stężeń wynoszą dla TRI\_N - 31, dla TRI\_IMI - 33, dla TRI\_BEN - 26. Jest to moment, kiedy liczba agregacji nie zależy od stężenia surfaktantu. Można przypuszczać, że micelle albo są jednego rozmiaru (nie powiększają się, nie nadbudowują kolejnych warstw) i zwiększa się jedynie ich liczba albo dochodzi do kondensowania miceli, co fałszuje wynik. Najmniejszy rozrzut  $N_{ag}$  w zależności od stężenia surfaktantu w roztworze obserwujemy dla TRI\_BEN (od 13 do 26), natomiast największy dla TRI\_IMI (od 7 do 33).



Rysunek 34. Wyznaczanie liczby agregacji dla badanych surfaktantów: widma fluorescencyjne pirenu w obecności c153 i TRI\_N o stężeniu 5 mM (A) oraz 30 mM (B), wyznaczenie nachylenia prostej  $\ln(I_0/I)$  od stężenia czynnika wygaszającego dla surfaktantu TRI\_N o stężeniu 5 mM (C) oraz 30 mM (D); graficzna reprezentacja zależności liczby agregacji od stężenia surfaktantu TRI\_N (E), TRI\_IMI (F), TRI\_BEN (G).

## 6.2 Ocena właściwości biologicznych układów surfaktant/DNA oraz surfaktant/lipid/DNA

---

Ocena własności biologicznych lipopleksów na bazie surfaktantów trimerycznych i formulacji lipidowych jest kluczowym etapem przy wyborze potencjalnych układów jako nośników do transportu materiału genetycznego do żywych komórek organizmu.

Ocenie tej podlega zarówno zdolność do wiązania materiału genetycznego przez lipopleksy, która umożliwia jego transport, jak i łatwość uwalniania w określonych docelowych warunkach, która jest konieczna do jego integracji z genomem komórki lub ekspresji danego białka. Zamiany w obrębie struktury kwasu nukleinowego są również ważne w ocenie przydatności danych nośników, ponieważ dostarczają informacji o m. in. stopniu jego skondensowania, czy dalszej przydatności terapeutycznej. Natomiast testy cytotoksyczności pozwalają określić równowagę między maksymalną efektywnością a najniższą toksycznością lipopleksów.

Większość prezentowanych w tym rozdziale wyników (testy elektroforetyczne, widma CD, testy komórkowe) została opublikowana przeze mnie w pracy pt. *The Process of Binding and Releasing of Genetic Material from Lipoplexes Based on Trimeric Surfactants and Phospholipids* w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* w 2020 roku, której autorami są: Żaneta Polańska, Zuzanna Pietralik-Molińska, Daria Wojciechowska, Augustyn Moliński, Marek Weiss, Andrzej Skrzypczak, Maciej Kozak.

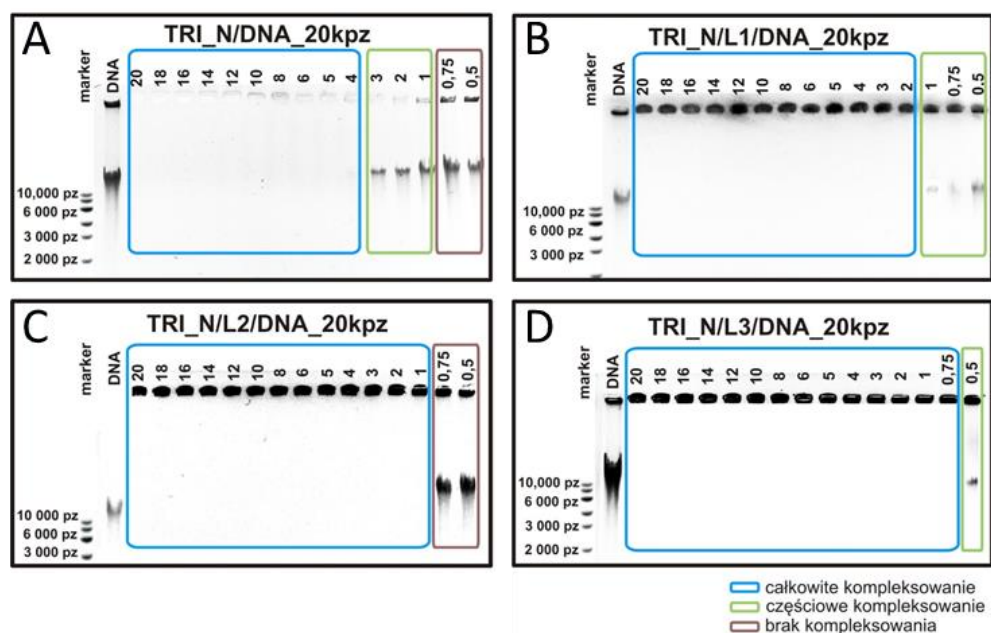
### 6.2.1 Proces kompleksowania

Ocena zdolności do kompleksowania lipopleksów na bazie surfaktantów trimerycznych z DNA o różnej długości przeprowadzono przy użyciu rozdziału elektroforetycznego oraz analizy potencjału zeta.

Na rysunku 35 przedstawiono przykładowe wyniki testów elektroforetycznych uzyskane dla surfaktantu TRI\_N z wysokomolekularnym DNA (o długości 20 kbp) w obecności lub nie układów lipidowych. Interpretacja uzyskanych przeze mnie wyników zostanie omówiona na podstawie rysunku 35 A. W pierwszej kieszonce żelu (od lewej strony) umieszczono marker masy DNA, który umożliwiał określenie długości badanego DNA. W następnej kieszonce znajdowało się referencyjne DNA tj. bez dodatku surfaktantu. Profil elektroforetyczny DNA nie miał jednego wyraźnego prążka, przyjmowało formę „smugi”, oznaczało to, że występował rozkład długości DNA. Najdłuższe fragmenty osiągały długość ok. 20 000 pz.

W przypadku braku kompleksowania (dla  $p/n$  0,5 oraz 0,75) obraz rozdziału elektroforetycznego odpowiadał wolnemu DNA - na rysunku 35 A zaznaczono brunatną ramką. Ze zwiększeniem stężenia surfaktantu intensywność profilu DNA maleje, oznacza to, że część DNA (szczególnie najdłuższe fragmenty) utworzyło kompleks z surfaktantem - dla  $p/n = 1, 2, 3$  (na rysunku 35 zaznaczono zieloną ramką). Od  $p/n \geq 4$  nie obserwujemy obrazu wolnego DNA w żelu. Świadczy to o tym, że doszło do pełnego kompleksowania z surfaktantem i nie była możliwa migracja DNA w polu elektrycznym (kompleks ma zerowy wypadkowy ładunek elektryczny) lub powstały kompleks migrował w przeciwnym kierunku.

Skuteczność kompleksowania materiału genetycznego przez surfaktanty ocenia się na podstawie najniższej wartości  $p/n$ , przy której obserwować można utworzenie całkowitego i stabilnego kompleksu.

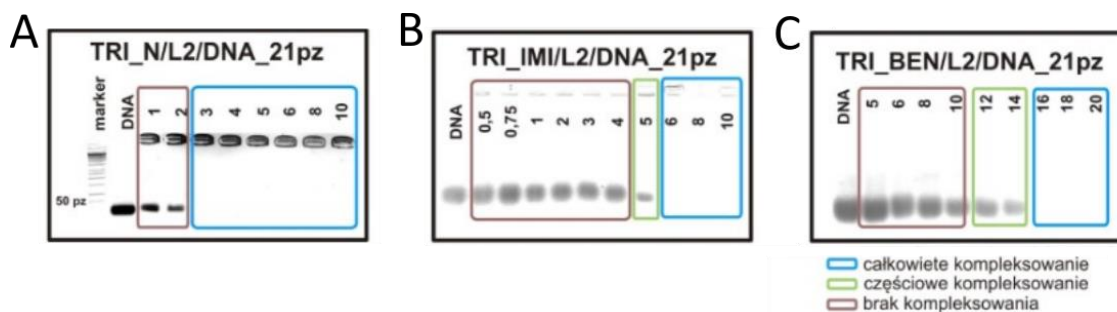


Rysunek 35. Rozdział elektroforetyczny układów TRI\_N/DNA\_20kpz (A), TRI\_N/L1/DNA\_20kpz (B), TRI\_N/L2/DNA\_20kpz (C) oraz TRI\_N/L3/DNA\_20kpz (D) o różnym stosunku  $p/n$ .

Analizując wpływ dodatku lipidów w układzie na proces kompleksowania surfaktantów z DNA obserwujemy kompleksowanie przy niższych wartościach  $p/n$  niż w przypadku układów surfaktant/DNA. Dla TRI\_N/L1/DNA\_20kpz najniższe  $p/n$  wymagane do utworzenia stabilnego kompleksu z DNA wynosi 2 (rysunek 35 B), dla TRI\_N/L2/DNA\_20kpz  $p/n = 1$  (rysunek 35 C), dla TRI\_N/L3/DNA\_20kpz  $p/n = 0,75$  (rysunek 35 D). Wyniki wskazują, że nie tylko dodatek lipidów zwiększa efektywność kompleksowania, ale również ich skład – im bardziej urozmaicona mieszanka fosfolipidów tym niższe wymagane stężenie surfaktantu do kompleksowania z DNA. Na zdjęciach rozdzielających elektroforetycznych dla układów surfaktant/lipid/DNA wyraźniej zaznaczone są kieszonki żelu inaczej niż w przypadku układów surfaktant/DNA - prawdopodobnie obecność lipidów w tych układach dodatkowo uwidacznia lokalizację kompleksów oraz zapobiega ewentualnej migracji w przyłożonym polu elektrycznym w kierunku elektrody ujemnej na skutek osłaniania przez cząsteczki lipidów części surfaktantów naładowanych dodatnio.

Porównując zdolności do kompleksowania z materiałem genetycznym badanych surfaktantów między sobą na przykładzie układów na bazie mieszaniny DMPC/DOPE (L2) i DNA o długości 21 pz (rysunek 36), najwyższą efektywność osiąga surfaktant TRI\_N. Stabilne kompleksy w tym układzie zostają utworzone przy  $p/n = 3$ . Dla układu TRI\_MI/L2/DNA\_21pz najniższe wymagane do utworzenia kompleksów  $p/n$  równe jest 6, natomiast dla TRI\_BEN/L2/DNA\_21pz -  $p/n = 16$ . Sugeruje to, że olbrzymie znaczenie dla wydajnego procesu wiązania kwasu nukleinowego przez surfaktanty ma budowa chemiczna ich części polarnych.

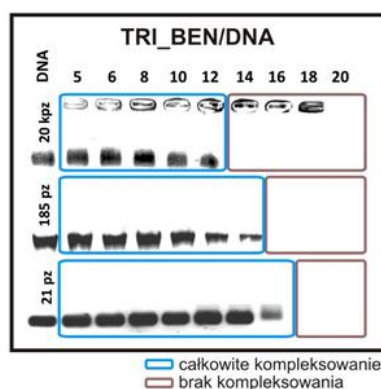




Rysunek 36. Rozdział elektroforetyczny układów na bazie DNA o długości 21 pz oraz formułacji lipidowej L2 i surfaktantu: TRI\_N (A), TRI\_IMI (B), TRI\_BEN (C) o różnym stosunku  $p/n$ .

Kolejnym aspektem wpływającym na wydajność kompleksowania surfaktant/DNA jest długość użytego fragmentu DNA. Na przykładzie układu TRI\_BEN/DNA (rysunek 37), zauważyć można, że dłuższe odcinki DNA kompleksują przy niższych stężeniach surfaktantu (niższych wartościach  $p/n$ ) w porównaniu do krótszych fragmentów DNA.

W tabeli 5 zestawiono wyniki testów elektroforetycznych i określonych progów kompleksowania dla analizowanych układów.



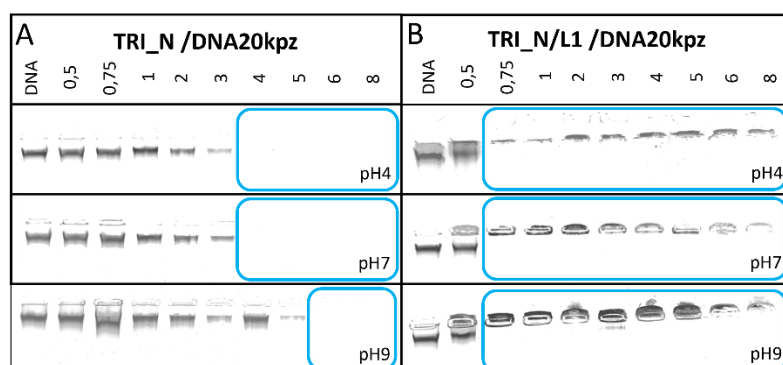
Rysunek 37. Rozdział elektroforetyczny układów o różnym stosunku  $p/n$  na bazie surfaktantu TRI\_BEN i DNA o długości: 20 kpz, 185 pz, 21 pz.

Tabela 5. Zestawienie wartości  $p/n$  odpowiadających całkowitemu kompleksowaniu DNA z surfaktantami i układami surfaktant/lipidy na podstawie rozdziałów elektroforetycznych.

DNA	Lipid/surfaktant	TRI_N	TRI_IMI	TRI_BEN
20 kpz	-	4	5	14
	L1	2	2	4
	L2	1	1	2
	L3	0,75	2	4
185 pz	-	4	5	16
	L1	2	2	14
	L2	3	3	10
	L3	3	2	10
21 pz	-	8	8	18
	L1	6	6	16
	L2	3	6	16
	L3	6	6	16

Proces kompleksowania zbadano również pod kątem wpływu pH środowiska przy zastosowaniu elektroforetycznego rozpraszania światła oraz elektroforezy żelowej dla systemów na bazie surfaktantu TRI\_N. Ocena wpływu pH środowiska pozwoli lepiej określić warunki stabilności badanych kompleksów np. podczas przechowywania.

Na podstawie przeprowadzonych testów elektroforetycznych dla układów TRI\_N/DNA\_20kpz i TRI\_N/L1/DNA\_20kpz (rysunek 38) nie stwierdzono istotnego wpływu pH środowiska na proces kompleksowania. Niemniej jednak przy pH 9 dla systemu TRI\_N/DNA\_20kpz zaobserwowano nieznaczny wzrost minimalnego  $p/n$ , przy którym powstaje stabilny kompleks (przesunięcie od  $p/n = 4$  do  $p/n = 6$ ). Przyjmuje się, że w zakresie pH od 5 do 9 cząsteczki DNA są stosunkowo stabilne. Powyżej tych wartości natomiast cząsteczki kwasów nukleinowych mogą ulec destabilizacji. W pH niższym niż 5 jest to depurynacja, czyli utrata zasad purynowych, co w konsekwencji powoduje pęknięcie wiązań fosfodiesterowych. Natomiast powyżej pH 9 DNA ulega denaturacji alkalicznej ze względu na obecność jonów wodorotlenkowych. Aniony OH<sup>-</sup> wiążąc się z atomami wodoru występującymi w zasadach azotowych DNA i biorącymi udział w tworzeniu wiązań wodorowych, usuwają je z pierwotnego położenia, przez co ulega rozerwaniu wiązanie między nićmi DNA. Wysokie pH może również powodować depurynację DNA. Dlatego prawdopodobnie w pH 9 dla TRI\_N/DNA\_20kpz doszło do uszkodzenia DNA i zwiększenia stopnia jego pofragmentowania [237,238], przez co krótsze jego fragmenty nie utworzyły kompleksu z surfaktantem przy zakładanej wartości  $p/n$ .

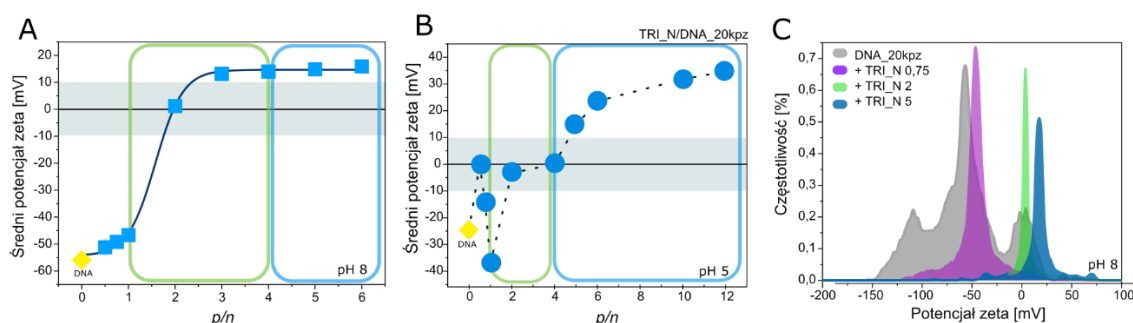


Rysunek 38. Testy elektroforetyczne dla układów TRI\_N/DNA\_20kpz (A) oraz TRI\_N/L1/DNA\_20kpz (B) w różnym pH.

Elektroforetyczne rozpraszanie światła jest techniką wrażliwą na siłę jonową i pH roztworów, dlatego bezpośrednie odniesienie wyników zeta potencjału do wyników z elektroforezy żelowej jest trudne i obarczone dużym błędem.

Próbki wybrane do pomiarów ELS były mierzone w 5 mM buforze fosforanowym o różnym pH. Już sam dodatek buforu fosforanowego, nawet o niskim stężeniu, mógł w znacznym stopniu zaburzyć właściwą interpretację wyników potencjału zeta. Gdyż potencjał zeta zależy ściśle od siły jonowej roztworu, a więc stężenia rozpuszczonych w nim jonów. Im wyższe stężenie soli w roztworze tym niższy zarejestrowany potencjał zeta, a co więcej efekt ten jest silniejszy dla jonów soli o wyższej wartościowości. Zjawisko to zwane efektem Debye'a związane jest z tendencją jonów do gromadzenia się wokół cząsteczek i ekranowania (osłabiania) ich ładunku elektrycznego netto – im więcej ładunków ekranujących tym niższa wartość potencjału zeta [239].

Na rysunku 39 zestawiono wyniki średniego potencjału zeta dla układów surfaktantu TRI\_N z wysokomolekularnym DNA w pH 8 oraz pH 5. Na podstawie wyników uzyskanych z rozdziału elektroforetycznego (rysunek 35) dla sytemu TRI\_N/DNA\_20kbpz w pH 6,8 zieloną ramką zaznaczono obszary częściowego kompleksowania, a niebieską ramką – obszary całkowitego kompleksowania. Żółtym rombem zaznaczono wyniki potencjału zeta referencyjnego roztworu DNA. W środowisku o pH 8 (rysunek 39 A) cząsteczki DNA wykazywały silny ujemny potencjał zeta, tj.  $(-57 \pm 3)$  mV, natomiast w pH 5 wartość potencjału zeta DNA wynosiło  $(-23 \pm 3)$  mV (rysunek 39 B). Ujemny ładunek DNA wynika z obecności grup fosforanowych. W niższym pH może dochodzić do przyłączania się protonów do grup fosforanowych, przez co część ładunków elektrycznych neutralizuje się i rejestrowany potencjał zeta ma mniej ujemną wartość [240]. Należy również zaznaczyć, że użyte wysokomolekularne DNA było silnie pofragmentowane, a uzyskane wyniki potencjału  $\zeta$  są uśrednioną wartością dla cząsteczek w całej objętości próbki. Na uzyskany wynik ma również wpływ pomiary w obecności buforu fosforanowego, który dodatkowo obniża wartości potencjału zeta.



Rysunek 39. Średni potencjał zeta zarejestrowany dla układów na bazie wysokomolekularnego DNA i surfaktantu TRI\_N w pH 8 (A) oraz pH 5 (B).

Rozkład potencjału zeta (C) dla TRI\_N/DNA\_20kbpz w pH 8.

Mając na uwadze powyższe czynniki wpływające na odczyt wartości potencjału zeta w badanych układach, przeanalizowano szczegółowo proces kompleksowania surfaktantu TRI\_N z DNA o długości 20 kbpz w pH 8. Wraz z dodawaniem surfaktantu do układu potencjał zeta wzrastał, na skutek stopniowego przyłączania się do łańcucha DNA cząsteczek surfaktantu, które redukowały jego ujemny ładunek elektryczny, aż w punkcie  $p/n = 2$  potencjał  $\zeta$  osiągnął wartość 0. Oznacza to, że uzyskano równowagę między ładunkami ujemnymi a dodatnimi w układzie, tym samym można założyć, że utworzyły się kompleksy surfaktant-DNA. Jednak zgodnie z założeniem, że w przedziale od -10 mV do +10mV, cząsteczki są traktowane jako neutralne, ale też niestabilne [189], dopiero powyżej wartości 10 mV przyjęto początek tworzenia stabilnych i trwałych kompleksów surfaktant-DNA. Dla lepszej wizualizacji na wykresach zależności potencjału zeta od wartości  $p/n$  zaznaczono przedział od -10 mV do 10 mV. Tym samym przyjęto  $p/n = 3$  za punkt początkowy tworzenia się kompleksów TRI\_N/DNA\_20kbpz.

Dalsze zwiększanie stężenia surfaktantu, a więc i ładunków dodatnich w układzie, sugerowałoby również dalszy wzrost  $\mu_{el}$ . Jednak zgodnie z zależnością (30) na wynik ruchliwości elektroforetycznej ma również wpływ wielkość kompleksu ( $\mu_{el} \sim 1/R_h$ ). Tym samym, aby utrzymać stałą  $\mu_{el}$  przy zwiększającym się wypadkowym ładunku elektrycznym ( $\mu_{el} \sim q$ ) dochodzi do powiększania się kompleksu w skutek dobudowywania kolejnych warstw surfaktantu lub lokalnego rozwijania się DNA [135]. Należy również pamiętać, że

wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w roztworze rośnie również lepkość tego roztworu, zgodnie z zależnością (32)  $\mu_{el} \sim 1/\eta$ , co również może kompensować wzrost ładunku elektrycznego układu. Prawdopodobnie obserwowana zależność  $\mu_{el}$  dla  $p/n > 3$  jest wypadkową powyższych hipotez.

Warto zauważyć, że rozkład potencjału  $\zeta$  dla roztworu DNA był mocno zróżnicowany (rysunek 39 C), co też potwierdza obecność wielu jego fragmentów o różnej długości. Jednak wyniki uzyskane dla kompleksów surfaktant/DNA, wykluczają obecność dwóch czy większej liczby populacji (nawet ewentualnych miceli surfaktantu, które nie połączyły się z cząsteczkami DNA), co sprawiłoby, że średni potencjał zeta dla kompleksu mógłby być zafałszowany. Wyniki rozkładu potencjału  $\zeta$  sugerują, że utworzone zostały kompleksy o względnie jednorodnej strukturze.

W środowisku lekko kwaśnym o pH 5 (rysunek 39 B) po dodaniu surfaktantu TRI\_N ( $p/n = 0,5$ ) do roztworu wysokomolekularnego DNA, potencjał zeta układu zbliżył się do wartości ok. 0 mV, a następnie z dalszym wzrostem stężenia surfaktantu potencjał zeta również wzrastał. Jest to spowodowane wiązaniem się cząsteczek związku powierzchniowoczynnego do nici DNA na całej ich długości i eksponowaniu dodatnich ładunków elektrycznych na zewnątrz powstałych agregatów, co więcej helisy DNA mogą ulegać lokalnym wydłużeniom, umożliwiając dołączanie kolejnych cząsteczek surfaktantów (ich interkalację między pary zasad DNA) [135]. Przy  $p/n = 1$  układ TRI\_N/DNA\_20kpz osiąga minimum -37 mV, co jest wynikiem prawdopodobnie tworzenia się specyficznych struktur o kationowym rdzeniu utworzonym z cząsteczek surfaktantów i dołączonych do niego nici kwasu nukleinowego, eksponujących na zewnątrz układu ujemne ładunki elektryczne grup fosforanowych, przez co wzrasta ujemny potencjał  $\zeta$  takiego agregatu - nawet poniżej wartości potencjału  $\zeta$  dla referencyjnego DNA [135]. Dla badanego układu zerowy potencjał  $\zeta$  osiągnięto przy  $p/n = 4$ . Natomiast za punkt tworzenia stabilnych kompleksów przyjęto  $p/n = 5$ .

Kompleksy TRI\_N/DNA\_20kpz w pH 5 wykazywały wyższy dodatni potencjał elektryczny niż kompleksy w pH 8, co może sugerować, że są stabilniejsze w tych warunkach. Informacja ta może następnie posłużyć do opracowania warunków ich przechowywania, zapewniających maksymalną trwałość.

W tabeli 6 zestawiono wyniki wartości współczynników  $p/n$  wymaganych do utworzenia stabilnych kompleksów wysokomolekularnego DNA i surfaktantu TRI\_N w różnym pH środowiska przy zastosowaniu niezależnych technik pomiarowych. W odniesieniu do wyników elektroforezy żelowej nie obserwuje się znaczących różnic między wynikami otrzymanymi techniką elektroforetycznego rozpraszania światła. Porównując wyniki dla dwóch wariantów pH środowiska, mimo różnic w przebiegu zależności potencjału zeta od  $p/n$ , nie obserwuje się wpływu pH środowiska na proces kompleksowania surfaktantów trimerycznych z kwasem nukleinowym.

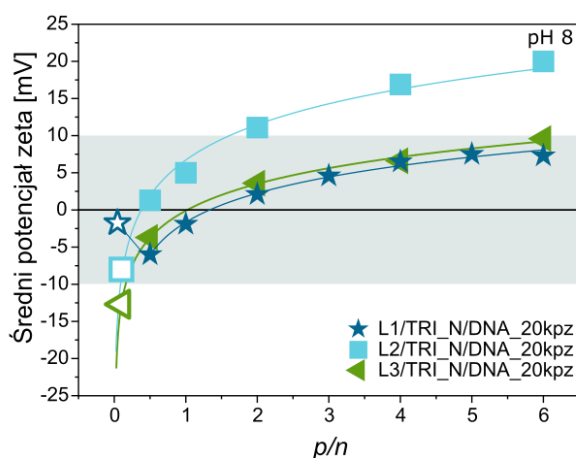
Tabela 6. Wartości  $p/n$  dla TRI\_N/DNA\_20kpz w zmiennym pH.

Metoda	pH	$p/n$
Elektroforetyczne rozpraszanie światła	5	5
	8	3
Elektroforeza żelowa	4	4
	6,8-7	4
	9	6

Ocenę stabilności układów na bazie surfaktantu TRI\_N, wysokomolekularnego DNA oraz formulacji lipidowych na podstawie uzyskanych wyników ELS zestawiono na rysunku 40.

Zeta potencjał neutralnych fosfolipidów takich jak DMPC, czy DPPC wynika z gromadzenia się w obszarze ich grup polarnych, jonów występujących w roztworze np. jeżeli są to jony chlorkowe - fosfolipid nabywać będzie ujemnego potencjału  $\zeta$  [241]. Wpływ na wypadkowy potencjał zeta liposomów ma również temperatura pomiaru np. w temperaturze poniżej temperatury głównej przemiany fazowej DPPC wykazuje dodatni potencjał zeta, natomiast w temperaturze poniżej  $T_m$  - ujemny potencjał  $\zeta$ . Nieznaczny wpływ na wartość potencjału zeta ma także forma liposomów (SUV, MLV, LUV - ang. *Large Unilamellar Vesicles* pęcherzyki jednowarstwowe o średnicy większej niż 100 nm, itp.) [242].

DMPC po dodaniu do DNA o silnie ujemnym potencjale  $\zeta$  (ok. -57 mV), znacząco neutralizował jego wartości do ok. -2 mV. W układzie z surfaktantem TRI\_N początkowo potencjał  $\zeta$  uległ obniżeniu (przy  $p/n = 0,5$ ), a następnie wzrósł i od  $p/n = 4$  utrzymywał się na stałym poziomie ok. 5 mV. Dla układów na bazie formulacji lipidowych dwuskładnikowych i trójskładnikowych wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu obserwowano ciągłą redukcję ujemnego potencjału  $\zeta$  kwasu nukleinowego. Kompleksy TRI\_N/L1/DNA\_20kbpz oraz TRI\_N/L3/DNA\_20kbpz osiągają zerowy potencjał  $\zeta$  wynoszą przy  $p/n > 1$ , dla oraz, natomiast TRI\_N/L2/DNA\_20kbpz przy  $p/n > 0,5$ . Co więcej jedynie dla układu z L2 można wyznaczyć punkt tworzenia stabilnych kompleksów dla  $p/n \geq 2$ .

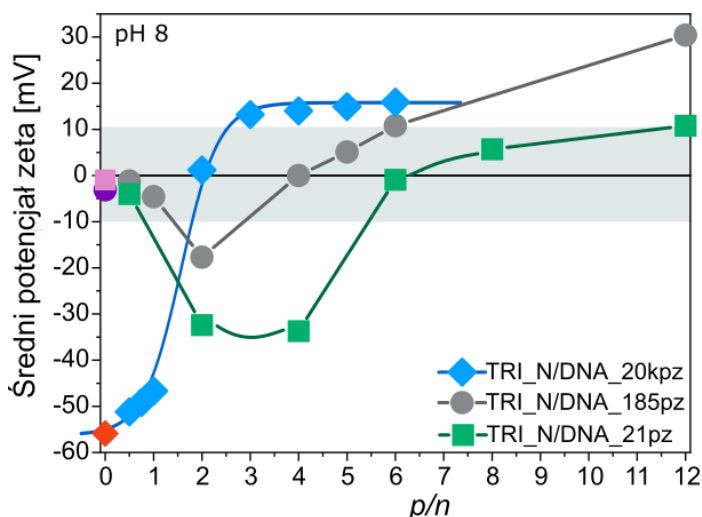


Rysunek 40. Potencjał zeta dla układów zawierających surfaktant TRI\_N, lipidy i DNA 20 kbpz. Dla lepszej wizualizacji potencjał zeta dla układów lipid/surfaktant bez DNA wyróżniono punktami bez wypełnienia.

Wpływ długości kwasu nukleinowego na proces kompleksowania na podstawie wyników ELS przeanalizowano dla układów na bazie surfaktantu TRI\_N (rysunek 41). Referencyjne DNA o długości 185 pz (fioletowe kółko) oraz 21 pz (różowy kwadrat) nie wykazywało tak silnie ujemnego potencjału zeta jak wysokomolekularne DNA (czerwony kwadrat) - wartość ich potencjału  $\zeta$  były bliskie 0 mV. Dla TRI\_N/DNA\_185pz oraz TRI\_N/DNA\_21pz po dodaniu surfaktantu wartości potencjału zeta początkowo uległa obniżeniu, a następnie odrastały. Punkty zerowego potencjału  $\zeta$  dla tych układów osiągnięto odpowiednio przy  $p/n = 4$  oraz  $p/n = 6$ , natomiast dla DNA 20kbpz  $p/n$  wynosiło 2. Wyniki ELS potwierdzają otrzymaną wcześniej zależność, że wraz ze wzrostem liczby par zasad kwasu nukleinowego maleje wartość  $p/n$ , a więc i stężenia surfaktantu wymaganego

do utworzenia kompleksu z DNA. Zestawiając wyniki ELS z wynikami elektroforezy żelowej nie obserwowano znaczących różnic.

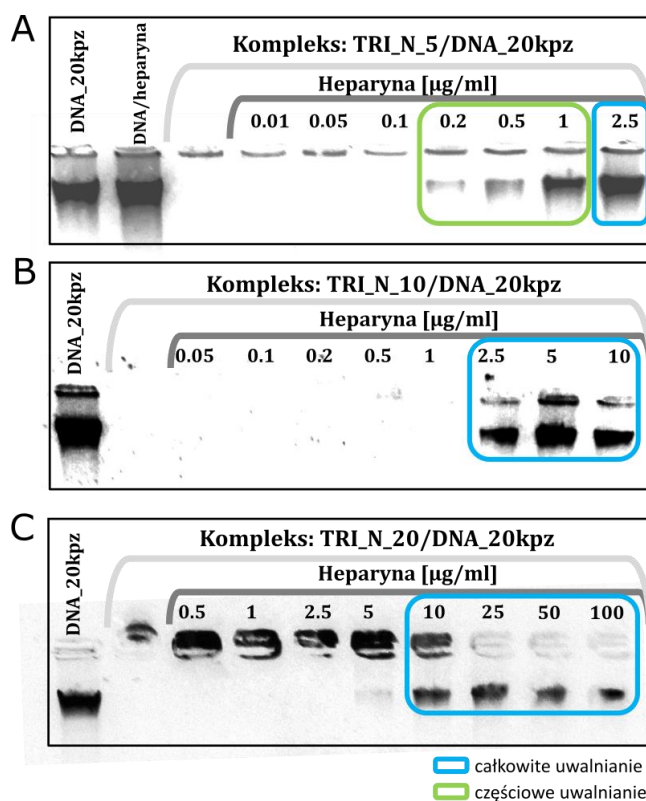
Trwałe kompleksy przy niskich wartościach  $p/n$  uzyskano dla TRI\_N i DNA 20 kpz. Natomiast kompleksy na bazie średniomolekularnego i niskomolekularnego DNA wymagały zastosowania wyższych stężeń surfaktantu, aby przekroczyć umowną granicę tworzenia stabilnych kompleksów tj. 10 mV. Kompleksy te wykazywały również tendencję dalszego, systematycznego wzrostu potencjału  $\zeta$  wraz ze wzrostem  $p/n$  układu.



Rysunek 41. Wpływ masy molekularnej kwasu nukleinowego na proces jego kompleksowania z surfaktantem TRI\_N.

### 6.2.2 Proces uwalniania materiału genetycznego

Proces uwalniania materiału genetycznego z lipopleksów jest kluczowy w odniesieniu do potencjalnych zastosowań układów w terapii genowej. Uwalnianie materiału genetycznego z kompleksu surfaktant-DNA przy zastosowaniu reakcji z heparyną, zostanie omówione na przykładzie układu TRI\_N/DNA\_20kpz przy  $p/n = 5$ . W pierwszej kieszonce żelu agarozowego przedstawionego na rysunku 42 A znajduje się referencyjny roztwór DNA. W kolejnej kieszonce umieszczono roztwór DNA z dodatkiem heparyny o stężeniu 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , aby wykluczyć ewentualne oddziaływania DNA-heparyna. Jak widać otrzymany obraz odpowiada obrazowi referencyjnego DNA, oznacza to, że nie występują interakcje heparyny z DNA, które mogłyby wpłynąć na wyniki eksperymentu. Następnie w trzeciej kieszonce znajduje się referencyjny kompleks TRI\_N/DNA\_20kpz o współczynniku  $p/n$  równym 5. Kompleks ten nie migruje w polu elektrycznym, dlatego nie jest widoczny na zdjęciu żelu agarozowego. W kolejnych kieszonkach żelu znajduje się kompleks TRI\_N/DNA\_20kpz ( $p/n = 5$ ) z heparyną dodaną w określonym stężeniu (od 0,01  $\mu\text{g/ml}$  do 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ).

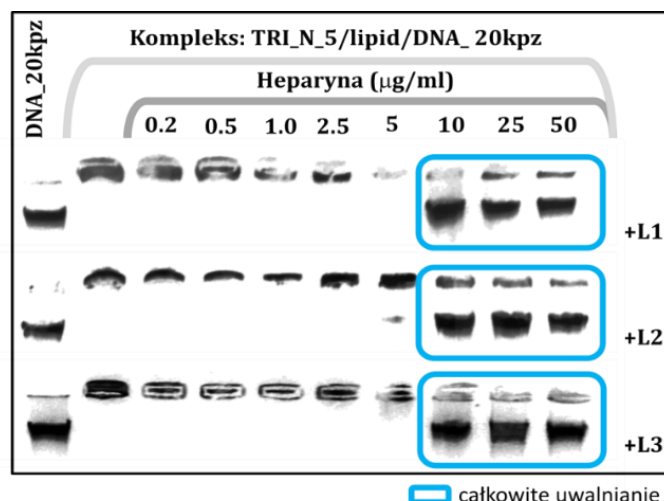


Rysunek 42. Proces uwalniania DNA o długości 20 kpz z kompleksu utworzonego na bazie surfaktantu TRI\_N przy  $p/n$  równym: 5 (A), 10 (B) oraz 20 (C).

Dla stężenia heparyny 0,2 µg/ml pojawia się jasny i cienki prążek (odpowiadający długim fragmentom DNA), co świadczy o częściowym uwolnieniu DNA z kompleksu z TRI\_N. Zwiększając stężenie heparyny obserwowano stopniowe zwiększanie się intensywności i wielkości prążka DNA. Aż do momentu, kiedy dochodzi do całkowitego uwolnienia DNA z kompleksu przy stężeniu heparyny równym 2,5 µg/ml – niezwiązane DNA migruje w polu elektrycznym, a jego obraz odpowiada referencyjnemu DNA. Tym samym najniższe stężenie heparyny wymagane do uwolnienia kwasu nukleinowego z kompleksu TRI\_N/DNA\_20kpz przy  $p/n = 5$  wynosi 2,5 µg/ml.

W przypadku, gdy stężenie surfaktantu będzie dwukrotnie wyższe, czyli przy  $p/n = 10$  (rysunek 42 B), otrzymane wyniki wskazują, że nie zmienia to najniższego wymaganego stężenia heparyny, przy którym dochodzi do uwolnienia DNA z kompleksu TRI\_N/DNA\_20kpz. Stężenie heparyny w tym układzie wynosi 2,5 µg/ml. Jednak dla kompleksów o  $p/n = 20$  (rysunek 42 C) należy zastosować 4-krotnie wyższe stężenie heparyny, czyli 10 µg/ml. Wyższe stężenie heparyny, oznacza większą konkurencję z DNA o cząsteczki surfaktantu w kompleksie. Tym samym zakłada się, że w takim przypadku wiązanie surfaktant-DNA jest silniejsze, ponieważ do jego rozerwania potrzebna jest większa ilość heparyny.

W przypadku układów z lipidami (rysunek 43), stężenie heparyny należy zwiększyć 4-krotnie w porównaniu do układów bez lipidów przy tej samej wartości  $p/n$ . Stężenie heparyny wymagane do uwolnienia DNA o długości 20 kpz z kompleksów na bazie surfaktantu TRI\_N i formulacji lipidowych (L1, L2, L3) wynosi 10 µg/ml. Na podstawie otrzymanych wyników utworzone kompleksy surfaktant/lipid/DNA można uznać za stabilniejsze niż kompleksy surfaktant/DNA. Należy również zaznaczyć, że na trwałość tych kompleksów nie ma wpływu rodzaj i skład zastosowanej mieszaniny fosfolipidów.



Rysunek 43. Proces uwalniania DNA o długości 20 kbp z kompleksu utworzonego na bazie surfaktantu TRI\_N przy  $p/n = 5$  i formułacji lipidowych: L1, L2, L3.

W tabeli 7 zestawiono minimalne stężenie heparyny wymagane do uwalniania kwasu nukleinowego o długości 20 kbp z kompleksów na bazie surfaktantów trimerycznych i mieszanin lipidów.

Tabela 7. Minimalne stężenie heparyny wymagane do uwolnienia DNA z kompleksów.

Kompleks		Stężenie heparyny [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
Surfaktant	$p/n$	-	L1	L2	L3
TRI_N	5	2,5	10	10	10
	10	2,5	10	10	10
	20	10	25	25	25
TRI_IMI	5	2,5	10	10	10
	10	2,5	10	10	10
	20	10	25	25	10
TRI_BEN	10	-	2,5	2,5	2,5
	20	1	10	10	10

### 6.2.3 Ocena zmian konformacyjnych DNA w kompleksie z surfaktantem

Zmiany konformacyjne kwasów nukleinowych w kompleksach z surfaktantami trimerycznymi były oceniane w odniesieniu do referencyjnego widma dichroizmu kołowego CD roztworów DNA o różnej długości: 21 pz, 185 pz lub 20 kpz. Wszystkie badane próbki były zawieszone w 5 mM buforze fosforanowym o pH 6,8, którego sygnał CD został odjęty od zarejestrowanych i prezentowanych widm CD.

Widma dichroizmu kołowego oraz położenia maksimum pasma dodatniego układów DNA i surfaktantu TRI\_N zestawiono na rysunku 44. Wszystkie badane kwasy nukleinowe pomimo różnic w ilości par zasad występowały w formie B-DNA. Wskazują na to charakterystyczne dla tej formy strukturalnej punkty widma CD, takie jak: minimum pasma ujemnego przy 245 nm, maksimum pasma dodatniego przy ok. 276 nm i przecięcie z osią odciętych przy około 260 nm.



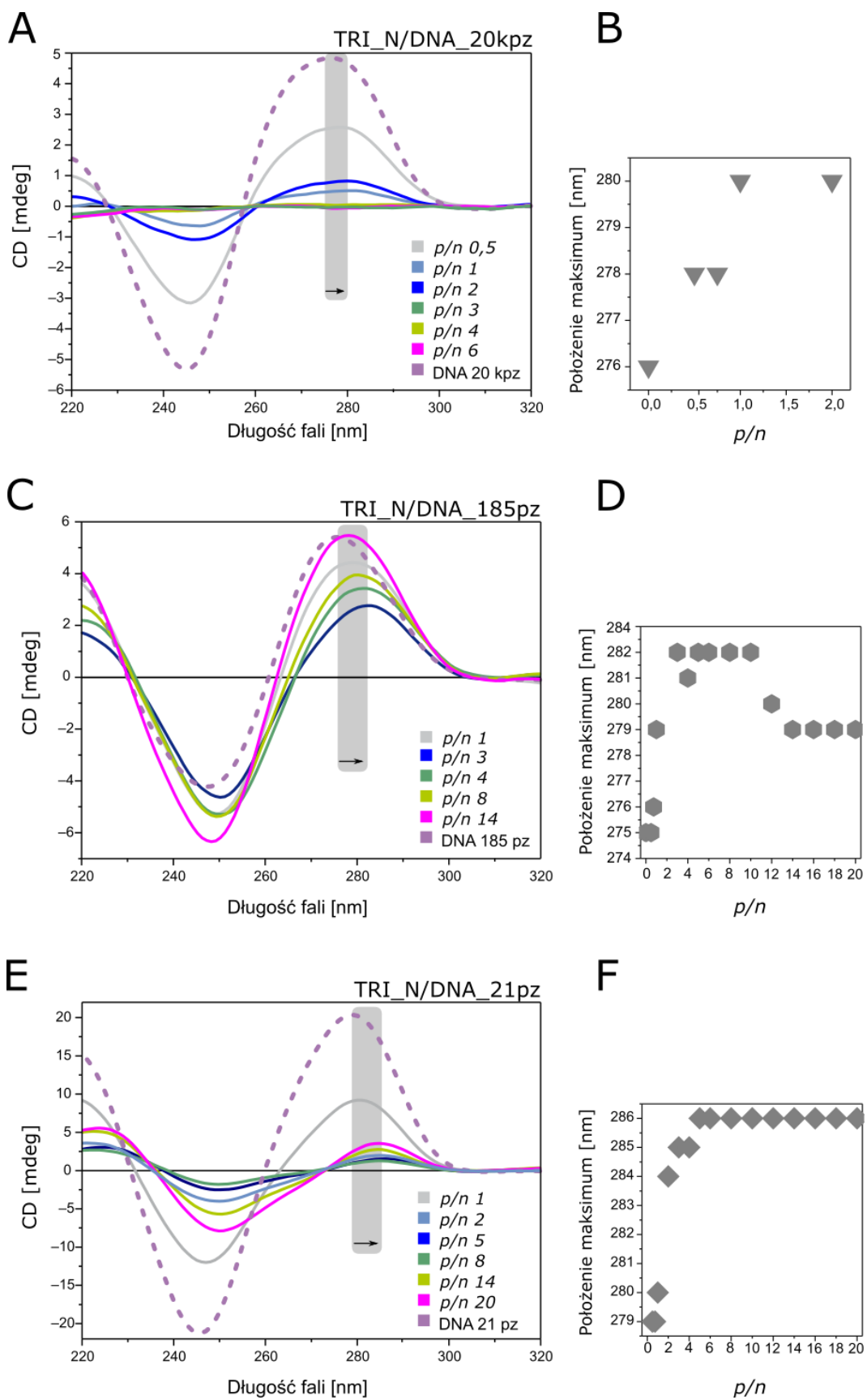
W przypadku układów surfaktant-DNA w widmach CD nie obserwowano zmian świadczących jednoznacznie o przemianie konformacyjnej DNA. Zmianie ulegała głównie intensywność pasm oraz obserwowano przesunięcie położenia ich maksimów.

Widma CD układów na bazie surfaktantu TRI\_N i wysokomolekularnego DNA (rysunek 44 A) przy różnych wartościach stosunku  $p/n$ , charakteryzowały się całkowitym zanikiem sygnału CD od wartości  $p/n=3$ . Zanik ten postępował stopniowo wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie: dla  $p/n$  równego 1 widmo osiągnęło intensywność równą 20% intensywności widma referencyjnego DNA, a dla  $p/n = 2$  wartość ta spadła do 10%. W przypadku niższych stężeń surfaktantu (a tym samym niższego  $p/n$ ) spadek ten wyniósł około 50% w stosunku do intensywności widma DNA. Obserwowano również przesunięcie się maksimum pasma dodatniego o 4 nm w kierunku dłuższych fal (rysunek 44 B).

Dla niskich wartości  $p/n$  (0,5 oraz 0,75) układów TRI\_N/DNA\_185pz (rysunek 44 C), intensywność widm CD maleje proporcjonalnie dla pasm dodatnich jak i ujemnych. Natomiast od wartości  $p/n=1$  obserwowano spadek o 30% intensywności pasma dodatniego, lecz intensywność pasma ujemnego wzrosła o 10% w stosunku do intensywności pasm referencyjnego roztworu DNA. Największy spadek intensywności pasma dodatniego wystąpił dla  $p/n=3$  i wyniósł ok. 40% wartości intensywności referencyjnej. Maksimum pasma dodatniego tego widma przypadło na 282 nm, czyli o 7 nm nastąpiło przesunięcie w kierunku wyższych wartości długości fali (rysunek 44 D). Od wartości  $p/n=4$  intensywność pasma dodatniego wzrasta, osiągając wartość zbliżoną do referencyjnej intensywności pasma dodatniego DNA. Największy przyrost intensywności pasma ujemnego (o 60%) zaobserwowano dla  $p/n=14$ . Położenie maksimum pasma dodatniego uległo zmianie i ustaliło się na poziomie 279 nm – odnotowano wzrost o 4 nm w stosunku do położenia maksimum pasma dodatniego DNA.

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku układów zawierających surfaktant TRI\_N i niskomolekularne DNA (rysunek 44 E), tj. dla niższych wartości  $p/n$  (0,5 – 1) intensywność widma spada w porównaniu do referencyjnego widma DNA o ok. 50%, natomiast położenie pasma dodatniego nie zmienia się. Od  $p/n > 2$  sygnał widma CD znacznie zmalał oraz przesunięciu uległo maksimum pasma dodatniego w kierunku wyższych długości fali. Największy zanik sygnału CD w stosunku do widma referencyjnego DNA obserwowano przy  $p/n=8$  (spadek intensywności pasma dodatniego o ok. 95%, i pasma ujemnego o ok. 90%). Dla  $p/n > 8$  intensywność widma ponownie wzrasta, ale nie osiąga intensywności odpowiadającej referencyjnemu DNA: pasmo dodatnie o intensywności około 40% względem referencyjnego widma DNA, pasmo ujemne – 15%. Maksimum pasma dodatniego przesuwa się do wartości 286 nm – wzrost o 7 nm w stosunku do maksimum pasma dodatniego DNA (rysunek 44 F). Co ciekawe, obserwowano punkt izodichroiczny przy 273 nm.

Widma CD dla układu zawierającego wysokomolekularne DNA i surfaktant TRI\_IMI zestawiono na rysunku 45 A. Dla niskich wartości  $p/n$  (0,5 oraz 0,75) intensywność widma nieznacznie spada w porównaniu do intensywności zarejestrowanej dla referencyjnego DNA. Od  $p/n=1$  intensywność widma znacząco się zmniejsza, a maksimum pasma dodatniego przesuwa się w kierunku większych długości fal, osiągając wartość 282 nm (przyrost o 6 nm) dla  $p/n > 3$  (rysunek 45 B). Dla  $p/n=6$  obserwowano zwiększenie intensywności pasma ujemnego widma.



Rysunek 44. Widma CD i położenia maksimum (szary obszar z zaznaczoną tendencją zmiany) dla układów surfaktantu TRI\_N i DNA o długości 20 kpz (A, B), 185 pz (C, D) oraz 21 pz (E, F).

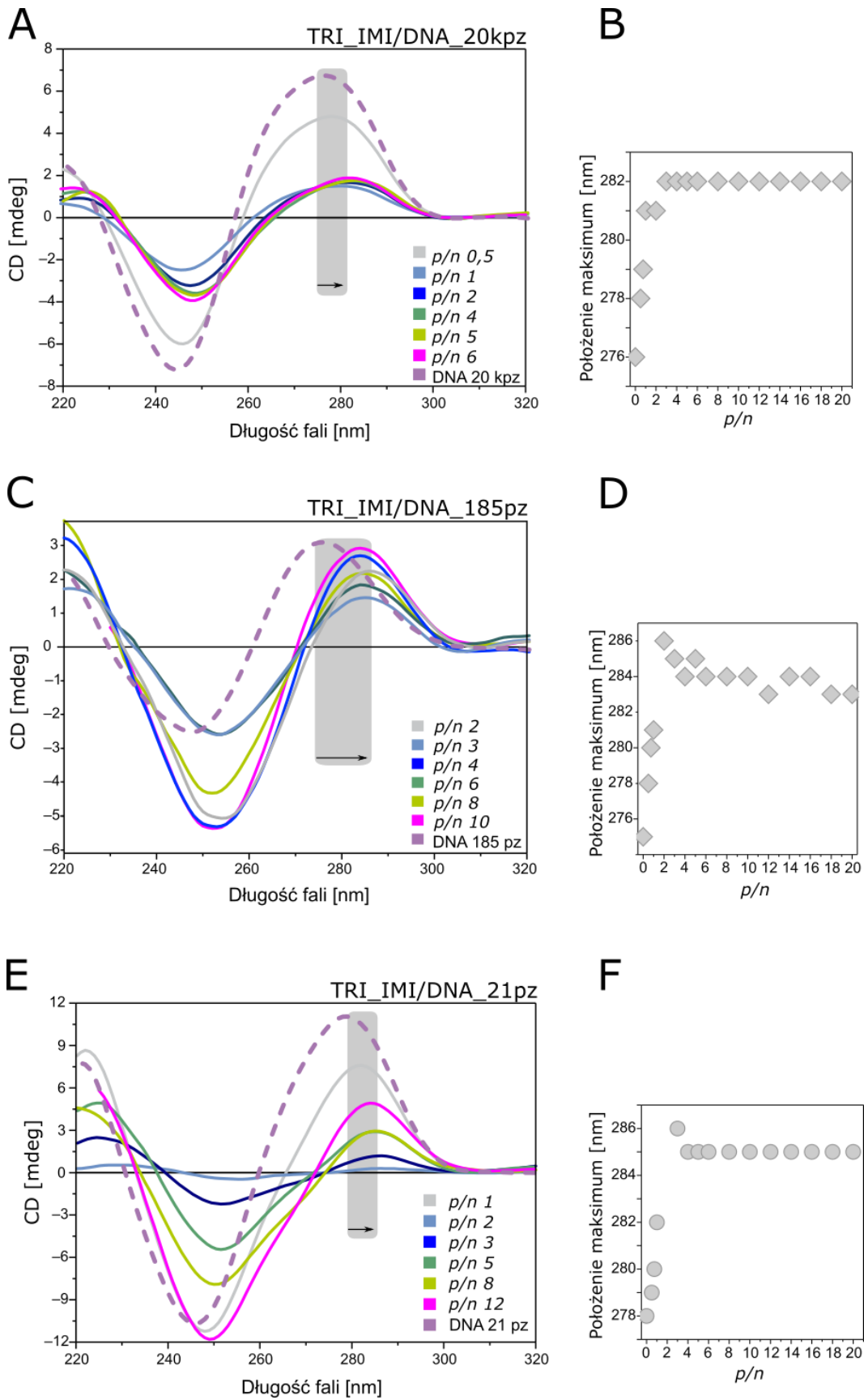
W przypadku układu surfaktantu TRI\_IMI i średniomolekularnego DNA (rysunek 45 C) obserwujemy zwiększenie intensywności pasma ujemnego w stosunku do intensywności pasma ujemnego widma referencyjnego DNA przy jednoczesnym nieznacznym spadku intensywności pasma dodatniego. Największą taką dysproporcję wykazuje widmo przy  $p/n = 4$ . Następnie intensywność pasma ujemnego spadała ( $p/n = 6$ ), aby ponownie zacząć odrastać (dla układów o  $p/n > 8$ ). Położenie maksimum pasma dodatniego przesuwa się o 11 nm (dla  $p/n > 2$ ) w kierunku wyższych długości fali tj. na pozycję 286 nm (rysunek 45 D). Zjawisko przesunięcia maksimum pasma dodatniego i zwiększenia intensywności pasma ujemnego, związane jest z silną chiralną kondensacją DNA w tzw. formę psi [243]. W rozważanych układach prawdopodobnie jest to wynik oddziaływania DNA z surfaktantem TRI\_IMI, który silnie upakuje cząsteczki kwasu nukleinowego.

Dla układów na bazie DNA o długości 21 pz i surfaktantu TRI\_IMI (rysunek 45 E) o  $p/n < 1$  obserwowano nieznaczny spadek intensywności widm dichroizmu kołowego, natomiast dla  $p/n = 2$  odnotowano praktycznie całkowity zanik sygnału CD. Zwiększając stężenie surfaktantu (dla systemów o  $p/n > 3$ ) intensywność pasma ujemnego wzrasta, ale jej wartość nie przekracza intensywności pasma ujemnego referencyjnego widma DNA. W przypadku  $p/n > 12$  pasmo ujemne ma większą intensywność niż pasmo DNA. Intensywność pasma dodatniego układów surfaktant/DNA nie odrasta proporcjonalnie do pasma ujemnego. Od  $p/n = 4$  maksimum pasma dodatniego przesuwa się do pozycji 286 nm, jest to przyrost o 8 nm w stosunku do widma referencyjnego DNA (rysunek 45 F).

Próbki układów na bazie surfaktantu TRI\_BEN i DNA dla niektórych stężeń były mętne, a w niektórych wytrącił się wyraźnie widoczny osad – oznacza to, że DNA zostało wyparte z roztworu. Pomiary w tych przypadkach nie dawały sygnału CD.

Widma CD dla układu DNA 20 kpz z surfaktantem TRI\_BEN zestawiono na rysunku 46 A. Dla  $p/n \leq 0,75$  intensywność widma nieznacznie spada w porównaniu do intensywności widma referencyjnego DNA. W przypadku układów o  $p/n$  równym 1 i 2 intensywność widma znacząco maleje, zachowując kształt charakterystyczny dla formy B-DNA. Maksimum pasma dodatniego (szary obszar na rysunku 46 A z zaznaczoną tendencją zmian) przesuwa się w kierunku większych długości fal, osiągając wartość 287 nm (przesunięcie o 10 nm) – zależność przedstawiono na rysunku 46 B. Dla układu o  $p/n = 3$  widmo ulega całkowitemu wypłaszczeniu. Sygnał CD układu TRI\_BEN/DNA\_20kpz o  $p/n \geq 4$  ponownie odrasta, jednak jego przebieg znacząco się różni od widma referencyjnego DNA. Widmo CD dla tego układu charakteryzuje się prawdopodobnie dwoma ekstremami: silnym pasmem ujemnym z minimum przy 253 nm oraz nieznacznym pasmem dodatnim przy 300 nm (zaznaczone pionową strzałką). Przebieg widma świadczy o silnej kondensacji DNA. Dla systemów o  $p/n$  od 6 do 14 przebieg widma był podobny z wyraźnym minimum przy 280 nm. Natomiast dla próbek o  $p/n$  równym 16 oraz 18 nie zarejestrowano widm CD, ponieważ nastąpiło wytrącenie DNA z roztworu, ale dla układu o  $p/n = 20$  ponownie uzyskano klarowny roztwór, jednak nie generował on sygnału CD.

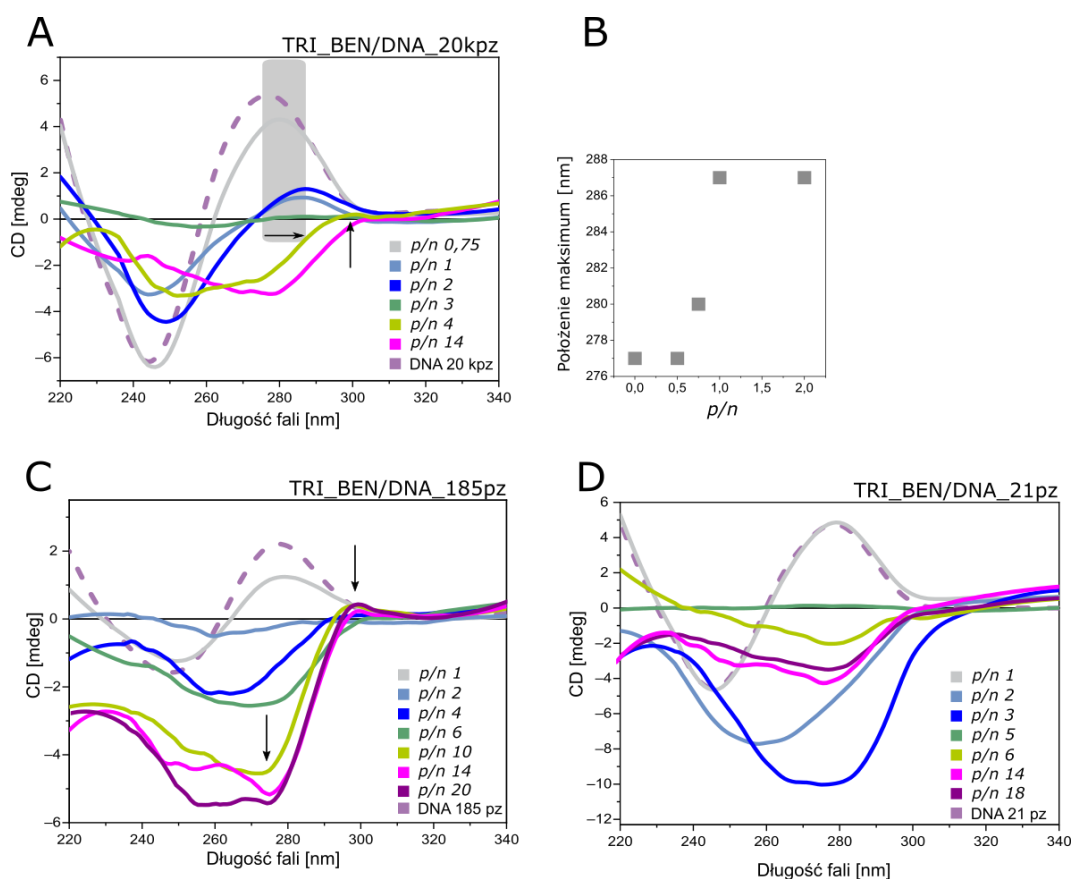
Dla układów na bazie surfaktantu TRI\_BEN z DNA o długości 185 pz (rysunek 46 C) zaobserwowano podobną zależność jak w przypadku układów z wysokomolekularnym DNA. Widma układów o niskich wartości  $p/n$  (0,5 - 1) wykazywały nieznacznie niższą intensywność od referencyjnego widma DNA. Dla TRI\_BEN/DNA\_185pz o  $p/n = 2$  widmo ulega całkowitemu wypłaszczeniu (przy zachowaniu jednorodności i klarowności próbki), a w próbce, gdzie  $p/n$  równe było 3 - DNA uległo wytrąceniu.



Rysunek 45. Widma CD i położenia maksimum (szary obszar z zaznaczoną tendencją zmiany) dla układów surfaktantu TRI\_IMI i DNA o długości 20 kpz (A, B), 185 pz (C, D) oraz 21 pz (E, F).

Dla układów o  $p/n \geq 4$  obserwowano wzrost intensywności pasma ujemnego, którego minimum przesuwa się z pozycji 265 nm (dla  $p/n = 4$ ) do 275 nm (dla  $p/n = 20$ ). Odnotowano również nieznaczne zmiany położenia maksimum, które ulega przesunięciu z 292 nm (dla  $p/n = 4$ ) do 299 nm (dla  $p/n = 20$ ). Dodatkowo należy zaznaczyć, że sygnał CD znacząco wzrósł dla próbek o wysokim stężeniu surfaktantu w układzie.

Widma TRI\_BEN/DNA 21pz (rysunek 46 D) dla  $p/n$  od 0,5 do 1 nie wykazywały znaczących zmian w stosunku do widma referencyjnego DNA. Dla układów o  $p/n$  równym 2 oraz 3 obserwujemy silne ujemne pasmo z minimum: przy 258 nm (dla  $p/n = 2$ ) i 274 nm (dla  $p/n = 3$ ), o intensywności odpowiednio ok. -8 mdeg oraz ok. -10 mdeg. Próbki o  $p/n$  4 i 5 były mętne i nie dawały sygnału CD. Od  $p/n \geq 6$  widmo CD ma jedno ujemne pasmo z minimum przy 278 nm, a jego pozycja nie ulega przesunięciu. Intensywność tego pasma rośnie wraz ze stężeniem surfaktantu w układzie osiągając najwyższą ujemną wartość dla  $p/n = 14$  (około -3,9 mdeg).

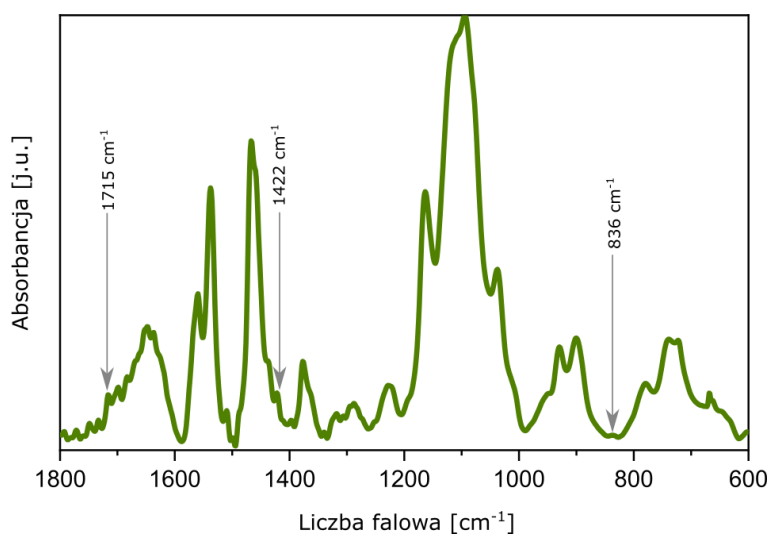


Rysunek 46. Widma CD układów TRI\_BEN i DNA o długości 20 kpz (A), 185 pz (C) i 21 pz (D) oraz zmiany położenia maksimum pasma dodatniego dla TRI\_BEN/DNA\_20kpz (B).

Wyznaczanie formy, jaką przyjmuje kwas nukleinowy w kompleksach z surfaktantami trimerycznymi na podstawie widma FTIR zostanie omówione na przykładzie układu surfaktantu TRI\_IMI i wysokomolekularnego DNA pozostających w stosunku  $p/n$  równym 20 (rysunek 47). Jest to reprezentatywny przykład, dla którego występuje zdecydowana większość charakterystycznych markerów danej struktury DNA i są one wyraźnie widoczne. Dla układu TRI\_IMI/DNA\_20kpz w widmie podczerwieni

można zlokalizować drgania: rozciągające  $\nu_{C=O}$ ,  $\nu_{C=N}$  pochodzące od guaniny i tyminy przy  $1715\text{ cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla deoksyrybozy przy  $1422\text{ cm}^{-1}$ , rozciągające reszt fosforanowych  $\nu_{PO_2^-}$  przy  $1226\text{ cm}^{-1}$ , oraz pasmo charakterystyczne przy  $836\text{ cm}^{-1}$ . Pozycje pasm odpowiadają markerom formy B-DNA.

W rozważanym przypadku pasma przy długości  $930\text{ cm}^{-1}$  i  $899\text{ cm}^{-1}$  mogą wskazywać na obecność innych form DNA (odpowiednio Z i A), co mogłoby wynikać z metodyki pomiaru - aby uzyskać dobry sygnał, próbki poddawane były lekkiemu osuszaniu. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi - suszone nieuwodnione DNA przyjmuje formę A-DNA [198]. Jednak nie obserwowano markerów od innych form DNA, przez co wykluczono możliwość współwystępowania kilku form strukturalnych kwasu nukleinowego [197].

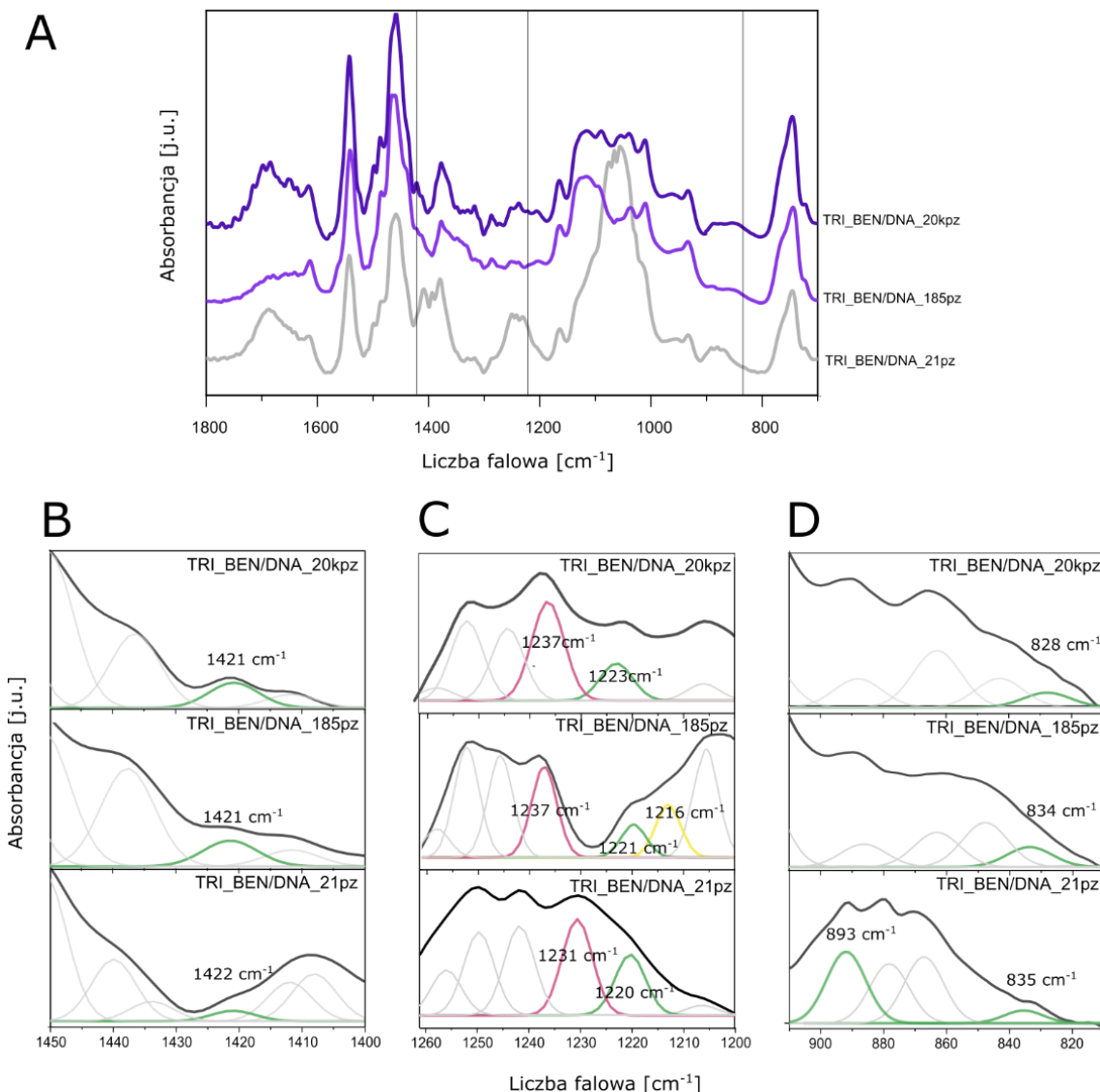


Rysunek 47. Widmo FTIR dla układu TRI\_IMI/DNA\_20kpz z zaznaczonymi markerami formy B-DNA.

W pozostałych przypadkach konieczne było zastosowanie w analizie drugiej pochodnej w celu zlokalizowania pasm absorpcyjnych markerów form DNA, ponieważ pasma od markerów konformacji kwasu nukleinowego pokrywały się z pasmami czystych surfaktantów. Wyniki zostaną omówione na przykładzie surfaktantu TRI\_BEN (rysunek 48 A) i DNA o różnej liczbie par zasad. O ile drgania deoksyrybozy charakterystyczne dla prawoskrętnej helisy (rysunek 48 B) oraz inne charakterystyczne markery (rysunek 48 D) występujące w obszarze  $800 - 900\text{ cm}^{-1}$  dość jednoznacznie wskazywały na strukturę B-DNA w tych układach, tak w przypadku analizy drgań rozciągających reszt fosforanowych (rysunek 48 C) tej jednoznaczności brakowało. Drgania  $\nu_{PO_2^-}$  są bardzo wrażliwe na stopień uwodnienia układu [198], a w wyniku łączenia się cząsteczek surfaktantu z kwasem nukleinowym dochodzi do zmian w otoczce hydratacyjnej tych grup, co potwierdzają wcześniejsze wyniki dichroizmu kołowego. Przez co identyfikację formy, jaką przyjmuje DNA w kompleksach na podstawie tych drgań – odrzucono.

Poza wilgotnością, stężeniem soli, wpływem przeciwjonów, pH środowiska, sekwencją zasad azotowych, istnieje wiele czynników wpływających na formę jaką przyjmuje DNA [198]. Ogromny wpływ na prawidłową interpretację wyników ma stopień złożoności badanych układów. Z tego względu zrezygnowano z wyznaczania formy DNA

w kompleksach DNA na bazie surfaktantów trimerycznych i formacji lipidowych powyższą metodą.



Rysunek 48. Widma FTIR zarejestrowane dla układów TRI\_BEN i DNA o różnej długości i przy  $p/n = 20$  (A) z uwzględnieniem drugich pochodnych obszarów pasm charakterystycznych dla drgań deoksyrybozy (B), reszt fosforanowych (C) oraz innych markerów (D). Pasma przypisane do konkretnych form oznaczono kolorystycznie: A-DNA pasma różowe, B-DNA zielone, Z-DNA żółte.

Poznanie formy, jaką przyjmuje DNA w rozważanych lipopleksach jest bardzo ważne z punktu widzenia dalszego wykorzystania ich jako nośników w terapii genowej. Niestety ze względu na brak możliwości pomiaru tych układów przy użyciu dichroizmu kołowego, zaproponowano metodę FTIR bazująca na lokalizowaniu charakterystycznych markerów określonych form DNA. Choć początkowo wiązano z nią duże nadzieje, to okazała się w przytoczonych przypadkach dość trudna i niedająca jednoznacznych wyników.

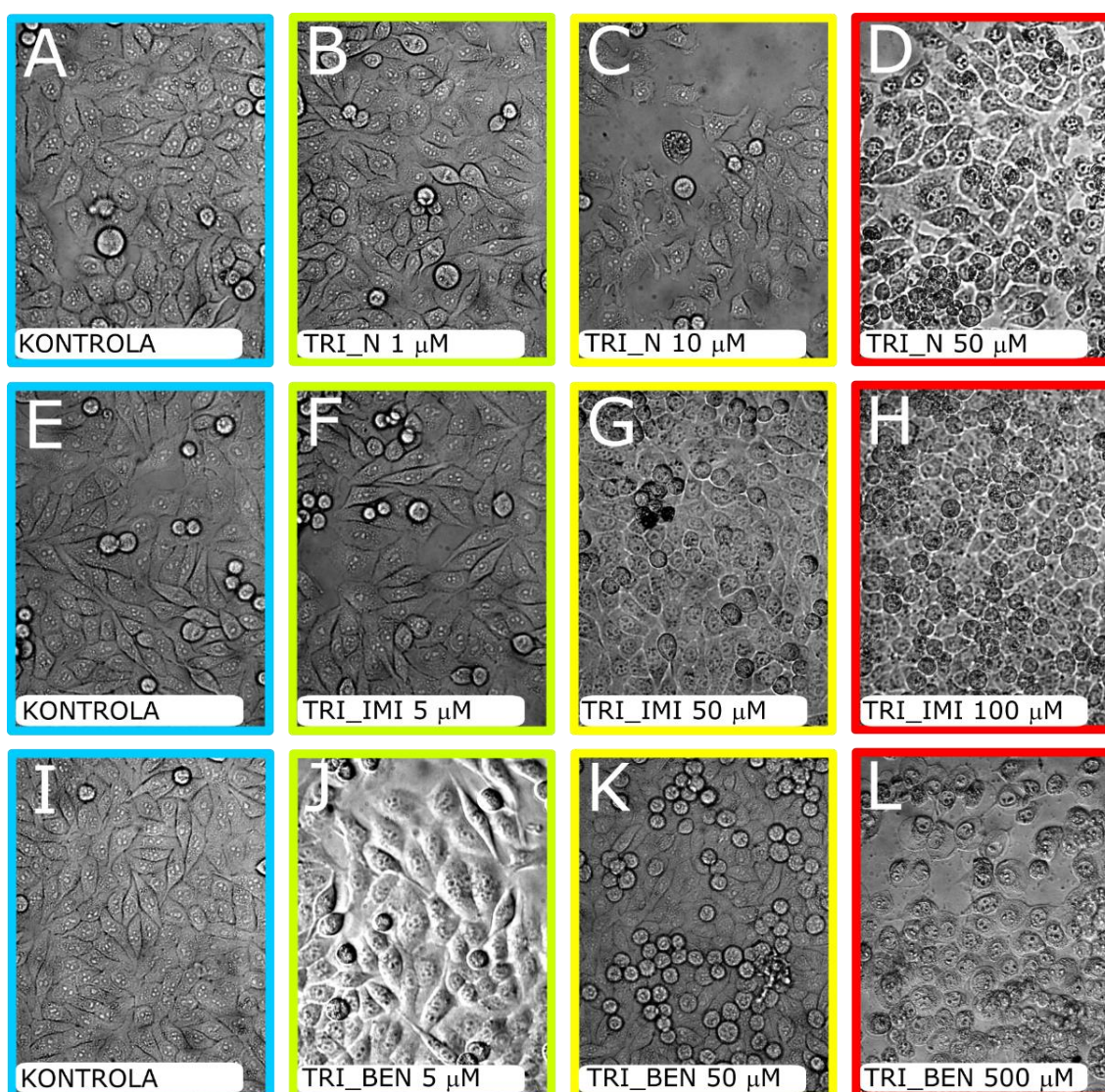
Niemniej we wszystkich badanych układach surfaktantów trimerycznych i DNA o różnej liczbie par zasad, kwas deoksyrybonukleinowy przyjmował strukturę natywnej prawoskrętnej helisy, czyli formę B-DNA.

#### 6.2.4 Cytotoksyczność surfaktantów i układów surfaktant/fosfolipid

Poznanie potencjalnych właściwości cytotoksycznych badanych w pracy surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych jest niezmiernie ważnym krokiem w dalszym projektowaniu nośników na ich bazie. Tak jak zostało to już wspomniane na początku rozdziału testy cytotoksyczności pozwalają określić możliwie najlepsze parametry lipopleksów zarówno pod względem maksymalnej efektywności jak i najniższej toksyczności.

Ocena toksyczności surfaktantów trimerycznych i układów surfaktant/fosfolipid została przeprowadzona na podstawie testu przeżywalności MTT oraz wybarwienia błękitem trypanu komórek nowotworowych linii HeLa.

Prawidłowe komórki HeLa mają wrzecionowaty kształt z dobrze widocznym jądrem, komórki ściśle do siebie przylegają, ale również do podłoża (rysunek 49 A, E, I). W kontroli widoczne są nieliczne martwe komórki, o okrągłym kształcie, luźno pływające w pożywce.



Rysunek 49. Zdjęcia mikroskopowe komórek HeLa poddane inkubacji z surfaktantami trimerycznymi o różnych stężeniach (powiększenie 200x).



Po dodaniu do dołków z komórkami, roztworów surfaktantów o niskim stężeniu, morfologia komórek się nie zmieniała (rysunek 49 B, F, J). Jednak dalsze zwiększanie stężenia surfaktantu w dołku, powodowało zmianę proporcji między żywymi a martwymi komórkami. W obrazie widoczne jest więcej kulistych struktur lub kształt potencjalnie żywych komórek staje się bardziej okrągły. Na zdjęciach przedstawionych na rysunkach 49 C, G, K warunki dobrano tak, aby stężenie było w granicach 50% przeżywalności –  $EC_{50}$ .

Gdy stężenie surfaktantu osiągnęło poziom krytyczny, powodujący 100% śmiertelność komórek, w obrazie mikroskopowym widoczne były jedynie okrągłe martwe komórki z „przerośniętymi” strukturami pęcherzykowymi w środku lub dochodziło do całkowitego wypłynięcia zawartości komórki na zewnątrz (rysunek 49 D, H, L). Próbkę z układami zawierającymi lipidy były nieprzezroczyste, przez co nie było niemożliwe uzyskanie zdjęć morfologii komórek.

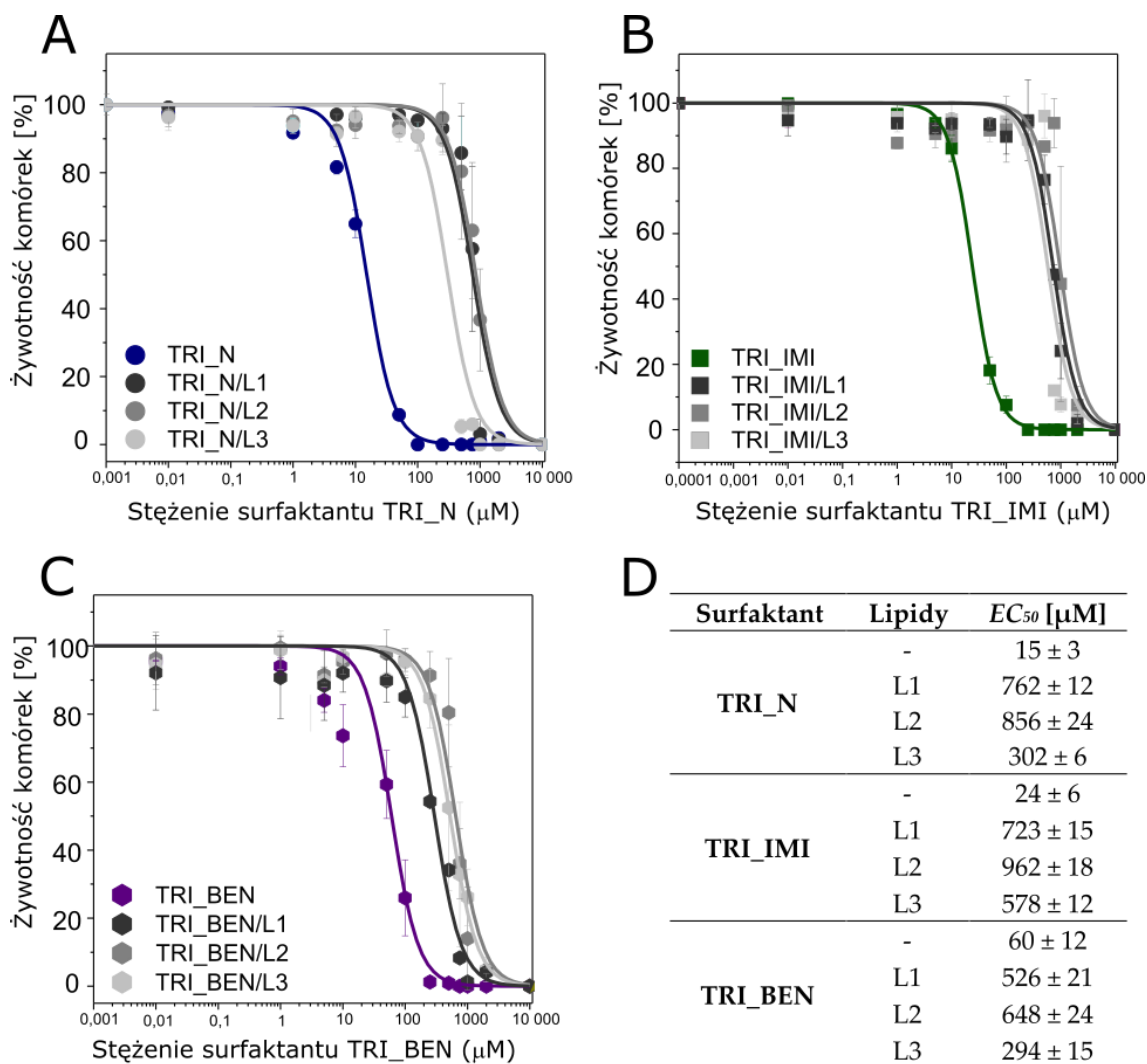
Żywotność komórek X HeLa wyznaczono z zależności (57), gdzie  $A_t$  to absorbancja mieszaniny DMEM/MTT/izopropanol,  $A_k$  to absorbancja dołka kontrolnego (komórki HeLa bez surfaktantu, przyjęto za 100% żywotności komórek), natomiast  $A_x$  to absorbancja w dołku, gdzie komórki były poddane działaniu surfaktantu o określonym stężeniu.

$$X[\%] = \frac{A_x - A_t}{A_k - A_t} \quad (57)$$

Wyniki testów MTT dla badanych surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych wraz z zestawieniem wyznaczonych wartości średniego stężenia efektywnego przedstawiono na rysunku 50. Otrzymane zależności wskazują, że śmiertelność komórek HeLa wzrastała wraz ze wzrostem stężenia surfaktantów trimerycznych. Wśród surfaktantów najniższą cytotoxycyzość indukuje surfaktant TRI\_BEN, dla którego  $EC_{50}$  równa się  $60 \pm 12 \mu\text{M}$ , natomiast najwyższą - TRI\_N z  $EC_{50} = 15 \pm 3 \mu\text{M}$ .

Badane fosfolipidy w stężeniu 1,5 mM nie wykazywały efektów cytotoxycyzości, nawet w dużo wyższych stężeniach niż założone w eksperymencie. Tym samym potwierdziło się założenie, że skoro naturalnie występują w błonach komórkowych nie są dla nich toksyczne.

Analizując wyniki przeżywalności komórek HeLa w obecności badanych układów zauważyć można, że dodatek lipidów znacząco zwiększa wartość  $EC_{50}$ , a szczególnie mieszanina lipidów DMPC/DOPE (L2), która podnosi jego wartość nawet ponad 50-krotnie dla surfaktantu TRI\_N. Spośród układów z lipidami najsłabiej efekty cytotoxycyzości surfaktantów redukowała mieszanina trójskładnikowa L3. Tendencja ta była zachowana dla wszystkich surfaktantów, jednak największy wzrost wartości  $EC_{50}$  wykazały układy bazie TRI\_N, a najmniejszy TRI\_BEN w obecności tych samych mieszanin lipidów np. w obecności L3 dla TRI\_N: 20-krotny spadek cytotoxycyzości, a dla TRI\_BEN: 5-krotny.



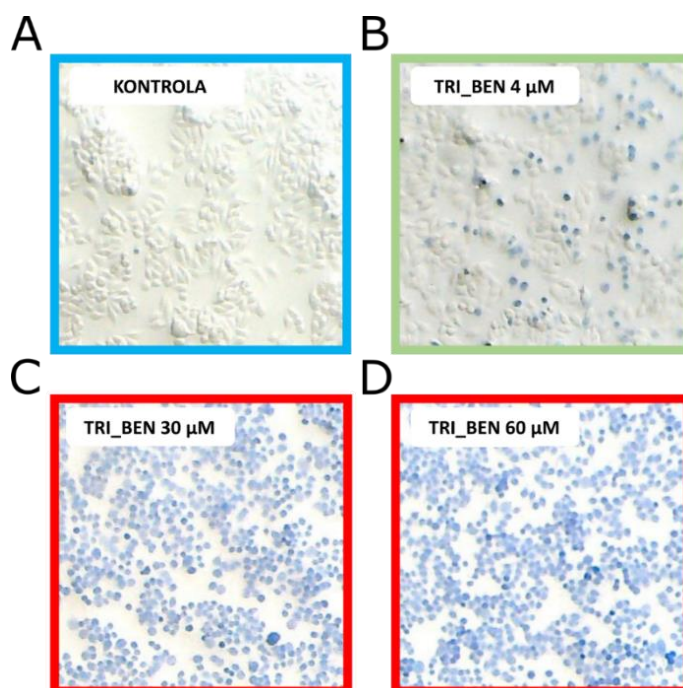
Rysunek 50. Wyniki testów przeżywalności MTT komórek HeLa dla układów na bazie lipidów i surfaktantów TRI\_N (A), TRI\_IMI (B) oraz TRI\_BEN (C) z zestawieniem wartości średniego stężenia efektywnego  $EC_{50}$  (D).

Kolejną metodą oceny cytotoksyczności substancji chemicznych jest wybarwienie komórek błękitem trypanu. Wybarwieniu ulegają martwe komórki, u których doszło do przerwania błony komórkowej, w wyniku czego barwnik może wnikać do środka komórki.

Zarówno w testach MTT, jak i w barwieniu błękitem trypanu, komórki były wystawione na ekspozycję czynnika toksycznego (surfaktantu) przez 1 godzinę. Niemniej wyniki z tych dwóch metod są różne.

Na przykładzie surfaktantu TRI\_BEN zostaną omówione wyniki cytotoksyczności przy zastosowaniu barwienia błękitem trypanu komórek HeLa. Zdjęcia zostały zrobione w 40-krotnym powiększeniu, jednak podłoże (polistyrenowa płytko wielodołkowa) znacząco obniżyło jakość zdjęć. W obrazie kontroli, czyli w dołku, do którego nie dodano roztworu surfaktantu, komórki HeLa mają prawidłową, charakterystyczną dla nich morfologię, czyli lekko wrzecionowaty kształt (rysunek 51 A). Komórki są przezroczyste, ponieważ nie zostały wybarwione przez błękit trypanu na skutek uszkodzenia błony komórkowej (w polu widzenia pojedyncze wybarwione na niebiesko martwe komórki). Po dodaniu już niewielkiej ilości surfaktantu TRI\_BEN (stężenie w dołku  $4 \mu\text{M}$ ), w polu

widzenia pojawiają się liczne niebiesko wybarwione komórki (rysunek 51 B). Komórki te mają kulisty kształt, co również sugeruje na występowanie niekorzystnych dla nich warunków, wskutek czego odklejają się od podłoża i zmienia się ich morfologia. Dalsze zwiększanie stężenia surfaktantu, powoduje pojawienie się zwiększonej populacji okrągłych niebieskich komórek, a w polu widzenia niewidoczne są żywe komórki o prawidłowej morfologii. Wzrost stężenia surfaktantu zwiększa populacje okrągłych wybarwionych komórek, a także zmienia się intensywność ich wybarwienia: dla wyższego stężenia komórki przyjmują granatowe zabarwienie (rysunek 51 D), podczas gdy dla niższych stężeń są bladoniebieskie (rysunek 51 C). Skrajnie wysokie stężenie (2000  $\mu\text{M}$ ) powodowało zlepianie się martwych komórek z wypłynięciem ich zawartości.

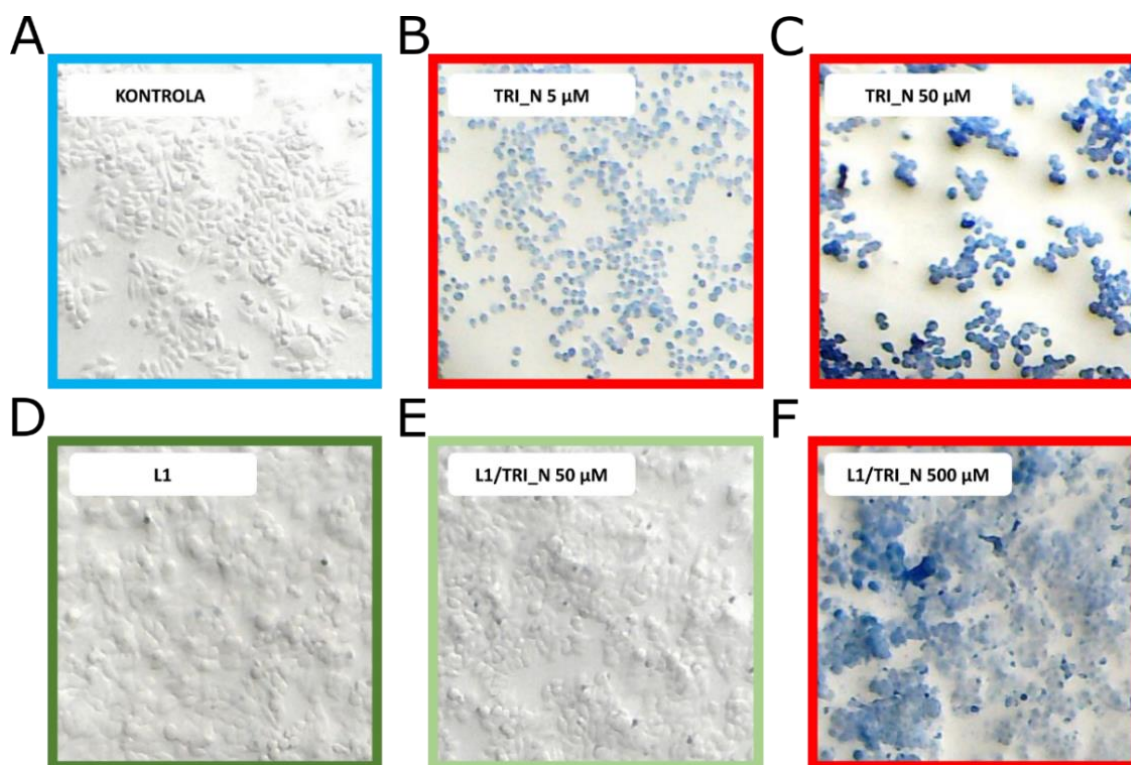


Rysunek 51. Wyniki wybarwiania komórek HeLa błękitem trypanu po godzinnej inkubacji z surfaktantem TRI\_BEN: A – kontrola, komórki bez surfaktantu, B, C, D – komórki w obecności surfaktantu o rosnącym stężeniu.

Na podstawie powyższych wyników dawkę  $EC_{50}$  dla surfaktantu TRI\_BEN można by oszacować na poziomie około 4  $\mu\text{M}$ . Jest to wynik dużo niższy niż otrzymane w teście MTT - 60  $\mu\text{M}$ . Oznacza to, że mogło dojść do dezintegracji błony komórkowej przy dużo niższym stężeniu surfaktantu, jednak nie doszło do uszkodzenia mitochondriów i komórka nadal mogła realizować swoje funkcje życiowe – tj. rozkładać MTT do formazanu.

Na rysunku 52 przedstawiono wyniki barwienia błękitu trypanu komórek HeLa poddanych inkubacji z surfaktantem TRI\_N oraz L1/TRI\_N o różnym stężeniu surfaktantu. W porównaniu do kontroli, gdzie wyraźnie widać zarys pojedynczych komórek (rysunek 52 A), w próbie z L1 o stężeniu 1,5 mM (rysunek 52 D) można przypuszczać, że dodane lipidy tworzą warstwę pokrywającą komórki. Niemniej czysty lipid jest nietoksyczny dla komórek, pozostają one żywe i nie wybarwiają się błękitem trypanu. W przypadku układów z surfaktantem, stężenie 50  $\mu\text{M}$  surfaktantu TRI\_N powoduje intensywne wybarwienie i śmierć komórek HeLa (rysunek 52 C). Jednak w obecności lipidu L1, to samo stężenie surfaktantu nie powoduje śmierci komórek, co więcej wydaje się dla

nich nietoksyczne, obserwowano nieliczne wybarwione komórki w polu widzenia (rysunek 52 E). Aby osiągnąć wysoką śmiertelność komórek w układzie z L1, należy znacząco zwiększyć stężenie surfaktantu TRI\_N tj. do 500  $\mu\text{M}$  (rysunek 52 F).



Rysunek 52. Wyniki wybarwiania komórek HeLa błękitem trypanu po godzinnej inkubacji z surfaktantem TRI\_N: A – kontrola, brak czynnika toksycznego, B, C – próbki z surfaktantem TRI\_N o stężeniu odpowiednio 5  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  bez L1, komórki podane inkubacji z DMPC (D) oraz DMPC i surfaktantem TRI\_N o stężeniu 50  $\mu\text{M}$  (E) i 500  $\mu\text{M}$  (F).

W tabeli 8 zestawiono wyniki wybarwiania błękitem trypanu komórek HeLa po godzinnej inkubacji ze wszystkimi badanymi systemami. Jedynie w dla surfaktantu TRI\_BEN o stężeniu 4  $\mu\text{M}$  (rysunek 51 B) możliwa była obserwacji punktu 50% przeżywalności. W pozostałych badanych przypadkach, przy bardzo niskich stężeniach surfaktantu wszystkie komórki były żywe, a po przekroczeniu pewnego poziomu - wszystkie były wybarwione, czyli prawdopodobnie martwe. Podobnie jak w wynikach testu MTT – najmniej toksyczny dla komórek okazał się surfaktant TRI\_BEN. Dodatek lipidów powodował znaczny spadek cytotoxyczności surfaktantów trimerycznych, z tym że nie miał znaczenia ani rodzaj surfaktantu ani skład mieszanki lipidowej.

Tabela 8. Śmiertelność komórek HeLa wybarwianych błękitem trypanu po godzinnej inkubacji z lipopleksami: x – 100% śmiertelność komórek.

System	Stężenie surfaktantu w dołku [ $\mu\text{M}$ ]							
	0	4	30	60	100	500	1000	2000
TRI_N		x	x	x	x	x	x	x
TRI_IMI		x	x	x	x	x	x	x
TRI_BEN			x	x	x	x	x	x
Surfaktant/lipidy					x	x	x	x

## 6.3 Ocena właściwości fizycznych układów surfaktant/fosfolipid i surfaktant/lipid/DNA

---

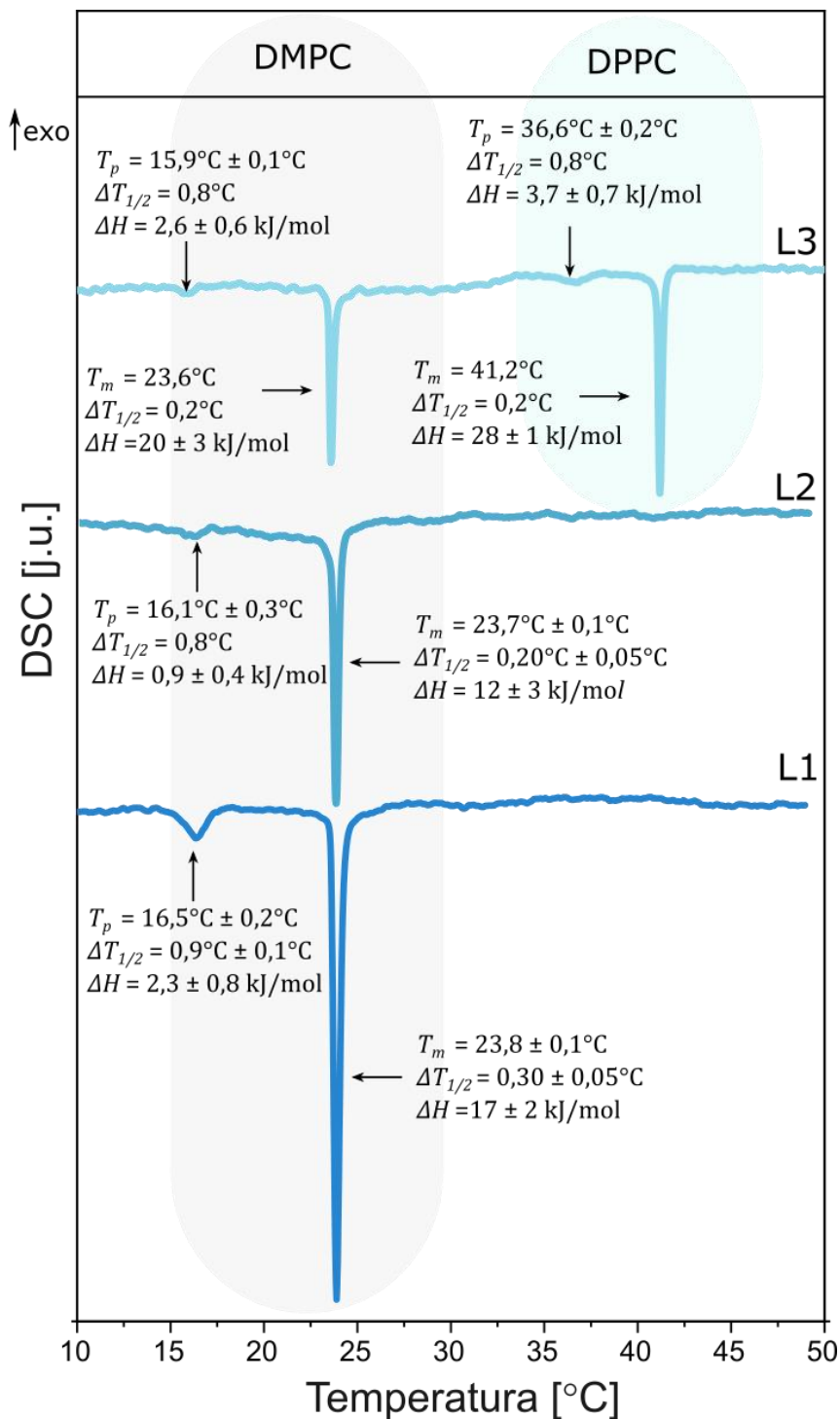
Kalorymetria DSC oraz spektroskopia FTIR pozwoliły wyznaczyć parametry termodynamiczne przemian fazowych badanych formułacji fosfolipidowych (rozdział 6.3.1) oraz wpływu na nie surfaktantów trimerycznych (rozdział 6.3.2), a także dodatku DNA (rozdział 6.3.3).

### 6.3.1 Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach fosfolipidowych

W pierwszej kolejności zostały przeprowadzone pomiary DSC, które umożliwiły oszacowanie zakresu temperaturowego przemian fazowych badanych formułacji lipidowych oraz zbadanie wpływu zmiany składu fosfolipidów tj. dodatku DOPE i DPPC na strukturę DMPC. Na podstawie otrzymanych termogramów (rysunek 53) wyznaczono temperatury przejść fazowych i bezwzględną wartość entalpii tych przemian. Wszystkie obserwowane przemiany fazowe fosfolipidów są procesami endotermicznymi pierwszego rodzaju, oznacza to, że zmiana parametrów fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej zachodzi w sposób skokowy, na skutek pobrania przez układ energii ciepłej z zewnątrz.

Wszystkie próbki były przygotowane w roztworach wody deuterowanej. Ciężka woda powoduje niewielki wzrost temperatury i entalpii przemiany fazowej fosfolipidów, z tym że dla przemiany  $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$  zmiany te są większe w stosunku do głównego przejścia fazowego  $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$  [244], np. dla DMPC dla przedprzejścia temperatura  $T_p$  rośnie z 11°C (dla H<sub>2</sub>O) do 15°C (dla D<sub>2</sub>O), czyli zmiana jest aż o 4°C, ale temperatura przemiany  $T_m$  zmienia się już stosunkowo niewiele (o 0,7°C) – z 23,3°C (dla H<sub>2</sub>O) do 24°C (dla D<sub>2</sub>O) [245]. Zjawisko to związane jest z właściwościami oddziaływań hydrofobowych, jakie powstają w wodzie zwykłej i ciężkiej, w środowisku wody deuterowanej wiązania te są energetycznie silniejsze niż w H<sub>2</sub>O, co przekłada się na zmianę oddziaływań między cząsteczkami substancji rozpuszczonej [244].

Dla układu L1, czyli roztworu DMPC o stężeniu 150 mM (10% w/v roztwór) obserwowano przedprzejście z fazy żelowej do fazy żelowej pofalowanej ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ) oraz główną przemianę związaną z przejściem między fazą żelową pofalowaną a fazą ciekłokrystaliczną ( $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ ) – rysunek 53. Zakres temperaturowy przedprzejścia mieści się od 15,5°C ( $T_{onset}$ ) do 17,0°C ( $T_{end}$ ), a jego szerokość połówkowa ( $\Delta T_{1/2}$ ) wynosi  $0,9 \pm 0,1$ °C. Maksimum przemiany przedprzejścia ( $T_p$ ) odnotowano w temperaturze  $16,5 \pm 0,2$ °C. Przemiana ta charakteryzowała się stosunkowo małą wartością entalpii –  $\Delta H = 2,3 \pm 0,8$  kJ/mol. Przemiana główna dla L1 osiąga wartość maksymalną przy  $T_m$  równej  $23,9 \pm 0,1$ °C. Zakres temperaturowy przemiany głównej to 23,7°C – 24,2°C ( $T_{onset} - T_{end}$ ), szerokość połówkowa  $0,30 \pm 0,05$ °C, a bezwzględna wartość entalpii wynosi  $\Delta H = 17,0 \pm 2,0$  kJ/mol. Powyższe wyniki uzyskano z uśrednienia wyników dla 6 pomiarów kalorymetrycznych. Otrzymane wyniki odpowiadają wartościom literaturowym [154].



Rysunek 53. Krzywe DSC badanych formułacji lipidowych z wyznaczonymi parametrami ich przemian fazowych. Dla lepszego porównania krzywe DSC zostały rozsunięte.

Dla układu L2 obserwowano przemiany fazowe w charakterystycznych temperaturach dla przemian czystego roztworu DMPC. Uzyskano przedprzejsie w zakresie od  $15,6^\circ\text{C}$  do  $17,1^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{onset}} - T_{\text{end}}$ ) o maksimum przy  $16,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ , szerokości połówkowej  $0,8^\circ\text{C}$  oraz o entalpii  $0,6 \pm 0,4$  kJ/mol. Przemiana główna przypadała na zakres temperaturowy  $23,6 - 24,0^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{onset}} - T_{\text{end}}$ ) i osiągała wartość maksymalną przy  $T_m = 23,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Szerokość połówkowa przemiany głównej dla DMPC w układzie L2

wynosiła  $0,20 \pm 0,05^\circ\text{C}$ , a entalpia  $10 \pm 3$  kJ/mol. Otrzymane wyniki parametrów przemian fazowych to uśredniona wartość dla 4 pomiarów.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że obecność DOPE w układzie wpływa na przemiany fazowe DMPC - choć nie zmienia się znacząco wartość  $T_m$  (zaledwie o  $0,1^\circ\text{C}$ ), to odnotowano znacznie zmniejszenie się entalpii przemiany głównej (o 7 kJ/mol, tj. ok. 40%) w porównaniu do L1. Jednocześnie w L2 występuje nieznaczne zmniejszenie szerokości połówkowej przemiany fazowej (o  $0,1^\circ\text{C}$ ) w stosunku do roztworu DMPC bez dodatku. Choć entalpia przedprzejścia dla DMPC w układzie L2 obarczona jest dużą niepewnością, można zauważyć znaczący jej spadek (o 1,7 kJ/mol, tj. prawie o 70%) w stosunku do L1. Po dodaniu do układu DOPE odnotowano również przesunięcie  $T_p$  w kierunku niższych temperatur (o  $0,4^\circ\text{C}$ ).

W przypadku mieszaniny lipidów L3 obserwuje się dwie główne przemiany fazowe oraz dwa przedprzejścia w temperaturach typowych dla DMPC oraz DPPC. W niższych temperaturach odnotowano przedprzejście (o parametrach:  $T_p = 15,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_{1/2} = 0,8^\circ\text{C}$  i  $\Delta H = 0,9 \pm 0,4$  kJ/mol) oraz przemianę główną (o parametrach:  $T_m = 23,7^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_{1/2} = 0,2^\circ\text{C}$  i  $\Delta H = 7,5 \pm 2$  kJ/mol) odpowiadające przejściom fazowym DMPC. W wyższych temperaturach natomiast obserwowano przemiany charakterystyczne dla DPPC, przedprzejście z fazy żelowej do fazy żelowej pofalowanej ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ) o parametrach -  $T_p = 36,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_{1/2} = 1,2^\circ\text{C}$  i  $\Delta H = 1,5 \pm 0,5$  kJ/mol; oraz główną przemianę, związaną z przejściem między fazą żelową pofalowaną a fazą ciekłokrystaliczną ( $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ ) o parametrach:  $T_m = 41,3^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_{1/2} = 0,3^\circ\text{C}$  i  $\Delta H = 10,3 \pm 1$  kJ/mol (wyniki z uśrednienia 4 krzywych kalorymetrycznych). Otrzymane wartości temperatur przemian fazowych opowiadają wartościom literaturowym [246]. Co ciekawe, przy dłuższym przechowywaniu roztworów DPPC w obniżonej temperaturze (ok.  $0^\circ\text{C}$ ) w okolicach temperatury ok.  $18^\circ\text{C}$  można zaobserwować subprzejście z fazy subżelowej pochylonej do fazy żelowej pochylonej ( $L_c \rightarrow L_{\beta'}$ ) [247]. W badanych układach nie odnotowano tej przemiany, ponieważ próbki były przechowywane w wyższych temperaturach (ok.  $4 - 8^\circ\text{C}$ ).

W układzie L3 dodatek DPPC pogłębia zmiany w parametrach przemian fazowych DMPC w stosunku do układu wyłącznie z DOPE (układ L2). Oznacza to, że przedprzejście i przemiana główna przesuwają się w kierunku niższych temperatur (odpowiednio o  $0,6^\circ\text{C}$  i o  $0,2^\circ\text{C}$ ), a także spada bezwzględna wartość entalpii przemiany głównej (o 9,5 kJ/mol, tj. o 56%) w stosunku do roztworu DMPC (L1). Odnosząc wartości parametrów fazowych DMPC w L3 do L2 obserwowano spadek temperatur przemian fazowych: dla przedprzejścia  $\Delta T_p = 0,2^\circ\text{C}$ , dla głównej przemiany  $\Delta T_m = 0,1^\circ\text{C}$  oraz spadek entalpii przemiany głównej o 2,5 kJ/mol - tj. o 25%. Szerokość połówkowa przemiany głównej wynosi  $0,2^\circ\text{C}$ , a przedprzejścia  $0,8^\circ\text{C}$  (podobnie jak w L2). Entalpia przedprzejścia wykazuje duży rozrzut wartości i trudno odnieść jej wartość do L2, ale mimo to jej spadek w stosunku do L1 jest zauważalny - o ponad 60%.

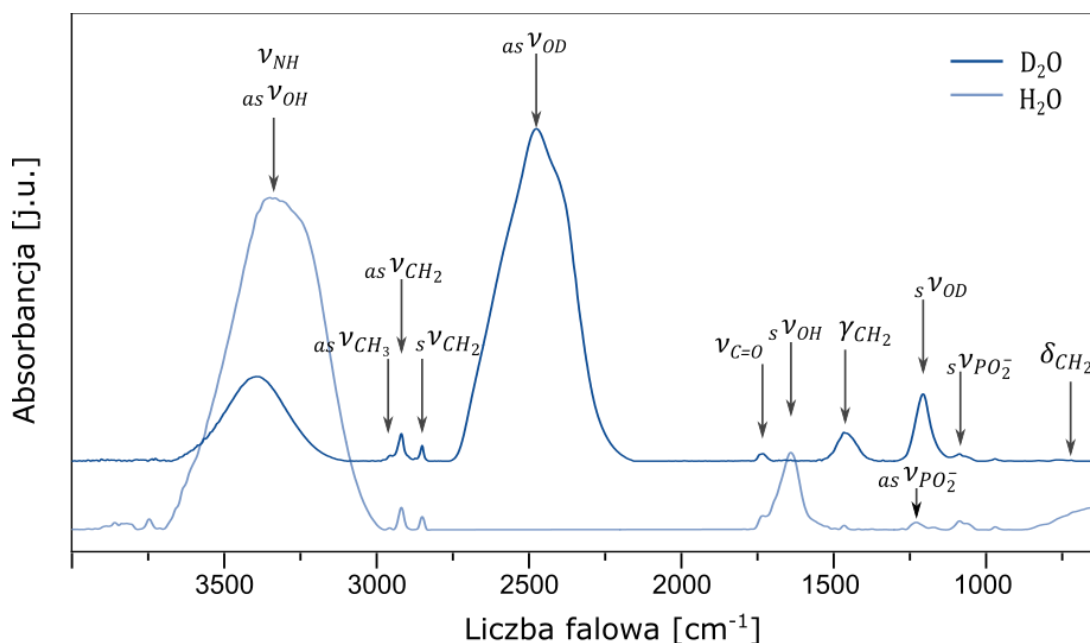
Na podstawie otrzymanych krzywych kalorymetrycznych możliwa jest również ocena stopnia kooperatywności przemian. W tym przypadku często wykorzystywanym parametrem jest liczba kooperatywności -  $CN$  (ang. *cooperative number*), jest to liczba cząsteczek lipidu, które przeszły przemianę fazową. Tak jak zostało to wcześniej wspomniane ocena kooperatywności przemiany fazowej zależna jest od szybkości skanowania np. dla DPPC przy szybkości skanowania równej  $1^\circ\text{C}/\text{min}$   $CN$  wynosi około 130 [208], natomiast przy szybkości  $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$  -  $CN$  wynosi 512 [248]. Aby wyliczyć  $CN$  przemiany, dla układów lipidowych stosuje się przybliżenie zależności  $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$  w postaci [249]:

$$CN = \frac{6,9 \cdot T_m^2}{\Delta T_{1/2} \cdot \Delta H_{cal}} \quad (58)$$

gdzie:  $T_m$  i  $\Delta T_{1/2}$  wyrażone są w [K], a  $\Delta H_{cal}$  wyrażona jest w [cal/mol], natomiast  $CN$  jest wartością bezwymiarową (patrz równanie (38)).

Dla układu L1 przemiana główna DMPC charakteryzowała się dużą kooperatywnością, może na to wskazywać wysoka wartość  $CN = 500 \pm 60$  (szybkość skanowania  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ) oraz wąska szerokość połówkowa ( $T_{1/2} = 0,30 \pm 0,05^\circ\text{C}$ ). W obecności DOPE (układ L2), zakres głównej przemiany DMPC uległ niewielkiemu zwężeniu ( $T_{1/2} = 0,20 \pm 0,05^\circ\text{C}$ ), entalpia przemiany znacząco zmalała, a wartość  $CN$  w tym przypadku była znacząco wyższa i wynosiła  $1060 \pm 260$ , co może wskazywać na wzrost kooperatywności przemiany. W przypadku układu L3 przemiana główna DMPC charakteryzowała się liczbą kooperatywności równą  $640 \pm 90$  i  $T_{1/2} = 0,2^\circ\text{C}$ , dla DPPC -  $CN$  osiągnęło wartość  $510 \pm 30$  przy  $T_{1/2} = 0,3^\circ\text{C}$ . Analizując liczbę kooperatywności i szerokość połówkową dla przemiany głównej DMPC w każdym z trzech mieszanin lipidów wyniki mogą wskazywać na wzrost kooperatywności przemiany DMPC w obecności różnorodnych fosfolipidów.

Po ocenie zakresu temperaturowego przemian fazowych badanych układów lipidowych przeprowadzono analizę widm podczerwieni. Na rysunku 54 zestawiono widmo FTIR dla DMPC w roztworze wodnym oraz w roztworze wody deuterowanej z zaznaczeniem pas charakterystycznych. Zastosowanie dwóch rozpuszczalników pozwala na analizę istotnych pasm, które mogą być przysłonięte przez widmo jednego z rozpuszczalników, np. drgania rozciągające grup karbonylowych  $\text{C}=\text{O}$  fosfolipidów są częściowo przysłonięte pasmem drgań symetrycznych grup hydroksylowych  $\text{OH}$  lub drgania asymetryczne grup fosforanowych  $\text{PO}_2^-$  - są całkowicie niewidoczne, gdy rozpuszczalnikiem jest woda deuterowana.

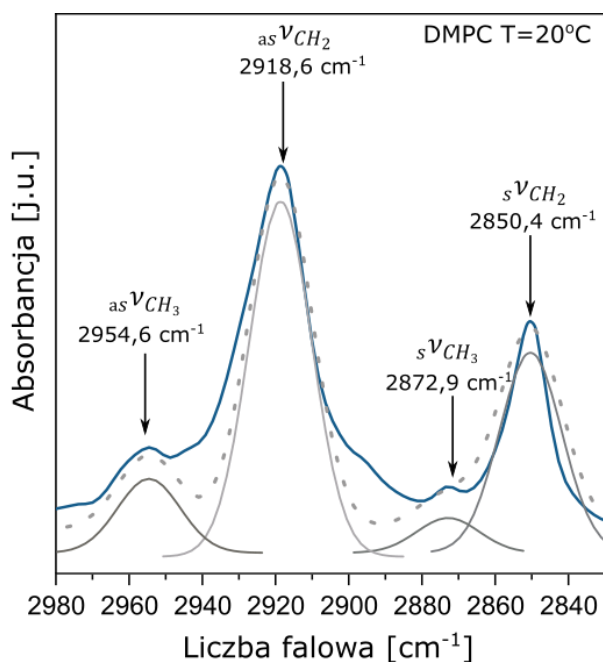


Rysunek 54. Widma FTIR roztworu DMPC zarejestrowane w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  w obecności różnych rozpuszczalników ( $\text{H}_2\text{O}$  oraz  $\text{D}_2\text{O}$ ) z zaznaczeniem drgań charakterystycznych. Widma FTIR rozsunięto dla lepszego porównania.



Po zarejestrowaniu widm FTIR rozważanych układów lipidowych w zadanych temperaturach, w pierwszej kolejności poddano analizie obszar 2980 - 2840  $\text{cm}^{-1}$ , odpowiadający drganiom rozciągającym grup metylenowych i metylowych łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów. Na podstawie zmian w położeniu maksimum tych pasm, możliwe jest wyznaczenie temperatury głównej przemiany i zakresu temperaturowego przejścia z konformacji *trans* na *gauche* łańcuchów alkilowych. Przejście to wiąże się z przesunięciem częstości pasm drgań w kierunku wyższych liczb falowych.

Na rysunku 55 przedstawiono widmo FTIR w zakresie drgań grup metylowych i metylenowych dla roztworu DMPC wraz z przykładową dekonwolucją pasm składowych oraz wyznaczonymi położeniami maksimum.



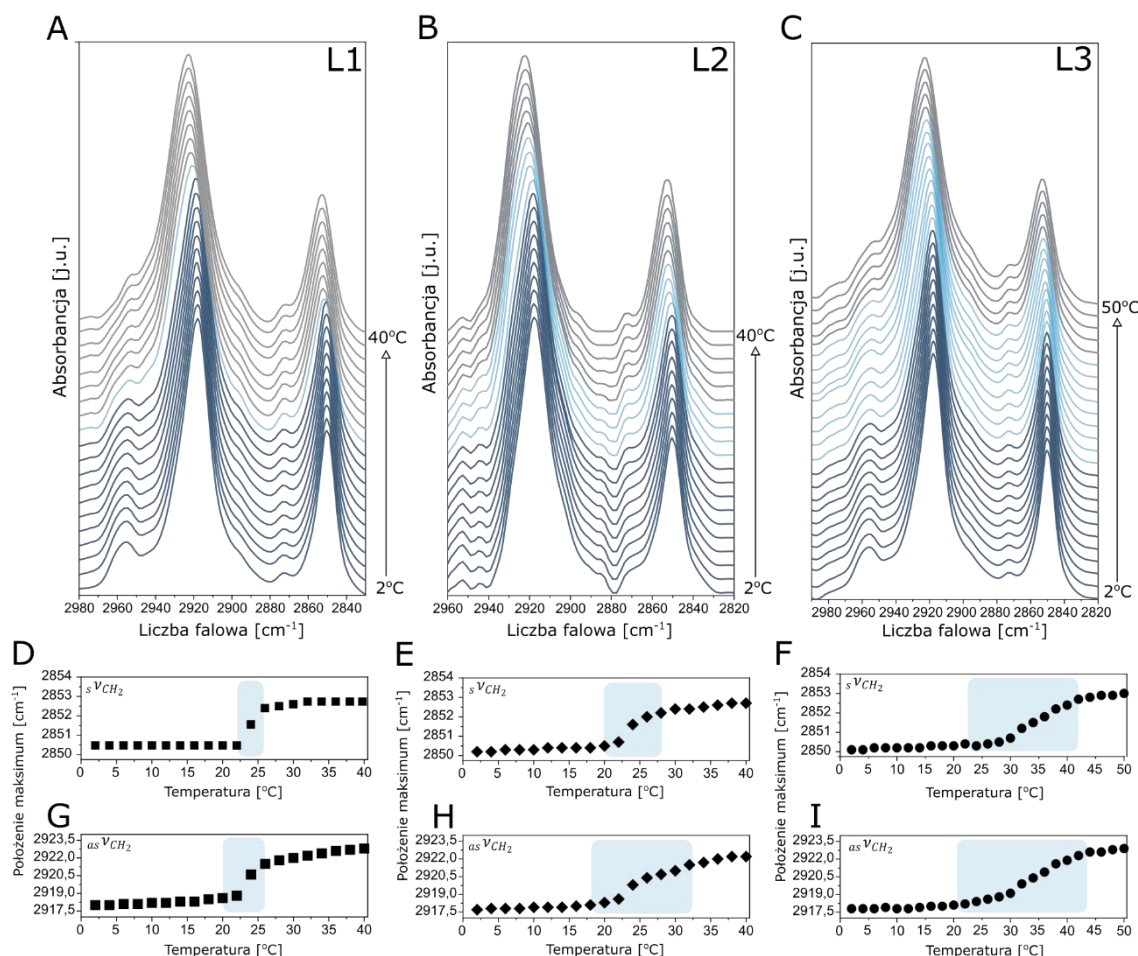
Rysunek 55. Widmo FTIR w zakresie drgań rozciągających grup metylowych i metylenowych roztworu DMPC wraz z dekonwolucją pasm (szare linie) oraz dopasowaniem (przerywana linia).

W analogiczny sposób wyznaczono położenia maksimum pasm drgań grup metylenowych w pozostałych badanych temperaturach. Choć każde z czterech pasm w tym obszarze w założeniu dostarcza tych samych informacji na temat przemiany fazowej fosfolipidu, to jakość uzyskanych wyników może być dyskusyjna. Odczyt położenia maksimum pasm drgań grup metylowych ze względu na małą intensywność obarczony jest dużym błędem, dlatego w pracy nie zawarto analizy tych pasm. Z kolei na pasmo asymetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych  $as\nu_{CH_2} \sim 2920 \text{ cm}^{-1}$  może wpływać rezonans Fermiego z pierwszym nadtonem drgań nożycowych grup metylenowych [209]. Z powyższych względów w pracy skupiono się głównie na analizie pików pochodzących od symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych  $s\nu_{CH_2}$ , które są zlokalizowane  $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ .

Na rysunku 56 przedstawiono widma FTIR badanych układów fosfolipidowych w różnych temperaturach wraz z wyznaczonymi położeniami maksimum pasm

od symetrycznych i asymetrycznych drgań rozciągających grup CH<sub>2</sub>. Ponadto zaznaczono zakres przemiany fazowej.

Dla roztworu DMPC (rysunek 56 A) wraz ze wzrostem temperatury od 2°C do 40°C obserwowano skokową zmianę wartości liczby falowej w maksimum pasma drań grup metylenowych:  $s\nu_{CH_2}$  o 2,2 cm<sup>-1</sup>, a  $as\nu_{CH_2}$  o 4,8 cm<sup>-1</sup>. Zwiększyła się również szerokość połówkowa pasm np.  $s\nu_{CH_2}$  z 16 cm<sup>-1</sup> (dla 2°C) do 21 cm<sup>-1</sup> (dla 40°C), co świadczy o wzroście nieuporządkowania upakowania łańcuchów alkilowych fosfolipidu [250]. W celu lepszej wizualizacji zmian na rysunku 57 zestawieniowo widma FTIR zarejestrowane w temperaturze 2°C i 40°C tj. przed i po przemianie fazowej.

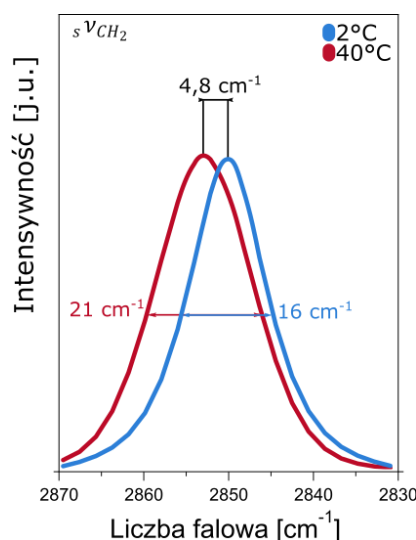


Rysunek 56. Drgania rozciągające grup metylenowych układów fosfolipidowych: A, B, C – widma FTIR, pozycja maksimum drgań symetrycznych (D, E, F) i asymetrycznych (G, H, I) odpowiednio dla L1, L2, L3. Niebieskie prostokąty oznaczają zakres temperaturowy przemiany. Widma FTIR dla układu przed przemianą fazową oznaczono kolorem granatowym, po przemianie fazowej szarym i w zakresie temperatur przemiany niebieskim. Dla lepszej wizualizacji zmian widma FTIR na rysunkach A, B, C rozsunęto.

Bazując na zmianach położenia maksimum pasma symetrycznych drgań grup metylenowych (rysunek 56 D) można stwierdzić, że do temperatury 22°C łańcuchy alkilowe DMPC pozostają w konformacji *trans*, natomiast dalszy wzrost temperatury (krok pomiarowy co 2°C) powoduje częściowe (w temperaturze 24°C), a następnie całkowite (od 26°C) przejście do konformacji *gauche*, co przekłada się na wzrost płynności błony lipidowej [251]. Zakres przemiany zawierał się w wąskim przedziale od 22 - 26°C, przez

co można uznać, że przemiana jest wysoce kooperatywna. Jeżeli przyjąć jako temperaturę przemiany głównej środek zakresu temperaturowego przemiany fazowej, w rozważanym przypadku  $T_m$  wyniesie  $24^\circ\text{C}$ , co pokrywa się z wynikami uzyskanymi przy pomocy kalorymetrii DSC, gdzie temperatura przemiany głównej wynosiła  $23,9^\circ\text{C}$ .

Asymetryczne drgania rozciągające grup  $\text{CH}_2$  nie wykazują tak wyraźnej skokowej zmiany położenia maksimum w zależności od temperatury (rysunek 56 G) jak drgania symetryczne  ${}_s\nu_{\text{CH}_2}$ , co więcej wydaje się, że przemiana rozpoczyna się w niższych temperaturach (zapewne wpływ rezonansu Fermiego). Jednak oszacowana wartość  $T_m$  w tym przypadku wynosi również  $24^\circ\text{C}$ , co odpowiada uzyskanym wcześniej wynikom.



Rysunek 57. Porównanie pasma symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych DMPC w temperaturze  $2^\circ\text{C}$  i  $40^\circ\text{C}$ .

Na skutek dodania DOPE do roztworu DMPC (układ L2, rysunek 56 B, E, H) zmiany położenia maksimum drgań pasm grup  $\text{CH}_2$  są bardziej płynne – brak skokowej zmiany wartości. Choć różnica w położeniu pasm ( ${}_s\nu_{\text{CH}_2}$  przesunięte o  $2,5\text{ cm}^{-1}$ ,  ${}_{as}\nu_{\text{CH}_2}$  o  $4,4\text{ cm}^{-1}$  w zakresie temperatur  $2 - 40^\circ\text{C}$ ) jest porównywalna z wynikami uzyskanymi dla referencyjnego roztworu DMPC, to duże znaczenie w tym przypadku ma ich szerokość połówkowa. Podobnie jak w przypadku roztworu DMPC szerokość połówkowa zwiększa się wraz z temperaturą np.  ${}_s\nu_{\text{CH}_2}$  z ok.  $22\text{ cm}^{-1}$  (dla  $2^\circ\text{C}$ ) do  $24\text{ cm}^{-1}$  (dla  $40^\circ\text{C}$ ). Choć zmiany te są mniejsze niż dla L1 (jedynie  $2\text{ cm}^{-1}$  różnicy w danym zakresie temperaturowym), to warto zaznaczyć, że w niższych temperaturach szerokość połówkowa pasma jest zdecydowanie wyższa niż dla czystego roztworu DMPC (o  $5\text{ cm}^{-1}$ ) może to sugerować, że dodatek DOPE zwiększa płynność dwuwarstwy w niższych temperaturach, indukując spadek uporządkowania łańcuchów alkilowych fosfolipidów. W porównaniu do L1, poszerzeniu ulega zakres temperaturowy przemiany – tj. do temperatury  $20^\circ\text{C}$  łańcuchy alkilowe fosfolipidów pozostają w uporządkowanej konformacji *trans*, a wraz ze wzrostem temperatury stopniowo zmieniają konformację w *gauche*, od  $30^\circ\text{C}$  można przyjąć, że zaszła całkowita przemiana i wszystkie cząsteczki fosfolipidu znajdują się w fazie ciekłokrystalicznej. Za wartość temperatury przemiany głównej można przyjąć  $24^\circ\text{C}$ , co odpowiada wynikom uzyskanym na podstawie DSC.

Jednak w przeciwieństwie do termogramów DSC, gdzie szerokość połówkowa maksimum przemiany głównej malała i sugerowała wzrost kooperatywności przemiany

fazowej - poszerzenie zakresu przejścia *trans-gauche* świadczy o spadku kooperatywności. Wyniki dla  $as\nu_{CH_2}$  potwierdzają powyższe hipotezy, dodatkowo sugerują jeszcze większy spadek stopnia kooperatywności przemiany i rozpoczęcie przemiany w niższych temperaturach.

Powyższe wyniki pozwalają, więc wysnuć hipotezę, że mieszanina składająca się z trzech rodzajów fosfolipidów (L3) ze względu na różnorodności w budowie cząsteczek, będzie charakteryzowała się zwiększonym stopniem nieuporządkowania układu, a tym samym dwuwarstwa z nich zbudowana będzie bardziej płynna. – rysunek 56 C, F, I Podobnie jak w poprzednich układach wraz ze wzrostem temperatury obserwowano wzrost częstości drgań grup  $CH_2$ , zmiana ta przebiegała stopniowo: od 24°C do 42°C obserwowano intensywny wzrost, natomiast powyżej 42°C przyrost ten zwalnia. Różnica w położeniu pasm drgań w zakresie temperatur 2 - 50°C wynosi dla  $s\nu_{CH_2}$  - 2,8  $cm^{-1}$ , a dla  $as\nu_{CH_2}$  - 4,8  $cm^{-1}$ . Zakres obserwowanej przemiany zawiera się w przedziale 24 - 42°C. Przypuszczać można, że będą obserwowane dwie przemiany – DMPC ok. 24°C oraz DPPC ok. 40°C. Jednak od 24°C, czyli w momencie gdy DMPC przechodzi przemianę aż po 42°C, czyli po przemianie DPPC, obserwowana jest ciągły wzrost liczby falowej maksimum pasma drgań grup metylenowych. Prawdopodobnie ze względu na równe proporcje w układzie DMPC i DPPC obserwuje się nałożenie obu przemian między 24-40°C tj. w niższych temperaturach zwiększa się udział cząsteczek DMPC o konformacji *gauche*, a zbliżając się do temperatury przemiany DPPC – zwiększa się udział cząsteczek DPPC o konformacji *gauche*. Powyżej 40°C dla wszystkich cząsteczek zarówno DMPC i DPPC zaszła przemiana fazowa. Szerokość połówkowa pasma  $s\nu_{CH_2}$  zmienia się z 15  $cm^{-1}$  (dla 2°C) do 20  $cm^{-1}$  (dla 40°C), a następnie osiąga wartość 21  $cm^{-1}$  (dla 50°C). Nieznacznie mniejsze wartości uzyskane niż dla czystego DMPC, mogłyby sugerować, że łańcuchy alkilowe są mniej nieuporządkowane w układzie L3.

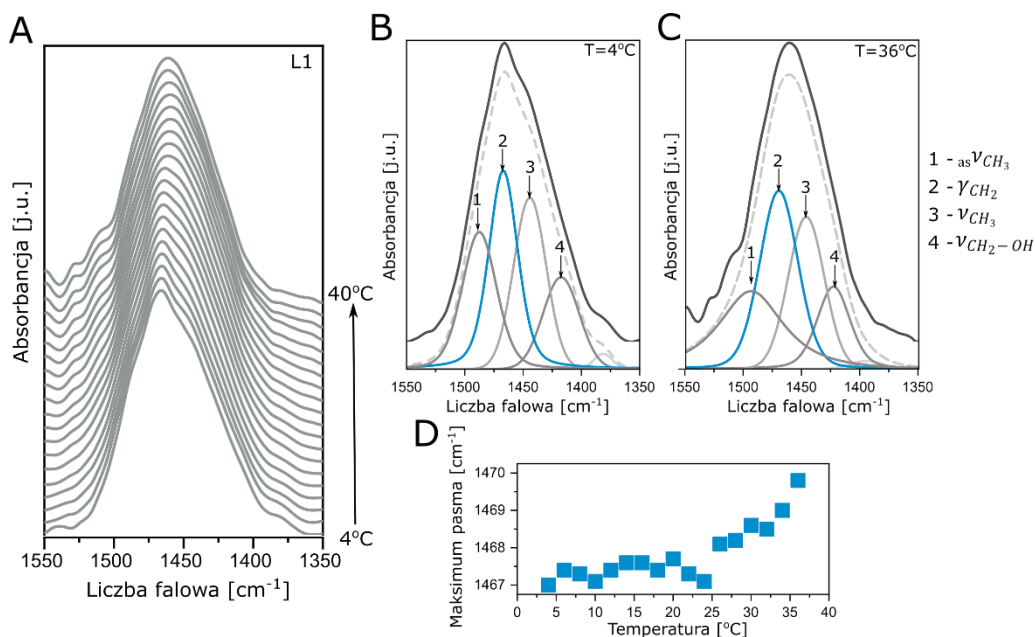
Analiza drgań asymetrycznych dostarcza podobnych wniosków, występuje szersza, bardziej płynna zmiana konformacji łańcuchów alkilowych fosfolipidów. W dalszej części pracy asymetryczne drgania rozciągające grup metylenowych fosfolipidów nie będą analizowane.

Analiza nożycowych drgań grup metylenowych  $\gamma_{CH_2}$  zlokalizowanych ok. 1470  $cm^{-1}$ , dostarcza również informacji o przemianach fazowych fosfolipidów, a co więcej może dostarczyć wiedzy o rodzaj upakowania łańcuchów alkilowych fosfolipidów. Jednak w tym obszarze zlokalizowane są także drgania pochodzące od innych grup funkcyjnych, przez co w pierwszej kolejności należy wyodrębnić pasma drgań  $\gamma_{CH_2}$  (na podstawie drugiej pochodnej widma i dekonwolucji pasm), a następnie poddać analizie ich kształt i położenie odpowiedniego maksimum. Łańcuchy boczne fosfolipidów mogą przyjmować upakowanie heksagonalne, wtedy obserwowane jest jedno pasmo w okolicach 1467  $cm^{-1}$ . Gdy łańcuchy przyjmują ułożenie rombów, to w wyniku oddziaływań krótkozasięgowych dochodzi do poszerzenia lub rozdzielenia pasma  $\gamma_{CH_2}$  i obserwowane są dwa maksima ok. 1463  $cm^{-1}$  oraz ok. 1473  $cm^{-1}$  [252]. Rozszczepienie to jest również widoczne w pasmie drgań kołyszących  $CH_2$  (ok. 720  $cm^{-1}$ ). Możliwa jest obserwacja wszystkich trzech pików (1463  $cm^{-1}$ , 1467  $cm^{-1}$  i 1473  $cm^{-1}$ ), co świadczy o współistnieniu upakowania rombów i heksagonalnego. Natomiast poszerzenie i przesunięcie pasma przy 1467  $cm^{-1}$  w kierunku wyższych częstości wraz ze wzrostem temperatury, sugeruje przejście w stan ciekłokrystaliczny, czyli przejście *trans-gauche* związane z przemianą fazową fosfolipidu [253].

Analizie poddano pasmo w obszarze od 1550  $\text{cm}^{-1}$  do 1350  $\text{cm}^{-1}$ , na podstawie drugiej pochodnej wyznaczono punkty przegięcia krzywej, a następnie widmo poddano dekonwolucji w celu wyodrębnienia pasm składowych. Niektórzy badacze ograniczają się w swojej analizie do bardzo wąskiego obszaru np. 1460 - 1480  $\text{cm}^{-1}$  [252], przez co wyselekcjonowane zostają istotne pod względem analizy pasma, jednak takie uproszczenie nie pokazuje w pełni złożoności i wzajemnego wpływu pasm składowych w tym obszarze, co może tylko zwiększać błąd odczytu.

Na rysunku 58 A zestawiono pasma drgań nożycowych grup  $\text{CH}_2$  DMPC w różnych badanych temperaturach. Następnie po dokonaniu dekonwolucji odczytano pozycje pików składowych (rysunek 58 B, C). Do najważniejszych obserwowanych pasm w tym regionie należy pasmo drgań rozciągających asymetrycznych grup  $\text{CH}_3$  łańcucha węglowodorowego, występujące przy ok. 1450  $\text{cm}^{-1}$ , w badanym układzie prawdopodobnie jest to pik 1445  $\text{cm}^{-1}$  [254]. Innym zarejestrowanym pasmem jest pasmo drgań rozciągających  $\text{CH}_3$  pochodzące od reszt cholinowych (ok. 1490  $\text{cm}^{-1}$ ) [255]. Natomiast drganie obserwowane przy 1420  $\text{cm}^{-1}$  pochodzi prawdopodobnie od drgań rozciągających grup  $\text{CH}_2$  [256] lub jak podają inne źródła od drgań grup  $\text{CH}_2\text{-OH}$ , które utworzyły wiązania wodorowe [257]. Pozostałe pasma o małej intensywności są prawdopodobnie wynikiem zaszumienia widma, czy nieodpowiedniej korekcji linii bazowej.

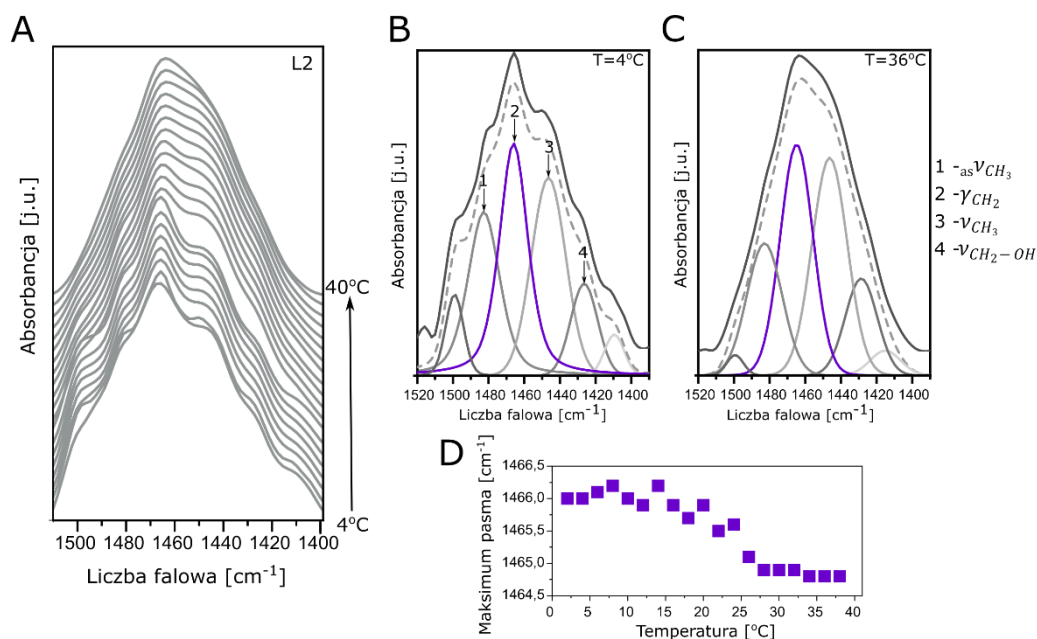
Na podstawie analizy pasma (rysunek 58 B, C) można stwierdzić, że położenie pików: ok. 1490  $\text{cm}^{-1}$ , 1445  $\text{cm}^{-1}$ , 1420  $\text{cm}^{-1}$ , nieznacznie przesuwa się wraz ze wzrostem temperatury w kierunku wyższych liczb falowych. Jak wspomniano wcześniej w ocenie przejść fazowych istotna jest analiza pasma ok. 1467  $\text{cm}^{-1}$ . Położenie maksimum pasma wskazuje na heksagonalne ułożenie łańcuchów (w analizie brak pasm od rombowego upakowania, tak więc można wykluczyć jego współistnienie z ułożeniem heksagonalnym) [258]. Pasma to się nie rozdziela, ale ulega nieznacznemu poszerzeniu. Na rysunku 58 D zestawiono maksimum  $\gamma_{\text{CH}_2}$  w funkcji temperatury. Obserwowano przesunięcie od ok. 1467  $\text{cm}^{-1}$  (dla 4°C) aż po 1469,4  $\text{cm}^{-1}$  (dla 36°C), czyli o 2,4  $\text{cm}^{-1}$ . Szerokość połówkowa pasma  $\gamma_{\text{CH}_2}$  zwiększa się z 31,2  $\text{cm}^{-1}$  (dla 4°C) do 38,7  $\text{cm}^{-1}$  (dla 36°C). Bazując na otrzymanych wynikach przemiana fazowa DMPC prawdopodobnie zaczyna się ok. 26°C, ale ciągły wzrost maksimum  $\gamma_{\text{CH}_2}$  w funkcji temperatury, sugeruje, że prawdopodobnie przemiana zachodzi stopniowo, czyli stopniowo zwiększa się udział cząsteczek w konformacji *gauche* w populacji fosfolipidów.



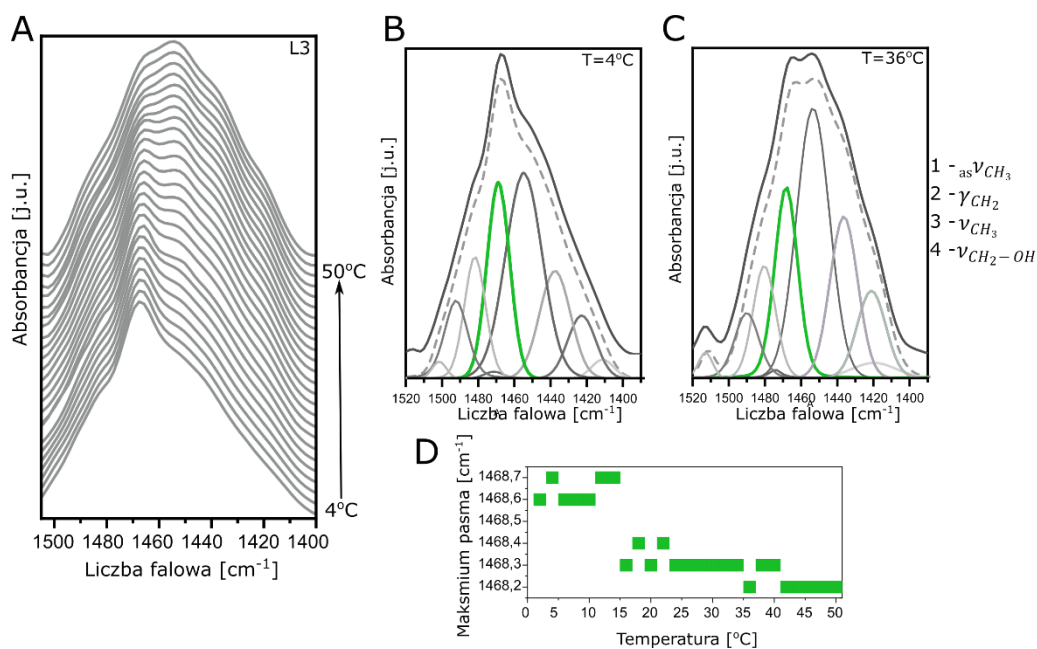
Rysunek 58. Drgania nożycowe grup metylenowych DMPC. Zestawienie widm FTIR dla różnych temperatur (A), przykładowa dekonwolucja pasma w temperaturze 4°C (B) oraz w 36°C (C) oraz położenie maksimum pasma w funkcji temperatury (D). Dla lepszego porównania widma FTIR na rysunku A zostały rozsunięte.

Przebieg zarejestrowanych widm dla L2 (rysunek 59) i L3 (rysunek 60) znacząco się różniły zarówno między sobą, jak i w porównaniu do widm uzyskanych dla roztworu DMPC. Prawdopodobnie na skutek obecności innych fosfolipidów w układzie, zwiększył się udział pasm drgań od innych grup funkcyjnych i ich wzajemnych interakcji (na widmach po dekonwolucji widać większą liczbę pasm składowych niż w przypadku DMPC). Dla układu L2 wyniki wskazywały na ułożenie heksagonalne łańcuchów alkilowych (pik przy ok. 1466 cm<sup>-1</sup>), natomiast dla L3 pasmo przy ok. 1468 cm<sup>-1</sup> sugeruje obecność fazy ciekłokrystalicznej.

Dla L2 oraz L3 obserwowano przesunięcie maksimum pasma drgań nożycowych CH<sub>2</sub> w kierunku niższych wartości liczb falowych. Przesunięcia te były nieznaczne w przypadku L2 – 1,5 cm<sup>-1</sup> (2 - 40°C), a L3 – 0,4 cm<sup>-1</sup> (2 - 50°C). Co ciekawe, można było zaobserwować niewielkie skokowe zmiany w okolicach 24°C (temperatura przemiany fazowej DMPC), a nawet w przypadku L3 ok. 42°C, czyli przemiany fazowej DPPC, której nie obserwowano w pasmach drgań rozciągających grup CH<sub>2</sub>. Pasma  $\nu_{CH_2}$  w L2 uległo niewielkiemu poszerzeniu z 19,5 cm<sup>-1</sup> (dla 4°C) do 20,8 cm<sup>-1</sup> (dla 36°C), a w przypadku L3 – z 15 cm<sup>-1</sup> (dla 4°C) do 15,8 cm<sup>-1</sup> (dla 50°C).



Rysunek 59. Drgania nożycowe grup metylenowych w układzie L2. Zestawienie widm FTIR dla różnych temperatur (A), przykładowa dekonwolucja pasma w temperaturze 4°C (B) oraz w 36°C (C) oraz położenie maksimum pasma w funkcji temperatury (D). Dla lepszego porównania widma FTIR na rysunku A zostały rozsunięte.



Rysunek 60. Drgania nożycowe grup metylenowych w układzie L3. Zestawienie widm FTIR dla różnych temperatur (A), przykładowa dekonwolucja pasma w temperaturze 4°C (B) oraz w 36°C (C) oraz położenie maksimum pasma w funkcji temperatury (D). Dla lepszego porównania widma FTIR na rysunku A zostały rozsunięte.

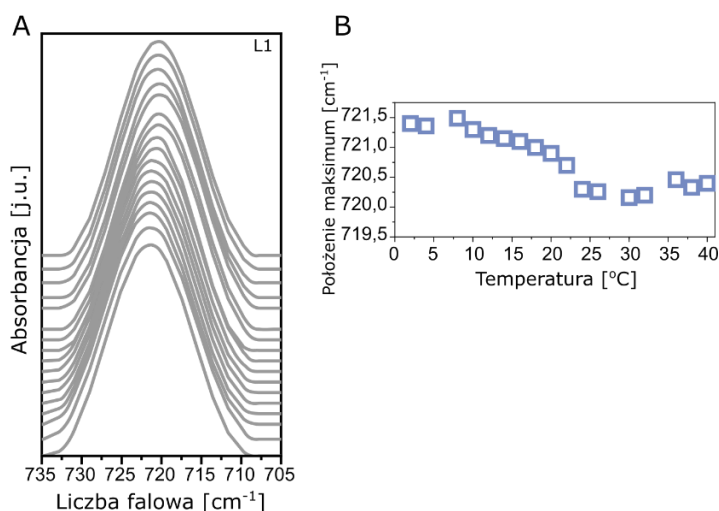
Powyższe wyniki sugerują porządkowanie się upakowania łańcuchów węglowodorowych wraz ze wzrostem temperatury, co jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi dla drgań rozciągających grup CH<sub>2</sub>. Różnice te są jednak na tyle niewielkie, że prawdopodobnie taka interpretacja wynika z niedokładności metody analizy

(niedostateczne dopasowanie nakładających się pasm) lub pomiaru (mała intensywność pasma, obecność szumów, itp.). Zastanawiający jest fakt, że całkiem dobrze możliwe było odczytanie punktów wskazujących na przemiany fazowe badanych układów. Niemniej drganie nożycowe grup  $\text{CH}_2$  są trudne do analizy oraz są obciążone dużym błędem, a tym samym nie dostarczają rzetelnych i jednoznacznych informacji o badanych układach.

Ostatnim typem drgań, który może posłużyć do analizy przemian fazowych układów lipidowych są drgania kołyszące grup metylenowych  $\delta_{\text{CH}_2}$  zlokalizowane w okolicy  $720\text{ cm}^{-1}$ . Są to drgania o bardzo małej intensywności, co może jednak znacząco wpływać na błąd odczytu maksimum pasma.

Gdy łańcuchy węglowodorowe fosfolipidów znajdują się w konformacji *trans*, pasmo  $\delta_{\text{CH}_2}$  charakteryzuje się dużą intensywnością i małą szerokością półwkową, w miarę procesu „topnienia” łańcuchów i wzrostu ich ruchliwości pasmo ulega poszerzeniu [209], tak jak w przypadku drgań rozciągających grup  $\text{CH}_2$ . Z tego względu zdecydowano się na zbadanie zmian położenia maksimum pasma  $\delta_{\text{CH}_2}$  w zależności od temperatury i podjęcie próby określenia temperatury głównej przemiany DMPC.

Na rysunku 61 zestawiono widma FTIR i położenia maksimum pasma  $\delta_{\text{CH}_2}$  w zależności od temperatury pomiaru dla roztworu DMPC (L1). Pasma ulega jedynie niewielkiemu poszerzeniu z  $11,7\text{ cm}^{-1}$  (dla  $4^\circ\text{C}$ ) do  $12,4\text{ cm}^{-1}$  (dla  $36^\circ\text{C}$ ). Położenie maksimum przesunęło się w kierunku niższych częstotliwości, z  $721,4\text{ cm}^{-1}$  ( $2^\circ\text{C}$ ) do  $720,4\text{ cm}^{-1}$  ( $40^\circ\text{C}$ ), czyli o  $1\text{ cm}^{-1}$ . Zmiana ta jest stosunkowo niewielka, ale wystarczająca na tyle, aby dobrze zobaczyć moment przemiany fazowej DMPC, której temperatura przypada na  $24^\circ\text{C}$ .



Rysunek 61. Drgania kołyszące grup metylenowych cząsteczek DMPC. Zestawienie widm FTIR (A) oraz położenia maksimum pasm (B) w zależności od temperatury. Dla lepszego porównania widma FTIR na rysunku A zostały rozsunięte.

Jak to było wcześniej wspomniane drgania kołyszące  $\text{CH}_2$  dostarczają również informacji o upakowaniu łańcuchów alkilowych fosfolipidów, w tym przypadku brak rozdwojenia pasma sugeruje ich heksagonalne upakowania.

Podobnie jak w przypadku drgań nożycowych grup  $\text{CH}_2$ , analiza drgań kołyszących  $\delta_{\text{CH}_2}$  obciążona jest zwykle dużym błędem, dlatego dla pozostałych układów rozważanych w pracy, zdecydowano się wyłącznie na badanie przemian fazowych na podstawie symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych.



### 6.3.2 Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach surfaktant/fosfolipid

Po scharakteryzowaniu przemian fazowych wyjściowych układów lipidowych przy pomocy metod DSC i FTIR, przystąpiono do analizy wpływu surfaktantów trimerycznych na rozważane dwuwarstwy lipidowe. Dla układów dwuskładnikowych surfaktant/lipid przeprowadzono analogiczne pomiary: w pierwszej kolejności pomiary DSC, aby określić zakres temperaturowy przemian; a następnie pomiary FTIR, by jeszcze dokładniej zbadać zmiany w przejściach fazowych fosfolipidów na skutek obecności surfaktantów trimerycznych.

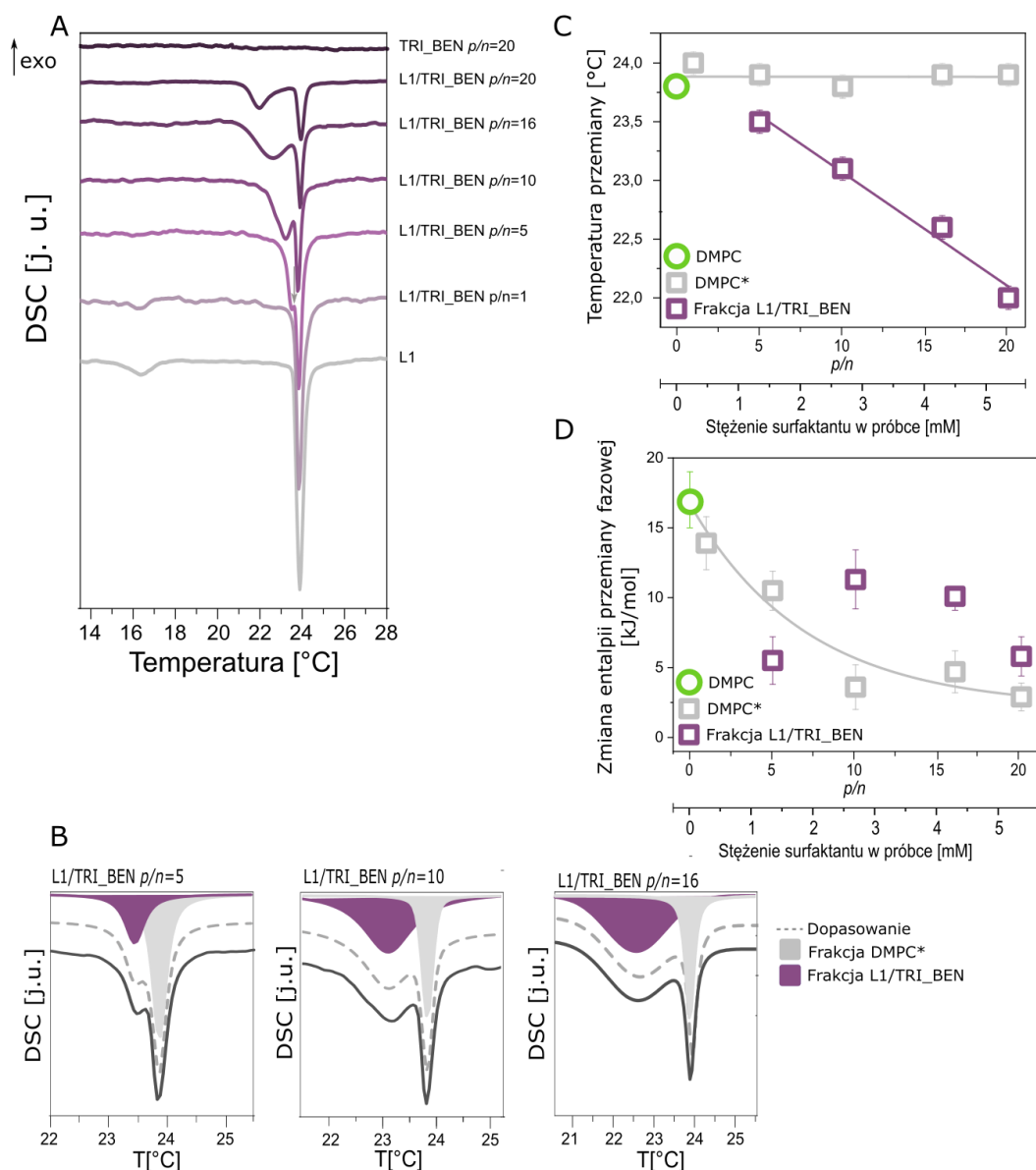
Analiza pomiarów kalorymetrycznych zostanie omówiona na przykładzie układu L1 i surfaktantu TRI\_BEN o różnym stężeniu (rysunek 62). Pozwoliła ona określić, w jakim stopniu stężenie surfaktantu wpływa na przemiany fazowe DMPC. Ze względu na obecność nakładających się pików krzywej kalorymetrycznej, analizę entalpii i wartości temperatury przemiany przeprowadzono w programie PeakFit, przykładowe dopasowania przedstawiono na rysunku 62 B. Powierzchnię całkowitą wyznaczoną w PeakFit odniesiono do wartości odczytanej z programu PROTEUS TA (wyrażonej w kJ/mg), a następnie na podstawie proporcji powierzchni pików składowych i stężeń układów, wyznaczono ich wartości entalpii [kJ/mol]. W analizie posłużono się odniesieniem do wartości  $p/n$  w układach surfaktant/DNA, ale na wykresach umieszczono również skalę stężenia surfaktantu w danej próbce. Wszystkie układy mierzono w roztworach wody deuterowanej.

W badanym zakresie temperatur ( $0^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ ) wykluczono występowanie przemiany fazowej w roztworze surfaktantu (rysunek 62 A, termogram DSC dla TRI\_BEN  $p/n = 20$ ).

Na podstawie otrzymanych termogramów DSC zauważyć można, że obecność surfaktantu TRI\_BEN w niskim stężeniu, czyli dla  $p/n = 1$ , nie wpływa na temperaturę przejścia fazowego DMPC:  $T_m$  wynosi  $24^{\circ}\text{C}$ , a  $\Delta T_{1/2} = 0,3^{\circ}\text{C}$ , ale TRI\_BEN powoduje spadek entalpii przemiany głównej do  $13,9 \pm 1,9$  kJ/mol. Następnie wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu poprzez stopniowe wyodrębnienie się drugiego pików (dla  $p/n = 5$ ), dochodzi do całkowitego rozdzielenia na dwa osobne minima (dla  $p/n = 20$ ). Prawdopodobnie wskazuje to na utworzenie frakcji mieszanej bogatej w cząsteczki surfaktantu oraz frakcji ubogiej w surfaktant (oznaczonej DMPC\*) [259].

Zauważono, że przedprzejście wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie zanika, zarejestrowano je jedynie dla układu o  $p/n = 1$  charakteryzuje je  $T_p = 16,3^{\circ}\text{C}$  i  $\Delta H = 0,8$  kJ/mol. W fazie żelowej  $L_{\beta'}$  wszystkie łańcuchy węglowodorowe lipidów przyjmują konformację *trans*, ale są nachylone do płaszczyzny błony pod pewnym kątem. Takie ułożenie jest korzystne, ponieważ wypełnione zostają wolne miejsca, które wynikają z ułożenia zdecydowanie większych grup polarnych lipidów. Po przekroczeniu temperatury  $T_p$  błona ulega pofałdowaniu – przyjmuje fazę żelową pofalowaną  $P_{\beta}$ . Zanik przemiany przedprzejścia sugeruje wbudowywanie się cząsteczek surfaktantu w dwuwarstwę lipidową, co jest równoznacznie z zanikiem jednej z faz - fazy żelowej pochyłonej  $L_{\beta'}$  [260].

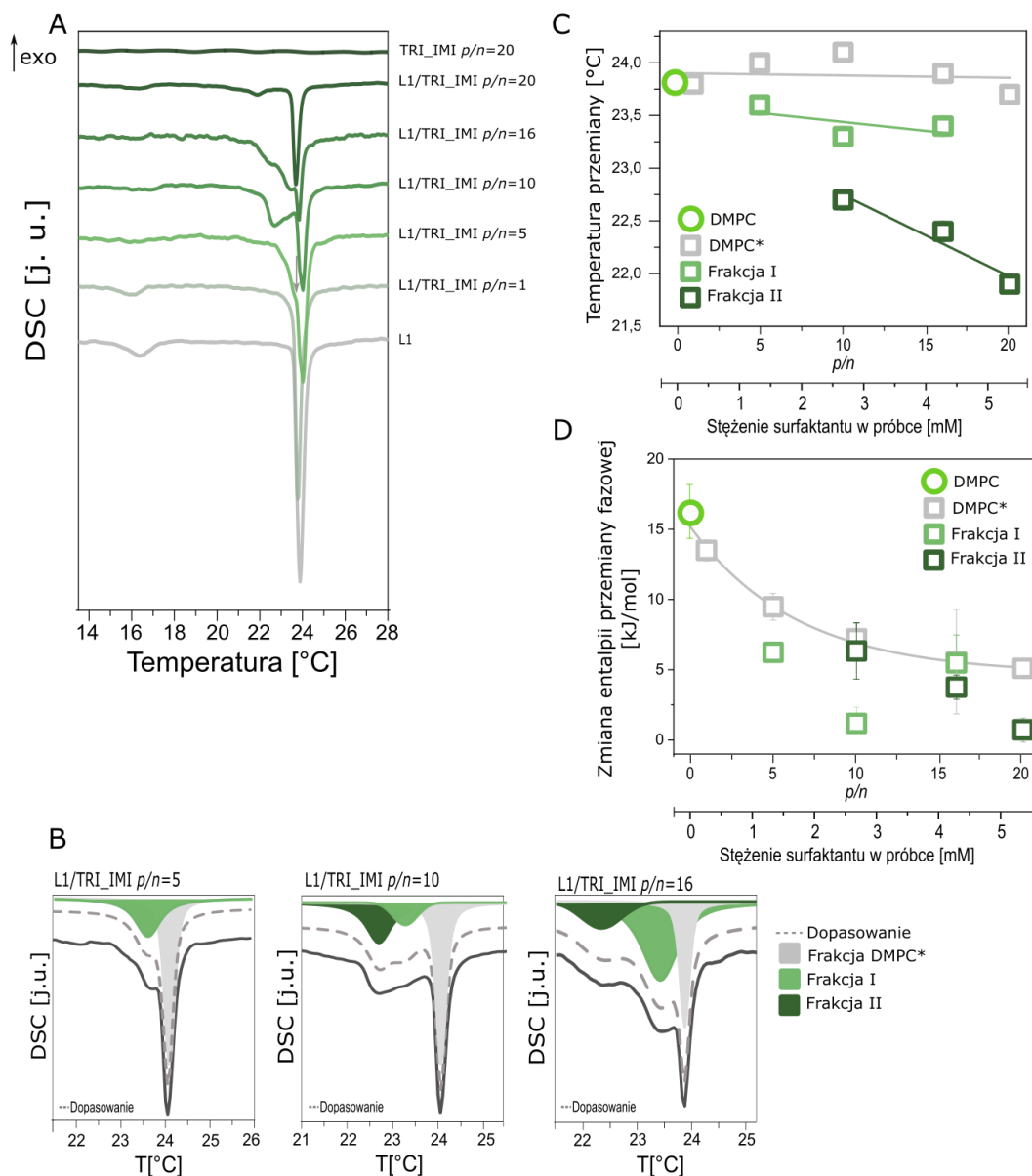
Położenie temperatury przemiany głównej dla frakcji ubogiej w surfaktant DMPC\* (bazując na dopasowaniu) utrzymuje się na stałym poziomie ok.  $23,9^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy przemiana fazowa frakcji bogatej w surfaktant zdecydowanie się obniża (maleje liniowo ze wzrostem  $p/n$ ): z  $24,0^{\circ}\text{C}$  (dla  $p/n = 1$ ) do  $22^{\circ}\text{C}$  (dla  $p/n = 20$ ) – rysunek 62 C.



Rysunek 62. Krzywe kalorymetryczne układu dwuskładnikowego L1/TRI\_BEN (A) wraz z dekonwolucją pików (B) oraz zestawienie wartości temperatur (C) i entalpii (D) charakteryzujących przemiany fazowe układów L1 w zależności od stosunku  $p/n$ : wartości dla roztworu L1 (DMPC), wartości dla frakcji bogatej (L1/TRI\_BEN) oraz frakcji ubogiej w surfaktanty (DMPC\*). Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktanty (szara strzałka).

Bezwzględna wartość zmiany entalpii dla frakcji ubogiej w surfaktanty znacząco spada ze wzrostem stosunku  $p/n$  z  $13,9 \pm 1,9$  kJ/mol dla  $p/n = 1$  do  $2,9 \pm 1$  kJ/mol dla  $p/n = 20$  przy zachowaniu stałej szerokości połówkowej. Z kolei entalpia przemiany głównej frakcji bogatej w surfaktant L1/TRI\_BEN wykazuje znaczne wahania wartości (rysunek 62 D). Analizując szerokość połówkową pików odpowiadającemu frakcji bogatej w surfaktant (rysunek 62 B) można zaobserwować jej wzrost: od  $0,4^\circ\text{C}$  dla  $p/n = 5$ , przez  $1,2^\circ\text{C}$  dla  $p/n = 10$ , do  $1,7^\circ\text{C}$  dla  $p/n = 16$ . Przyjąć można, że zapewne zwiększa się populacja cząsteczek surfaktantu w tej frakcji, dla DMPC\* szerokość połówkowa była na stałym

poziomie tj.  $0,3^{\circ}\text{C}$ . Po separacji faz (dla  $p/n = 20$ ) dla pików pochodzącego od frakcji L1/TRI\_BEN zarejestrowano mniejszą szerokość połówkową przemiany  $\Delta T_{1/2} = 1^{\circ}\text{C}$ , a dla frakcji DMPC\* obserwowano nieznaczne poszerzenie przemiany:  $\Delta T_{1/2} = 0,4^{\circ}\text{C}$ , co wskazuje na spadek stopnia kooperatywności przemiany fazowej [261].



Rysunek 63. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L1/TRI\_IMI (A) wraz z dekonwolucją pików (B) oraz zestawienie wartości temperatur (C) i entalpii (D) charakteryzujących przemiany fazowe układów L1 w zależności od stosunku  $p/n$ : wartości dla roztworu L1 (DMPC), wartości dla frakcji bogatej (L1/TRI\_IMI) oraz frakcji ubogiej w surfaktant (DMPC\*). Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktant (szara strzałka).

Dla układu L1/TRI\_IMI obserwowano podobną tendencję z tą różnicą, że na podstawie krzywych kalorymetrycznych możliwe było wyodrębnienie 3 frakcji (rysunek 63 A). Dla niskiego stężenia  $p/n = 1$  krzywa DSC układu L1/TRI\_IMI ulegała nieznacznemu poszerzeniu, co sugeruje wbudowywanie się cząsteczek surfaktantu

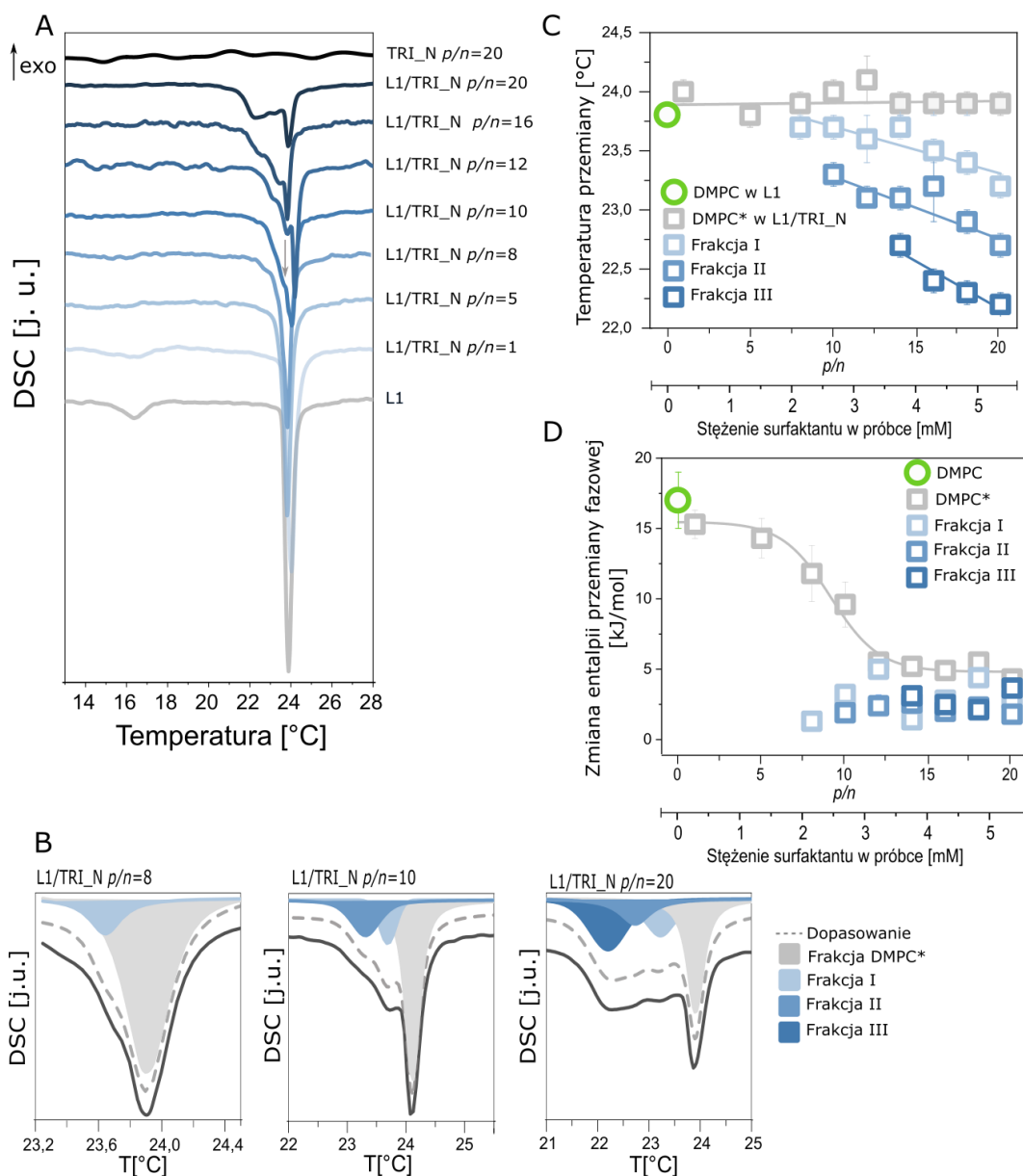
w dwuwarstwę DMPC. Ze wzrostem stężenia surfaktantu (dla  $p/n = 5$ ) możliwa była rejestracja dwóch frakcji: ubogiej i bogatej w cząsteczki surfaktantu (podobnie jak dla L1/TRI\_BEN), co więcej dla  $p/n$  równego 10 lub 16 obserwowano jeszcze jedną frakcję, która prawdopodobnie odpowiada obszarowi DMPC o jeszcze większym nasyceniu surfaktantem TRI\_IMI (Fracja II) [259].

Zarówno dla frakcji I i II zarejestrowano spadek temperatury przemiany głównej (rysunek 63 C) oraz wzrost szerokości połówkowej  $\Delta T_{1/2}$  (rysunek 63 B). Frakcja uboga w TRI\_IMI – DMPC\*, utrzymywała stałą temperaturę przemiany, ale entalpia malała ze wzrostem stężenia surfaktantu (rysunek 63 D). Ze wzrostem stężenia surfaktantu zanika również przedprzejście DMPC, choć dla układu w  $p/n = 20$  można by przypuszczać, że przedprzejście występuje.

Podobnie jak dla L1/TRI\_BEN dla wysokiego stężenia surfaktantu TRI\_IMI w układzie (dla  $p/n = 20$ ), widoczne były jedynie dwie odrębne frakcje. Zanikł podział na struktury o różnym nasyceniu surfaktantem, a nowa frakcja L1/TRI\_IMI charakteryzowała się dużo mniejszą entalpią. Być może jest to związane z izotropowym rozmieszczeniem surfaktantów w dwuwarstwie DMPC.

Jeszcze bardziej skomplikowany układ obserwowano dla L1/TRI\_N, dla którego wyszczególniono i przeanalizowano cztery frakcje, w tym trzy prawdopodobnie o różnym nasyceniu surfaktantem (rysunek 64): od  $p/n$  równego 8 występowały dwie frakcje, od  $p/n \geq 10$  – trzy frakcje, a od  $p/n \geq 14$  – cztery frakcje. Zależności  $T_m$  i  $\Delta H$  od stężenia surfaktantu przebiegały analogicznie, jak dla układów L1 z TRI\_BEN lub TRI\_IMI. Entalpia dla frakcji bogatych w surfaktanty utrzymywała się na względnie stałym poziomie, podobnie jak entalpia DMPC\* od  $p/n \geq 12$ .

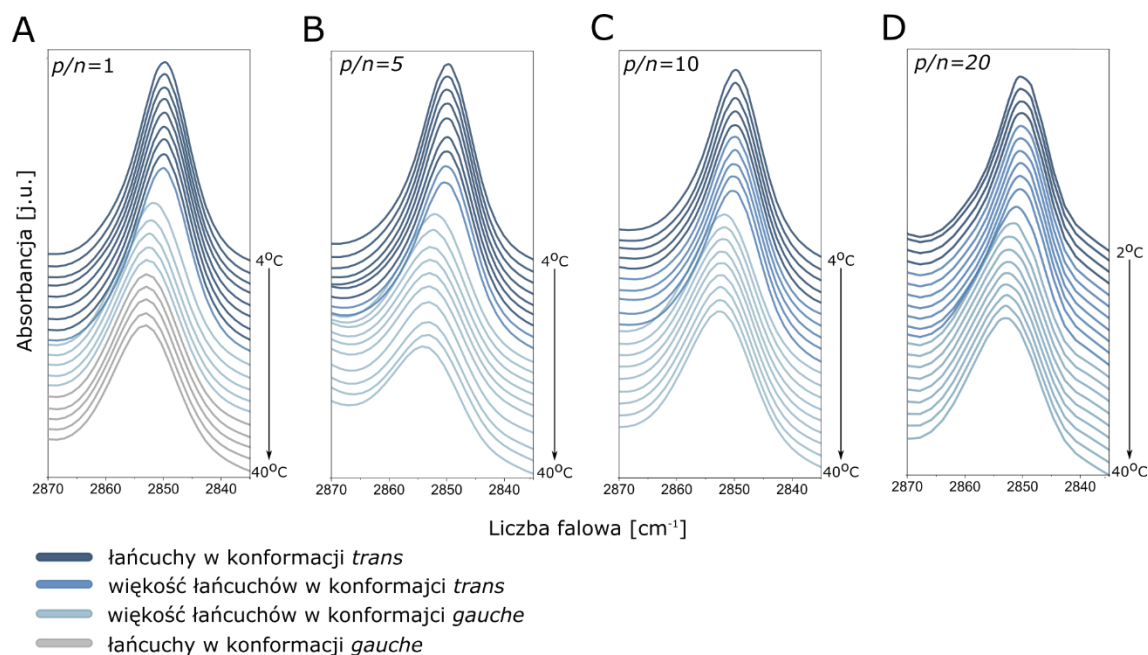
Prawdopodobnie wyniki uzyskane dla tego układu mogą wynikać z budowy chemicznej surfaktantu TRI\_N. A dokładniej, ze sposobu w jaki wbudowuje się w dwuwarstwę lipidową DMPC, dalsze badania przy użyciu SAXS być może wyjaśnią tą intrygującą separację fazową.



Rysunek 64. Krzywe kalorymetryczne układu dwuskładnikowego L1/TRI\_N (A) wraz z dekonwolucją pików (B) oraz zestawienie wartości temperatur (C) i entalpii (D) charakteryzujących przemiany fazowe układów L1 w zależności od stosunku  $p/n$ : wartości dla roztworu L1 (DMPC), wartości dla frakcji bogatej (L1/TRI\_N) oraz ubogiej w surfaktant (DMPC\*). Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktanty (szara strzałka).

Analiza symetrycznych drgań rozciągających grup  $\text{CH}_2$  w funkcji temperatury zostanie omówiona na podstawie układu L1/TRI\_N dla różnych stężeń surfaktantu. Wraz ze wzrostem temperatury pasma ulegają poszerzeniu, a ich intensywność spada, związane jest to ze zwiększeniem stopnia nieuporządkowania łańcuchów alkilowych fosfolipidów po przemianie fazowej [143]. Wyniki badań FTIR dla tych układów w obszarze drgań symetrycznych grup metylenowych przedstawiono na rysunku 65, gdzie dla lepszej wizualizacji pasma rozsunięto i użyto kolorów (bazując na dokładnych wynikach położenia

maksimum, rysunek 66) tak, aby oznaczyć pasma odpowiadające konformacji *trans* lub *gauche* oraz pasma, gdzie dominuje populacja danej konformacji.



Rysunek 65. Zestawienie pasm drgań symetrycznych grup metylenowych w funkcji temperatury dla układu L1/TRI\_N o stężeniu surfaktantu odpowiadającemu  $p/n$ : 1 (A), 5 (B), 10 (C), 20 (D). Dla lepszego porównania widma FTIR zostały rozsunięte.

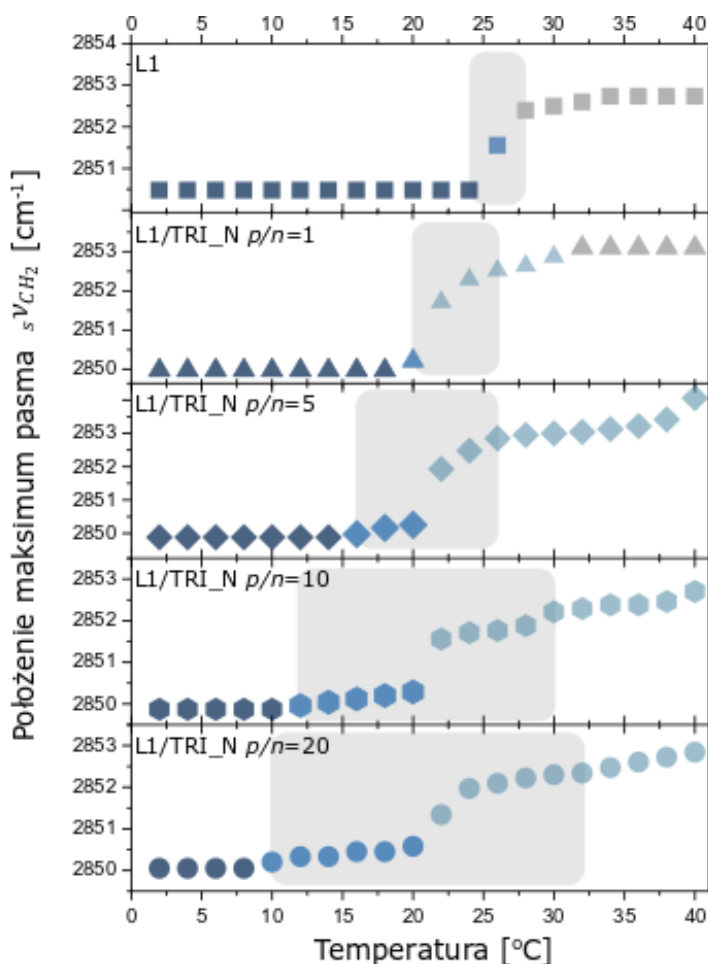
W każdym z rozważanych układów położenie maksimum pasma drgań grup  $\text{CH}_2$  ulegało przesunięciu w kierunku wyższych częstości wraz ze wzrostem temperatury. Przy małym dodatku surfaktantu TRI\_N w układzie (przy  $p/n = 1$ ) obserwowano niewielkie zmiany w stosunku do zależności dla roztworu DMPC, zmiana była nadal wyraźna, choć nie tak skokowa jak w przypadku układu referencyjnego - DMPC. W badanych układach zakresy przemian fazowych (szare prostokąty na rysunku 66) są umowne, o ile możliwe jest wyznaczenie temperatury początku przemiany fazowej, tak temperatura końca przemiany jest niejednoznaczna lub też niemożliwa do określenia dla niektórych układów. Dlatego za temperaturę końca przemiany uznano wartość, gdzie zdecydowana większość populacji lipidów przyjmuje konformację *gauche*.

Dla układu L1/TRI\_N o stężeniu surfaktantu odpowiadającym  $p/n = 1$  obserwowano poszerzenie się zakresu przemiany fazowej, której początek przypadał na  $20^\circ\text{C}$ , a za koniec przyjęto temperaturę  $24^\circ\text{C}$ , choć obserwowano dalszy nieznaczny wzrost, który ostatecznie osiągnął *plateau* przy  $32^\circ\text{C}$ . Natomiast wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie zmiany położenia maksimum pasma drgań  $\text{CH}_2$  były jeszcze bardziej płynne. Dla układu o  $p/n = 5$  przyjęto za początek przemiany temperaturę  $18^\circ\text{C}$ , a za koniec  $26^\circ\text{C}$ ; dla  $p/n = 10$ : odpowiednio  $12^\circ\text{C}$  i  $30^\circ\text{C}$ . Dla układu o  $p/n = 20$  początek przemiany przypadał na  $10^\circ\text{C}$ , ale temperaturę końca przemiany (choć przyjęto  $32^\circ\text{C}$ ) jest trudno jednoznacznie określić, warto jednak zauważyć, że po przekroczeniu  $24^\circ\text{C}$  zmienia się kąt nachylenia zależności, ale *plateau* nie jest osiągnięte w badanym zakresie temperatur. Temperatura przemiany głównej dla każdego z układów przypada na około  $22^\circ\text{C}$ .

Łagodny wzrost liczby falowej położenia maksimum pasma  $\nu_{\text{CH}_2}$  wskazuje, że przemiana zachodzi stopniowo, maleje jej kooperatywność tzn. zmiana konformacji

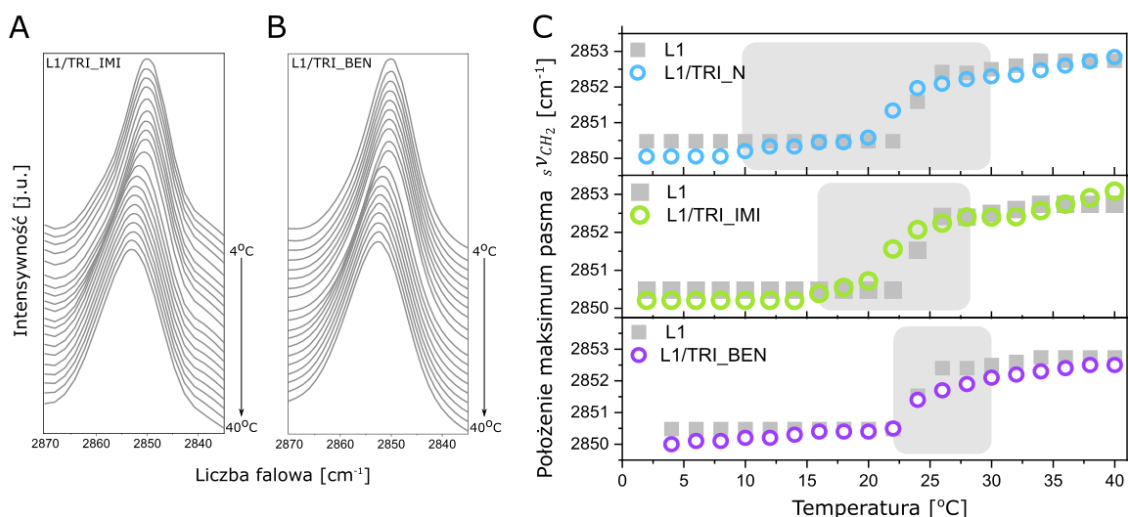
z *trans* na *gauche* nie zachodzi w jednej temperaturze dla całej populacji fosfolipidów, ale wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się populacja cząsteczek, których łańcuchy acylowe przyjmują konformację *gauche*. Dodatek surfaktantu w układzie przesuwa również początek przemiany fazowej, dwuwarstwy DMPC staje się bardziej płynna w niższych temperaturach w obecności surfaktantu TRI\_N.

Zestawiając powyższe wyniki z wynikami kalorymetrycznymi DSC, można wysnuć podobny wniosek, iż dodatek surfaktantów w układzie zwiększa płynność błony lipidowej poprzez obniżanie temperatury przemiany głównej.



Rysunek 66. Zestawienie położenia maksimum pasma symetrycznych drgań rozciągających na widmie FTIR odpowiadającym grupom metylenowym dla układów na bazie L1 i surfaktantu TRI\_N o różnym stężeniu.

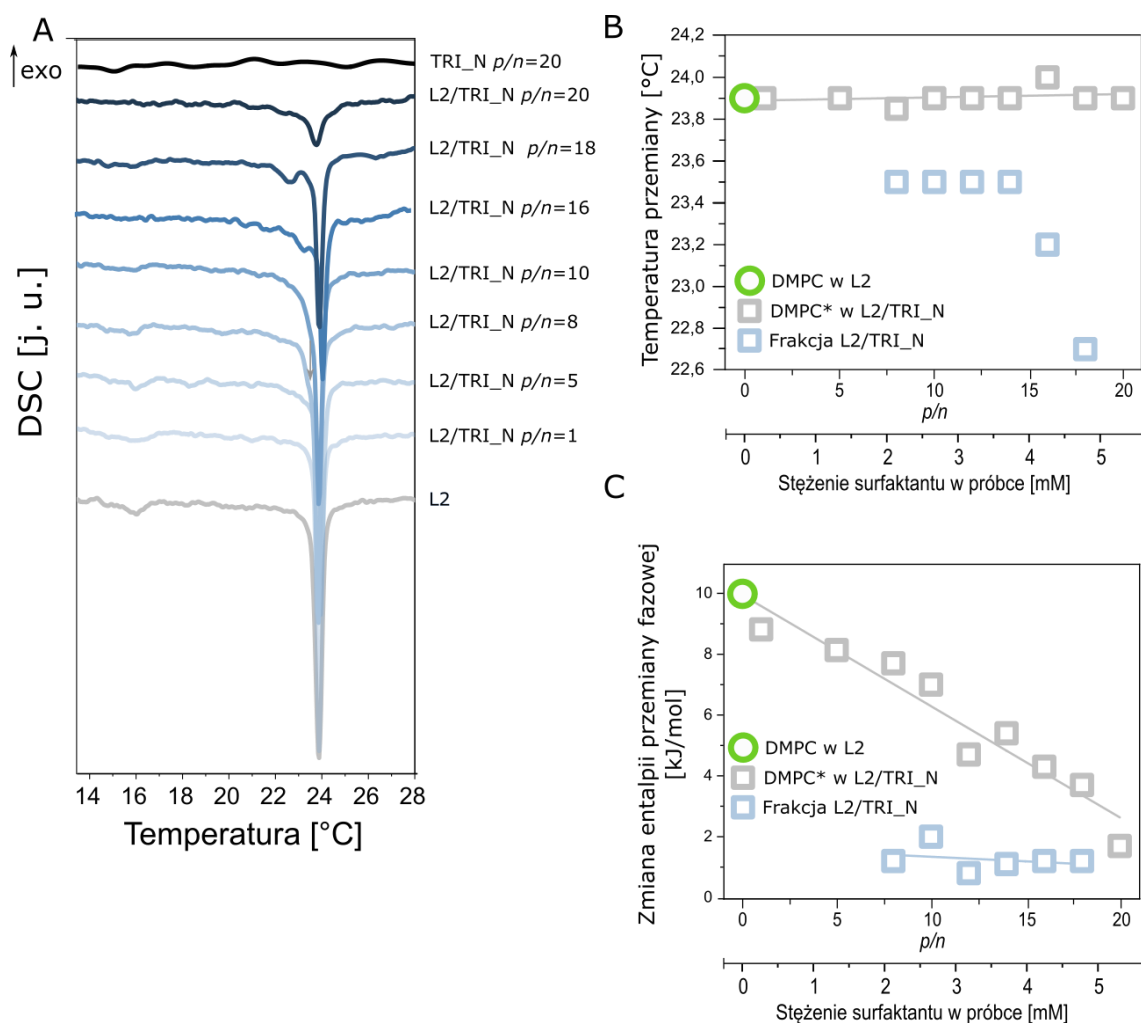
Dla układów na bazie L1 i surfaktantu TRI\_IMI lub TRI\_BEN obserwowano podobną zależność jak powyżej. Dodatek surfaktantu do DMPC powodował poszerzenie zakresu przemiany fazowej (rysunek 67) z tym, że zmiany te nie były tak duże jak dla TRI\_N. Dla układu L1/TRI\_IMI zakres przemiany przypadął od 16°C do 26°C, a temperatura głównej przemiany wynosiła 22°C. Natomiast dla L1/TRI\_BEN zakres przemiany to 22 - 30°C, a temperatura przemiany to ok. 23°C.



Rysunek 67. Zestawienie widm FTIR odpowiadających drganiom symetrycznym grup metylenowych dla układu L1/TRI\_IMI (A) oraz L1/TRI\_BEN (B) o stężeniu surfaktantu odpowiadającemu  $p/n = 20$  oraz położenia maksimum pasma tych drgań w układach z badanymi surfaktantami trimerycznymi (C). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR zostały rozsunięte (A).

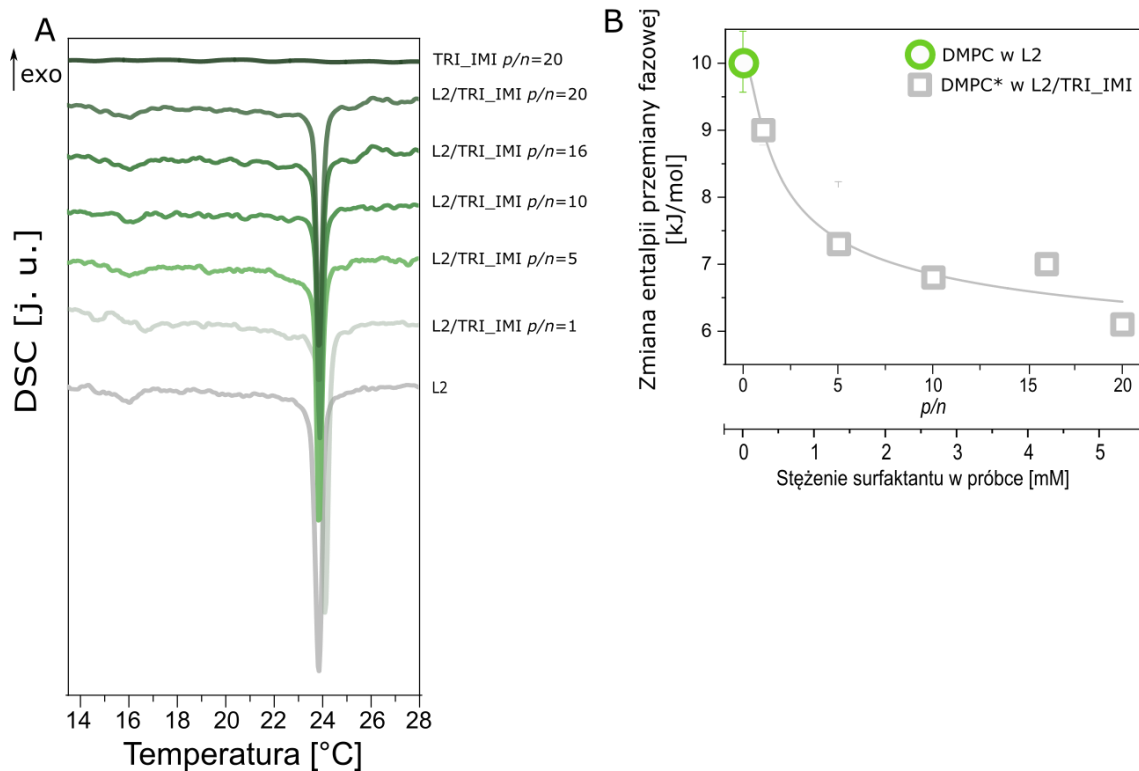
W układach L2 zmiany zachodzące w przemianach fazowych DMPC na skutek obecności surfaktantów trimerycznych znacząco się różniły od tych zaprezentowanych dla układów wyłącznie na bazie DMPC. Pierwszą różnicą była redukcja liczby frakcji. Dla układu L2/TRI\_N (rysunek 68) obecne są dwa piki na krzywej kalorymetrycznej: jeden pochodzący od frakcji ubogiej w surfaktanty (oznaczony jako DMPC\*) o temperaturze przemiany odpowiadającej referencyjnemu roztworowi DMPC, a drugi od frakcji bogatej w cząsteczki surfaktantu (oznaczony jako DMPC/TRI\_N), w przypadku L1/TRI\_N frakcji bogatych w surfaktant było aż 3. Prawdopodobne kluczowe znaczenie we wbudowywaniu się surfaktantów w dwuwarstwę miała obecność DOPE, być może wpływa ona na lepsze rozdystrybuowanie surfaktantów w błonie lipidowej. Frakcję bogatą w surfaktanty obserwowano od  $p/n \geq 8$ , ale dopiero od  $p/n$  większego od 14, wartość temperatury głównej przemiany przesuwiała się w kierunku niższych temperatur. Dla układu L2/TRI\_N o  $p/n = 20$  zarejestrowano tylko jeden pik o małej entalpii, co może potwierdzać wcześniejszą hipotezę, iż DOPE zapobiega tworzeniu się skupisk surfaktantów (frakcji) i umożliwia ich równomierny rozkład w błonie. Spadek entalpii i poszerzenie szerokości pików na termogramie DSC świadczy o wbudowywaniu się cząsteczek surfaktantu. Różnice w redukcji entalpii przemiany w tym układzie są większe niż dla L1/TRI\_N o tym samym stężeniu surfaktantu. Przy  $p/n = 20$  dla L2/TRI\_N spadek wynosił aż 83% w stosunku do entalpii przemiany dla L2, dla frakcji DMPC\*. W układzie L1/TRI\_N odnotowano spadek o 74%, a w porównaniu do całkowitej entalpii, czyli dla wszystkich składowych tylko o 25% do entalpii przemiany L1. Temperatura przemiany frakcji bogatej w surfaktanty dla L2/TRI\_N (dla  $p/n = 18$ ) wynosiła 22,7°C i tym samym była wyższa niż dla L1/TRI\_N o tym samym stężeniu surfaktantu - 22,3°C (wynik dla frakcji III).





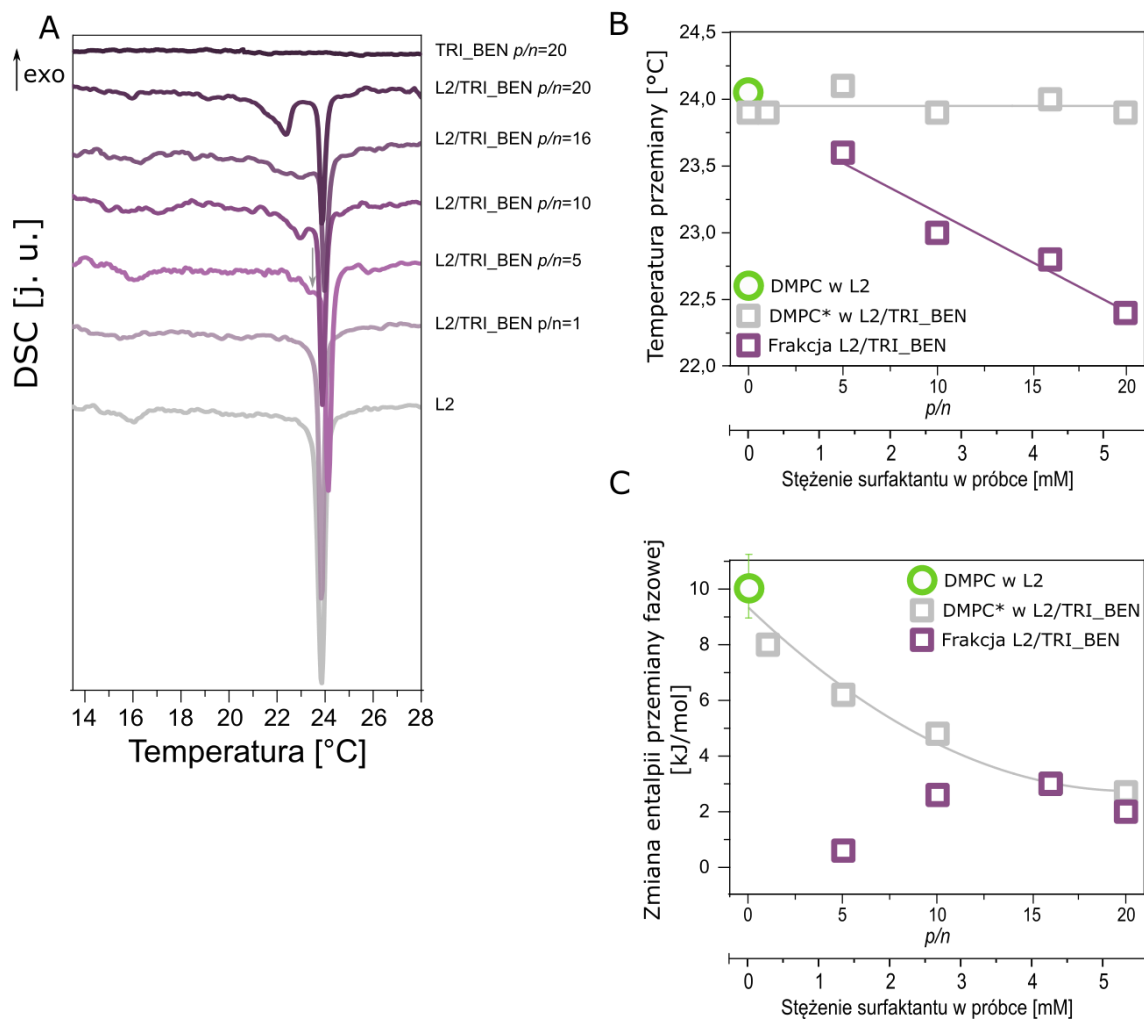
Rysunek 68. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L2/TRI\_N (A) oraz zestawienie wartości temperatur (B) i entalpii (C) przemian fazowych DMPC w L2 w zależności od stężenia surfaktantu TRI\_N. Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktant (szara strzałka).

W przypadku układu L2/TRI\_IMI (rysunek 69) na termogramie zarejestrowano wyłącznie jeden pik pochodzący od przemiany głównej – brak występowania podziału na frakcje. Temperatura przemiany utrzymywała stałą wartość ze wzrostem stężenia surfaktantu. Entalpia początkowo malała, ale od  $p/n \geq 5$  pozostała na względnie stałym poziomie. Porównując powyższe wyniki z wynikami dla układu L1/TRI\_IMI można zauważyć, że układ na bazie wyłącznie DMPC i surfaktantu TRI\_IMI o stężeniu odpowiadającym  $p/n = 20$  posiadał dwie frakcje, ale frakcja uznawana za bogatą w surfaktant, charakteryzowała się bardzo małą entalpią, a więc prawdopodobnie układ miał takie proporcje surfaktantu do lipidu, które zapewniają jego równomierne rozmieszczenie w błonie, ale dopiero dodatek DOPE pomógł osiągnąć to najbardziej równomierne rozłożenie, stąd jeden pik na termogramie. Jednak przeczyć mogą temu wartości entalpii dla L1/TRI\_IMI o  $p/n = 20$  odnotowano spadek o 70%, a dla L2/TRI\_IMI jedynie o 40% w stosunku do czystych formułacji lipidowych, czyli odpowiednio L1 i L2. W porównaniu do L2/TRI\_N spadek entalpii L2/TRI\_IMI również był mniejszy dla tego samego stężenia surfaktantu w układzie.



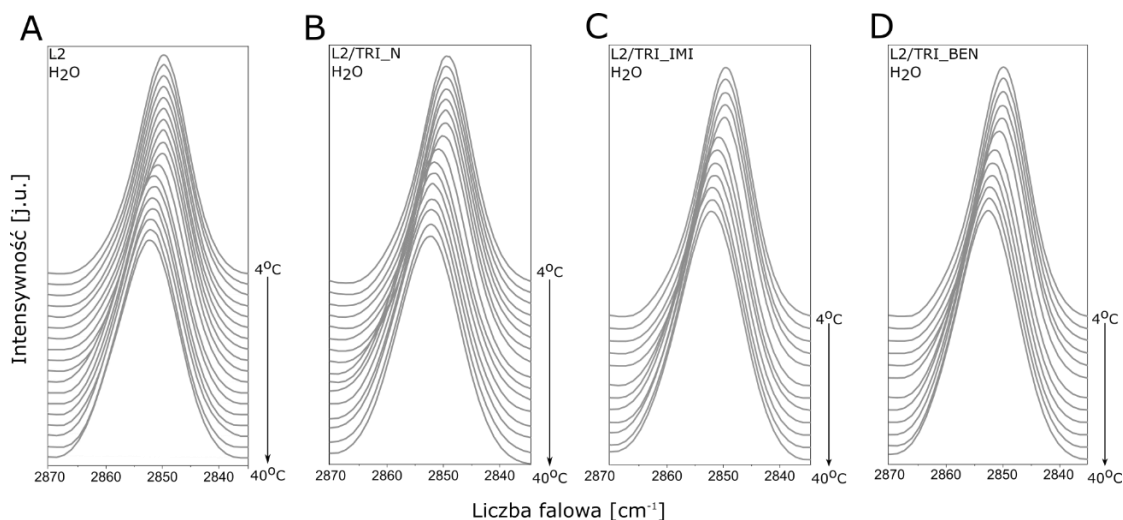
Rysunek 69 Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L2/TRI\_IMI (A) oraz zestawienie wartości entalpii przemian fazowych DMPC w L2 w zależności od stężenia surfaktantu TRI\_IMI (B). Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte.

W oparciu o dane DSC dla układu L2/TRI\_BEN (rysunek 70) można zauważyć, że w tym przypadku obecność DOPE w układzie nie spowodowała takich zmian jak w L2/TRI\_IMI, a wręcz można by powiedzieć, iż zaburzyła układ – w porównaniu do wyników dla L1/TRI\_BEN krzywe kalorymetryczne były bardziej regularne, a frakcja bogata w surfaktant nie wyodrębniła się tak wyraźnie.



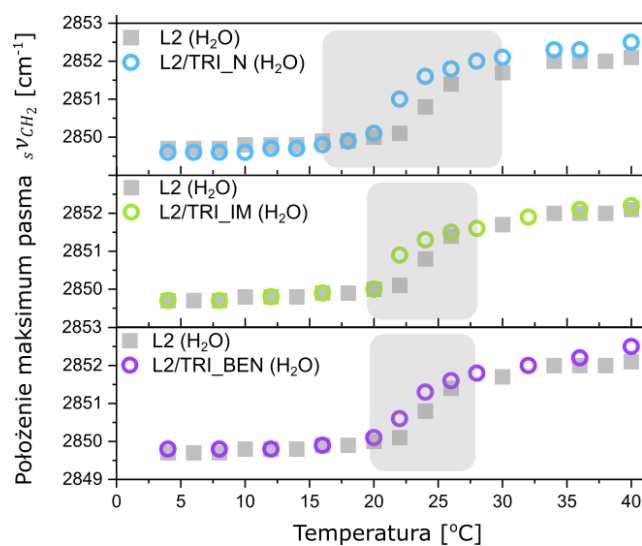
Rysunek 70. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L2/TRI\_BEN (A) oraz zestawienie wartości temperatur (B) i entalpii (C) przemian fazowych DMPC w L2 w zależności stężenia surfaktantu TRI\_BEN. Dla lepszego porównania krzywe DSC na rysunku A zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktant (szara strzałka).

Pomiary FTIR przeprowadzono w wodzie ( $H_2O$ ), by móc dokonać analizy drgań, które przysłaniały pasma pochodzące od  $D_2O$ . Nie ma to wpływu na przebieg badanej zależności (obserwuje się jedynie niewielkie przesunięcie liczb falowych ze względu na inny rozpuszczalnik) i wyznaczanie parametrów przemian fazowych fosfolipidów. Zestawienie pasm symetrycznych grup metylenowych przedstawiono na rysunku 71, a wartości położenia maksimum w zależności od temperatury pomiaru przedstawiono na rysunku 72.



Rysunek 71. Zestawienie pasma drgań symetrycznych grup metylenowych na widmach FTIR zarejestrowanych dla układu L2 (A), L2/TRI\_N (B), L2/TRI\_IMI (C) oraz L2/TRI\_BEN (D) o stężeniu surfaktantu odpowiadającemu  $p/n = 20$  (rozpuszczalnik H<sub>2</sub>O). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR zostały rozsunięte.

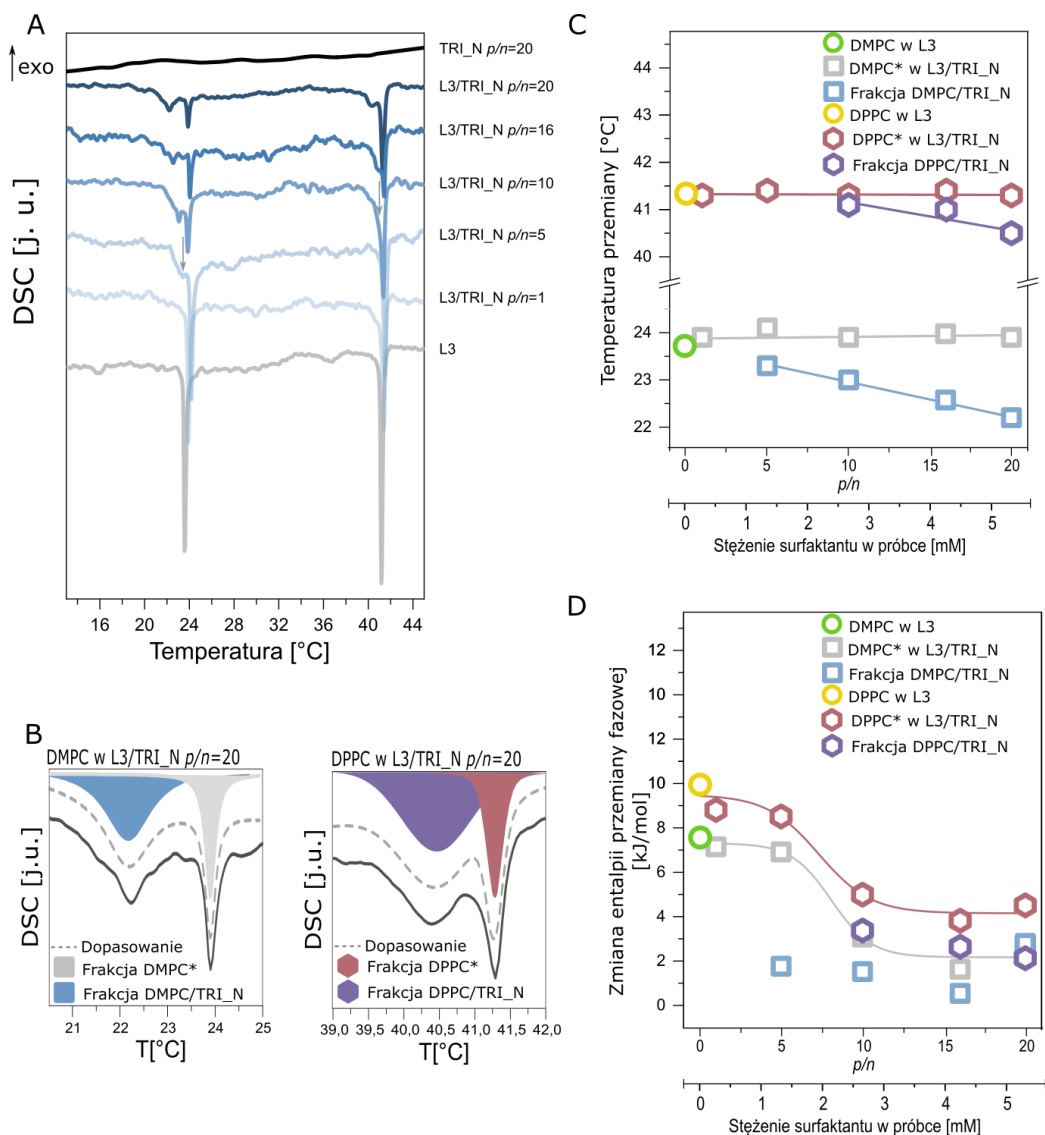
Zakres przemiany DMPC w układzie L2 nie ulegał zmianie w obecności surfaktantu TRI\_IMI ani TRI\_BEN i odpowiadał przedziałowi dla roztworu L2, czyli od 20°C do 28°C, natomiast dla TRI\_N obserwowano poszerzenie 16 – 30°C, a więc surfaktant TRI\_N powodował największe zmiany w strukturze dwuwarstwy lipidowej.



Rysunek 72. Zestawienie położenia maksimum pasma symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych fosfolipidów w układach L2 z badanymi surfaktantami trimerycznymi o stężeniu surfaktantu odpowiadającemu  $p/n = 20$  (rozpuszczalnik H<sub>2</sub>O).

Dla układów bazujących na L3 ponownie największe zmiany obserwowano w obecności surfaktantu TRI\_N. Dla tych układów zaobserwowano rozdwojenie pików zarówno odpowiadających DMPC jak i DPPC (rysunek 73). Dla układów L3 z TRI\_IMI (rysunek 74) lub z TRI\_BEN (rysunek 75) nie zarejestrowano rozdzielania pików pochodzącego od przemiany DPPC, natomiast dla DMPC pik rozdzielał się przy stężeniach surfaktantu ze środkowego zakresu. Dla układu L3/TRI\_IMI przy  $p/n = 20$  ponownie

występowały pojedynczy pik przemiany DMPC, a dla L3/TRI\_BEN o tym samym stężeniu surfaktantu – pik przemiany DMPC praktycznie całkowicie zanikał.

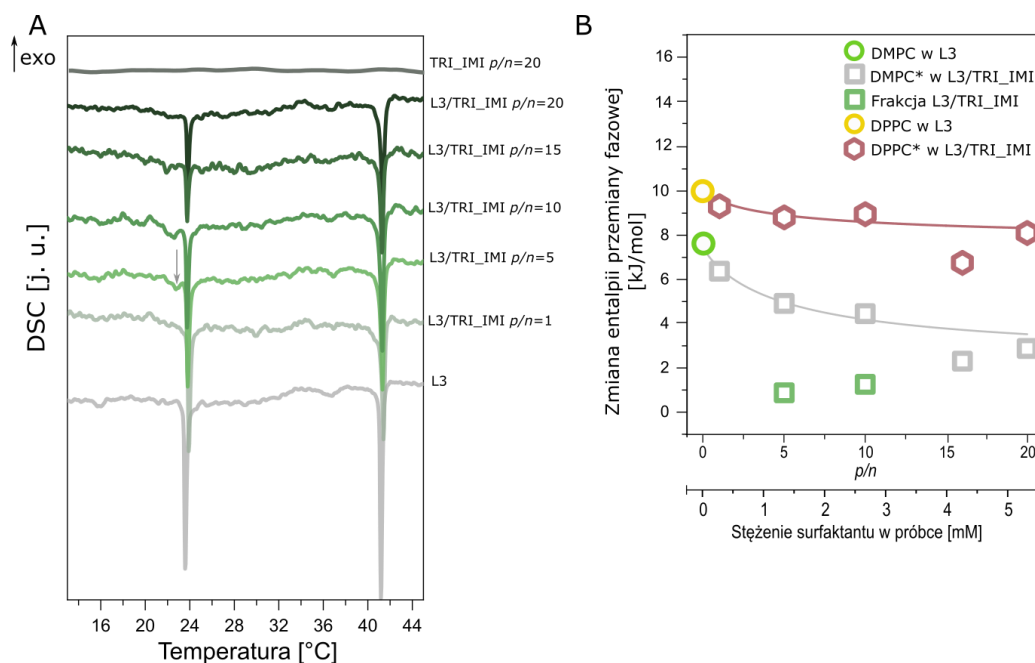


Rysunek 73. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L3/TRI\_N (A) wraz z dekonwolucją w obszarze głównych przemian DMPC i DPPC (B) oraz zestawienie wartości temperatur (C) i entalpii (D) przemian fazowych frakcji L3 w zależności od stężenia surfaktantu lub wartości  $p/n$ . Na rysunku A dla lepszego porównania krzywe DSC zostały rozsunęte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktanty (szara strzałka).

Dla L3/TRI\_N obserwowano rozdział piku DMPC od  $p/n \geq 5$ , a w wyższych stężeniach surfaktantu (tj. od  $p/n \geq 10$ ) występowało również rozdwojenie piku pochodzącego od DPPC. Zarówno temperatura przemiany dla frakcji bogatej w surfaktanty w DMPC (frakcja DMPC/TRI\_N) jak i w DPPC (frakcja DPPC/TRI\_N) przesuwała się w kierunku niższych temperatur ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie. Przy  $p/n = 20$  dla frakcji DMPC/TRI\_N temperatura przemiany osiągała wartość 22,2°C, tym samym była porównywalna do wartości dla L1, L2. Dla frakcji DPPC/TRI\_N zaobserwowano spadek temperatury przemiany o 0,8°C w stosunku do frakcji DPPC\*. W układzie L3/TRI\_MI

zarejestrowano frakcje DMPC/TRI\_IMI przy  $p/n$  równym 5 i 10, o temperaturach przemiany odpowiednio 22,7°C i 22,4°C. Natomiast dla L3/TRI\_BEN frakcje DMPC/TRI\_BEN obserwowano w temperaturze 23,3°C (dla  $p/n = 5$ ) i 22°C (dla  $p/n = 16$ ).

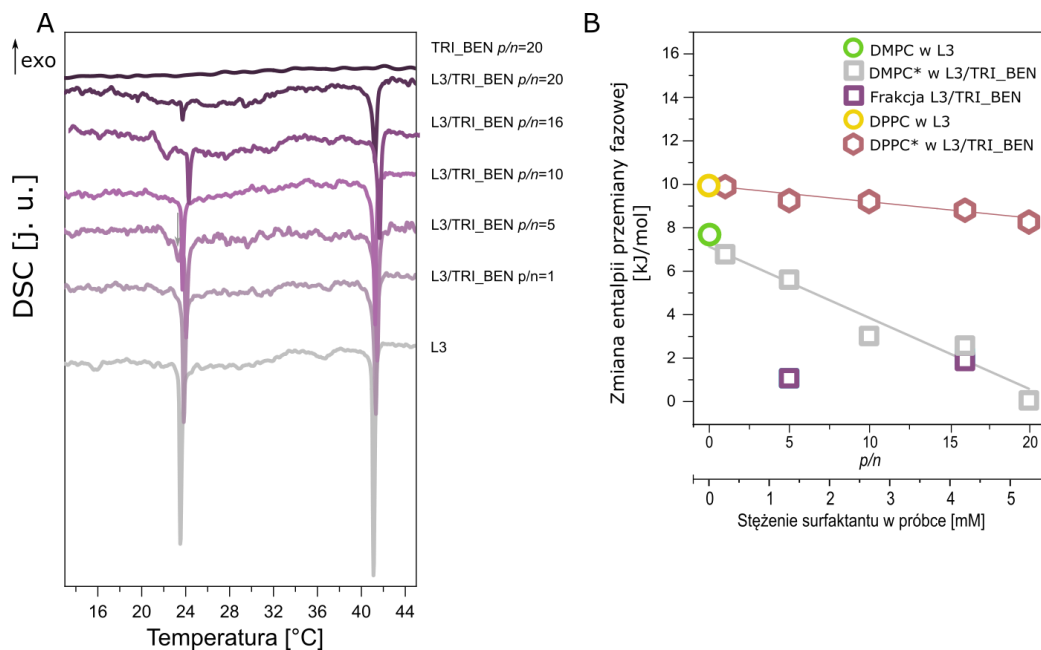
Dla wszystkich układów L3 z badanymi surfaktantami trimerycznymi temperatury przemian frakcji ubogich w surfaktant: DMPC\* i DPPC\*, pomimo wzrostu stężenia surfaktantów, pozostawała na stałym poziomie odpowiednio ok. 23,9°C i ok. 41,3°C.



Rysunek 74. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L3/TRI\_IMI (A) oraz zestawienie wartości entalpii przemian fazowych frakcji L3/surfaktant w zależności od stężenia surfaktantu TRI\_IMI (B). Na rysunku A dla lepszego porównania krzywe DSC zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktant (szara strzałka).

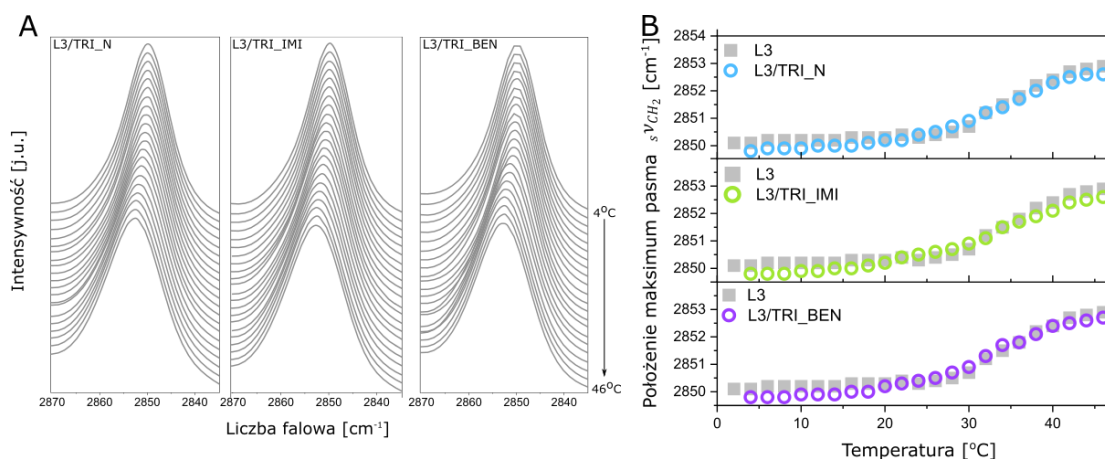
Entalpia głównej przemiany dla DMPC\* i DPPC\* malała wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie z tym, że zmiany te były różne w zależności od typu surfaktantu. Dla L3/TRI\_N obserwowano początkowy spadek entalpii, a następnie mimo zwiększania udziału surfaktantu w układzie entalpia przejścia głównego utrzymywała się na stałym poziomie, a dla L3/TRI\_IMI spadek ten był jeszcze mniejszy. Jedynie dla L3/TRI\_BEN entalpia malała proporcjonalnie w całym zakresie stężeń. Dla  $p/n = 20$  spadek entalpii przemiany DMPC\* wynosił dla L3/TRI\_N 63%, dla L3/TRI\_IMI – 70%, a dla L3/TRI\_BEN aż 97%. Natomiast przy tym samym stężeniu surfaktantu spadek entalpii DPPC\* wynosił odpowiednio: 55%, 19% i 17%, a więc uzyskano odwrotną zależność dla badanych rodzajów surfaktantów. Wyniki te mogą sugerować, że dany typ surfaktantu ma różną zdolność do wbudowywania się w dwuwarstwy lipidowe o różnym składzie - TRI\_BEN chętniej wbudowuje się w dwuwarstwy DMPC, o czym świadczy znaczący spadek entalpii, a TRI\_N w DPPC. Frakcja DMPC\* dla wszystkich badanych surfaktantów i frakcja DPPC/TRI\_N charakteryzują się entalpią na względnie stałym poziomie pomimo wzrostu stężenia surfaktantu w układzie.

Dla wszystkich badanych układów L3 w obecności surfaktantów trimerycznych zanika przedprzejście zarówno DMPC, jak i DPPC.



Rysunek 75. Krzywe DSC układu dwuskładnikowego L3/TRI\_BEN (A) oraz zestawienie wartości entalpii przemian fazowych frakcji L3 w zależności od stężenia surfaktantu TRI\_BEN (B). Na rysunku A dla lepszego porównania krzywe DSC zostały rozsunięte oraz zaznaczono początek wyodrębniania się frakcji bogatej w surfaktant (szara strzałka).

Na podstawie analizy maksimum pasm symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych fosfolipidów w układach L3 z badanymi surfaktantami trimerycznymi (rysunek 76) można zauważyć nieznaczne poszerzenie zakresu przemiany fazowej na skutek obecności surfaktantów. Dla roztworu L3 przemiana zawierała się w przedziale 24 - 42°C, dla L3/TRI\_N przedział ten można przyjąć 16 - 44°C. Dla układów L3/TRI\_IMI i TRI\_BEN niemożliwe było określenie końca przemiany, natomiast początek przemiany przypadał na 16°C. Tym samym, tak jak w poprzednich przykładach dodatek surfaktantu zwiększał płynność dwuwarstwy lipidowej.

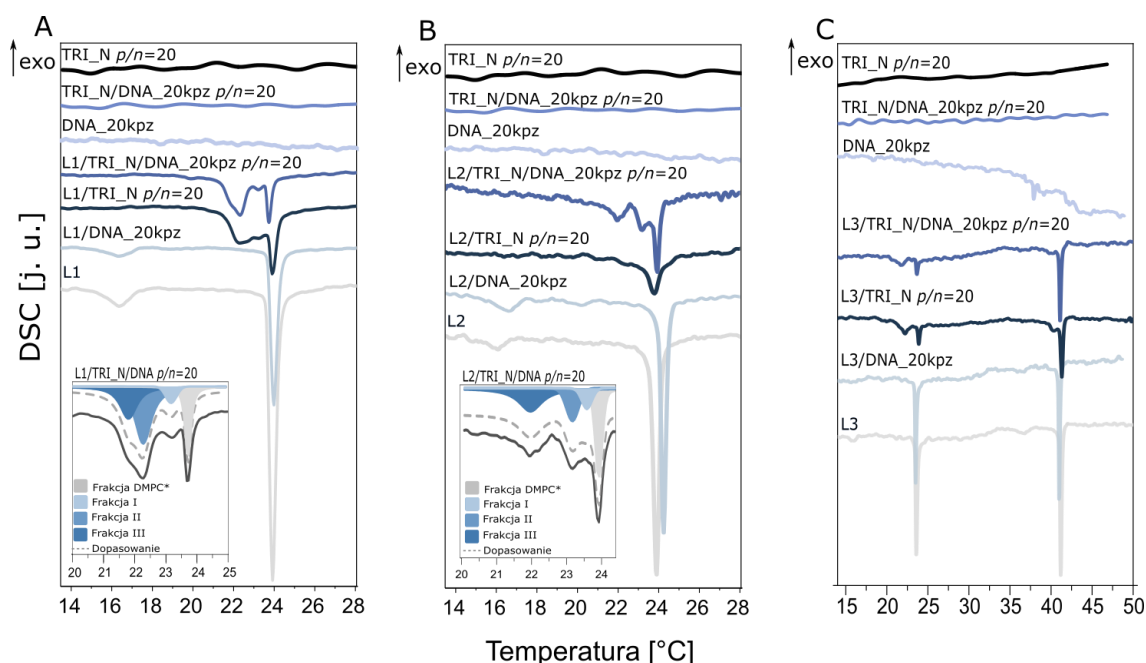


Rysunek 76. Zestawienie pasm widm FTIR zarejestrowanych w obszarze drgań rozciągających grup metylenowych fosfolipidów (A) oraz zależność położenia ich maksimum w układach L3 z badanymi surfaktantami trimerycznymi o stężeniu odpowiadającym  $p/n = 20$  (B). Na rysunku A widma FTIR zostały rozsunięte dla lepszego wizualizacji zmian.

### 6.3.3 Wyznaczenie parametrów przejść fazowych w układach trójskładnikowych

Analizę pomiarów kalorymetrycznych układów trójskładnikowych, czyli lipid-surfaktant-DNA omówiona zostanie na przykładzie układów na bazie surfaktantu TRI\_N i DNA o długości 20 000 par zasad z różnymi mieszaninami fosfolipidów (rysunek 77). Stosunek ładunków dodatnich do ujemnych w tych układach wynosił 20.

W pierwszej kolejności sprawdzono jak zachowują się poszczególne składniki układu w zadanym zakresie temperatur tj. 0°C - 50°C. Tak jak wcześniej to ustalono surfaktant TRI\_N nie przechodzi przemiany fazowej w tym zakresie temperatur - krzywa kalorymetryczna jest linią prostą.



Rysunek 77. Krzywe DSC układów trójskładnikowych na bazie DNA o długości 20 kpz, surfaktantu TRI\_N oraz mieszaniny lipidów: L1 (A), L2 (B), L3 (C). Dla lepszej wizualizacji krzywe DSC zostały rozsunięte. Dodatkowo na rysunku A i B zamieszczono dekonwolucje krzywej DSC dla układów z wysokomolekularnym DNA.

Natomiast dla referencyjnego roztworu DNA w niższych temperaturach krzywa jest linią prostą, ale od ok. 35°C sygnał DSC mocno spada. Zjawisko to najprawdopodobniej związane jest z topnieniem dwuniciowego DNA (denaturacją), czyli z rozdzieleniem na pojedyncze nici na skutek zerwania wiązań wodorowych między zasadami azotowymi. Denaturacja DNA zazwyczaj obserwowana jest powyżej badanego zakresu temperaturowego pomiaru i silnie zależy min. od długości DNA i składu nukleotydowego [262–264]. Należy również odnotować, że ogromny wpływ na przebieg krzywej kalorymetrycznej dla roztworów DNA ma także zastosowany rozpuszczalnik (pH, stężenie jonów) [265]. Co więcej przy niskim stężeniu DNA (0,5 mM) oraz niskim stężeniu soli w roztworze (0,01 mM NaBr) na termogramie nie obserwowano przemiany – zakres do 110°C [266]. W literaturze można znaleźć również, że dla DNA o stężeniu 1,05 mg/ml rozpuszczonego w 85 mM buforze fosforanowym o pH 7,3 obserwowano przemianę fazową przy temperaturze 63°C, której entalpia wynosiła około 18 kJ/mol. Warto zaznaczyć, że przemiana ta zachodziła w szerokim zakresie temperaturowym od 50°C do 70°C [264].



Dlatego zapewne gdyby zwiększyć zakres temperaturowy pomiaru to pomimo niskiego stężenia DNA i niskiego stężenia soli a także polidispersyjności próbki (ze względu na liczne fragmenty DNA o różnej długości), oraz uwzględniając możliwości aparaturowe (wysoka czułość DSC) możliwa byłaby obserwacja topnienia DNA. Choć przemiana ta zapewne odbywałaby się w szerokim zakresie temperaturowym i charakteryzowała się małymi zmianami entalpii

Dla próby DNA z surfaktantem TRI\_N nie zarejestrowano sygnału DSC. Doniesienia literaturowe wskazują, że surfaktanty powodują przesunięcie się temperatury topnienia DNA do wyższych temperatur oraz powodują poszerzenie przemiany [267], prawdopodobnie dlatego krzywa DSC ma inny przebieg niż krzywa zarejestrowana dla roztworu DNA.

Następnie poddano analizie oddziaływania między fosfolipidami w badanych mieszaninach i kwasem nukleinowym o długości 20 kpz. Dla układu L1/DNA\_20kpz zaobserwowano przesunięcie temperatury przemiany głównej o  $0,2^{\circ}\text{C}$  w kierunku wyższych temperatur ( $T_m = 24^{\circ}\text{C}$ ) w porównaniu do roztworu L1. Odnotowano również dla tej próbki znaczący spadek entalpii – do  $8,5 \text{ kJ/mol}$ , czyli o połowę wartości w stosunku do L1. Dla L2/DNA\_20kpz wzrost temperatury głównej przemiany był jeszcze większy, bo o  $0,3^{\circ}\text{C}$  ( $T_m = 24,2^{\circ}\text{C}$ ), ale entalpia przemiany nieznacznie zmalała (o 7%) w stosunku do L2 i wynosiła  $9,3 \text{ kJ/mol}$ . Dla L3/DNA\_20kpz nie zarejestrowano znaczących zmian w wartościach temperatur przemian: dla DMPC  $T_m = 23,6^{\circ}\text{C}$ , czyli o  $0,1^{\circ}\text{C}$  niższa niż dla DMPC w L3, a dla DPPC  $T_m = 41,3^{\circ}\text{C}$ , czyli wynosiła tyle samo co dla DPPC w L3. Natomiast odnotowano obniżenie entalpii przemian: DMPC o ok. 30%; a DPPC o ok. 9% w stosunku do L3 bez DNA.

W obecności kwasu nukleinowego - spada entalpia głównej przemiany fosfolipidów. Ta zależność jest obserwowana w każdej z trzech badanych mieszanin fosfolipidowych. Natomiast przesunięcie w kierunku wyższych temperatur przemiany głównej obserwuje się dla układów na bazie DMPC (L1) i DMPC/DOPE (L2).

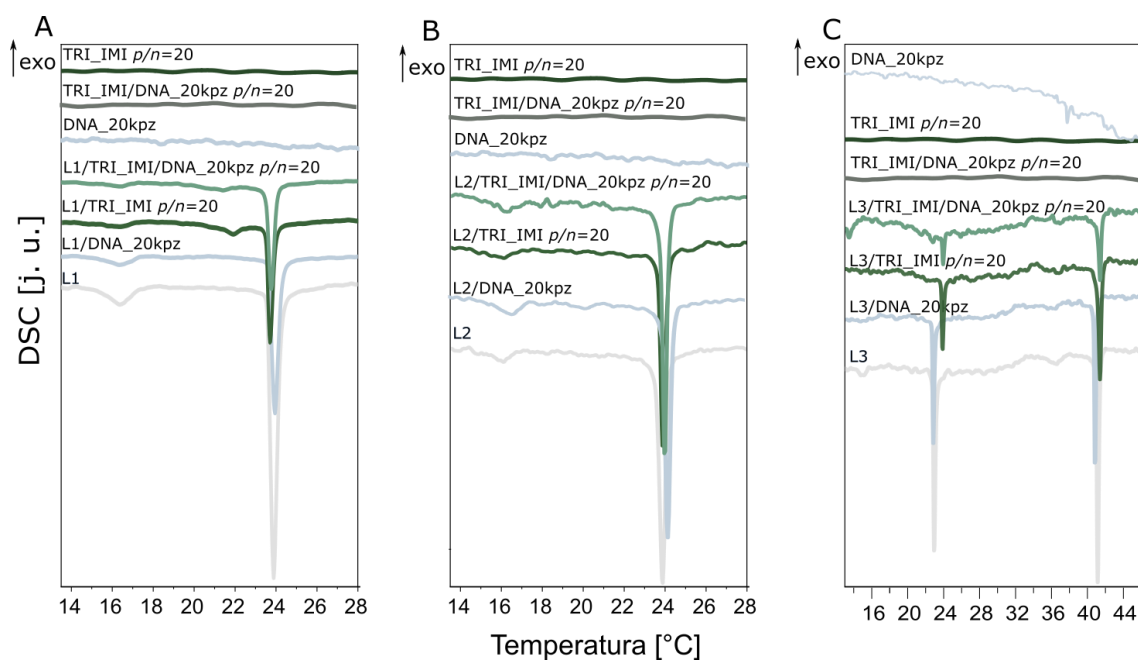
W następnym kroku poddano analizie wyniki DSC dla układów trójskładnikowych, składających się z formułacji lipidowych, surfaktantu trimerycznego i kwasu nukleinowego.

W układach na bazie L1 obserwowano spadek temperatury i spadek entalpii przemiany głównej, a także zmiany w rozkładzie entalpii między poszczególnymi frakcjami. Podobnie jak w L1/TRI\_N, w układzie L1/TRI\_N/DNA zarejestrowano 4 frakcje: jedną ubogą w TRI\_N i trzy o wyższej zawartości cząsteczek surfaktantu. Obecność DNA w układzie powodowała przesunięcie w kierunku niższych temperatur: dla frakcji DMPC\* o  $0,2^{\circ}\text{C}$ , a dla frakcji III spadek o  $0,4^{\circ}\text{C}$ . Odnotowano również spadek sygnału DSC, a tym samym spadek entalpii przemiany głównej. Co ciekawe, zmienił się wzajemny stosunek entalpii przemiany głównej dla frakcji DMPC\* do entalpii frakcji bogatych w surfaktant: dla układu bez DNA wynosił on 40:60, natomiast dla układu z DNA zmienił się na 20:80 – na korzyść frakcji bogatej w surfaktant. Istotna jest również znaczna separacja tych frakcji, na termogramie krzywe DSC bardzo się różnią między sobą kształtem. Dla L1/TRI\_IMI\_DNA\_20kpz (rysunek 78 A) temperatura przemiany dla frakcji L1/TRI\_IMI spadła aż o  $0,5^{\circ}\text{C}$ , ale temperatura dla frakcji DMPC\* pozostała bez zmian. Natomiast dla L1/TRI\_BEN/DNA\_20kpz (rysunek 79 A) temperatura obu frakcji spadła o  $0,1^{\circ}\text{C}$ . W obu układach entalpia przemiany spadała, ale nieznacznie zwiększał się udział frakcji DMPC\*.

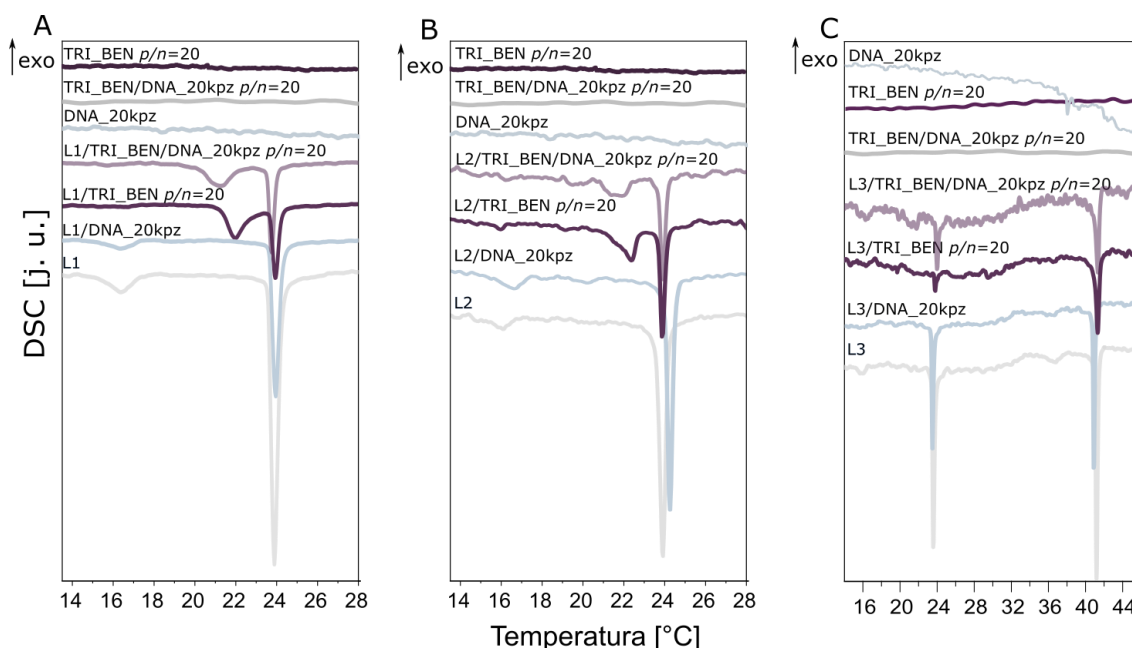
Dla układu L2/TRI\_N/DNA\_20kpz zarejestrowano cztery frakcje, choć dla próby referencyjnej (bez DNA) obserwowano jeden pik na krzywej DSC. Przebieg krzywej kalorymetrycznej jest bardzo podobny jak dla L1/TRI\_N/DNA\_20kpz. Temperatura

przemiany dla najbardziej obfitej w surfaktant TRI\_N frakcji to 22°C. Stosunek entalpii frakcji DMPC\* do entalpii frakcji bogatej w surfaktanty wynosi 40:60, a entalpia przemiany DMPC\* była większa niż dla próby bez DNA. Jedynie dla tego układu obserwowano tak silne zmiany w krzywej kalorymetrycznej na skutek obecności kwasu nukleinowego. Krzywe DSC dla L2/TRI\_IMI/DNA\_20kpz (rysunek 78 B) lub dla L2/TRI\_BEN/DNA\_20kpz (rysunek 79 B) mają podobny przebieg, jak krzywe odpowiadających im prób bez DNA, a zarejestrowane zmiany są stosunkowo niewielkie i dotyczą np. wzrostu entalpii przemiany o ok. 25% (L2/TRI\_IMI/DNA\_20kpz) lub spadku temperatury przemiany frakcji bogatej w surfaktant o 0,5°C (L2/TRI\_BEN/DNA\_20kpz).

W układach na bazie L3, podobnie jak w poprzednich układach największe zmiany obserwowano w próbkach na bazie surfaktantu TRI\_N (rysunek 77 C). Na skutek obecności DNA w układzie L3/TRI\_N dla wszystkich zarejestrowanych frakcji obserwowano spadek temperatury przemiany: o 0,2°C dla frakcji DMPC\*, o 0,4°C - DMPC/TRI\_N, o 0,2°C - DPPC\* i o 0,5°C - DPPC/TRI\_N. Zarejestrowano spadek entalpii DMPC\* i DMPC/TRI\_N, ale wzrost entalpii DPPC\* i DPPC/TRI\_N. Dla L3/TRI\_IMI/DNA (rysunek 78 C) nieznacznie wzrosła temperatura przemiany fazowej obu zarejestrowanych frakcji, ale entalpia spadła. Z kolei dla L3/TRI\_BEN/DNA (rysunek 79 C) temperatura pozostała bez zmian, ale sygnał od DMPC\* silniej wzrósł.

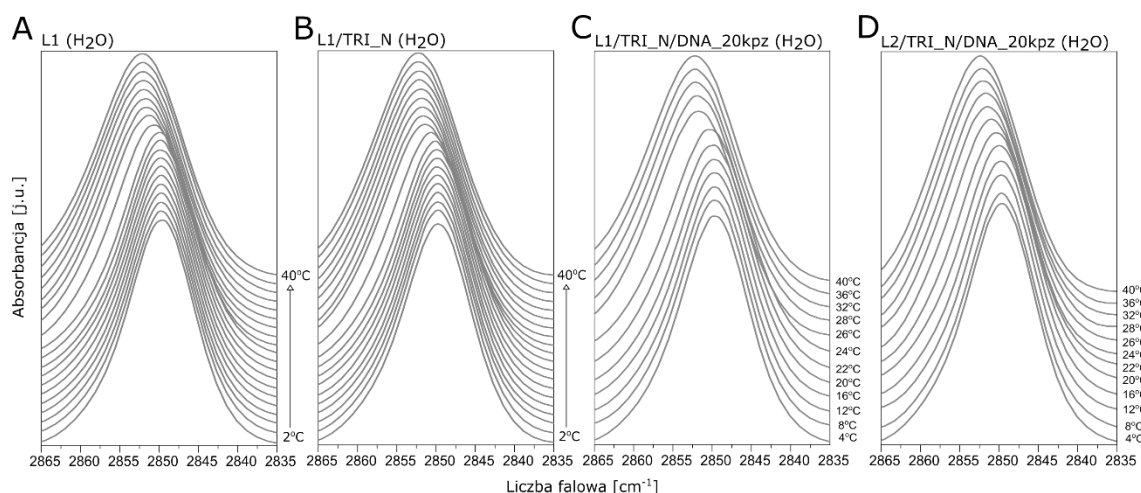


Rysunek 78. Krzywe DSC dla układów trójskładnikowych na bazie DNA o długości 20 kbp, surfaktantu TRI\_IMI oraz mieszaniny lipidów: L1 (A), L2 (B), L3 (C). Dla lepszej wizualizacji krzywe DSC zostały rozsunięte.



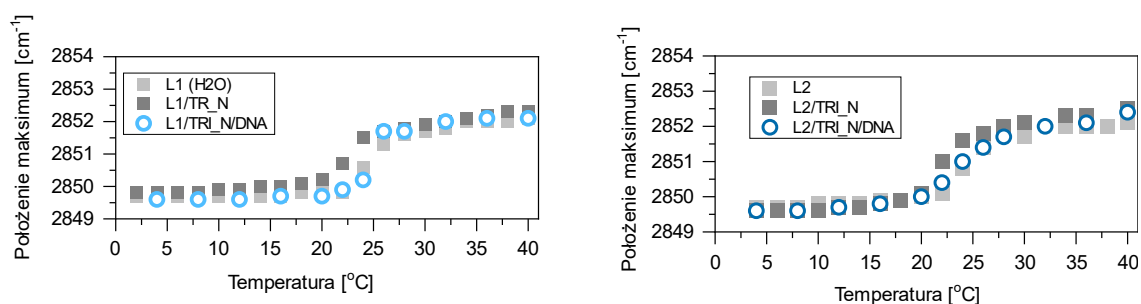
Rysunek 79. Krzywe DSC dla układów trójskładnikowych na bazie DNA o długości 20 kbp, surfaktantu TRI\_BEN oraz mieszaniny lipidów: L1 (A), L2 (B), L3 (C). Dla lepszej wizualizacji krzywe DSC zostały rozsunięte.

Podjęto również próbę analizy widm podczerwieni i sprawdzenia, jak dodatek DNA wpływa na konformację łańcuchów alkilowych fosfolipidów w funkcji temperatury. Obserwowane zmiany były bardzo niewielkie, a zostaną omówione na przykładzie układu L1/TRI\_N/DNA\_20kbp, w którym rozpuszczalnikiem była woda. Na rysunku 80 zestawiono pasma drgań symetrycznych grup metylenowych dla L1, L1/TRI\_N oraz L1/TRI\_N/DNA\_20kbp, z kolei na wykresie 81 przedstawiono wyniki położenia maksimum pasma w funkcji temperatury dla analizowanych układów. Przebieg zależności dla L1 oraz L1/TRI\_N odpowiada wynikom uzyskanym dla roztworów na bazie wody deuterowanej – dla czystego DMPC widać wyraźną skokową zmianę, natomiast dodatek surfaktantu powoduje bardziej płynne zmiany w położeniu maksimum. Natomiast w obecności kwasu nukleinowego ze wzrostem temperatury początkowo nie obserwowano przesunięcia maksimum pasma, dopiero w temperaturze 22°C i 24°C odnotowano nieznaczny wzrost liczby falowej, a po osiągnięciu temperatury 26°C wystąpiła skokowa zmiana położenia maksimum, którego wartość nie uległa zmianie z dalszym wzrostem temperatury. Zestawiając te wyniki z układami bez DNA można zauważyć, że w niskich temperaturach mają one podobny przebieg, ale początek przemiany dla układu L1/TRI\_N/DNA\_20kbp przypada w nieco wyższej temperaturze. Z kolei skokowa zmiana i dalsza stabilizacja położenia maksimum koreluje bardziej z wynikami uzyskanymi dla DMPC. Dlatego być może dodatek DNA podwyższa temperaturę przemiany fazowej, ale też zwiększa jej kooperatywność.



Rysunek 80. Zestawienie pasma drgań symetrycznych grup metylenowych w funkcji temperatury dla wodnych roztworów układów: L1 (A), L1/TRI\_N o  $p/n = 20$  (B), L1/TRI\_N/DNA\_20kpz o  $p/n = 20$  (C) oraz L2/TRI\_N/DNA\_20kpz o  $p/n = 20$  (D). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR zostały rozsunięte.

Innym przykładem obserwowanych zmian jest układ L2/TRI\_N/DNA\_20kpz, gdzie również temperatura początku przemiany przypada na wyższe temperatury niż dla układu bez DNA, ale w tym przypadku przemiana zachodziła w znacznie szerszym zakresie - obserwowano przesuwanie się położenia maksimum w wyższych temperaturach.



Rysunek 81. Zależność położenia maksimum pasm symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych fosfolipidów L1 (A) oraz L2 (B) w układach z surfaktantem TRI\_N oraz DNA o długości 20 kpz.

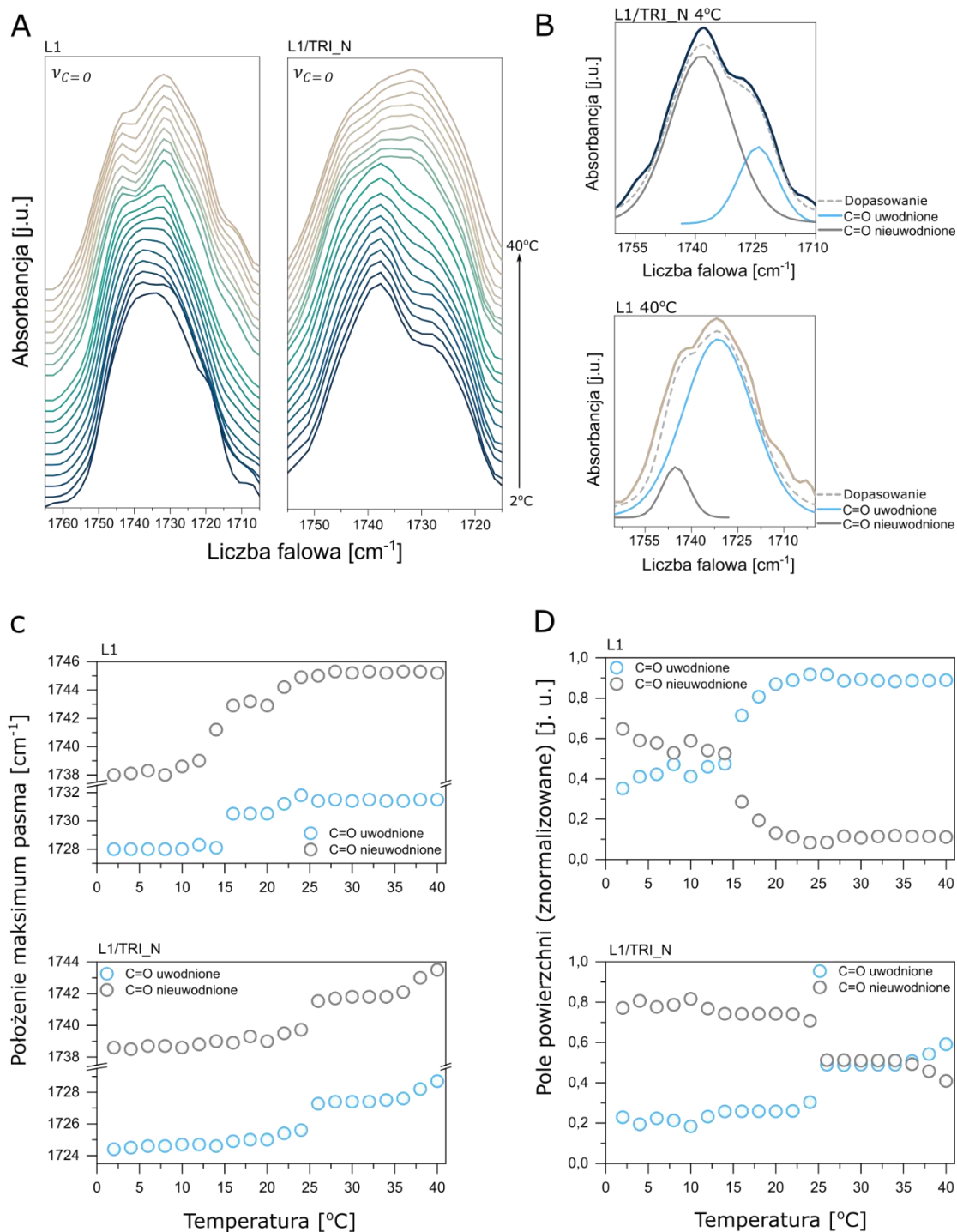
### 6.3.4 Zmiany stopnia hydratacji części polarnych fosfolipidów w układach dwuskładnikowych

Obszar międzyfazowy błon biologicznych to region między hydrofilowymi głowami a hydrofobowymi ogonami lipidów budujących błonę, w obszarze tym dochodzi do kontaktu z cząsteczkami wody. Szacuje się, że obszar międzyfazowy zajmuje nawet około 40% grubości w przypadku membrany o przekroju 40 Å [268]. Wodę występującą w tym regionie uważa się za składnik błony. Cząsteczki wody mogą być bezpośrednio przyłączone do grupy fosforanowej lub karbonylowej lipidów – jest to tzw. woda hydratacyjna, lub występować w postaci tzw. wody uwięzionej (ang. *confined water*). Jedna cząsteczka fosfolipidu jest w stanie przyłączyć od 18 do 22 cząsteczek wody, z czego aż 6 cząsteczek wody jest bezpośrednio związanych z pojedynczą grupą fosforanową [268].

Na obserwowane w podczerwieni drganie rozciągające grup karbonylowych ( $\nu_{C=O}$ ) zlokalizowane w zakresie 1750 - 1720  $\text{cm}^{-1}$ , składa się z pasmo od drgań grup C=O fosfolipidu, które utworzyły wiązanie wodorowe (ok. 1740  $\text{cm}^{-1}$ ) i pasmo od grup C=O, które tego wiązania nie utworzyły (ok. 1728  $\text{cm}^{-1}$ ). Dodatkowo położenie tych pasm uzależnione jest od fazy, jaką tworzą fosfolipidy, dla DMPC [154]:

- dla fazy żelowej  $L_{\beta'}$  położenie pasma od grup C=O, które utworzyły wiązanie wodorowe przypada na ok. 1730,7  $\text{cm}^{-1}$ , natomiast dla grup C=O, które nie tworzą wiązania wodorowego drganie to zlokalizowane jest ok. 1738,4  $\text{cm}^{-1}$ , różnica położenia maksimów wynosi 7,7  $\text{cm}^{-1}$ , a więc pasma są stosunkowo blisko siebie,
- dla fazy żelowej pofałdowanej  $P_{\beta'}$  odpowiednio: ok. 1724  $\text{cm}^{-1}$ , ok. 1742  $\text{cm}^{-1}$ , różnica położenia maksimów wynosi 18  $\text{cm}^{-1}$ , oznacza to, że pasma są mocno od siebie oddalone,
- dla fazy ciekłokrystalicznej  $L_{\alpha}$ : ok. 1721,5  $\text{cm}^{-1}$  oraz ok. 1738  $\text{cm}^{-1}$ .

Analiza zmian hydratacyjnych w obrębie grup karbonylowych zostanie omówiona na przykładzie L1 oraz układu L1/TRI\_N o stężeniu surfaktantu odpowiadającym  $p/n = 20$ . Na rysunku 82 A zestawiono pasma drgań grup C=O w zależności temperaturowej dla wskazanych wyżej układów. Kształt pasm ulega zmianie, oznacza to, że w niższych temperaturach obserwuje się wyższą intensywność pasma przy długości ok. 1740  $\text{cm}^{-1}$ , natomiast wraz ze wzrostem temperatury – początkowo dochodzi do zrównania się intensywności obu pików składowych, natomiast w wyższych temperaturach pasmo przy ok. 1730  $\text{cm}^{-1}$  ma większą intensywność. Aby dokładnie wyznaczyć położenia maksimum składowych drgania  $\nu_{C=O}$  przeprowadzono dekonwolucję poszczególnych pasm (na rysunku 82 B przedstawiono przykładowe dekonwolucje pasm, które znacząco się między sobą różniły) oraz wykreślono zależność położenia maksimów pasm składowych od temperatury dla obu układów (rysunek 82 C, D). Dla porządku wprowadzono oznaczenie „C=O uwodnione”, dla pasm drgań grup karbonylowych, które utworzyły wiązanie wodorowe oraz oznaczenie „C=O nieuodnione”, dla pasm drgań grup karbonylowych, które nie utworzyły wiązań wodorowych. Warto wspomnieć, że niektórzy badacze podejmują próbę dekonwolucji pasma grup karbonylowych na składową nietworzącą wiązań wodorowych oraz na kilka składowych tworzących wiązania wodorowe, ale uwzględniając różny stopień ich hydratacji [269].



Rysunek 82. Widma FTIR w zakresie drgań grup karbonylowych dla układu L1 oraz L1/TRI\_N w różnych temperaturach (A) wraz z przykładowymi pasmami po dekonwolucji (B) oraz zależność temperaturowa położenia maksimum pasm drgań grup C=O (C). Zależność pola powierzchni pasm drgań grup C=O uwodnionych i niewodnionych od temperatury dla układu L1 oraz L1/TRI\_N(D). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR zostały rozsunięte (A).

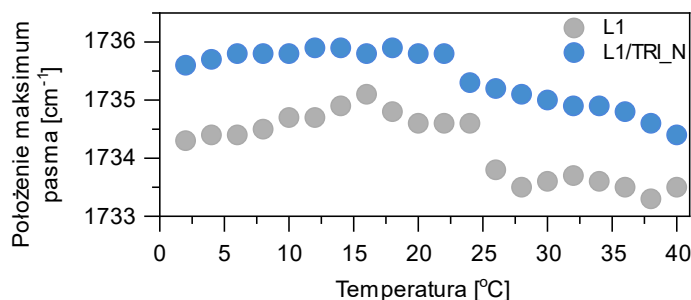
Położenie maksimum pasm drgań grup C=O zarówno uwodnionych jak i niewodnionych wykazuje charakterystyczną zależność temperaturową. Wzrasta liczba

falowa położenia maksimum wraz ze wzrostem temperatury. W przypadku L1, czyli roztworu DMPC, zarejestrowano dwa punkty przegięcia tej zależności: ok. 16°C oraz 24°C – co odpowiada przemianom fazowym DMPC. W temperaturze od 2°C do 14°C maksimum pasma uwodnionych grup karbonylowych obserwowano przy 1728 cm<sup>-1</sup>. Następnie w temperaturze 16°C obserwowano wzrost liczby falowej do 1730,5 cm<sup>-1</sup>, a powyżej 24°C położenie maksimum pasma utrzymało się na poziomie 1731,8 cm<sup>-1</sup>. Dla drgań rozciągających grup C=O nietworzących wiązań wodorowych zależność temperaturowa przebiega podobnie: w przedziale 2 - 14°C maksimum przypada na 1738 cm<sup>-1</sup>, w 16°C wzrosła do 1742,9 cm<sup>-1</sup>, a po przekroczeniu 24°C utrzymywała wartość 1744,9 cm<sup>-1</sup>. Pasma grup karbonylowych uwodnionych i nieuwodnionych wraz ze wzrostem temperatury ulegają wyraźniej separacji, która wynosi: 10 cm<sup>-1</sup> (w przedział temperatur 2 - 14°C), 12,5 cm<sup>-1</sup> (w 16°C) oraz 12,8 cm<sup>-1</sup> (powyżej 24°C).

Dla układu L1 z surfaktantem TRI\_N obserwowano łagodniejsze zmiany w przebiegu zależności temperaturowej położenia pasm drgań grup karbonylowych niż w przypadku roztworu DMPC. Nie odnotowano tak wyraźnej zmiany związanej z przedprzejdciem jak w L1, a co więcej powyżej 36°C zarejestrowano dalszy wzrost liczby falowej maksimum pasm grup C=O.

Zmiany hydratacyjne w obrębie grup karbonylowych można również ocenić na podstawie zmian w proporcji populacji grup C=O, które utworzyły wiązanie wodorowe do populacji grup C=O, które nie utworzyły wiązania wodorowego. Powyższe zmiany w funkcji temperatury mogą być obserwowane na podstawie wyznaczenia stosunku powierzchni pasma pochodzącego od drgań grup C=O uwodnionych i C=O nieuwodnionych (wszystkie widma FTIR w obszarze drgań C=O zostały wcześniej znormalizowane). Powyższa zależność zostanie omówiona na przykładzie układu L1 oraz L1/TRI\_N (rysunek 82 D). Dla L1 wraz ze wzrostem temperatury obserwuje się stopniowe zmniejszenie populacji grup C=O nietworzących wiązań wodorowych na korzyść grup C=O tworzących te wiązania. W temperaturze 16°C obserwuje się zrównanie powierzchni obu składowych, a od 24°C ok. 90% grup C=O utworzyło wiązanie z cząsteczkami wody. W przypadku układu L1 z surfaktantem TRI\_N punkt równowagi między obiema populacjami grup C=O przypada na zakres temperatur 26-36°C, a dopiero potem większość grup C=O utworzyło wiązania wodorowe. W tym przypadku można by wysnuć wniosek, że surfaktanty wpływają na zmniejszenie stopnia hydratacji lipidów.

Zupełnie innym podejściem jest pominięcie rozdziału na różne składowe i analizowanie pasma C=O jako całości oraz wyznaczanie tzw. punktu środkowego [154]. Na rysunku 83 przedstawiono wyniki zależności temperaturowej od położenia maksimum pasma od drgań grup C=O dla układu L1 i L1/TRI\_N. W przypadku L1 obserwuje się początkowo (do 16°C) wzrost liczby falowej położenia maksimum pasma od drgań grup karbonylowych, a następnie nieznaczny spadek. Po przekroczeniu 24°C odnotowano znaczący spadek, ale pomimo dalszego wzrostu temperatury liczba falowa nie zmieniała już swojej wartości. Tym samym odnotowane zmiany pokrywają się z temperaturami przedprzejdcia i przemiany głównej dla DMPC. W przypadku układu z surfaktantem zmiany były dużo bardziej subtelne: nieznaczny wzrost liczby falowej do 24°C, a następnie jej spadek z dalszym wzrostem temperatury. Przebieg powyższej zależności jest zgodny z doniesieniami literaturowymi [154].

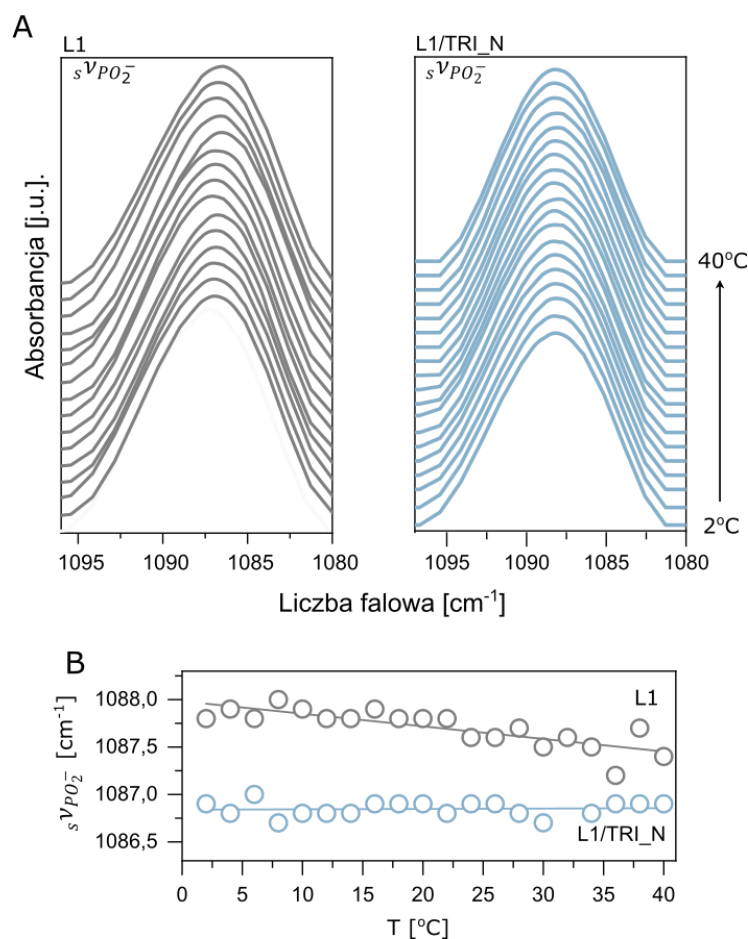


Rysunek 83. Zależność temperaturowa położenia maksimum pasma drgań grup C=O dla układu L1 i L1/TRI\_N wyznaczonego na podstawie punktu środkowego pasma.

Przyjmuje się, że to grupy fosforanowe w pierwszej kolejności wiążą cząsteczki wody, a dopiero kiedy osiągną nasycenie (6 cząsteczek wody przyłączy się do każdej grupy fosforanowej) woda penetruje w kierunku hydrofobowych łańcuchów fosfolipidu [270]. Aby móc obserwować zmiany w tym obszarze podczerwieni, należało zastosować wodę jako rozpuszczalnik, gdyż pasma od wody deuterowanej pokrywają się z pasmami drgań fosforanowych.

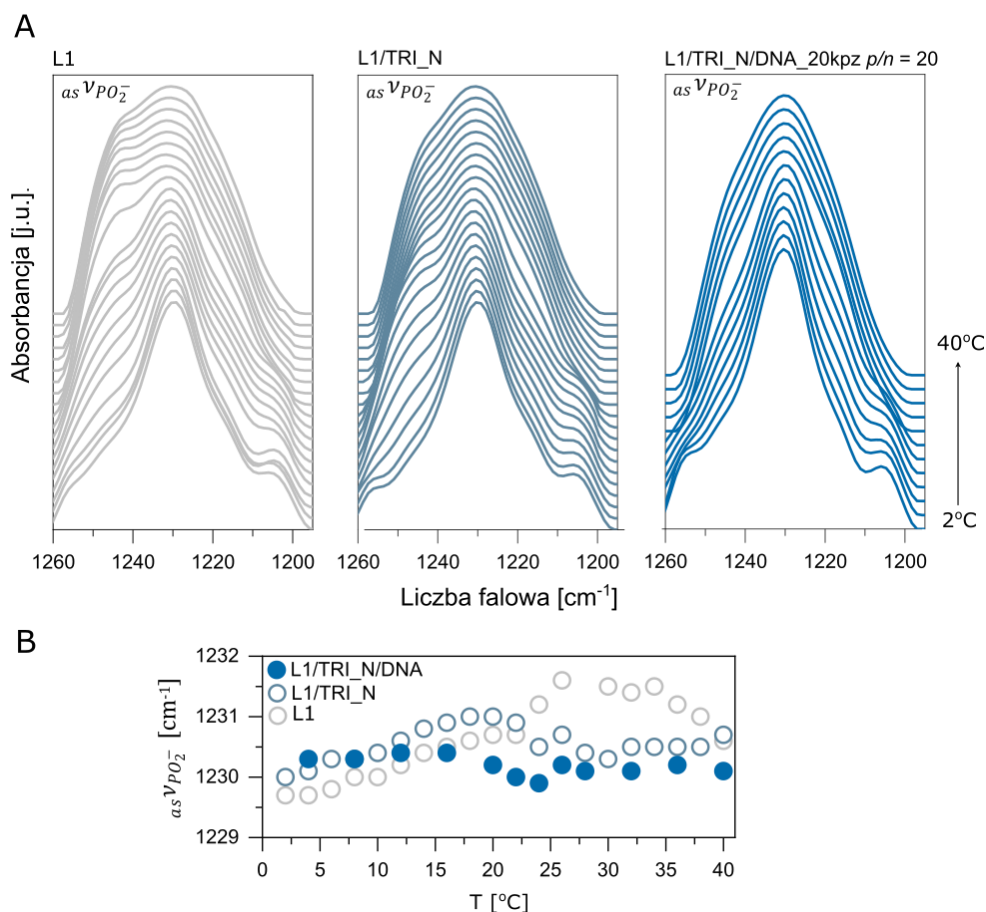
W przypadku symetrycznych drgań rozciągających grup fosforanowych (zlokalizowanych w obszarze 1100 - 1050  $\text{cm}^{-1}$ ) obserwowane zmiany były niewielkie zarówno dla układu L1 jak i L1/TRI\_N o stężeniu surfaktantu odpowiadającym  $p/n = 20$  (rysunek 84). Dla L1 odnotowano nieznaczny spadek liczby falowej (o 0,5  $\text{cm}^{-1}$ ) wraz ze wzrostem temperatury, natomiast dla L1/TRI\_N wartość liczby falowej dla maksimum pasma tego drgania utrzymywało się na względnie stałym poziomie. Trudność w analizie symetrycznych drgań rozciągających grup fosforanowych prawdopodobnie wynika z bardzo małej intensywności tego pasma w podczerwieni, stąd odczyt położenia piku może być obarczony błędem.





Rysunek 84. Widma FTIR w obszarze symetrycznych drgań rozciągających grup fosforanowych dla układu L1 oraz L1/TRI\_N (A) wraz zależnością temperaturową dla położenia maksimum tego drgania (B). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR na rysunku A zostały rozsunięte.

Asymetryczne drgania rozciągające grup fosforanowych występują w regionie 1260 - 1200  $\text{cm}^{-1}$  i charakteryzują się większą intensywnością niż symetryczne drgania grup  $\text{PO}_2^-$ . Dla roztworu DMPC (rysunek 85 A) wraz ze wzrostem temperatury obserwuje się zmianę kształtu rejestrowanego widma FTIR, a ok.  $1250\text{cm}^{-1}$  wyodrębnia się dodatkowy pik, którego pochodzenie jest niejasne. Być może drganie  $as\nu_{\text{PO}_2^-}$  należy analizować w podobny sposób, jak pasmo drgań grup karbonylowych (opisane powyżej), czyli rozłożyć je na dwa pasma składowe: od drgań grup  $\text{PO}_2^-$ , które utworzyły wiązanie z cząsteczkami wody oraz drgań grup  $\text{PO}_2^-$ , które tego wiązania nie utworzyły. Ostatecznie analizę oparto o punkt środkowy pasma drgań grup fosforanowych. Dla L1 pasmo drgań asymetrycznych grup  $\text{PO}_2^-$  w niskich temperaturach charakteryzuje się małą szerokością półwąką, natomiast wraz ze wzrostem temperatury szerokość ta wzrasta. W zależności temperaturowej położenia maksimum pasma asymetrycznych drgań grup  $\text{PO}_2^-$  (rysunek 85 B) można zauważyć początkowy wzrost liczby falowej ze wzrostem temperatury.

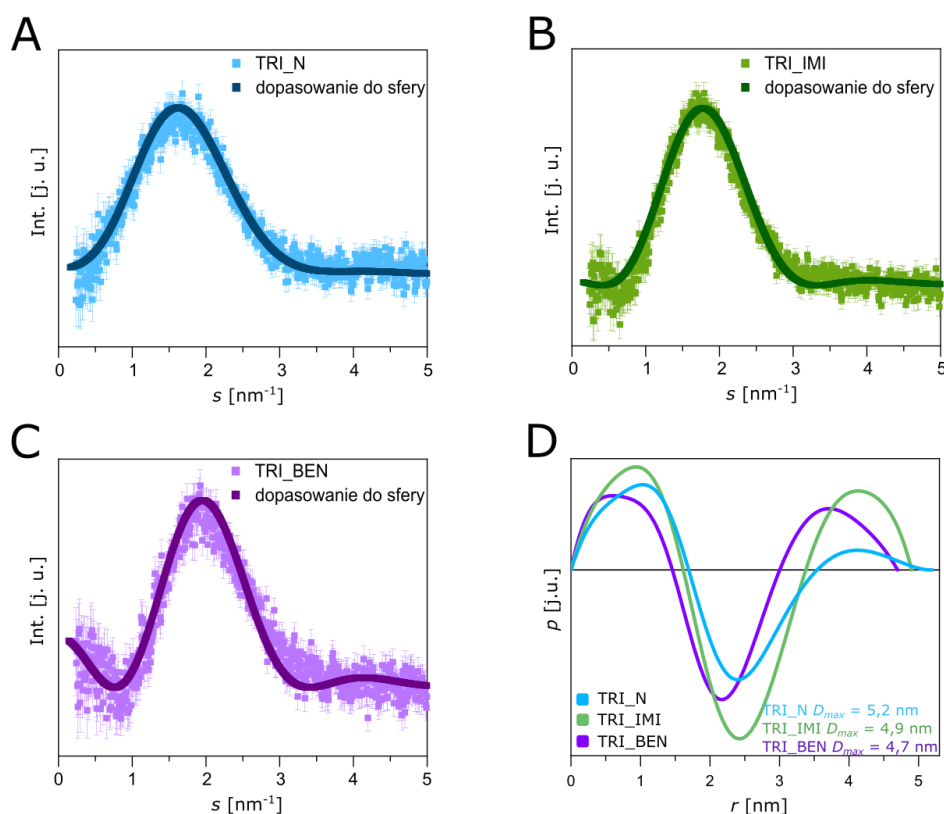


Rysunek 85. Widma FTIR w obszarze asymetrycznych drgań rozciągających grup fosforanowych dla układu L1, L1/TRI\_N oraz L1/TRI\_N/DNA\_20kpz (A) wraz zależnością temperaturową dla położenia maksimum tego drgania (B). Dla lepszej wizualizacji widma FTIR zostały rozsunięte (A).

Wzrost ten było obserwowany do ok. 26°C z tym, że od 22°C był intensywniejszy, co za pewne związane jest z główną przemianą DMPC. Dla L1/TRI\_N o stężeniu surfaktantu odpowiadającemu  $p/n = 20$ , po początkowy wzroście w temperaturze 20°C wartość liczby falowej zmniejszyła się. Dla L1/TRI\_N/DNA\_20kpz o  $p/n = 20$  również odnotowano spadek po przekroczeniu 16°C. Podobną zależność obserwował Rosa, który spadek liczby falowej przypisał wzrostowi liczby wiązania wody przez grupy  $PO_2^-$ , a ponowny wzrost liczby falowej miał sugerować, że wzrost temperatury w stanie ciekłokrystalicznym lipidów jest niekorzystny dla ich hydratacji [270]. Obserwowane zmiany są mniejsze dla układów wieloskładnikowych: dla L1 maksymalna różnica wynosi 1,9  $cm^{-1}$ , dla L1/TRI\_N: 1  $cm^{-1}$ , a dla L1/TRI\_N/DNA: 0,5  $cm^{-1}$ . Podobne zależności obserwował Pohle, z tym że zmniejszenie amplitudy zmian omawianej zależności tłumaczył obecnością grup fosforanowych DNA, które „przysłaniały” drgania grup fosforanowych lipidów [271].

## 6.4 Określenie parametrów strukturalnych wybranych układów za pomocą techniki SAXS

Analizę parametrów strukturalnych na podstawie wyników małokątowego rozpraszania rentgenowskiego SAXS, rozpoczęto od zbadania wodnych roztworów surfaktantów trimerycznych o stężeniu 5,35 mM. Stężenie to odpowiada stężeniu surfaktantu w układach mieszanych o stosunku  $p/n$  równym 20. Na rysunku 86 przedstawiono krzywe SAXS oraz wyliczone na ich podstawie rozkłady odległości wewnątrzcząsteczkowych dla badanych surfaktantów trimerycznych. Kształt funkcji  $p(r)$  wskazuje na tworzenie przez surfaktanty tzw. „core-shell type micelles”. Oznacza to, że obserwowane maksima funkcji  $p(r)$  pochodzą od obszarów o wysokiej gęstości elektronicznej, czyli części polarnych surfaktantów, które tworzą zewnętrzną powłokę (ang. *shell*) miceli. Natomiast minimum funkcji  $p(r)$  odnosi się do hydrofobowego rdzenia (ang. *core*) o niższej gęstości elektronicznej, utworzonego z łańcuchów alkilowych surfaktantów. W skład powłoki zewnętrznej wchodzi również otoczka z przyłączonych przeciwjonów [272]. Z wykresu rozkładu odległości wewnątrzcząsteczkowych można uzyskać informacje m. in. o promieniu rdzenia hydrofobowego miceli ( $r_c$ ) oraz średnicy miceli ( $D_{max}$ ) [272 – 274].



Rysunek 86. Krzywe SAXS zarejestrowane dla badanych surfaktantów trimerycznych wraz z dopasowaniem do sfery (A, B, C) oraz wyliczone funkcje rozkładu odległości wewnątrzcząsteczkowych (D).

Średnica miceli dla TRI\_N wynosi 5,2 nm, dla TRI\_IMI 4,9 nm, a dla TRI\_BEN 4,7 nm. Promień rdzenia hydrofobowego wyznacza się w oparciu o punkt przegięcia między maksimum a minimum funkcji  $p(r)$  i wynosi dla TRI\_N – 1,35 nm, dla TRI\_IMI – 1,33 nm,

a dla TRI\_BEN – 1,29 nm. Różnice między wartościami średnicy miceli i rdzenia hydrofobowego dla badanych surfaktantów są niewielkie. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że wszystkie badane surfaktanty miały taki sam łańcuch hydrofobowy, a rozmiar miceli w dużej mierze właśnie zależy od długości łańcucha alkilowego surfaktantów [272].

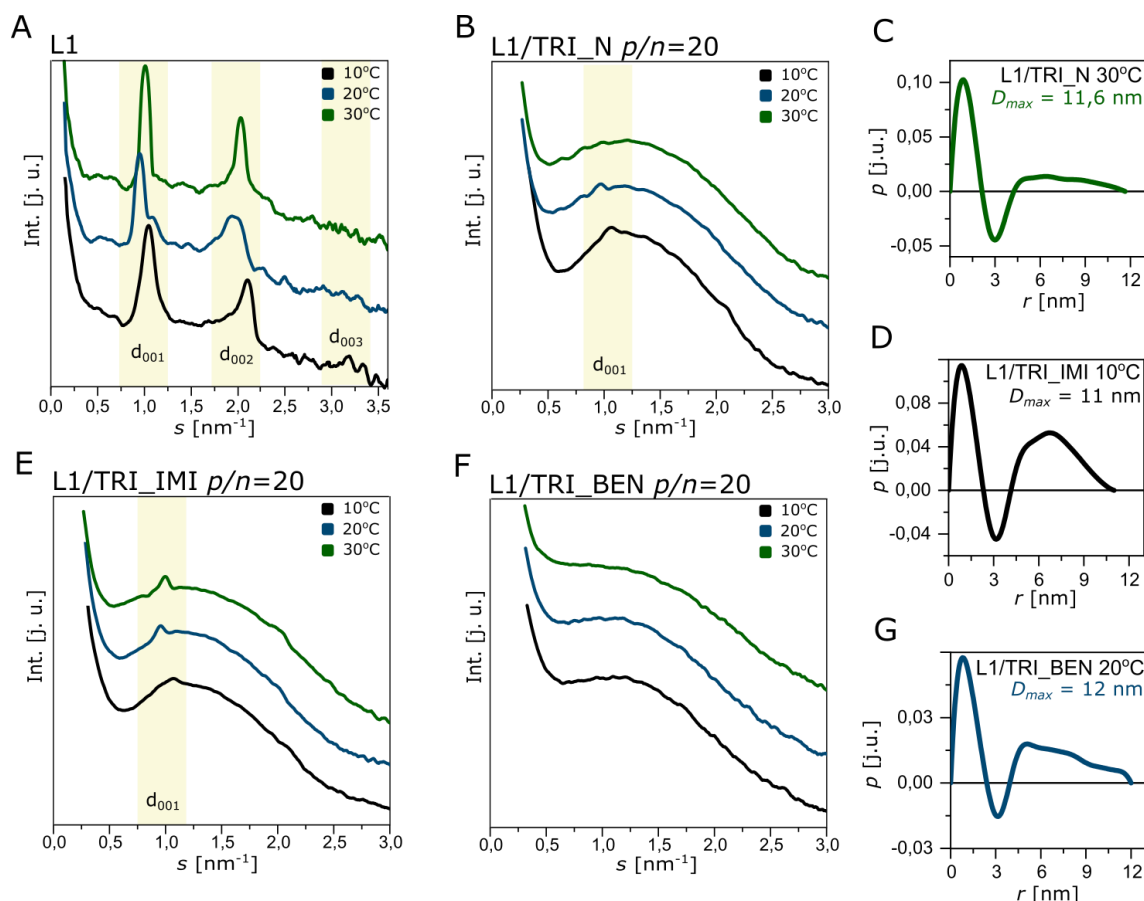
Warto zauważyć, że micle surfaktantów nie zawsze będą strukturami idealnie kulistymi (sferycznymi). W obecności soli w roztworze często obserwuje się micle dyskoidalne (ang. *disc-like micelles*) albo pałeczkowate (ang. *rod-like micelles*) [275]. Dalszy wzrost stężenia soli w układzie może indukować początkowe sklejanie się miceli w pałeczkowate struktury, a następnie w długie łańcuchy zwane często „robakowatymi” micelami (ang. *worm-like micelles*) [276]. Podobny efekt wydłużania się miceli surfaktantów obserwował Atri i inni w obecności mocznika [277].

Choć roztwory surfaktantów sporządzono na wodzie deuterowanej, a więc wyklucza się dodatkowe czynniki, które mogłyby indukować wydłużanie miceli to ze względu na to, że są to nowe związki - zdecydowano się na dopasowanie krzywych rozpraszania do modeli geometrycznych. Jedynym z dostępnych komercyjnie programów umożliwiających dopasowywanie krzywych SAXS do określonego modelu jest oprogramowanie SasView 5.0.6 [278]. Na wykresach zarejestrowanych krzywych SAXS dla badanych surfaktantów przedstawiono dopasowanie do modelu kuli/sfery (rysunek 86). W parametrach dopasowania oparto się na wyliczonych wartościach  $D_{max}$  i  $r_c$  z zależności  $p(r)$ .

Następnie przeanalizowano krzywe rozpraszania dla 150mM roztworu DMPC w wybranych temperaturach (rysunek 87 A). W niskiej temperaturze (10°C) widać dwa wyraźne maksima pochodzące najprawdopodobniej od równoodległych od siebie dwuwarstw lipidowych o odległościach międzypłaszczyznowych:  $d_{001} = 6,00$  nm oraz  $d_{002} = 3,00$  nm. Być może jest również trzeci pik ( $d_{003} = 1,98$  nm), ale ze względu na niski stosunek sygnału do szumu wyznaczenie jego pozycji może być obarczone dużym błędem. Piki braggowskie w ułożeniu 1:2:3 wskazują na uwodnione struktury lamelarne.

W temperaturze 20°C, a więc powyżej temperatury przedprzejścia, ale poniżej temperatury przejścia głównego, DMPC występuje w fazie żelowej pofałdowanej. Na krzywej SAXS w tej temperaturze obserwuje się dla DMPC zwiększenie odległości międzypłaszczyznowych (na podstawie dopasowania:  $d_{001} = 6,65$  nm,  $d_{002} = 3,20$  nm), która wynika ze zwiększenia się grubości błony lipidowej wskutek hydratacji fosfolipidów i pofałdowania błony. Obecne są również dodatkowe piki: 5,82 nm oraz 3,83 nm. W fazie ciekłokrystalicznej DMPC, czyli w 30°C maleje grubość dwuwarstwy:  $d_{001} = 6,23$  nm,  $d_{002} = 3,10$  nm. Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi literaturowymi [279].

Dla układów DMPC z surfaktantem TRI\_BEN (rysunek 87 F) na krzywych SAXS obserwuje się zanik struktur lamelarnych, a kształt krzywych sugeruje tworzenie struktur unilamelarnych - nie występują piki dyfrakcyjne, a jedno szerokie maksimum. Przypuszczać można, że są to bicele [280]. W literaturze zazwyczaj odnaleźć można opis biceli, jako dyskoidalnych struktur, które tworzą układy lipidów różniących się krytycznym parametrem upakowania. Takim przykładem jest np. układ DMPC/DHPC, gdzie w biceli występuje region bogaty w DMPC, tworzący dwuwarstwę biceli, oraz region bogaty w DHPC tzw. ang. *micelle-like edge*, czyli krawędź zamykającą podobną do miceli [281,282]. Bazując na przytoczonych bicelach DMPC/DHPC, w układzie DMPC/surfaktant zapewne płaski dwuwarstwowy fragment biceli tworzy dwuwarstwa DMPC z wbudowanymi w nią surfaktantami, a krawędź zamykającą tworzą surfaktanty.

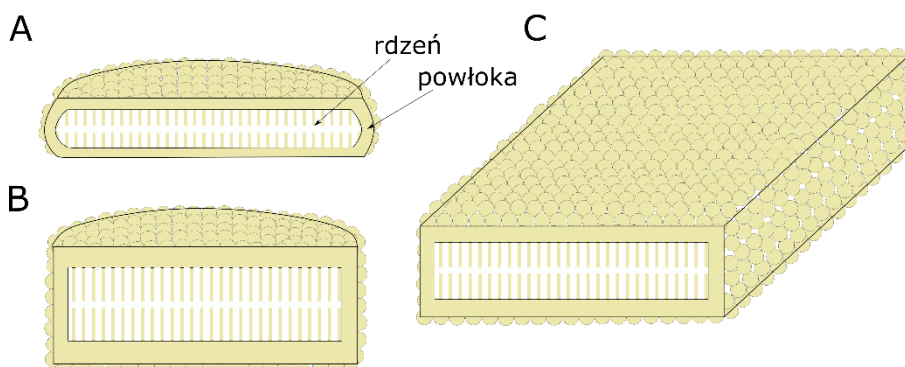


Rysunek 87. Krzywe SAXS zarejestrowane dla roztworu DMPC (A) oraz układów na bazie L1 i surfaktantów trimerycznych: TRI\_N (B), TRI\_IMI (E) oraz TRI\_BEN (F) w wybranych temperaturach. Na żółto oznaczono charakterystyczne maksimum  $d_{hkl}$ . Dla wybranych układów wyliczono funkcję  $p(r)$  – C, D, G.

Nowe światło w kwestii badań nad strukturami unilamelarnymi rzucają prace grupy Pedersen'a. Ze względu na duże rozbieżności w literaturze dla układów na bazie DHPC i DMPC, grupa ta w pracy z 2018 roku [283] zbadała struktury, jakie tworzą układy DMPC/DHPC w zależności od ich wzajemnego stosunku molowego. Co ciekawe, termin „bicela” jest stosowany przez autorów dla każdego z 3 zaproponowanych modeli. Poniżej zostaną pokrótce omówione prawdopodobne modele, a ich schematyczną reprezentację przedstawiono na rysunku 88:

1. Elipsoidalna bicela typu rdzeń-powłoka (ang. *core-shell ellipsoid*) – model ten odpowiada biceli opisanej w poprzednim akapicie, czyli spłaszczonemu dyskowi o przekroju podłużnym w kształcie elipsoidy. Takie struktury obserwowano dla czystych roztworów DHPC.
2. Cylindryczna bicela typu rdzeń-powłoka (ang. *core-shell short cylinder*) – model ten zakłada tworzenie struktur o przekroju podłużnym w kształcie prostokąta, a przekrój poprzeczny w kształcie elipsoidy, czyli struktury w formie krótkich walców. Model ten był obserwowany dla układu DHPC/DMPC, w którym DMPC występował w niskim stężeniu.
3. Prostopadłościenna bicela typu rdzeń-powłoka (ang. *core-shell rectangular cuboid*) – dla tego modelu zarówno przekrój podłużny jaki i poprzeczny jest w kształcie prostokąta. A co więcej, wraz ze wzrostem stężenia DMPC

w układzie obserwuje się wydłużanie przekroju poprzecznego, aż po uzyskanie struktur warstwowych dla czystego DMPC.



Rysunek 88 Schematyczna reprezentacja biceli lipidowych wraz z ich przekrojami poprzecznymi: elipsoidalna (A), cylindryczna (B), prostopadłościenna (C) bicele typu rdzeń-powłoka.

Dla powyższych struktur opracowano odpowiednie modele matematyczne, które pozwalają przypisać krzywe SAXS do określonego modelu. Jednak odniesienie tych modeli do danych eksperymentalnych nie jest takie proste, ponieważ trzeba dopasowywać szereg parametrów, a co niezwykle istotne - próbka powinna być możliwie monodispersyjna. Dlatego ocenę czy dochodzi do wydłużenia struktur bicelarnych oparto o analizę kształtu funkcji  $p(r)$  - gdy występuje charakterystyczny „ogon” bicele przybierają kształt cylindryczny lub prostopadłościenny [283].

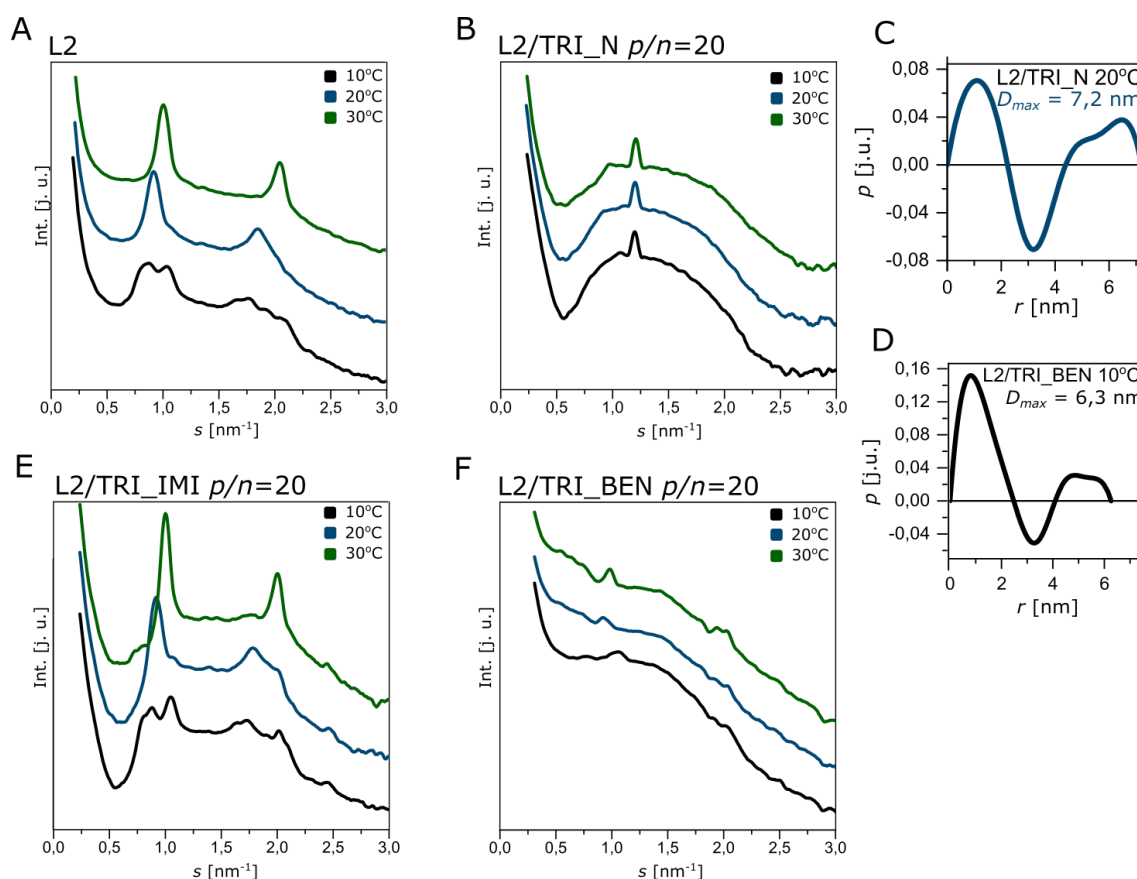
Niestety ze względu na zbyt niski zakres danych zebranych przy niskich kątach dla układu L1/TRI\_BEN prawidłowe wyznaczenie parametrów biceli jest obarczone błędem. Można przypuszczać (na podstawie funkcji  $p(r)$  wyliczonej dla układu w 10°C - rysunek 87 G), że średnica biceli wynosi ok. 12,0 nm. Natomiast grubość biceli można wyznaczyć na podstawie podwojonej wartości promienia rdzenia wyznaczonego z położenia minimum funkcji  $p(r)$ , czyli dla tego układu grubość biceli wynosiłaby 6,35 nm. Grubość ta bliska jest grubości dwuwarstwy DMPC w fazie ciekłokrystalicznej. Natomiast w oparciu o kształt funkcji  $p(r)$  można stwierdzić, że prawdopodobnie bicele stają się bardziej cylindryczne lub prostopadłościenne.

Natomiast dla L1/TRI\_N (rysunek 87 B) oraz L1/TRI\_IMI (rysunek 87 E) oprócz szerokiego maksimum obserwowano również piki braggowskie, świadczy to o współistnieniu fazy lamelarnej i unilamelarnej. Innym wyjaśnieniem obecności pików na krzywych SAXS może być tzw. stos bicel, czyli ułożone obok siebie bicele tak że tworzą się struktury lamelarne [284], takie stosy bicel obserwowano np. dla DPPC [285]. Innym wyjaśnieniem może być utworzenie wielowarstwowych liposomów, a maksima dyfrakcyjne pochodzą od warstw [286].

Niemniej polidispersyjność próbki znacząco wpływa na prawidłowe wyznaczenie rozkładu odległości międzycząsteczkowych. W temperaturze 10°C dla układu L1/TRI\_N prawdopodobnie obecne są dwa piki:  $d_{001} = 5,93$  nm i  $d_{002} = 3,00$  nm; a dla układu L1/TRI\_IMI:  $d_{001} = 5,90$  nm i  $d_{002} = 2,98$  nm. Wartości te są mniejsze niż dla roztworu DMPC, czyli doszło do zmniejszenia odległości międzypłaszczyznowych wskutek obecności surfaktantów w dwuwarstwie. W fazie żelowej pofałdowanej (w 20°C) zarejestrowano przesunięcie pierwszego refleksu, gdzie wartości  $d_{001}$  wynoszą: 6,44 nm (L1/TRI\_N) oraz

6,61 nm (L1/TRI\_IMI). Te wartości są z kolei większe niż wyznaczone dla roztworu DMPC, może to wskazywać, że surfaktanty dodatkowo rozsuwają połażowane dwuwarstwy fosfolipidowe lub fosfolipidy występują w konformacji *gauche*, co sugerują także wyniki ze spektroskopii podczerwieni. Natomiast w wysokiej temperaturze (30°C) dla L1/TRI\_N nie obserwuje się pików braggowskich, a dla L1/TRI\_IMI zarejestrowano wartości  $d_{001} = 6,35$  nm oraz  $d_{002} = 3,14$  nm. Wzrost temperatury dla L1/TRI\_N powoduje zanik fazy lamelarnej, natomiast dla L1/TRI\_IMI piki dyfrakcyjne od dwuwarst są bardziej widoczne w wyższych temperaturach. Prawdopodobna średnica i grubość struktur dla L1/TRI\_N to odpowiednio: 11,6 nm i 6,0 nm (na podstawie krzywej SAXS zarejestrowanej w 30°C – rysunek 87 C), a dla L1/TRI\_IMI – 11,0 nm i 6,3 nm (na podstawie krzywej SAXS zarejestrowanej w 10°C – rysunek 87 D). Wartości te uzyskano w analogiczny sposób jak dla układu L1/TRI\_BEN. Tak jak dla L1/TRI\_BEN również dla L1/TRI\_N oraz L1/TRI\_IMI bicele zapewne tworzą formy cylindryczne lub prostopadłościennne.

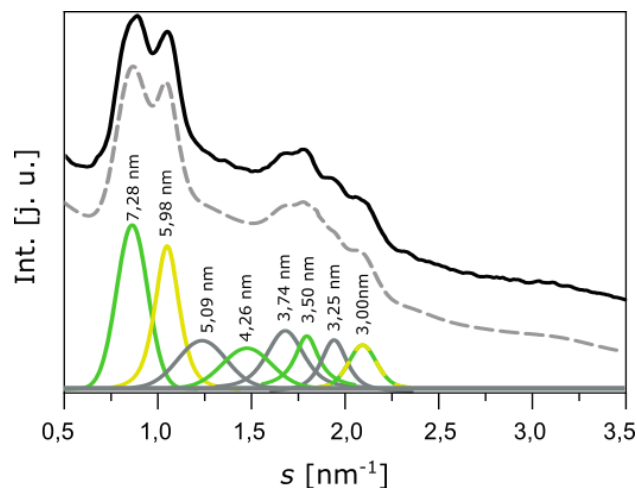
Następnie analizie poddano układ L2 (rysunek 89 A). W niskiej temperaturze (w 10°C) na krzywej SAXS układu L2 zarejestrowano w porównaniu do DMPC większą liczbę pików braggowskich, których położenie wyznaczono przez dekonwolucję krzywej SAXS (rysunek 90).



Rysunek 89. Krzywe SAXS zarejestrowane dla roztworu L2 (A) oraz układów na bazie L2 i surfaktantów trimerycznych: TRI\_N (B), TRI\_IMI (E) oraz TRI\_BEN (F) w wybranych temperaturach pomiaru. Dla wybranych układów wyliczono funkcję  $p(r)$  – C, D.

Najprawdopodobniej w układzie tym współistnieją dwie fazy. Piki oznaczone kolorem żółtym ( $d_{001} = 5,98$  nm,  $d_{002} = 3,00$  nm) odpowiadają fazie lamelarnej

(porównywalne z odległościami międzypłaszczyznowymi DMPC). Ze względu na obecność DOPE, które może indukować powstawanie fazy heksagonalnej, piki o  $d$ : 7,28 nm, 4,26 nm; 3,50 nm; 3,00 nm, przypisano fazie heksagonalnej o refleksach: 100, 110, 200, 210 [287], występują one w stosunku  $\sqrt{1}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{6}$ .



Rysunek 90. Dekonwolucja krzywej SAXS zarejestrowanej dla układu L2 w 10°C. Piki oznaczone kolorem żółtym przyporządkowano do fazy lamelarniej, natomiast oznaczone kolorem zielonym do fazy heksagonalnej. Piki oznaczone na szaro nie przyporządkowano do żadnej znanej struktury.

Faza heksagonalna, która występuje w układach lipidowych zazwyczaj przyjmuje postać fazy heksagonalnej odwróconej  $H_{II}$ . Oznacza to, że powstałe cylindryczne struktury, zbudowane są z warstwy lipidowej, gdzie hydrofobowe części lipidów zwrócone są na zewnątrz, a hydrofilowe części zwrócone są do wnętrza wodnego rdzenia. Komórkę elementarną układu heksagonalnego opisują parametry sieciowe (długości boków i miary kątów) odpowiadające zależnościom:  $a = b \neq c$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ . Dla takiego układu wartość parametru sieci  $a$ , który określa odległość między środkami wodnych rdzeni, można wyznaczyć z zależności:

$$a = \frac{2\sqrt{h^2 + k^2 - hk}}{\sqrt{3}} d_{hkl} \quad (59)$$

gdzie  $d_{hkl}$  odległość między płaszczyznowo do płaszczyzny opisanej wskaźnikami Millera, a  $h, k, l$  - to wskaźniki Millera opisujące tę płaszczyznę [64].

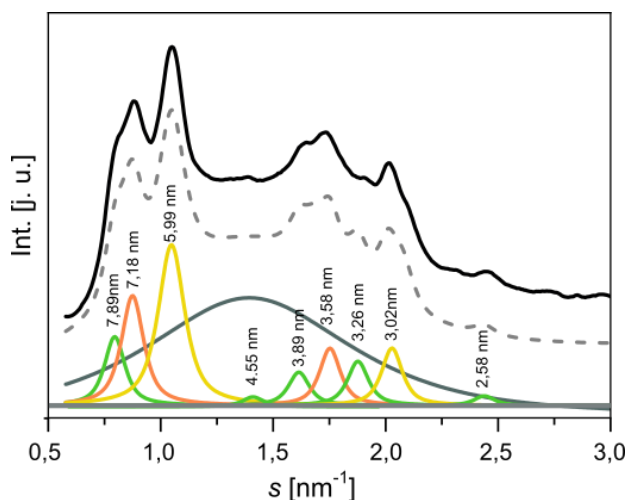
Stała sieciowa  $a$  dla układu L2 w temperaturze 10°C na podstawie refleksu 100 o  $d_{100} = 7,28$  nm wynosi 8,5 nm. W wyższych temperaturach zanika rozważana faza heksagonalna, a obecne są wyłącznie piki od fazy lamelarniej: w 20°C  $d_{001} = 6,77$  nm,  $d_{002} = 3,37$  nm, a w 30°C:  $d_{001} = 6,21$  nm,  $d_{002} = 3,06$  nm. Wartości  $d$  zarejestrowane w temperaturze 20°C są większe niż dla DMPC, ale w wyniki zarejestrowane w 30°C są porównywalne dla obu układów. Dlatego wyjaśnieniem może być fakt, że DOPE powoduje przejście łańcuchów alkilowych DMPC w konformację *gauche* już w niższych temperaturach (tj. 20°C), natomiast w temperaturze 10°C cząsteczki DOPE chętniej tworzą struktury heksagonalne niż wbudowują się w dwuwarstwę.

Dla układu na bazie L2 i surfaktantu TRI\_N (rysunek 89 B) krzywa SAXS zarejestrowana w temperaturze 10°C ma prawie symetryczny przebieg, sugerować by to mogło, że bicele odpowiadają modelowi z rysunku 88 A. Jednak na podstawie funkcji



$p(r)$  (rysunek 89 C) średnica utworzonej struktury wynosi 7,2 nm, a jej grubość 6,4 nm. Wyniki te wskazywać mogą, że są to raczej spłaszczone micelle. Uzyskane struktury są znacznie mniejsze niż dla L1/TRI\_N. Natomiast odległość międzypłaszczyznowa dla refleksu 001 dwuwarstwy lipidowej zarejestrowane w każdej temperaturze wynosiła 5,21 nm. Niemniej należy zaznaczyć, że układ ten jest polidispersyjny.

Ciekawym przypadkiem jest krzywa SAXS zarejestrowana w temperaturze 10°C dla układu L2/TRI\_IMI (rysunek 89 E). Na podstawie dekonwolucji krzywej SAXS i dopasowania położenia pików braggowskich (rysunek 91), można sądzić że w układzie tym występuje faza unilamelarna wraz z fazami lamelarną i heksagonalną. Co więcej dla tej próbki istnieje duże prawdopodobieństwo, że występuje faza lamelarna ( $d_{001} = 5,99$  nm,  $d_{002} = 3,02$  nm), gdzie lipidy są w konformacji *trans*, ale też faza lamelarna, gdzie lipidy przyjmują konformację *gauche* ( $d_{001} = 7,18$  nm,  $d_{002} = 3,58$  nm) [288,289]. Obecne są również inne piki (7,89 nm; 4,55 nm; 3,89 nm, 2,58 nm), które z kolei mogą pochodzić od fazy heksagonalnej, występują one w stosunku  $\sqrt{1}$ :  $\sqrt{3}$ :  $\sqrt{4}$ :  $\sqrt{6}$ :  $\sqrt{9}$ .



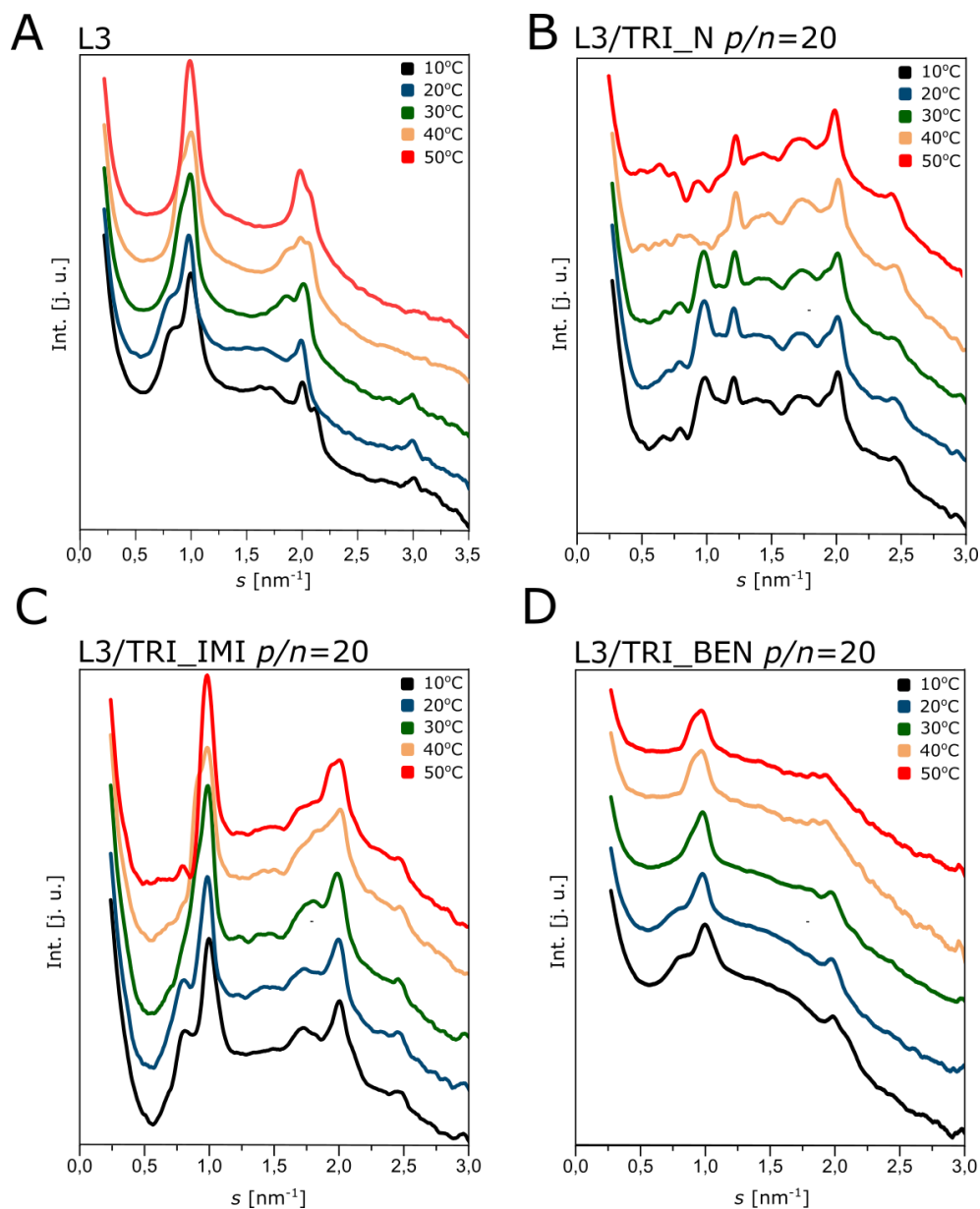
Rysunek 91. Dekonwolucja krzywej SAXS zarejestrowanej dla układu L2/TRI\_IMI w 10°C. Piki oznaczone kolorem żółtym i pomarańczowym przyporządkowano do fazy lamelarnej odpowiednio dla lipidów w konformacji *trans* i *gauche*, natomiast piki oznaczone kolorem zielonym – fazy heksagonalnej. Pik oznaczony na szaro odpowiada strukturom unilamelarnym.

W wyższych temperaturach w L2/TRI\_IMI zanika większość pików, a te które pozostały można zapewne przypisać do fazy lamelarnej: w 20°C są to:  $d_{001} = 6,77$  nm,  $d_{002} = 3,37$  nm, a w 30°C:  $d_{001} = 6,21$  nm,  $d_{002} = 3,06$  nm. Dla tego układu nie podjęto próby wyliczenia funkcji  $p(r)$ .

Próbka L2/TRI\_BEN (rysunek 89 F) słabo rozpraszała promieniowanie, dlatego analiza struktury jest utrudniona. Niemniej można stwierdzić, że układ jest polidispersyjny. Utworzyły się struktury bicelarne o długości około 6,3 nm i średnicy około 5,0 nm (wynik w 10°C) (rysunek 89 D). Natomiast jak w poprzednich przypadkach, wartości  $d$  dla struktur lamelarnych wykazują zależność temperaturową  $d_{001}$ : 10°C - 5,85 nm, 20°C - 6,75 nm, 30°C - 6,35 nm.

Najbardziej interesujące wydają się wyniki dla układów otrzymanych na bazie DMPC/DOPE/DPPC (rysunek 92). Dla wszystkich badanych układów na bazie L3 wraz

ze wzrostem temperatury maleje liczba obserwowanych pików dyfrakcyjnych na krzywych SAXS.



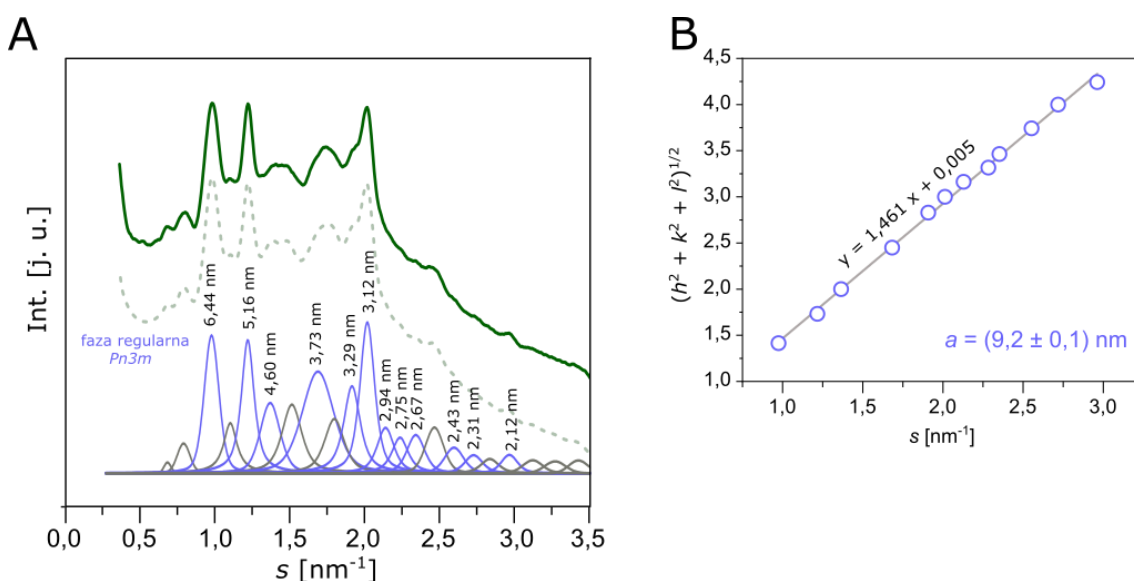
Rysunek 92. Krzywe SAXS zarejestrowane dla układu L3 (A) oraz układów na bazie L3 i surfaktantów trimerycznych: TRI\_N (B), TRI\_IMI (C) oraz TRI\_BEN (D) w wybranych temperaturach.

Dla czystego L3 w temperaturze 10°C obecna jest faza lamelarna, w której łańcuchy fosfolipidów znajdują się w konformacji *tans* ( $d_{001} = 6,30$  nm,  $d_{002} = 3,14$  nm,  $d_{003} = 2,09$  nm), ale również występują dodatkowe piki braggowskie. Wartości  $d$  dla refleksu 001 dla L3 nie zmieniały się znacząco wraz ze wzrostem temperatury: 6,38 nm (20°C); 6,33 nm (30°C); 6,28 nm (40°C); 6,33 nm (50°C).

W przypadku układów z surfaktantem trimerycznym interesującym wydaje się być układ L3/TRI\_N, w którym zarejestrowano wiele wyraźnych pików dyfrakcyjnych, dzięki czemu możliwe jest prawidłowe wyznaczenie struktur, jakie się tworzą te układy (rysunek 92 B). Analizę struktury układu L3/TRI\_N przeprowadzono na podstawie krzywej

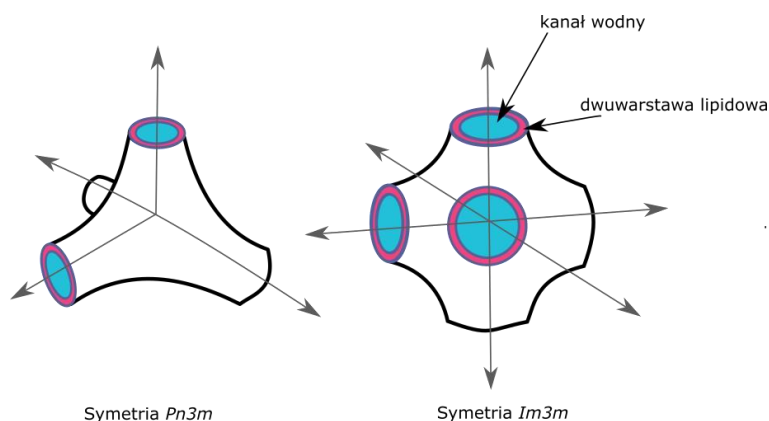
SAXS zarejestrowanej w temperaturze 30°C. Wybrano tę krzywą, ponieważ w wyższych temperaturach zanikają niektóre piki (np. ten ok. 1,0 nm<sup>-1</sup>). Podobnie jak poprzednio po dekonwolucji krzywej SAXS i wyodrębnianiu pików składowych, przypisano je na podstawie położenia i wzajemnych stosunków do odpowiednich mezofaz.

Przypuszcza się, że w układzie L3/TRI\_N w temperaturze 30°C wiodącą mezofazą jest faza regularna o symetrii Pn3m, potwierdzać to może zaprezentowane na rysunku 93 A piki dyfrakcyjne ułożone w stosunku:  $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{9}:\sqrt{10}:\sqrt{11}:\sqrt{12}:\sqrt{14}:\sqrt{16}:\sqrt{18}$ . Odpowiadają one refleksom: 110, 111, 200, 211, 220, 221, 310, 311, 222, 321, 400, 411 o wartościach  $d$ : 6,44 nm; 5,16 nm; 4,60 nm; 3,73 nm; 3,29 nm; 3,12 nm; 2,94 nm; 2,75 nm; 2,67 nm; 2,43 nm; 2,31 nm i 2,12 nm. Stała sieciowa  $a$  dla tego układu wynosiła  $9,2 \pm 0,1$  nm (rysunek 93 B).



Rysunek 93. Dekonwolucja krzywej SAXS zarejestrowanej w 30°C dla układu L3/TRI\_N wraz z przypisanymi pikami do fazy regularnej o symetrii Pn3m (A) wraz z wyznaczeniem parametru sieci krystalicznej  $a$  (B).

Fazę regularną dwuciągłą lipidów można przyrównać do sieci kanałów wodnych utworzonych z dwuwarstwy lipidowych o bardzo dobrym uporządkowaniu przestrzennym. W fazie regularnej prymitywnej o symetrii Im3m kanały wodne łączą się ze sobą pod kątem 90°. W fazie regularnej o symetrii Pn3m cztery kanały wodne łączą się pod kątem 109,5° [290]. Na rysunku 94 przedstawiono uproszczony schemat omawianych wyżej kanałów wodnych. W tym miejscu warto wspomnieć że struktury o fazie regularnej i heksagonalnej ze względu na swoją budowę mogą być wykorzystywane do transportu cząsteczek np. cząsteczki leków zostają zamknięte w kanałach wodnych [291].



Rysunek 94. Uproszczony schemat struktury kanałów wodnych układów lipidowych w fazie regularnej o symetrii  $Pn3m$  oraz  $Im3m$ . Kolorem niebieskim zaznaczono przebieg kanałów wodnych.

Komórka elementarna układu regularnego jest sześcianem oznacza to, że parametry sieciowe (stałe sieciowe i miary kątów) odpowiadają zależnościom:  $a = b = c$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Dla takiego układu wartość parametru sieci krystalicznej  $a$  [64]:

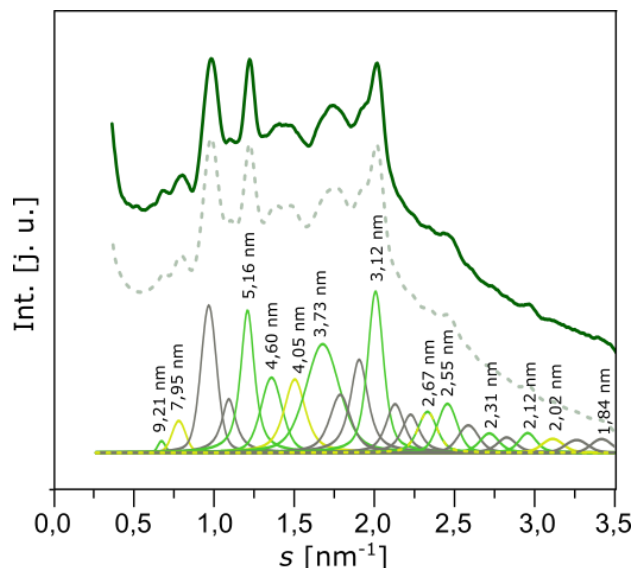
$$a = \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} d_{hkl} \quad (60)$$

Parametr  $a$  można również wyznaczyć z nachylenia prostej, tak jak pokazano na rysunku 93 B. Dla układu L3/TRI\_N o symetrii  $Pn3m$  uzyskano wartość parametru  $a$  równą  $9,2 \pm 0,1$  nm.

Pozostałe nieprzypisane słabe piki dyfrakcyjne, najprawdopodobniej wskazują na separację fazową, a tym samym obecność innych mezofaz w układzie. Na termogramach DSC dla L3/TRI\_N obserwowano również wiele pików (rysunek 73), co może potwierdzać słuszność powyższych hipotez o współistnieniu wielu faz. Co więcej taka mnogość faz często była obserwowana dla innych układów złożonych np. dla wieloskładnikowych układów na bazie lipidów [292–294].

Dlatego z dużą ostrożnością podjęto próbę przypisania pozostałych pików dyfrakcyjnych do innych rodzajów mezofaz. Jedną z nich być może być faza lamelarna (rysunek 95), która została określona na podstawie pików występujących w stosunku 1:2:3:4 o odległościach międzypłaszczyznowych  $d_{001} = 7,95$  nm,  $d_{002} = 4,05$  nm,  $d_{003} = 2,67$  nm oraz  $d_{004} = 2,02$  nm (rysunek 95, piki żółte).

Co ciekawe, z dużą dokładnością udało się przypisać piki dyfrakcyjne również do fazy heksagonalnej (rysunek 95, piki zielone):  $d_{100} = 9,21$  nm;  $d_{110} = 5,16$  nm;  $d_{200} = 4,60$  nm;  $d_{210} = 3,73$  nm;  $d_{300} = 3,12$  nm,  $d_{220} = 2,67$  nm,  $d_{310} = 2,55$  nm,  $d_{400} = 2,12$  nm, które występują we wzajemnym stosunku:  $\sqrt{1} : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{6} : \sqrt{9} : \sqrt{12} : \sqrt{13} : \sqrt{16}$ . Zdecydowano się na ten krok ponieważ pik przy 2,55 nm jest dość wyraźny, a nie „pasował” ani do fazy lamelarniej ani do regularnej. Parametr  $a$  na podstawie położenia refleksu 001 wynosi 10,6 nm.



Rysunek 95. Dekonwolucja krzywej SAXS zarejestrowanej w 30°C dla układu L3/TRI\_N oraz przypisanie pików do prawdopodobnych mezofaz: lamelarnej – żółte piki oraz heksagonalnej – zielone piki.

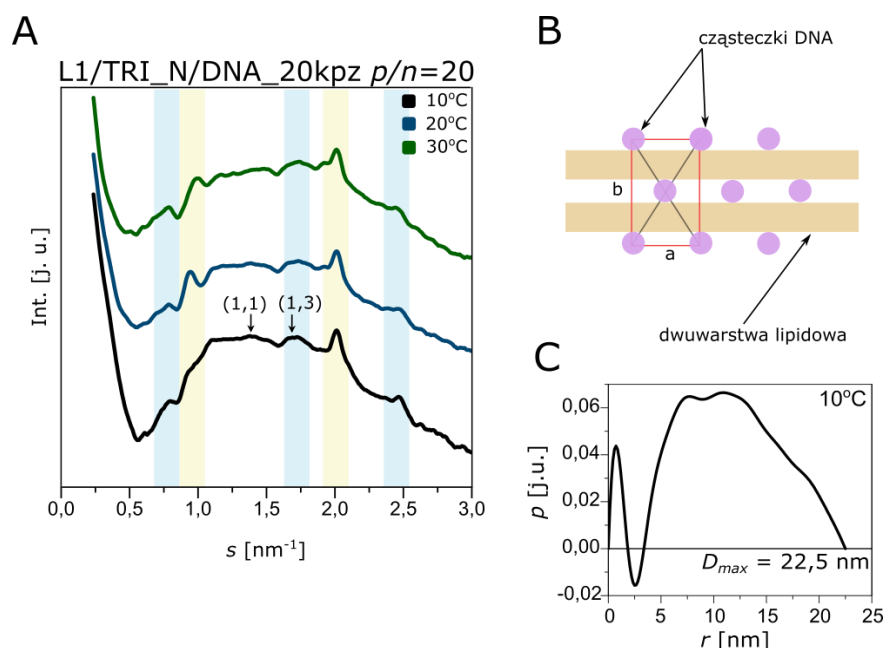
W przypadku L3/TRI\_IMI i L3/TRI\_BEN nie obserwowano takiej dużej ilości pików dyfrakcyjnych, a występujące piki odpowiadają fazie lamelarnej.

Zarejestrowano również krzywe SAXS dla układu z kwasem nukleinowym. Zdecydowano się na zbadanie wpływu wysokomolekularnego DNA w stosunku  $p/n = 20$  na układ L1/TRI\_N, ze względu na jego mniejszą złożoność. Wynika ona z małej ilości składników (DMPC i surfaktant TRI\_N), a także nietworzenia skomplikowanych struktur. Pierwsza różnica, jaka wynika z obecności DNA w układzie L1/TRI\_N, to brak zaniku fazy lamelarnej (rysunek 96 A). Co więcej zarejestrowano na krzywych SAXS dodatkowe piki dyfrakcyjne. Przypuszcza się, że w układzie doszło do utworzenia warstw lipidowych i warstw zbudowanych z cząsteczek DNA wbudowanych pomiędzy tymi lipidowymi [293]. Fazę lamelarną „lipidową” opisują piki: w 10°C  $d_{001} = 6,49$  nm i  $d_{002} = 3,12$  nm, w 20°C  $d_{001} = 6,33$  nm i  $d_{002} = 3,12$  nm, w 30°C:  $d_{001} = 6,62$  nm i  $d_{002} = 3,12$  nm. Wartości odpowiadają dwuwarstwie w fazie żelowej pofałdowanej DMPC, czyli surfaktanty wbudowały się między cząsteczki fosfolipidu. Warstwę zbudowaną z cząsteczek DNA opisują piki: w 10°C  $d_{001} = 8,06$  nm i  $d_{003} = 2,54$  nm, w 20°C  $d_{001} = 8,06$  nm i  $d_{003} = 2,57$  nm, w 30°C:  $d_{001} = 8,06$  nm i  $d_{003} = 2,57$  nm. Piki od płaszczyzny 002 są znacznie poszerzone i trudno jest wyznaczyć dokładne wartości  $d$ , ale przypuszcza się, że znajdują się około 4 nm. Na rysunku 96 A zaznaczono potencjalne lokalizacje pików dyfrakcyjnych pochodzących od fazy lamelarnej utworzonej przez fosfolipidy (oznaczone na żółto) oraz cząsteczki DNA (oznaczone na niebiesko).

W niskich temperaturach (gdy cząsteczki lipidów są w fazie żelowej) cząsteczki DNA mogą porządkować się w specyficzny sposób między dwuwarstwami lipidowymi i tworzyć tzw. super sieć (ang. *superlattice*), przedstawioną na rysunku 96 B. Wskazywać mogą to piki dyfrakcyjne: (1,1) oraz (1,3) oraz czasem występujący (1,5) [295]. Na zarejestrowanej krzywej SAXS w temperaturze 10°C z dużą ostrożnością można przypisać pik 5,69 nm do płaszczyzny (1,1) a pik 4,54 nm do płaszczyzny (1,3). Wtedy na podstawie zależności (61) możliwe jest wyznaczenie parametrów  $a$  oraz  $b$ , gdzie  $b = 2d$ , czyli dwukrotność odległości międzypłaszczyznowych i cząsteczek DNA [296].

$$d_{hk} = \sqrt{\left(\frac{h}{a}\right)^2 + \left(\frac{k}{b}\right)^2} \quad (61)$$

Dla rozważanego układu L1/TRI\_N/DNA wynoszą one:  $a = 5,5$  nm oraz  $b = 16,1$  nm. Ze względu na słabą intensywność pików, takie rozważania mają charakter przybliżony, niemniej w analizie oddziaływań cząsteczek DNA z dwuwarstwami lipidowymi warto sprawdzić, czy dochodzi do utworzenia takich struktur. Co więcej w niskiej temperaturze -  $10^\circ\text{C}$ , kształt krzywej SAXS sugerować może tworzenie unilamelarnych struktur. Wyznaczona średnica z funkcji  $p(r)$  dla tego układu wynosi  $22,5$  nm, natomiast grubość  $5$  nm (rysunek 96 C).



Rysunek 96. Krzywe SAXS zarejestrowane w wybranych temperaturach dla układu L1/TRI\_N/DNA\_20kpz o stosunku  $p/n = 20$  z zaznaczeniem potencjalnych lokalizacji pików dyfrakcyjnych pochodzących od fazy lamelarniej utworzonej przez fosfolipidy (oznaczone na żółto) oraz cząsteczki DNA (oznaczone na niebiesko) (A) oraz funkcja  $p(r)$  dla tego układu (C). Graficzna reprezentacja super sieci w układach fosfolipid/DNA (B).

Należy podkreślić, że próbka była silnie polidispersyjna. Wynikało to zapewne z tego, że do eksperymentu użyto silnie pofragmentowane DNA. Cząsteczki DNA o różnej długości mogą indukować powstawanie różnych struktur z mieszaniną surfaktant/lipid. Co więcej należałoby przeanalizować układy o innych stężeniach, ponieważ zbyt wysokie stężenie surfaktantu/lipidu (nadmiar tych cząsteczek niezbędnych do wiązania z DNA) mógł doprowadzić do tworzenia struktur bez DNA.

## 6.5 Określenie topografii wybranych układów surfaktant/DNA oraz surfaktant/lipid/DNA przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych

---

Analiza topografii układów badanych w niniejszej pracy została już zaprezentowana w publikacji z roku 2021, której jestem współautorem. Badania przy użyciu mikroskopii sił atomowych w przytoczonej publikacji przeprowadził w oparciu o przygotowane przeze mnie próbki - dr inż. Marek Weiss z Politechniki Poznańskiej. Zastosowana preparatyka próbek do badań AFM polegała na bezpośrednim nałożeniu roztworu próbki na podłoże z miki, a następnie pomiarach ich mikrostruktury (topografii) po wyschnięciu w temperaturze pokojowej. Otrzymano kuliste (lub prawie kuliste) agregaty zarówno cząsteczek DNA, kompleksów DNA/surfaktant jak i DNA/surfaktant/lipid. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wpływ na wielkość agregatów ma rodzaj zastosowanego surfaktantu oraz formulacji lipidowej. Co więcej badania AFM dowiodły kondensowania cząsteczek DNA w obecności surfaktantów i lipidów [297].

W toku dalszych prac nad rozważanymi lipopleksami i analizy doniesień literaturowych na temat badanych układów - zdecydowano się na dalszą charakterystykę formowanych przez lipopleksy struktur zapewniając im odpowiednio sfunkcjonalizowane podłoże. Funkcjonalizacja podłoża to proces nadawania nowych właściwości materiałom poprzez zmianę chemicznych właściwości ich powierzchni np. właściwości hydrofobowych, magnetycznych czy nadanie właściwości selektywnie wiążących pewne cząsteczki, itp. W przypadku AFM funkcjonalizacji mogą podlegać zarówno podłoża do badań jak i sondy skanujące [298, 299].

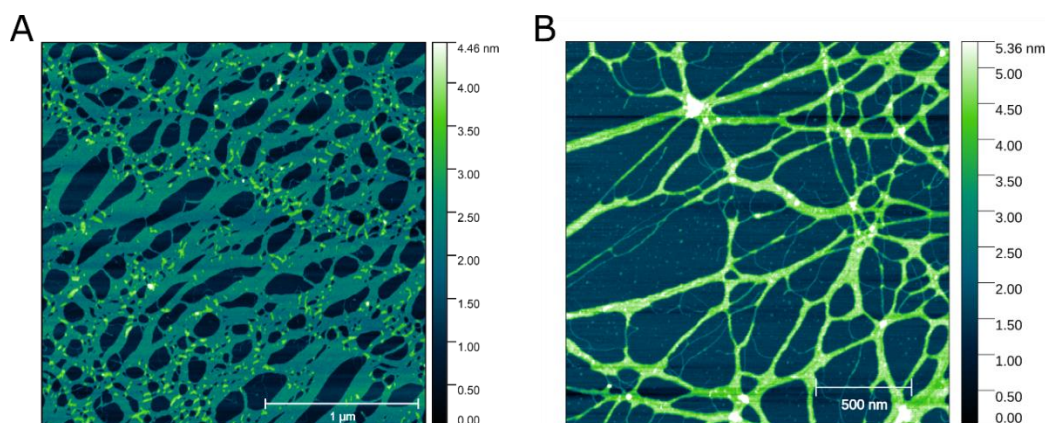
Liczne badania wskazują, że do obrazowania AFM cząsteczek kwasów nukleinowych warto zdecydować się na funkcjonalizację podłoża z miki (minerał z grupy krzemianów w formie płatkowej, o właściwościach silnie hydrofobowych) kationami np. magnezu, kobaltu, lantanu czy cyrkonu, aby zwiększyć powinowactwo negatywnie naładowanych cząsteczek DNA do podłoża [300]. W toku prac wykazano, że nie ma potrzeby bezpośredniego nakładania na mikę roztworu chlorku magnezu, ale wystarczy gdy kationy magnezu będą obecne w roztworze badanej próbki, np. w badaniach nad plazmidowym DNA o stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$ , stężenie chlorku magnezu wynosiło od 3 mM [301] do 5 mM [302]. Inne badania sugerują, że podczas obrazowania cząsteczek DNA istotna jest również obecność chlorku sodu, a co więcej niezwykle istotna jest proporcja między  $\text{MgCl}_2$  i  $\text{NaCl}$  [303].

Zdecydowano się początkowo przetestować chlorek magnezu o stężeniu 20  $\mu\text{M}$ , który na oczyszczonej mikę nałożono w objętości 10  $\mu\text{l}$ , a następnie po 5-minutowej inkubacji na podłoże nałożono 10  $\mu\text{l}$  roztworu wysokomolekularnego DNA o stężeniu 0,08  $\mu\text{M}$ . Taką próbkę następnie pozostawiono do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Otrzymano wyniki zaprezentowane na rysunku 97 A.

Obserwowano pasmowe struktury, przeplatane cienkimi nićmi, które są najprawdopodobniej pojedynczymi cząsteczkami DNA. Natomiast pasy to skupiska nici DNA. Tak więc funkcjonalizacja podłoża znacząco wpłynęła na obserwowane struktury w porównaniu do podłoża niefunkcjonalizowanego, gdzie DNA występowało w postaci kulistych agregatów [297]. Jednak wynik był niesatysfakcjonujący, ponieważ nie potwierdzał jednoznacznie czy obserwowane struktury to cząsteczki DNA, dlatego w kolejnych krokach stopniowo zmieniano kolejne warunki preparatyki próbek - zmieniano

zarówno stężenie DNA jak i chlorku magnezu, a także wprowadzono spłukiwanie powierzchni na różnych etapach preparatyki.

Pierwszą zmianą była redukcja stężenia DNA, tak aby uzyskać obraz o mniejszej liczbie obiektów zdeponowanych na danej powierzchni. W toku badań określono, że najodpowiedniejsze będzie 10 000-krotne rozcieńczenie. Choć nie uzyskano jednorodnej próbki - występowały skupiska, to możliwe było obrazowanie pojedynczych nici DNA. Drugim modyfikowanym parametrem było zredukowanie stężenia  $MgCl_2$  do  $4 \mu M$ . Po nałożeniu roztworu chlorku magnezu w objętości  $10 \mu l$  odczekano 10 minut i spłukano podłoże wodą destylowaną w objętości około  $500 \mu l$  nanoszonej delikatnym strumieniem. Następnie nałożono  $10 \mu l$  roztworu DNA 10 000-krotnie rozcieńczonego i po kolejnych 10 minutach ponownie spłukano wodą destylowaną o samej objętości. Spłukiwanie próbki jest często stosowaną metodą pozbycia się nie przyłączonych do podłoża cząsteczek [304]. Próbkę pozostawiono do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Na rysunku 97 B przedstawiono wyniki obrazowania AFM wysokomolekularnego DNA przygotowanej według wyżej opisanej preparatyki. Ułożenie DNA może wskazywać właśnie na kierunek spłukiwania i schnięcia.



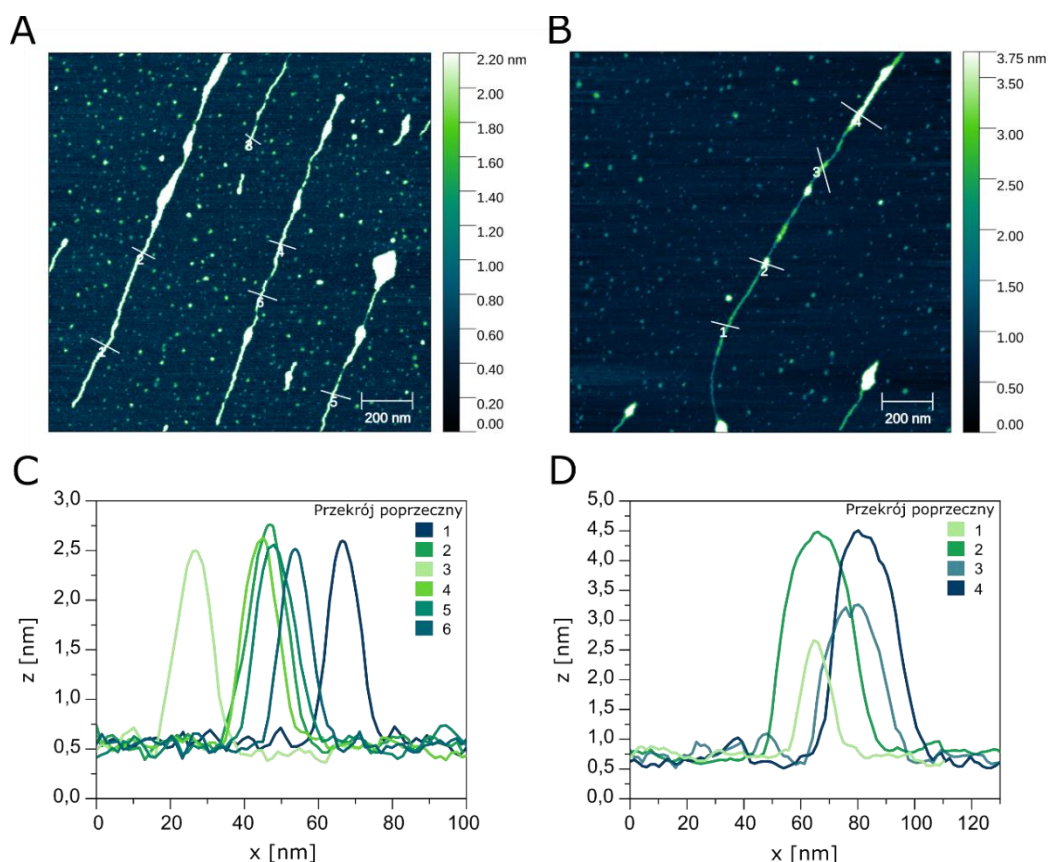
Rysunek 97. Obrazy AFM wysokomolekularnego DNA otrzymane dla różnych metod preparatyki.

W kolejnym kroku podjęto próbę dokładnej analizy rozmiarów nici DNA, dlatego wybrano obszary, gdzie występowały pojedyncze struktury – rysunek 98. Na obrazie AFM występowały struktury o przekroju poprzecznym o wysokości około 2 nm, co potwierdza obecność pojedynczych helis DNA [305]. Obecne były również „zgrubienia” nici DNA (wysokości kilku nanometrów), być może wynikające z formowania się agregatów krótszych fragmentów DNA, osadu chlorku magnezu lub niedostatecznego wyschnięcia próbki. Długość DNA można oszacować przyjmując, że jedna para zasad ma długość 0,34 nm [302], tak więc najdłuższe fragmenty DNA 20 kbp mogą osiągać nawet długość 6,8 μm (forma idealna – wydłużona). Jednak badane DNA jest silnie pofragmentowane, więc widoczne są odcinki o różnej długości.

Następnym etapem analizy topografii nici DNA było poznanie jej struktury podłużnej. Z racji ograniczeń aparaturowych próba obrazowania pojedynczych pary zasad DNA jest niemożliwa, wynika to z minimalnego do zarejestrowania dystansu ( $d_{min}$ ) między strukturami o wysokości ( $H$ ) sondą skanującą o promieniu krzywizny ostrza ( $R$ ) – występuje zależność [305]:



$$d_{min} = 2\sqrt{(0,4 R H)} \quad (62)$$



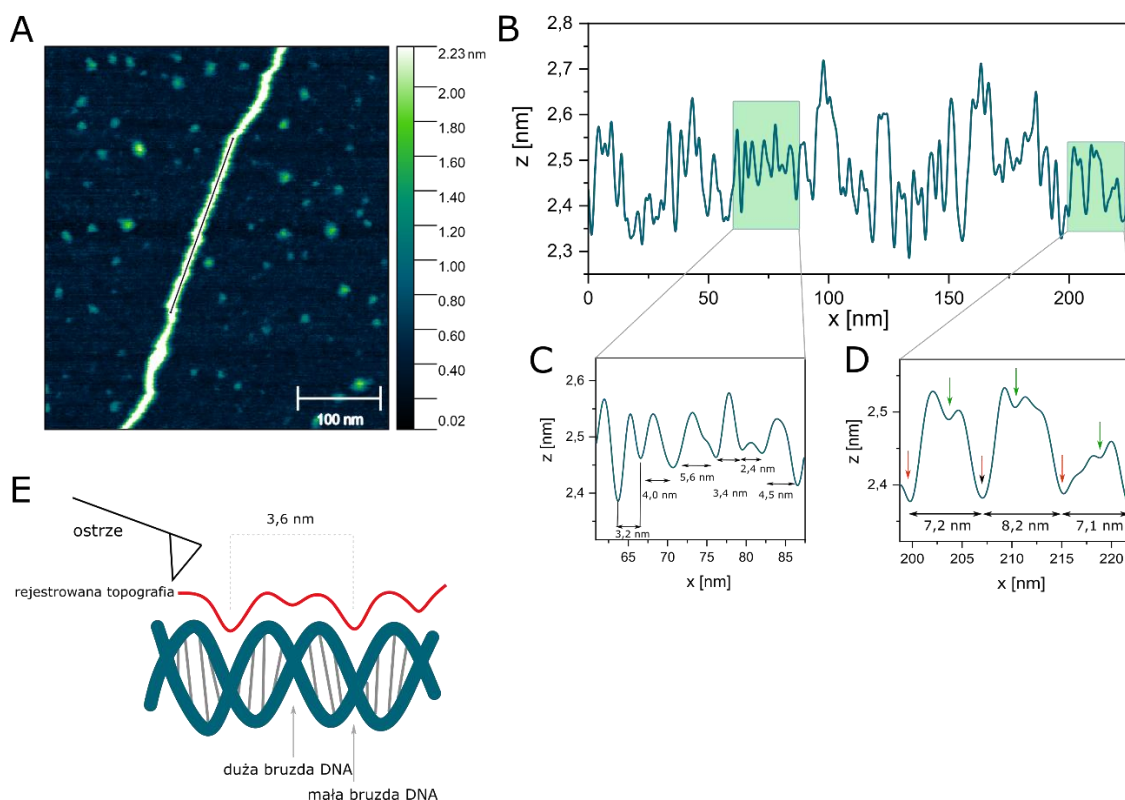
Rysunek 98. Obraz AFM wysokomolekularnego DNA 10 000-krotnie rozcieńczonego na podłożu sfunkcjonalizowanym chlorkiem magnezu o stężeniu 4  $\mu\text{M}$  (A, B) wraz z przekrojami poprzecznymi (C, D).

Wartość nominalna promienia krzywizny ostrza zastosowanego do pomiarów AFM określona jest na  $< 8$  nm. Stąd dla cząsteczek DNA o wysokości 2 nm, minimalna dystans do zarejestrowania wynosi około 5,1 nm. Wartość ta znacznie przekracza odległości między kolejnymi parami zasad (0,34 nm). Dlatego nie jest możliwe zbadanie topografii cząsteczek DNA z dokładnością do par zasad. Jednak opierając się o wyniki przedstawione na rysunku 99 dla przekroju podłużnego nici wysokomolekularnego DNA prawdopodobnie można obserwować bruzdy helisy DNA. Choć przytoczona wcześniej zależność (62) wykluczała analizowanie struktur oddalonych od siebie w mniejszej odległości niż 5 nm, to być może kierunek skanowania jest w tym przypadku bardzo istotny. Po drugie podany przez producenta promień nie jest dokładnie określony (do obliczeń przyjęto 8 nm, ale rzeczywisty rozmiar może być mniejszy). Aby analizować struktury oddalone od siebie o około 3,4 nm (dla wysokości 2 nm) promień ostrza powinien wynosić około 7,2 nm.

Na rysunku 99 E przedstawiono schemat pomiaru AFM cząsteczki DNA z zaznaczeniem rejestrowanej zmiany wysokości na bruzdzie mniejszej i większej.

Dokładnej analizie przekroju podłużnego nici DNA (rysunek 99 B) poddano dwa fragmenty. Pierwszy obszar (rysunek 99 C) charakteryzował się minimami oddalonymi średnio od siebie o  $3,8 \pm 1,0$  nm, a zmiany wysokości powierzchni były na poziomie

około 0,1 nm. Obserwowane minima prawdopodobnie odpowiadały dużym bruzdom helisy B-DNA, gdzie skok helisy wynosi 3,6 nm [306]. Drugi obszar (rysunek 99 D) charakteryzował się naprzemiennymi minimami z obniżeniem wysokości około 0,15 nm oraz 0,03 nm. Profil ten przypomina przekrój podłużny dla helisy, w którym widać zarówno wgłębienia dużej bruzdy i małej bruzdy. Jednak odległości między prawdopodobnymi dużymi bruzdami wyniosły  $7,5 \pm 0,5$  nm. Taki wynik sugerowałby prawdopodobnie lokalne wydłużenie lub deformację helisy DNA. Innym wyjaśnieniem może być, na skutek wysokiego stężenia jonów (w tym przypadku chloru i magnezu) lokalnie doszło do przejścia z formy B-DNA do formy Z-DNA [307]. Jednak skok helisy dla formy Z-DNA wynosi około 4,6 – 4,9 nm [307], a otrzymane wartości są znacznie wyższe. W badaniach nad plazmidowym DNA o długości 3,5 kbp obserwowano podobne struktury - wyznaczony skok helisy w przytoczonych badaniach wynosił  $8,0 \pm 0,5$  nm, a struktury te przypisano do lewoskrętnej helisy DNA, jednak nie formy Z-DNA, gdyż inne metody to wykluczyły [306].

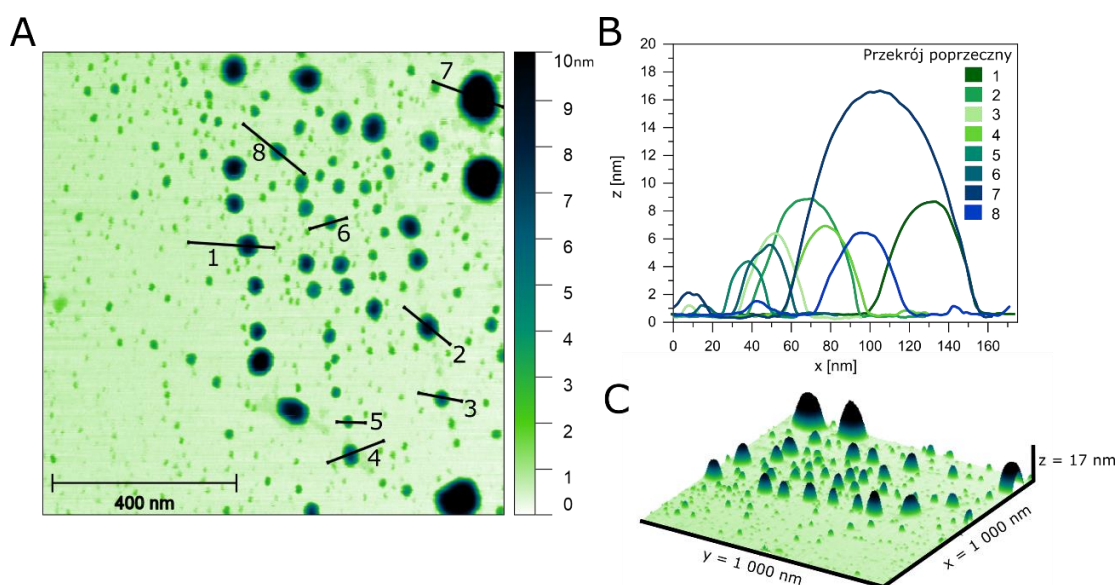


Rysunek 99. Obraz AFM pojedynczej nici wysokomolekularnego DNA (A) oraz jej przekroju podłużny (B, C, D). Schematyczna reprezentacja pomiaru AFM dla cząsteczek DNA (E).

Otrzymane wyniki badań AFM dla wysokomolekularnego DNA jednoznacznie potwierdziły, możliwa jest obserwacja pojedynczych nici DNA: nie w postaci kulistych agregatów, a w formie zbliżonej do „zrelaksowanej” (rozciągniętej) w roztworze. Oczywiście obecność jonów czy proces suszenia może wpływać na strukturę kwasu nukleinowego, dlatego warunki preparatyki w kolejnych krokach powinny zostać jeszcze dopracowane.

Preparatyka układów surfaktant/DNA została opracowana na bazie układu TRI\_IMI/DNA o stosunku  $p/n = 5$ . Prawdopodobnie dla pozostałych surfaktantów

należałyby ją nieznacznie zmodyfikować, co sugerowały wyniki z publikacji [297]. Na oczyszczoną mikę nałożono 4 mM chlorek magnezu w objętości 10  $\mu$ l, a po 10 minutach nałożono 10  $\mu$ l badanej próbki, a pomiar AFM przeprowadzono po całkowitym wyschnięciu próbki. Początkowo kompleksy TRI\_IMI/DNA rozcieńczono wodą destylowaną jedynie 100-krotnie i nie spłukiwano po nałożeniu na podłoże. Ze względu na silne właściwości powierzchniowe surfaktantów obawiano się, że spłukiwanie powierzchni może całkowicie „zmyć” kompleksy z podłoża. A po drugie z racji utworzenia kompleksów DNA obawiano się, że może być obecna tylko mała ilość obserwowanych struktur, stąd mniejszy stopień rozcieńczenia. Późniejsze wyniki potwierdziły obawy w sprawie małej gęstości próbki – niemożliwe było zlokalizowanie lipopleksów. Na rysunku 100 przedstawiono wyniki obrazowania AFM kompleksów TRI\_IMI/DNA dla powyższych warunkach preparatyki.



Rysunek 100. Topografia kompleksów TRI\_IMI/DNA o stosunku  $p/n = 5$  (A) wraz z przekrojami poprzecznymi (B) oraz reprezentacją trójwymiarową (C).

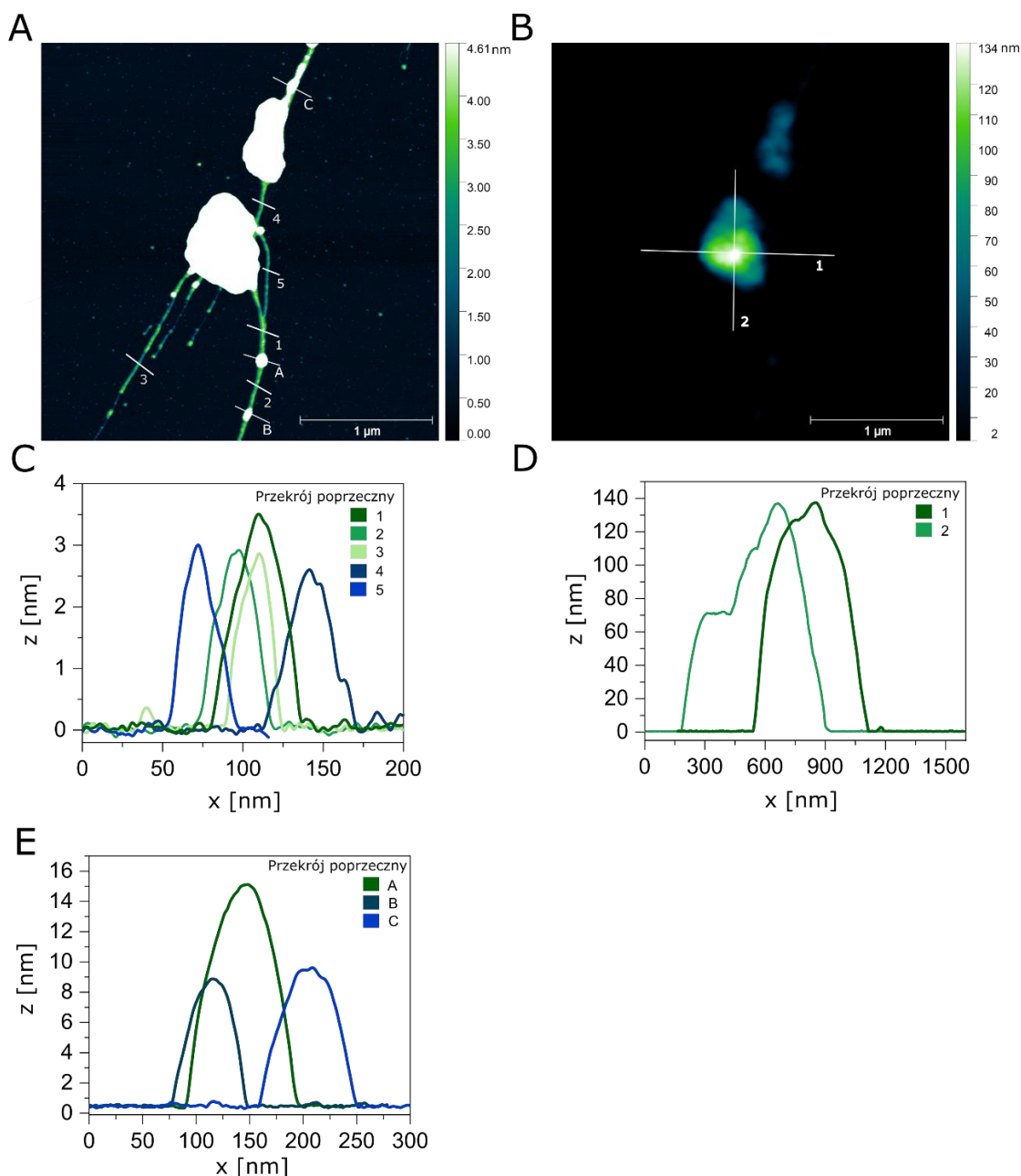
Na obrazie AFM obserwowano prawie kuliste agregaty (w innych obszarach próbki występowały bardziej nieregularne struktury) o znacznej polidispersyjności wielkości od kilku do kilkunastu nanometrów. W poprzednich badaniach dla surfaktantu TRI\_IMI uzyskano również lipopleksy o kształcie owalnym albo nieregularnym, ale o wysokości  $44 \pm 9$  nm [297]. Tak więc funkcjonalizowanie podłoża chlorkiem magnezu znacząco wpłynęło na wielkość obserwowanych struktur, być może na rysunku 100 zaprezentowane są pojedyncze lipopleksy.

W drugim podejściu wprowadzono etap spłukiwania podłoża zarówno po nałożeniu chlorku magnezu i próbki. Zastosowana preparatyka przebiegała następująco: na oczyszczoną mikę nałożono 10  $\mu$ l 4mM chlorku magnezu i po 10 minutowej inkubacji spłukano wodą destylowaną, następnie nałożono rozcieńczony 100-krotnie roztwór kompleksów TRI\_IMI/DNA, który inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut i również spłukano wodą destylowaną. Pomiar AFM przeprowadzono po całkowitym wyschnięciu próbek w temperaturze pokojowej.

Obserwowano nitkowate (rysunek 101 A) struktury przyłączone do większych agregatów o nieregularnej budowie (rysunek 101 B). Ze względu na znaczne różnice wysokości między tymi dwoma strukturami zdecydowano przedstawić dwa obrazy tego

samego obszaru. Struktury nitkowate miały wysokość około 3,0 - 3,5 nm wysokości (rysunek 101 C). Wartości te są większe niż dla nici DNA, być może DNA zostało otoczone cząsteczkami surfaktantów.

Obserwowano również duże agregaty o wysokości dochodzącej do 134 nm (rysunek 101 D) oraz mniejsze rzędu kilku - kilkunastu nanometrów (rysunek 101 E). Warto zauważyć, że agregaty miały nieregularną strukturę powierzchni.

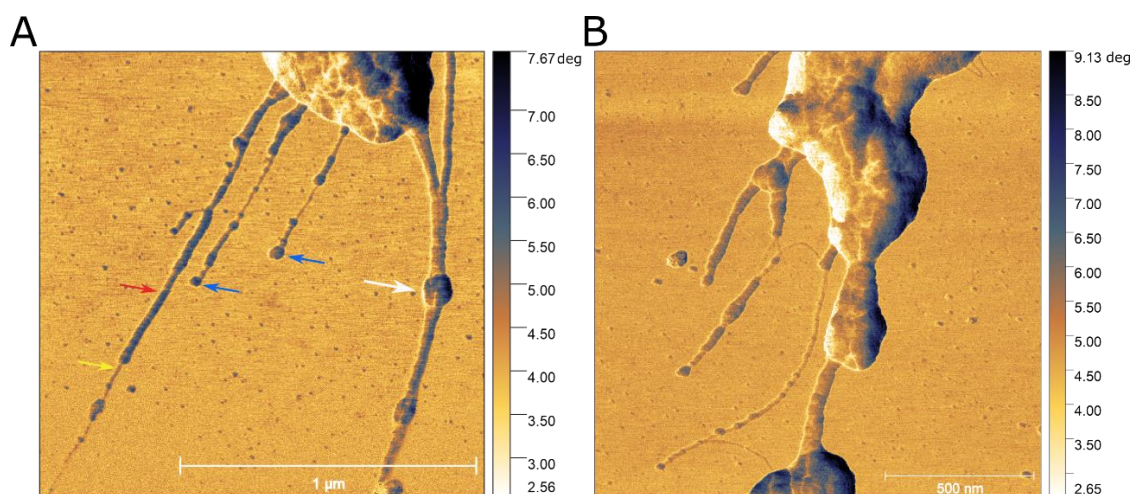


Rysunek 101. Obraz AFM lipopleksów na bazie surfaktantu TRI\_IMI i wysokomolekularnego DNA o stosunku  $p/n = 5$  z wyodrębnieniem struktur o małej (A) i dużej (B) wysokości oraz przekroje poprzeczne przez nitkowate struktury (C), duże (D) i małe agregaty (E).

Obrazy fazowe AFM powstają w wyniku rejestrowania opóźnienia fazowego między sygnałem oscylacji sondy skanującej, a sygnałem wyjściowym wysyłanym z elementu

piezoelektrycznego mikroskopu sił atomowych. Zmiany opóźnienia fazowego odpowiadają zmianom właściwości mechanicznych powierzchni próbki (adhezji, tarcia, lepkości itp.). Obraz topografii i obraz fazowy są rejestrowane w tym samym czasie dla danego obszaru, przez co lepiej można zinterpretować obserwowane struktury [308]. Na rysunku 102 przedstawiono obrazy fazowe omawianych lipopleksów, dzięki czemu dokładnie widać, jakie powstały struktury. Poza widocznymi dużymi skupiskami o zróżnicowanej topografii powierzchni, warte uwagi wydają się być mniejsze struktury. Na rysunku 102 A zaznaczono strzałkami różnego typu obserwowane struktury, które zostaną przeanalizowane. Struktura oznaczona żółtą strzałką może być czystą nicią DNA, co prawda jej wysokość jest zaledwie rzędu 1,0-1,5 nm, ale może być to wynik niedobrania parametrów pomiaru do tak małych struktur lub jej odwodnienia.

Z kolei strzałką czerwoną zaznaczono fragment, który z dużym prawdopodobieństwem można przypisać nici DNA pokrytej warstwą surfaktantów. W obrazie widoczne są również kuliste agregaty (niebieskie strzałki), odpowiadające zapewne skupiskom surfaktantów przyłączonych do DNA. Ciekawy jest obszar wskazany białą strzałką, gdzie widoczne jest wgłębienie między dwoma łączącymi się nićmi DNA pokrytymi surfaktantami. Być może ze względu na splukiwanie lub suszenie próbki surfaktanty nie przyłączyły się do nici DNA w sposób równomierny, na całej jej długości. Innym wyjaśnieniem może być fakt, że stężenie surfaktantu jest niewystarczające:  $p/n = 5$  jest najniższym stosunkiem, przy którym obserwowano kompleksy TRI\_IMI i DNA o długości 20 kbp.

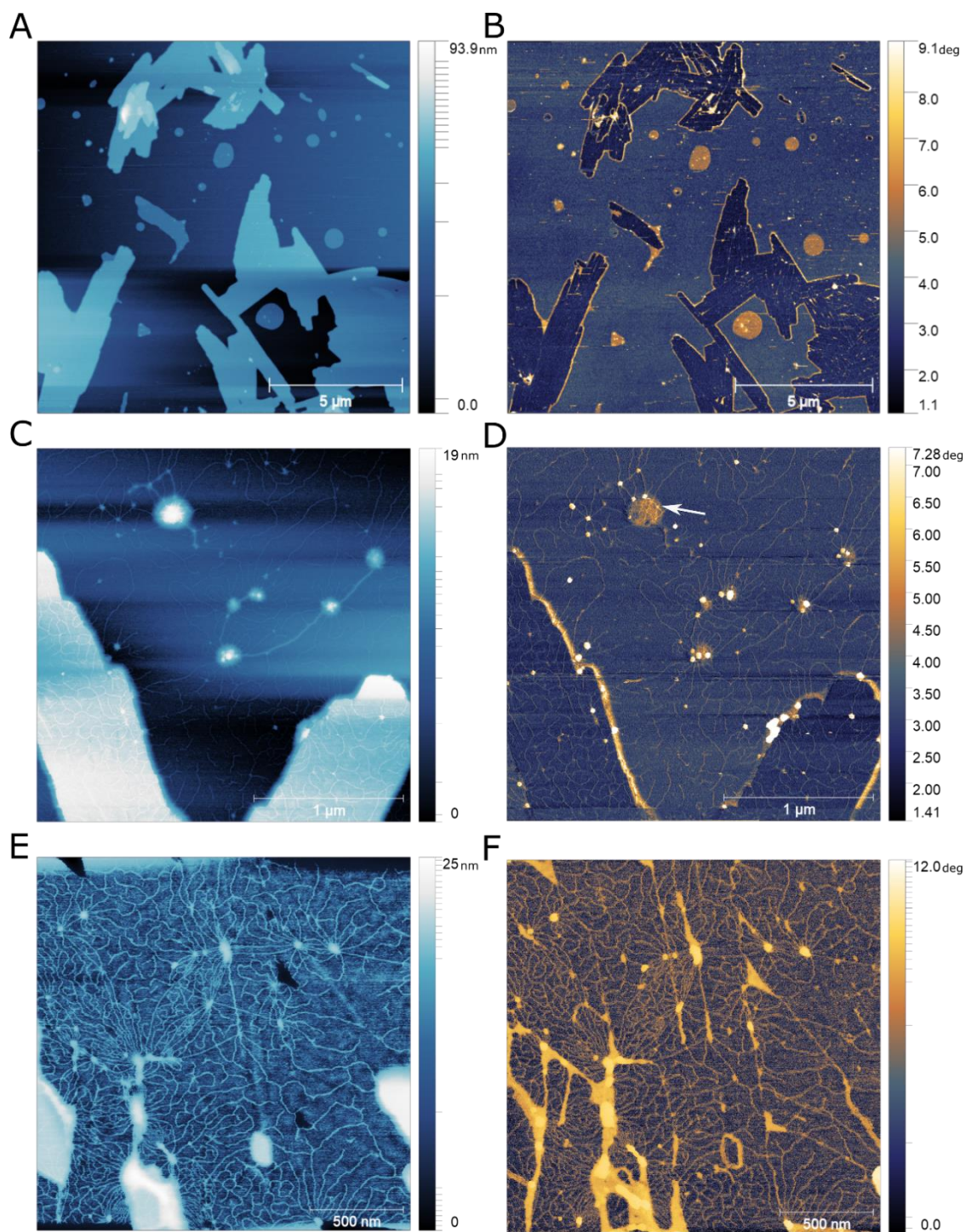


Rysunek 102. Obrazy fazowe lipopleksów na bazie surfaktantu TRI\_IMI i wysokomolekularnego DNA o stosunku  $p/n = 5$ .

Otrzymane wyniki potwierdzają przyłączanie się cząsteczek surfaktantów do łańcuchów DNA, jednak wydaje się, że należałoby przetestować jeszcze inną metodę preparatyki próbek na bazie surfaktantów, albo nawet inną metodę pomiaru (np. pomiar w cieczy).

Ciekawe wyniki uzyskano dla próbek na bazie formułacji lipidowej L2, surfaktantu TRI\_IMI i wysokomolekularnego DNA o stosunku  $p/n = 5$  (rysunek 103). W przypadku próbek z lipidami, należało zastosować 10 000-krotne rozcieńczenie wyjściowych roztworów, gdyż w obrazie próbek widoczne były duże skupiska nachodzących na siebie kulistych agregatów. zastosowana preparatyka przebiegała następująco: na oczyszczonej miance nałożono 10 µl 4 mM chlorku magnezu i po 10 minutowej inkubacji splukano wodą

destylowaną, następnie nałożono rozcieńczony 10 000-krotnie roztwór kompleksów L2/TRI\_IMI/DNA, który inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut i spłukano wodą destylowaną. Pomiar AFM przeprowadzono po całkowitym wyschnięciu próbek w temperaturze pokojowej. Aby dobrze uwidocznić struktury, w niektórych przypadkach zdecydowano się na nieliniową skalę wysokości lub fazy (opcja dostępna przy prezentacji obrazów topograficznych za pomocą programu Gwyddion) np. rysunek 103 E lub 103 F.

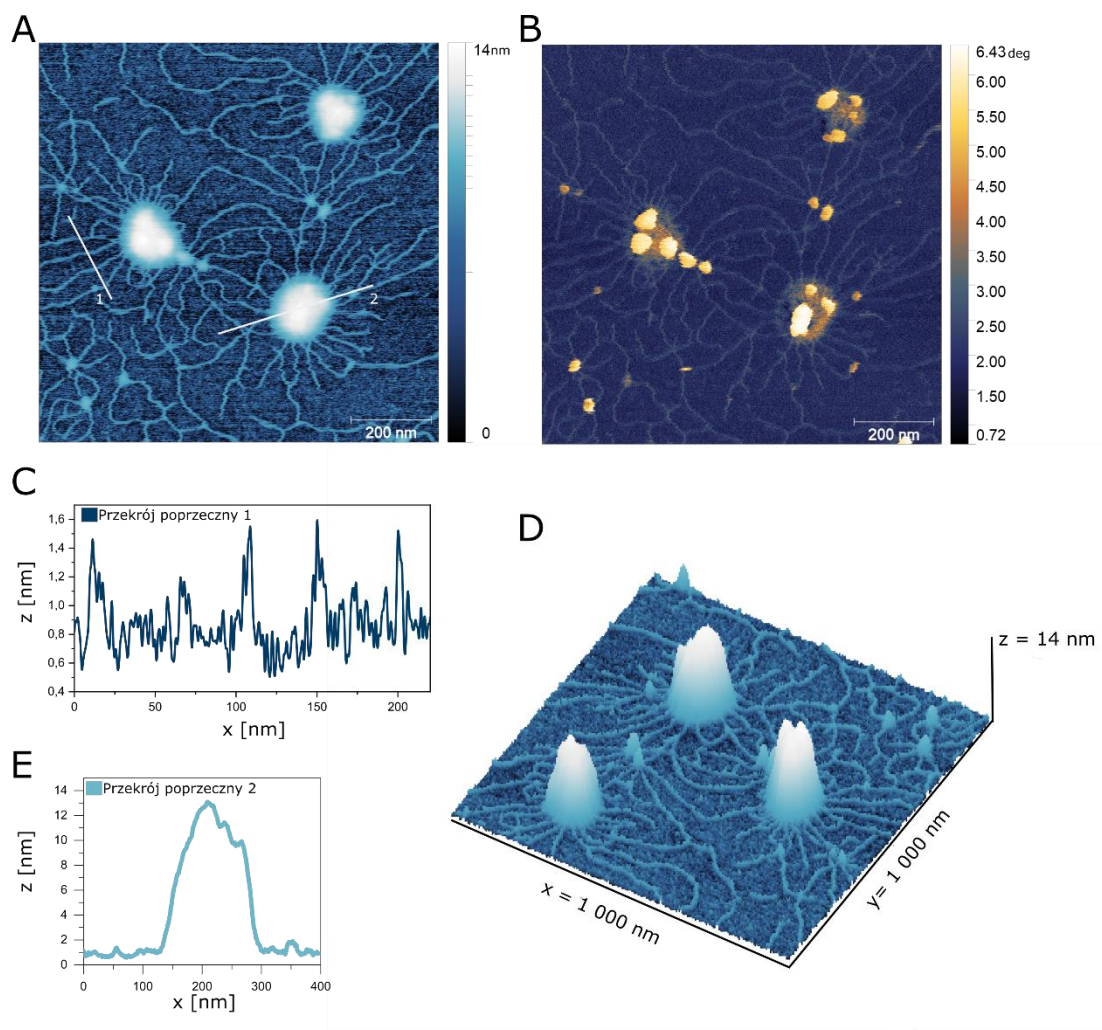


Rysunek 103. Obrazy topograficzne (A, C, E) i fazowe (B, D, F) lipopleksów na bazie formacji lipidowej L2, surfaktantu TRI\_IMI oraz wysokomolekularnego DNA o  $p/n = 5$ .

Na rysunku 103 A przedstawiono uzyskaną topografię próbki na dużym obszarze oraz odpowiadający jej obraz fazowy (rysunek 103 B). W obrazie widoczne były duże płaszczyzny i kuliste twory różniące się właściwościami mechanicznymi.

Dokładniejszy pomiar (tzn. zbliżenie tego obszaru) uwidoczniał nitkowate struktury przebiegające zarówno przez wspomniane wcześniej płaszczyzny, ale również obszar, który mógłby odpowiadać podłożu, czyli „gołej” micy (rysunek 103 C). Co więcej szczególnie ciekawy wydaje się obrys płaszczyzn, który może wykazywać inne własności mechaniczne (rysunek 103 D). Zbliżenie na kuliste struktury dostarcza również bardzo interesujących informacji o ich budowie, tj. składają się one z mniejszych kulistych struktur. Takie pojedyncze małe kuliste twory obserwowane są również na innych obszarach. Wydaje się jakby obserwowane nitkowate struktury tworzyły swojego rodzaju sieć na całej powierzchni próbki, a w miejscach ich łączenia/skrzyżowań tworzyły się kuliste zgrupowania. W agregacie (zaznaczony strzałką na rysunku 103 D) wyraźnie widać skupisko przeplatających się nici.

Na kolejnym przybliżeniu w obszarze, który początkowo przypisywano podłożu można obserwować wyraźną sieć nici, które łączą się we wspomnianych wcześniej „zgrubieniach” (rysunek 103 E, F). Na rysunku 104 przedstawiono szczegółową analizę tych struktur. Tak jak poprzednio, kuliste agregaty tak naprawdę były skupiskami mniejszych agregatów (rysunek 104 B), a ich wysokość wynosiła kilkanaście nanometrów (rysunek 104 E). Na obrazie trójwymiarowym wyraźnie widać nieregularną budowę tych agregatów (rysunek 104 D). Nitkowate struktury odchodziły promieniście od dużych agregatów, a ich wysokość wynosiła około 0,8 nm (rysunek 104C).



Rysunek 104. Topografia (A), obraz fazowy (B) oraz obraz trójwymiarowy (D) lipopleksów L2/TRI\_IMI/DNA\_20kpz o  $p/n = 5$  wraz z przekrojami poprzecznymi obserwowanych struktur (C, E).

Uzyskana wysokość nitkowatych struktur jest znacznie mniejsza niż wysokość referencyjnych nici DNA. Jednak opierając się o przedstawione obrazy fazowe dla tego układu przypuszcza się, że cała badana powierzchnia podłoża jest pokryta najprawdopodobniej fosfolipidami, tym samym nici DNA są zanurzone w warstwie fosfolipidów i ich obserwowana wysokość jest niższa. W obrazie fazowym kuliste agregaty i nici DNA wywołują podobne zmiany fazowe oscylacji mikrobilki skanera AFM, tym samym przypuszcza się, że jest to efekt surfaktantów, które pokrywają nici DNA, a także formują większe kuliste struktury. Co więcej surfaktanty mogą gromadzić się na granicy płaszczyzn (rysunek 103 D).



## 7 Dyskusja i podsumowanie wyników

---

W niniejszej dysertacji szczegółowo scharakteryzowano wybrane surfaktanty trimeryczne, zbadano ich wpływ na modelowe układy lipidowe, a także przeprowadzono szeroką analizę własności lipopleksów uzyskanych na bazie surfaktantów trimerycznych i formulacji lipidowych jako potencjalnych nośników materiału genetycznego.

Wstępna dyskusja wyników była prowadzona już w trakcie prezentacji wyników, a w tym miejscu zebrano najważniejsze wnioski i spostrzeżenia oraz podjęto próbę dyskusji w szerszym zakresie, aby uwypuklić pełen obraz możliwości i ograniczeń aplikacyjnych lipopleksów.

Układy na bazie surfaktantów trimerycznych i formulacji lipidowych badanych w niniejszej pracy posiadają szereg unikatowych właściwości, które czynią je obiecującymi nośnikami kwasów nukleinowych. Choć podjęto próbę wytypowania układu o najlepszych właściwościach pod względem zastosowania jako niewirusowego nośnika, to wymaga on jeszcze dalszych badań pod kątem właściwości fizykochemicznych i biologicznych.

### 7.1 Charakterystyka surfaktantów trimerycznych

---

W pracy badano trzy surfaktanty trimeryczne różniące się częścią polarną, w skład której wchodziła: IV-rzędowa sól amoniowa (surfaktant TRI\_N), imidazoliowa (TRI\_IMI) lub benzimidazoliowa (TRI\_BEN). Tym samym możliwa była ocena właściwości surfaktantów trimerycznych pod kątem wpływu rodzaju części hydrofilowej.

Dla badanych surfaktantów wyznaczono krytyczne stężenie agregacji i micelizacji, liczbę agregacji oraz rozmiar formowanych przez nie miceli. Zweryfikowano również ich budowę chemiczną.

Analiza widm FTIR obszaru poniżej  $900\text{ cm}^{-1}$ , w którym zlokalizowane są drgania od struktur cyklicznych, wykazała, że pasmo to ma największą intensywność dla TRI\_BEN, mniejszą TRI\_MI, natomiast dla TRI\_N nie obserwuje się pasma przy tej liczbie falowej. Tym samym w dużym przybliżeniu potwierdzono różną budowę surfaktantów tj. liniową surfaktantu TRI\_N oraz heterocykliczną surfaktantu TRI\_IMI i surfaktantu TRI\_BEN.

Wyniki badań krytycznego stężenia micelizacji uzyskane metodą konduktometryczną, spektrofotometryczną i fluorescencyjną są do siebie zbliżone: dla surfaktantu TRI\_N  $CMC$  wynosi około  $0,6\text{ mM}$ , dla TRI\_IMI - około  $0,8\text{ mM}$ , a dla TRI\_BEN około  $0,9\text{ mM}$ . Tym samym obserwowano zależność wzrostu wartości  $CMC$  wraz z liczbą struktur aromatycznych w cząsteczce surfaktantu. Wyniki te mogą sugerować, że wielkość i charakter części polarnej wpływa na wartość krytycznego stężenia micelizacji. Gdyby w dużym uproszczeniu podejść do tego problemu i zbadać powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika (ang. *solvent-accessible area*) dla tych molekuly tj. trimetyloaminy, imidazolu i benzimidazolu, czyli związków wchodzących w skład grup polarnych surfaktantów, największą powierzchnię zajmuje benzimidazol, przez co może wprowadzać dodatkową zawadę steryczną przy tworzeniu miceli. Należy podkreślić, że takie podejście jest dużym uogólnieniem i nie uwzględnia wielu składowych, mogących wpływać na uzyskane wyniki.

Co więcej, zastanawiające są wyniki uzyskane z analizy zależności molowej przewodności od pierwiastka kwadratowego ze stężenia surfaktantu, które znacząco

odbiegają od wyżej przedstawionych wartości. Dodatkowo w badaniu spektrofotometrycznym przy użyciu BZA, delikatny wzrost stosunku  $A_{310}/A_{250}(C)$  może wskazywać, że  $CMC$  badanych surfaktantów może mieć niższą wartość.

Jednym z wyjaśnień może być fakt, że zastosowane metody głównie są stosowane do charakterystyki surfaktantów monomerycznych, gdzie zmiany badanych zależności są przeważnie bardzo wyraźne. Natomiast dla rozważanych w pracy surfaktantów trimerycznych wszystkie uzyskane zależności nie wykazują skokowej zmiany, ale przebiegają w sposób stopniowy, stąd wyznaczone wartości mogą być obarczone pewnym błędem.

W tym miejscu również warto wspomnieć o oddziaływaniu typu  $\pi$ - $\pi$  (ang.  $\pi$ - $\pi$  stacking), które dotyczy oddziaływania ze sobą struktur aromatycznych, tak że tworzą one stopy ułożonych kolejno bezpośrednio nad sobą lub nieznacznie przesuniętych epierścieni aromatycznych. Takie oddziaływanie może również występować w surfaktantach, które mają w swojej budowie grupy aromatyczne [309 – 311]. Badania sugerują, że surfaktanty o grupach aromatyczne w części polarnej wykazują niższe wartości krytycznego stężenia micelizacji niż te z grupami liniowymi np. dla surfaktantu SDS (dodecylosiarczan sodu)  $CMC$  wynosi ok. 2 mg/ml, a dla jego homologu, ale z grupą aromatyczną w części polarnej SDBS (dodecylobenzenosulfonian sodu)  $CMC = 0,73$  mg/ml [312]. Co więcej obserwuje się dalszy spadek wartości  $CMC$  wraz ze wzrostem liczby pierścieni fenylowych w cząsteczkach surfaktantu [313].

Do wyznaczenia wartości krytycznego stężenia micelizacji zastosowano również analizę zależności przewodności molowej od pierwiastka kwadratowego ze stężenia surfaktantu. Niektórzy badacze podejmują próbę wyznaczenia  $CAC$  bezpośrednio z zależności  $\kappa(C)$ , gdzie za punkt krytycznego stężenia micelizacji przyjmują stężenie, kiedy zależność  $\kappa(C)$  przestaje być liniowa [233]. Jednak dla rozważanych surfaktantów takie podejście również jest problemowe, bo zmiany są subtelne. W świetle powyższych doniesień uzyskane wartości krytycznego stężenia agregacji na podstawie analizy zależności  $\Lambda(C^{0.5})$  (dla TRI\_N - około 0,2 mM, dla TRI\_IMI - około 0,04 mM, a dla TRI\_BEN około 0,03 mM) prawdopodobnie wskazują na oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  dla TRI\_IMI i TRI\_BEN, które mają zdecydowanie niższe wartości  $CAC$  niż surfaktanty o liniowej grupie polarnej TRI\_N.

Co do uzyskanych wartości  $CMC$  z zależności  $\Lambda(C^{0.5})$ , prawdopodobnie istnieją dwa wyjaśnienia stojące jednak wobec siebie w opozycji. Pierwsze wyklucza stosowanie tej metody do wyznaczania  $CMC$ , gdyż nie dla wszystkich surfaktantów można zarejestrować punkt  $CMC$ . Drugie wyjaśnienie: metoda ta wyłapuje subtelne zmiany przewodności na skutek agregowania surfaktantów już w niskich stężeniach. Gdyby sugerować się wynikami  $CMC$  wyznaczonymi z zależności  $\Lambda(C^{0.5})$  to hipoteza, że wraz ze zwiększeniem się ilości struktur aromatycznych w budowie surfaktantu spada  $CMC$  wydaje się wysoce prawdopodobna.

Niemniej porównując uzyskane w pracy wyniki  $CMC$  do monomerycznych homologów surfaktantów np. na bazie trimetyloaminy (chlorek dodecylotrimetyloamoniowy, DTAC) [314] lub imidazolu (chlorek 1-dodecylo-3-metyloimidazoliowy) [315], dla których  $CMC$  wynosi ok. 20 mM, obserwuje się spadek wartości  $CMC$  wraz ze wzrostem stopnia oligomeryczności surfaktantów.

W przypadku pomiarów DLS, gdzie metodyka wymusza zastosowania soli w badanych roztworach surfaktantów, tym samym zmieniając warunki środowiska (m.in. siłę jonową), wyników  $CMC$  z tych badań nie można odnieść bezpośrednio do

wyników uzyskanych w roztworach wodnych. Jednak na podstawie przeprowadzonych badań DLS dla surfaktantu TRI\_N potwierdzono, że obecność jonów obniża *CMC* surfaktantów [234].

Co więcej, niemożliwe do przeprowadzenia były pomiary DLS dla surfaktantu TRI\_BEN, którego roztwory były mętne nawet w niskim stężeniu NaBr. Zjawisko mętnienia roztworów surfaktantów obserwowane jest zazwyczaj dla surfaktantów niejonowych i polega na tym, że na skutek wzrostu temperatury roztworu surfaktantu dochodzi do separacji fazowej i staje się on mętny. W przypadku surfaktantów jonowych muszą wystąpić inne warunki, takie jak np.: wysokie stężenie soli, surfaktanty o dużych częściach polarnych, duże przeciwjony lub mieszaniny kationowych i anionowych surfaktantów. Zjawisko to tłumaczy się wzrostem oddziaływań hydrofobowych, odwodnieniem części hydrofilowych oraz tworzeniem bardzo dużych agregatów [316]. Można przypuszczać, że mętnienie roztworów surfaktantu TRI\_BEN jest wynikiem tworzenia dużych agregatów, ponieważ surfaktant ten spełnia kryterium dużej części polarnej, a obecność soli dodatkowo wzmacnia ten efekt. Podobnie dla surfaktantu TRI IMI, który charakteryzuje się mniejszą głową niż surfaktant TRI\_BEN (brak pierścienia benzenowego), w obecności niższego stężenia NaBr obserwowano duże struktury, natomiast wyższe stężenie soli powodowało mętnienie roztworów TRI\_IMI.

Na podstawie badań SAXS wyznaczono średnicę utworzonych przez surfaktanty trimeryczne miceli, która wynosiła średnio  $49,3 \pm 2,0$  nm. Niestety podobnie jak w przypadku *CMC*, metodyka pomiarów DLS wymusza zmianę warunków środowiska, przez co obserwowane są inne struktury i zachowania surfaktantów, dlatego nie podjęto próby porównywania wyników z DLS i SAXS. Należy również pamiętać, że w obecności soli dla wielu surfaktantów dochodzi do zmiany kształtu miceli w formy dyskoidalne lub pałeczkowate [275] a nawet znacznie wydłużone – formy robakowate [276]. Dlatego choć do badań SAXS przygotowano roztwory wodne surfaktantów, to sprawdzono czy utworzone struktury surfaktantów są na pewno kulistymi micelami. Nie obserwowano znaczących odstępstw od modelu sfery. Dodatkowo sugerując się wynikami liczby agregacji wyznaczonej przy stężeniu 15 mM, która dla wszystkich surfaktantów wynosiła  $30 \pm 3$ , można przypuszczać, że badane surfaktanty tworzą podobnych rozmiarów micelle.

Choć badane surfaktanty trimeryczne wykazują niższe wartości krytycznego stężenia micelizacji niż ich monomeryczne odpowiedniki, to między sobą nie różnią się znacząco. Zarówno rozmiar utworzonych miceli jak i liczba cząsteczek surfaktantów wchodzących w ich skład są porównywalne pomiędzy badanymi surfaktantami trimerycznymi. Zauważono, że wartość krytycznego stężenia agregacji maleje ze wzrostem liczby struktur aromatycznych w cząsteczce surfaktantu. Natomiast wartości krytycznego stężenia micelizacji prawdopodobnie wykazuje tendencję wzrostu przy wzroście liczby struktur cyklicznych, niemniej są to różnice niewielkie. Prawdopodobnie surfaktanty mają zbliżone wartości *CMC*, ponieważ mają taką samą długość łańcucha alkilowego, który przede wszystkim wpływa na wartość krytycznego stężenia micelizacji [317], jak i na rozmiar miceli [272].

## 7.2 Charakterystyka formulacji lipidowych

Kolejnym etapem badań była dokładna charakterystyka formulacji lipidowych na bazie, których przygotowywano lipopleksy. Badania te obejmowały pomiary DSC, dzięki którym wyznaczono temperaturowy zakres przemian fazowych dla badanych formulacji lipidowych; pomiary FTIR, które poszerzyły wiedzę o przejściach fazowych oraz hydratacji fosfolipidów oraz badania SAXS, które dostarczyły informacji o strukturach, jakie tworzą układy lipidowe. Tym samym zbadano wpływ różnych fosfolipidów (DOPE i DPPC) na strukturę DMPC.

Dla DMPC obserwowane są dwie przemiany: przedprzejście, czyli przejście z fazy żelowej do fazy żelowej pofalowanej ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ) oraz główna przemiana związana z przejściem między fazą żelową pofalowaną a fazą ciekłokrystaliczną ( $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ ). Wyniki otrzymane dla L1, czyli 150 mM roztworu DMPC w deuterowanej wodzie odpowiadają wartościom literaturowym [154], czyli przemiana główna obserwowana jest przy  $T_m = 23,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , a entalpia przemiany wynosi  $17,0 \pm 2,0 \text{ kJ/mol}$ , oraz przedprzejście o temperaturze  $T_p = 16,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  i entalpii  $\Delta H = 2,3 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}$ .

Warte uwagi są również doniesienia literaturowe, które sugerują, że wartości parametrów przemian fazowych dla fosfatydylocholin takich jak DMPC i DPPC są zależne od struktur, jakie tworzą w roztworach wodnych, czyli jaki rodzaj liposomów formują cząsteczki fosfolipidów. W tabeli zestawiono wyniki dla różnych rodzajów liposomów [246].

Tabela 9. Wartości parametrów przemian fazowych DMPC oraz DPPC w zależności od rodzaju liposomów w roztworach wodnych [246].

lipid	Rodzaj liposomów	Przedprzejście		Przemiana główna	
		$T_p$ [ $^\circ\text{C}$ ]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$T_m$ [ $^\circ\text{C}$ ]	$\Delta H$ [kJ/mol]
DMPC	MLV	$13,7 \pm 2,2$	$5,0 \pm 4,6$	$23,6 \pm 1,5$	$25,1 \pm 6,3$
	SUV			$22,2 \pm 2,0$	$17,2 \pm 8,4$
DPPC	MLV	$34,4 \pm 2,5$	$5,4 \pm 4,1$	$41,3 \pm 1,0$	$34,3 \pm 5,9$
	LUV	33,8	$2,5 \pm 0,5$	$41,4 \pm 0,1$	$31,4 \pm 2,1$
	SUV	28,0	$0,5 \pm 0,1$	$37,8 \pm 1,0$	$24,7 \pm 5,4$

SUV - małe jednowarstwowe liposomy (ang. *Small Unilamellar Vesicles*), LUV - duże jednowarstwowe liposomy (ang. *Large Unilamellar Vesicles*), MLV - duże wielowarstwowe liposomy.

Ponieważ zakresy temperatur przemian poszczególnych rodzajów liposomów i ich entalpii się wzajemnie nakładają, trudno jednoznacznie stwierdzić jakie struktury liposomów się tworzą. Należy zauważyć, że temperatura i entalpia głównej przemiany DMPC tworzących w roztworze MLV osiągają wyższe wartości niż dla SUV, dlatego uzyskane wyniki DSC pozwalają przypuszczać, że w badanych roztworach uzyskano małe jednowarstwowe liposomy DMPC [318, 319].

Zastosowana metoda przygotowania roztworów fosfolipidów (tj. użycie rozbijania ultradźwiękami) zakłada tworzenie się małych jednowarstwowych pęcherzyków tj. SUV. Otrzymane wyniki kalorymetryczne prawdopodobnie potwierdzają założenia przyjętej metody preparatyki liposomów - pomimo zastosowania wody deuterowanej  $T_m$  dla DMPC mieściła się w górnym zakresie temperatur, a przemiana główna charakteryzowała się stosunkowo niską entalpią, co w zestawieniu z danymi zamieszczonymi w tabeli 9 odpowiada utworzeniu małych jednowarstwowych liposomów (SUV).

W układzie L2 zarejestrowano przemianę główną i przedprzejście w temperaturach charakterystycznych dla czystego roztworu DMPC. Zgodnie z danymi literaturowymi przemiany fazowe DOPE możliwe do zaobserwowania to:  $T_m$  przy  $-16^\circ\text{C}$  oraz  $T_h$  przy  $10^\circ\text{C}$  [320]. Pomiary kalorymetryczne prowadzono w temperaturze  $0-50^\circ\text{C}$ , jednak na zarejestrowanych termogramach nie odnotowano przemiany DOPE z fazy ciekłokrystalicznej  $L_\alpha$  do fazy odwróconej heksagonalnej  $H_{II}$ , prawdopodobnie ze względu na małe stężenie DOPE (tj. 1%) w układzie L2, ale również przez stosunkowo małą entalpię tej przemiany, co wykazał Shalaev i Steponkus [321]. Może to również wynikać z obecności samego DMPC, ponieważ przejścia  $L_\alpha \rightarrow H_{II}$  są bardzo wrażliwe na obecność innych składników dwuwarstwy np. białek błonowych lub innych fosfolipidów [322].

W porównaniu dla czystego roztworu DMPC w układzie L2 zaobserwowano niewielki spadek temperatury głównej przemiany oraz szerokości połówkowej. Natomiast zmiana entalpii przemiany głównej i przedprzejścia zmalała znacząco, a co więcej temperatura przemiany przedprzejścia przesunęła się w kierunku niższych wartości. Zmiany te najprawdopodobniej świadczą o wbudowywaniu się DOPE w dwuwarstwę DMPC. Ze względu na swoją budowę chemiczną DOPE (wiązaną wielokrotnie w pozycji 9 i dłuższy łańcuch alkilowy niż DMPC) zmniejsza upakowanie lipidów w błonie przez co wzrasta jej płynność [138].

Na krzywych kalorymetrycznych dla układu L3 zarejestrowano przedprzejścia oraz główną przemianę w temperaturach odpowiadających przemianom fazowym dla DMPC i DPPC. Podobnie jak DMPC, DPPC w badanym zakresie temperatur przechodzi przemianę z fazy żelowej do fazy żelowej pofalowanej, a następnie wraz z dalszym wzrostem temperatury do fazy ciekłokrystalicznej. Zauważono, że obecność DPPC w układzie dodatkowo modulowała zmiany w przemianach fazowych DMPC, istotnie zmalała entalpia przemiany głównej i przedprzejścia, a także obserwowano niewielkie przesunięcie temperatury przemian fazowych w stronę niższych wartości.

Otrzymane wyniki skłaniają do analizy potencjalnych struktur, jakie mogą powstawać w układzie L3. Pierwsza hipoteza zakłada, że w roztworze współistnieją dwa rodzaje jednoskładnikowych liposomów tj. zbudowanych wyłącznie z DMPC albo z DPPC. Świadczyć o tym może obecność dwóch pików na termogramie, odpowiadających roztworowi DMPC oraz roztworowi DPPC. Gdyby w roztworze istniały pęcherzyki zbudowane z obydwu rodzajów fosfatydylocholin i to równomiernie rozłożonych, to na krzywej kalorymetrycznej odnotowany powinien być jeden szeroki pik z maksimum ok.  $34^\circ\text{C}$  (jak było obserwowane dla układu DMPC:DPPC w stosunku 44:56 w PBS) [323, 324]. Inna z hipotez zakłada utworzenie się pęcherzyków o asymetrycznej dwuwarstwie, tj. jedna warstwa wyłącznie z DMPC, a druga wyłącznie z DPPC. Jednak hipotezę tę odrzucono, ponieważ asymetryczne dwuwarstwy można osiągnąć tylko w określonych i kontrolowanych warunkach [325, 326]. Ze względu na znaczny spadek entalpii przemiany fazowej DMPC w porównaniu do roztworu DMPC (L1) i stosunkowo niską wartość entalpii przemiany fazowej DPPC w stosunku do wartości literaturowych, ułożenie fosfolipidów, które powstało w układzie L3 silnie zaburza przemiany fazowe poszczególnych składników. Dlatego bardzo prawdopodobna jest sytuacja, że w mieszaninie lipidów tworzą się duże obszary: bogate w DMPC i bogate w DPPC (stąd dwa maksima na termogramie w charakterystycznych miejscach dla pojedynczych składników), które nie tworzą jednorodnej frakcji. Występowanie takich dwóch regionów zaobserwowano np. dla biceli na bazie DMPC/DHPC. W układzie tym występuje region bogaty w DMPC, tworzący dwuwarstwę biceli, oraz region bogaty w DHPC tzw. ang. *micelle*-

*like edge*, czyli krawędź zamykającą podobną do miceli [281,282]. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że DOPE wnika równomiernie w obszary bogate w DMPC i obszary bogate w DPPC.

Ze względu na złożoność układu L3 ocena typu formowanych liposomów może być obarczona pewnym błędem. Jednak bazując na wartościach otrzymanych dla DPPC ( $T_p$ ,  $T_m$ ), lipid ten teoretycznie może dążyć do tworzenia MLV, co więcej spadek wartości  $T_p$ ,  $T_m$  i  $T_{1/2}$  dla DMPC może również wskazywać na tworzenie się większych struktur.

Kooperatywność przemiany dostarcza informacji o tym jak duża część lipidów przeszła przemianę fazową jednocześnie. W przypadku DMPC duży rozrzut literaturowych wartości liczby kooperatywności, nie pozwala ocenić, czy uzyskane z badań DSC wartości liczby kooperatywności  $CN$  dla DMPC są poprawne [208, 323]. Niemniej zauważono, że wyliczona dla DPPC liczba kooperatywności jest niższa niż dla DMPC (wyznaczone dla układu L3). Wynika to zapewne z faktu, że  $CN$  nieznacznie maleje wraz z długością łańcucha alkilowego [323]. Badania DSC wykazały wzrost kooperatywności przemiany fazowej DMPC wraz z obecnością innych składników mieszanin fosfolipidowych. Dodatkowo dane literaturowe sugerują, że w dwuskładnikowych układach lipidowych kooperatywność maleje w porównaniu do kooperatywności wyjściowych roztworów lipidów. A najmniejsza wartość  $CN$  osiągana jest, gdy składniki mieszaniny lipidów występują w tym samym pierwiastku molowym [323]. Taka sytuacja ma miejsce dla układu L3, gdzie liczba kooperatywności dla DMPC jest wyższa od  $CN$  dla referencyjnego roztworu DMPC, ale niższa niż dla DMPC w układzie L2.

Analiza pasm drgań grup metylenowych pozwala dostarczyć informacji o zachowaniu termotropowym łańcuchów alkilowych fosfolipidów i ich wrażliwości na zmiany temperatury. Jak wiadomo w niskich temperaturach, tj. poniżej temperatury głównej przemiany fazowej łańcuchy alkilowe fosfolipidów są rozprostowane i uporządkowane. Na skutek wzrostu temperatury (tj. powyżej temperatury głównej przemiany) dochodzi do rotacji wokół wiązania -C-C- w łańcuchu alkilowym fosfolipidu i zmiany kąta torsyjnego między kolejnymi atomami węgla ze  $180^\circ$  (konformacja *trans*) na  $60^\circ$  (konformacja *gauche*). Zmiana ta może dotyczyć jednego bądź wielu wiązań [327]. W ten sposób powstają zgięcia łańcucha alkilowego fosfolipidów, które w konsekwencji wprowadzają nieuporządkowanie w dwuwarstwie i zwiększają jej płynność [251].

Wyniki FTIR położenia pasm drgań rozciągających grup metylenowych w funkcji temperatury dla roztworu DMPC (L1) wykazały, że przemiana fazowa jest wysoce kooperatywna i zachodzi w temperaturze  $24^\circ\text{C}$ , co odpowiada wynikom uzyskanym z DSC. W układzie L2 zależność położenia maksimum pasma drgań grup metylenowych nie wykazywała tak skokowej zmiany jak w przypadku L1, co zapewne jest wynikiem obecności DOPE w układzie i zwiększeniem płynności błony. Co więcej przemiana fazowa rozpoczynała się już w  $22^\circ\text{C}$  (wzrost szerokości oraz przesunięcie położenia pasma drgań), oznacza to że łańcuchy alkilowe przyjęły konformacje *gauche*. Natomiast wzrost szerokości przemiany sugeruje, że kooperatywność przemiany maleje, co jest tendencją przeciwną do otrzymanej na podstawie wyników DSC. Dla układu L3 nie obserwowano w prawdzie dalszego obniżenia temperatury początku przemiany, ale zakres przemiany uległ znacznemu wydłużeniu. Taka sytuacja prawdopodobnie związana jest z obecnością przemian fazowych od DMPC i DPPC w badanym zakresie temperatur.

Analiza nożycowych drgań grup metylenowych wykazała, że przemiana DMPC rozpoczyna się około  $26^\circ\text{C}$ , a zależność temperaturowa położenia maksimum przesuwają się w kierunku wyższych długości fali, co może sugerować stopniowy wzrost populacji

cząsteczek fosfolipidów w konformacji *gauche*. Dla układów L2 i L3 obserwowano przeciwną zależność - położenie maksimum pasma przesunęło się w kierunku niższych fal wraz ze wzrostem temperatury, co sugerowałoby porządkowanie się łańcuchów węglowodorowych wraz ze wzrostem temperatury, a to z kolei jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi dla drgań rozciągających grup CH<sub>2</sub>. Dodatkowo dla L2 powyżej 24°C zależność przebiega stopniowo, natomiast dla L3 obserwowane są skokowe zmiany: przy 24°C (przemiana fazowa DMPC) oraz przy 42°C (przemiana fazowa DPPC), których nie obserwowano w pasmach drgań rozciągających grup metylenowych.

W oparciu o analizę drgań nożycowych grup metylenowych można również wyznaczyć rodzaj upakowania łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów. W przypadku układów L1 i L2 zapewne poniżej temperatury przemiany DMPC jest to ułożenie heksagonalne [258], natomiast w układzie L3 obecna jest wyłącznie faza ciekłokrystaliczna [253]. Dla układu L3 w całym badanym zakresie temperaturowym, obecność fazy ciekłokrystalicznej potwierdzają również wyniki badań SAXS, gdzie odległości międzypłaszczyznowe dla refleksu 001 zbliżone są co do wartości do wyników  $d_{001}$  DMPC w fazie ciekłokrystalicznej (30°C).

Kolejną grupą analizowanych na widmach FTIR drgań są drgania kołyszące grup metylenowych, które charakteryzują się bardzo małą intensywnością, przez co zbadano je jedynie dla czystego roztworu DMPC. Choć zamiany przesunięcia i szerokości pasma były niewielkie, to jednoznacznie wskazują, że temperatura przemiany DMPC wynosi 24°C. Brak rozdwojenia pasma może wskazywać, że łańcuchy są heksagonalnie ułożone [328]. Wyniki uzyskane dla DMPC stanowiły dane referencyjne i wskazywały na poprawność przeprowadzonych analiz.

W spektroskopii podczerwieni można obserwować zmiany stopnia hydratacji fosfolipidów w zależności od temperatury. Zmiany te również mogą być dodatkowo modulowane przez rozpuszczone w układzie inne substancje np. badane w ramach niniejszej pracy surfaktanty czy kwasy nukleinowe. Do analizy zmian hydratacji fosfolipidów wykorzystuje się: pasmo drgań rozciągających grup karbonylowych oraz pasma drgań symetrycznych i asymetrycznych grup fosforanowych [270, 271].

Zmiany stopnia hydratacji w obrębie grup karbonylowych badane na podstawie pasma w zakresie 1750-1720 cm<sup>-1</sup> można analizować na dwa sposoby: poprzez dekonwolucję na pasma składowe pochodzące od grup C=O tworzących i nietworzących wiązania wodorowe lub z wyznaczenia punktu środkowego pasma. W pierwszym podejściu obserwowano ze wzrostem temperatury wzrost liczby falowej położenia maksimum dla pasm drgań grup C=O zarówno uwodnionych jak i niewodnionych. Co więcej zwiększała się populacja grup karbonylowych tworzących wiązania wodorowe ze wzrostem temperatury, a więc zwiększał się stopień uwodnienia fosfolipidów. W obu zależnościach występują dwa istotne punkty przegięcia, w temperaturze 16°C oraz 24°C – co odpowiada przemianom fazowym dla DMPC. W drugim podejściu tj. wyznaczeniu punktu środkowego obserwowano fluktuacje położenia maksimum pasma ze wzrostem temperatury w charakterystycznych dla przemian fazowych DMPC temperaturach. Na podstawie wyników otrzymanych z pierwszej metody zależność położenia maksimum pasma C=O od temperatury ma przebieg przeciwny do opisanego w literaturze [268], ale bardzo dobrze było widać zmiany po przekroczeniu temperatur przejść fazowych DMPC oraz wzrost liczby wiązań wodorowych wraz ze wzrostem temperatury. Natomiast te same wyniki, przeanalizowane w drugi sposób, pokrywają się z doniesieniami literaturowymi [154].

Na podstawie analizy drgań rozciągających grup fosforanowych DMPC zauważono, że ze wzrostem temperatury położenie maksimum pasma  $s\nu_{PO_2^-}$  nieznacznie się przesuwa w kierunku niższych liczb falowych, ale bez żadnych charakterystycznych punktów, natomiast zależność położenia maksimum  $as\nu_{PO_2^-}$  od temperatury układu wykazuje fluktuacje z wyraźnym punktem w 24°C (co odpowiada przemianie fazowej DMPC). Wyniki uzyskane zarówno z analizy drgań grup karbonylowych jak i fosforanowych potwierdzają wzrost stopnia uwodnienia fosfolipidów wraz ze wzrostem temperatury układu [154], ale w fazie ciekłokrystalicznej dalszy wzrost temperatury prawdopodobnie przyczynia się do obniżenia stopnia hydratacji [270]. Warto podkreślić, że dane te stanowiły referencję dla dalszych układów.

Krzywe SAXS dostarczają informacji o strukturze badanych układów i mogą pomóc w wyjaśnieniu wcześniej poruszanych problematycznych kwestii, szczególnie w przypadku układów zawierających surfaktant trimeryczny.

Dla 150 mM roztworu DMPC (L1) obserwuje się struktury warstwowe (lamelarne) oddzielone od siebie warstwami rozpuszczalnika (wody) o odległościach międzypłaszczyznowych wykazujących termotropowe zachowanie. Po przejściu z fazy żelowej do fazy żelowej pofałdowanej dochodzi do zwiększenia grubości dwuwarstwy w wyniku zwiększenia hydratacji fosfolipidów i pofałdowania błony, a następnie w fazie ciekłokrystalicznej znowu błona staje się cieńsza, ale nie tak jak w fazie żelowej, co ma potwierdzenie w literaturze [279], gdyż łańcuchy alkilowe w konformacji *gauche* ulegają skróceniu.

DMPC to modelowy fosfolipid, przebadany pod wieloma kątami zarówno w zakresie właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych. A więc z jednej strony stanowi referencję, ale również zbadanie i przeanalizowanie jego właściwości pozwala zweryfikować pracę eksperymentatora. Podsumowując wszystkie przeprowadzone badania dla DMPC: w roztworze tworzy lamelarne struktury o heksagonalnym upakowaniu łańcuchów węglowodorowych. Wskutek wzrostu temperatury układu DMPC przechodzi dwie przemiany: pierwsza w 16°C zwana przedprzejściem, czyli przejściem z fazy żelowej do fazy żelowej pofałdowanej oraz druga zwaną główną przemianą w 24°C związaną z przejściem z fazy żelowej pofałdowanej do fazy ciekłokrystalicznej. Przemiana główna cechuje się wysoką kooperatywnością i dużą wartością bezwzględną entalpii. Natomiast przedprzejście charakteryzuje się mniejszą wartością entalpii i mniejszym stopniem kooperatywności, dlatego w wielu metodach pomiarowych jest trudna do zarejestrowania. Wzrost temperatury układu wiąże się ze wzrostem uwodnienia DMPC, tym samym zwiększa się grubość dwuwarstwy fosfolipidowej, ale w fazie ciekłokrystalicznej dalszy wzrost temperatury jest niekorzystny dla hydratacji, przez co maleje stopień uwodnienia DMPC i zmniejsza się grubość dwuwarstwy.

Krzywe SAXS zarejestrowane w niskiej temperaturze dla układu mieszanego (L2) wskazują na współistnienie fazy lamelarnej i heksagonalnej, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, gdzie DOPE indukuje powstawanie fazy heksagonalnej odwróconej [128] lub w układach mieszanych przyczynia się właśnie do współistnienia fazy lamelarnej i heksagonalnej [105]. Piki braggowskie fazy heksagonalnej zanikają w wyższej temperaturze, ale zarejestrowane odległości międzypłaszczyznowe, które są większe niż dla DMPC być może sugerują, że na skutek wbudowywania się DOPE między cząsteczki DMPC łańcuchy węglowodorowe przechodzą w konformację *gauche*. Wbudowywanie się cząsteczek DOPE w dwuwarstwę lipidową mogą potwierdzać wyniki z kalorymetrii (spadek



entalpii przemian fazowych) oraz wyniki z badań FTIR – przesunięcie temperatury początku przemiany fazowej do 20°C.

Wyniki badań SAXS dla kolejnego układu mieszanego (L3) wskazują na współistnienie fazy lamelarniej oraz jeszcze jednej fazy, dla której nie można jednoznacznie przypisać położenia pików. Początkowo na podstawie wyników z badań DSC sądzono, że być może w układzie L3 tworzą się dwuwarstwowe bicele, o obszarze bogatym w DMPC i obszarze bogatym w DPPC [281, 282]. Jednak krzywe SAXS przeczą tej hipotezie (brak charakterystycznego szerokiego piku dla biceli). Dlatego prawdopodobnie pozostałe piki braggowskie, które nie zostały jednoznacznie przypisane mogą należeć (w oparciu o wyniki DSC, gdzie widoczne były dwa piki na termogramie) do dwuwarstwy utworzonych głównie z DPPC. W oparciu się o wyniki badań kalorymetrycznych, spektroskopii podczerwieni i małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego zaproponowano model struktury układu L3, gdzie występują dwuwarstwy zbudowane głównie z DMPC z domieszką DOPE i DPPC oraz warstwy złożone głównie z DPPC z domieszką DMPC i DOPE.

Choć techniki DSC oraz FTIR różnią się między sobą metodyką (np. ciągłym lub skokowym trybem grzania) i dostarczają niekiedy sprzecznych wyników (np. o stopniu kooperatywności), to dzięki technice SAXS można było wyjaśnić problematyczne kwestie. Dzięki czemu stwierdzono, że obecność różnorodnych fosfolipidów w układzie wpływa na zachowanie termotropowe przemian fazowych DMPC i DPPC oraz indukuje formowanie określonych struktur (np. lamelarniej, heksagonalnej) w układach lipidowych. Szczególnie obiecujący jest układ L2, gdzie prawdopodobnie możliwa była obserwacja struktury heksagonalnej, która z kolei pozytywnie wpływa na wydajność transfekcji.

### 7.3 Wpływ surfaktantów trimerycznych na formulacje lipidowe

---

Aby zbadać wpływ surfaktantów trimerycznych na formulacje lipidowe przeprowadzono serię badań analogiczną jak dla mieszanin lipidów tj. badania DSC, FTIR oraz SAXS.

Na podstawie wyników DSC dla układów L1 z różnymi surfaktantami trimerycznymi zaobserwowano: występowanie frakcji ubogiej w cząsteczki surfaktantów i w niektórych przypadkach kilku frakcji bogatych w cząsteczki surfaktantów o różnym stopniu nasycenia [259] oraz zanik przedprzejścia w układach o wyższym stężeniu surfaktantu. Brak przemiany przedprzejścia na krzywych kalorymetrycznych wiąże się z zanikiem fazy żelowej pochylonej na skutek wbudowywania się cząsteczek surfaktantów w dwuwarstwę lipidową w obrębie głów fosfolipidów [260].

Wartość temperatury  $T_m$  dla DMPC\* (frakcji ubogiej w surfaktanty) w układach ze wszystkimi badanymi surfaktantami miała stałą wartość ok. 23,9°C, ale obserwowany spadek entalpii (przy  $p/n = 20$ ) był największy dla układu z surfaktantem TRI\_BEN, a najmniejszy dla TRI\_IMI. Wyznaczając stosunek entalpii przemiany frakcji DMPC\* do entalpii wszystkich frakcji bogatych w surfaktanty przy  $p/n = 16$  uzyskano: dla TRI\_N stosunek 40:60, dla TRI\_IMI 37:63, natomiast dla TRI\_BEN 32:68. Wyniki te są zbliżone do siebie i wskazują, że ze wzrostem stężenia surfaktantów w układzie frakcja bogata w surfaktanty zwiększa udział w stosunku do frakcji ubogiej w surfaktanty.

Dla TRI\_BEN występowała jedna frakcja bogata w surfaktanty, dla TRI\_IMI – dwie frakcje, a dla TRI\_N - trzy frakcje. Przy  $p/n = 20$  przemiana główna dla frakcji o największym stężeniu surfaktantu przypadała: na 22°C dla L1/TRI\_BEN, 21,9°C dla L1/TRI\_IMI (frakcja II), a dla L1/TRI\_N (frakcja III) - 22,2°C.

Tym samym nie odnotowano znaczących różnic w parametrach dla układów z DMPC i różnymi surfaktantami trimerycznymi, z wyjątkiem separacji na frakcje o różnym nasyceniu surfaktantem. Jednakże surfaktanty trimeryczne powodowały: spadek entalpii przemiany frakcji DMPC\* oraz spadek temperatury przemiany i wzrost szerokości połówkowej przemian frakcji bogatych w surfaktanty.

Wbudowywanie się cząsteczek surfaktantów w dwuwarstwę lipidową, a dokładnie niedopasowanie długości łańcuchów alkilowych, powoduje zaburzenie uporządkowania dwuwarstwy i spadek entalpii przy wzroście  $T_{1/2}$ , co z kolei sugeruje spadek kooperatywności przemiany [261], taki efekt obserwowany był także przez Casals i Cañadas dla cholesterolu [329].

Gdy temperatura  $T_m$  oraz entalpia przemiany maleją, a  $\Delta T_{1/2}$  znacząco wzrasta, wskazuje to na wzrost płynności dwuwarstwy [330], w wyniku oddziaływań dodatków takich jak surfaktanty z częściami lipofilowymi fosfolipidów [204]. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że w układzie występują surfaktanty kationowe, ponieważ ogromny wpływ w procesie wbudowywania się w błonę lipidową oprócz oddziaływań hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych mają oddziaływania elektrostatyczne grup polarnych [330]. Dlatego mimo względnie stałej wartości  $T_m$  nie obserwuje się stałej entalpii przejścia np. tak jak w przypadku frakcji ubogiej w surfaktanty i takie zjawisko przypisuje się dominacji oddziaływań elektrostatycznych [331]. W sytuacji, gdy temperatura przemiany spada, a entalpia jest względnie stała – wzrasta entropia układu. Taki wzrost nieuporządkowania układu, może wskazywać na wbudowywanie się kolejnych cząsteczek surfaktantu w dwuwarstwę DMPC w obrębie frakcji bogatej w surfaktanty. W tym przypadku zwiększa

się również  $\Delta T_{1/2}$  i początek przemiany ( $T_{onet}$ ) przesuwają się w kierunku niższych temperatur.

Na podstawie analizy symetrycznych drgań rozciągających grup metylowych DMPC (L1), zauważono że dodatek surfaktantu powodował wzrost zakresu przemiany fazowej fosfolipidu tzn. obniżał temperaturę początku przemiany, z tym że największe zmiany zakresu przemiany fazowej obserwowano w obecności surfaktantu TRI\_N. Tym samym otrzymane wyniki sugerują mniejszy wpływ surfaktantów TRI\_IMI oraz TRI\_BEN na DMPC. Surfaktanty te nie zmieniają tak silnie płynności dwuwarstwy, co nie do końca się pokrywa z wynikami DSC.

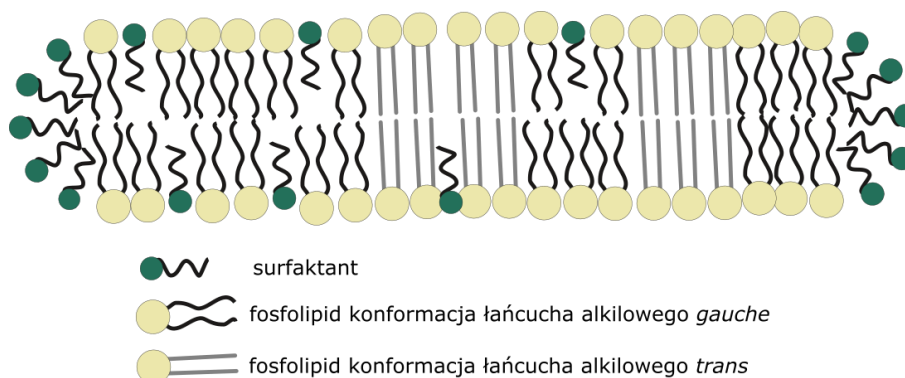
Dla wszystkich układów na bazie L2 z surfaktantami trimerycznymi obserwowano większe obniżenie entalpii niż dla układów na bazie wyłącznie DMPC, ale przesunięcia temperatury przemiany były mniejsze. W porównaniu z układami na bazie L1, nie obserwowano tak intensywnej separacji fazowej, jedynie przy niektórych wysokich stężeniach surfaktantu występował dodatkowy pik na termogramie pochodzący od frakcji bogatych w surfaktanty. Co ciekawe, przemiana przedprzejścia była widoczna nawet w wysokich stężeniach surfaktantu, dla TRI\_N zanika dopiero przy  $p/n > 10$ , być może zmienia się tym samym sposób wbudowywania się surfaktantów w dwuwarstwę lipidową. Takie zachowanie może świadczyć, o tym że DOPE ułatwia rozdystrybuowanie surfaktantów trimerycznych w błonie lipidowej, przez co nie tworzą się ich skupiska (frakcje bogate w surfaktanty). Badania FTIR wykazały, że w porównaniu do referencyjnego L2, surfaktanty TRI\_IMI i TRI\_BEN nie wpływały na zakres temperatury przemiany, jedynie surfaktant TRI\_N tylko nieznacznie obniżał temperaturę początku przemiany fazowej.

W układach na bazie L3 w obecności surfaktantu TRI\_N na krzywych kalorymetrycznych zarejestrowano separacje pików odpowiadających zarówno DMPC, jak i DPPC. Dla pozostałych dwóch badanych surfaktantów trimerycznych separacja fazowa występowała przy wybranych stężeniach surfaktantu, głównie dla pików od DMPC. Temperatury frakcji ubogich w surfaktanty (DMPC\* i DPPC\*) nie zamieniały się wraz ze wzrostem stężenia we wszystkich badanych układach, natomiast temperatury przemian frakcji bogatych w surfaktanty przesunęły się w kierunku niższych temperatur. W żadnym z układów nie zarejestrowano przedprzejścia ani dla DMPC ani dla DPPC. Największe zmiany obserwowano w bezwzględnej wartości entalpii przemiany fazowej dla poszczególnych surfaktantów. Choć dla każdego przypadku entalpia przemiany głównej dla frakcji DMPC\* i DPPC malała ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie, to spadek ten nie był liniowy (z wyjątkiem układu L3/TRI\_BEN). Na podstawie różnic w redukcji wartości entalpii poszczególnych przemian fazowych, wysunięto hipotezę, że surfaktant TRI\_BEN silniej oddziałuje z obszarem bogatym w DMPC, a surfaktant TRI\_N z obszarem bogatym w DPPC. Choć zmiany w widmach FTIR układów L3 w obecności surfaktantów trimerycznych nie są tak znaczące jak dla innych układów lipid/surfaktant (w odniesieniu do referencyjnych formułacji lipidowych), to również dla tych układów można stwierdzić wzrost płynności błony lipidowej wskutek obecności surfaktantów trimerycznych.

Zarówno badania kalorymetryczne jak i spektroskopii podczerwieni wskazują na obniżanie temperatury przemiany fazowej fosfolipidów w obecności surfaktantów trimerycznych i wzrost płynności dwuwarstwy. Największe zmiany obserwowano w obecności surfaktantu TRI\_N, który jednocześnie przyczyniał się do powstawania największej niejednorodności próbki. Natomiast układ L2 najsłabiej reagował na dodatek surfaktantów.

Na podstawie zarejestrowanych i przeanalizowanych krzywych SAXS można zauważyć, że wszystkie badane układy wykazują zależność termotropową, jednak nie ma jeden wyraźnej tendencji i w głównej mierze zależy ona od rozważanego układu. Wpływ temperatury na struktury w badanych układach objawiała się: zmianami położenia maksimum dyfrakcyjnych, a tym samym zmianami odległości między płaszczyznami lub zanikiem mezofaz np. fazy lamelarniej w układach wielofazowych (zanik maksimum dyfrakcyjnych).

Krzywe SAXS dla układów DMPC z surfaktantem TRI\_BEN odpowiadają najprawdopodobniej strukturze bicelarnym [280], a kształt funkcji  $p(r)$  wyliczonej dla tego surfaktantu, najprawdopodobniej wskazuje na tworzenie biceli cylindrycznych lub kuboidalnych [283]. Wyniki z badań DSC wskazują na dwa regiony dwuwarstwy DMPC: bogaty w surfaktanty i ubogi w surfaktanty. Z kolei dane z FTIR mogą sugerować, że ze względu na niewielkie zmiany w stosunku do L1, tylko niewielka populacja surfaktantów oddziałuje z dwuwarstwą DMPC. Tym samym dla układu L1/TRI\_BEN o stężeniu surfaktantu odpowiadającym stosunkowi  $p/n = 20$  zaproponowano, że układ ten tworzy bicele utworzone z dwuwarstwy DMPC z wbudowanymi w nią surfaktantami TRI\_BEN, a krawędź zamykającą tworzą głównie cząsteczki surfaktantu TRI\_BEN. Wymiary tych biceli (na podstawie krzywych SAXS zarejestrowanych w 10°C) oszacowano na: około 12,00 nm średnicy i około 6,35 nm grubości. Na rysunku 105 przedstawiono uproszczony schemat przekroju podłużnego biceli.



Rysunek 105. Uproszczony schemat przekroju podłużnego biceli fosfolipid/surfaktant.

W przypadku L1/TRI\_N i L1/TRI\_IMI obserwowano współistnienie struktur lamelarnych i unilamelarnych na krzywych SAXS, polidispersyjność próbki sugerowały również wyniki badań DSC. Jednakże obecność zarówno szerokiego maksimum i wyraźnych pików braggowskich na krzywych SAXS może wynikać z układania się biceli w stosy [284], lub tworzenia się wielowarstwowych liposomów [286]. Co więcej w fazie żelowej DMPC obserwowano zmniejszenia odległości między płaszczyznami wskutek obecności surfaktantów w dwuwarstwie, być może w wyniku oddziaływań między surfaktantami. Natomiast powyżej temperatury przemiany wartości  $d$  są większe niż dla referencyjnego DMPC, w oparciu o wyniki badań FTIR przypuszcza się, że fosfolipidy występują w konformacji *gauche*.

Dla układu na bazie L2 i surfaktantu TRI\_N o  $p/n = 20$  wyniki badań DSC sugerują jednorodną fazowo próbki, ale na krzywych SAXS, których kształt wskazuje

na występowanie najprawdopodobniej kulistych liposomów, widać również pik braggowski, który mógłby odpowiadać strukturom lamelarnym. Jednak ze względu na to, że nie ma jego powtórzenia periodycznego w stosunku 1:2:3, a także jego położenie nie zmienia się wraz ze wzrostem temperatury, przypuszcza się, że być może wytworzyły się wielowarstwowe liposomy. Taka sytuacja ma miejsce, gdy drastycznie spadnie grubość warstwy wody między dwuwarstwami lipidowymi, a tym samym spadanie stopień hydratacji lipidów [332]. Najprawdopodobniej jest to związane ze strukturą surfaktantu TRI\_N, która powoduje że surfaktant ten może oddziaływać z więcej niż jedną błoną lipidową.

Ciekawym przypadkiem jest również układ L2/TRI\_IMI o  $p/n = 20$ , w którym przypuszcza się, że istnieją dwie fazy lamelarne o różnej konformacji łańcuchów alkilowych fosfolipidów [288,289] oraz faza heksagonalna. Jednak wraz ze wzrostem temperatury układu zanika separacja fazowa i pozostaje wyłącznie faza lamelarna. Ze względu na małą intensywność krzywych SAXS dla L2/TRI\_BEN nie podjęto się szerszej analizy, ale przypuszcza się, że w układzie występują struktury bicelarne i warstwowe.

Układy na bazie L3 z surfaktantami trimerycznymi są zdecydowanie bardziej złożone niż układy omawiane wcześniej. Choć dla L3/TRI\_IMI i L3/TRI\_BEN wiodącą fazą jest faza lamelarna, to w przypadku układu L3/TRI\_N na podstawie krzywych SAXS zarejestrowanych w 30°C przypisano piki braggowskie do fazy lamelarnej, regularnej o symetrii Pn3m, a nawet heksagonalnej. Współistnienie wielu faz w układzie, jest często obserwowane dla wieloskładnikowych układów na bazie lipidów [292–294], co więcej wyniki DSC wskazują na przynajmniej 4 różne frakcje, o różnym stopniu nasycenia surfaktantem i o różnym składzie lipidowym.

W układach na bazie lipid/surfaktant w większości przypadków występowała niejednorodność struktur, jakie powstały w tych układach, jednak nie ma jednej wiodącej zależności w tej kwestii. Można przypuszczać, że surfaktanty trimeryczne ze względu na swoją budowę nie wbudowują się jednorodnie w dwuwarstwy lipidowe, przez co mogą tworzyć różnorodne struktury w układach lipid/surfaktant o zmiennym stopniu nasycenia surfaktantem, takie wnioski uzyskano na podstawie badań DSC, jak i badań SAXS. Przypuszcza się, że większą skłonność do równomiernego wbudowywania się w dwuwarstwy lipidowe ma surfaktant TRI\_BEN, ponieważ wykazuje większą tendencję do tworzenia mniej złożonych struktur tj. preferowane struktury to lamelarne czy unilamelarna, a także nie wykazuje znacznej separacji fazowej na termogramach DSC.

## 7.4 Układy lipid/surfaktant/DNA

---

W pierwszym etapie analizy zaproponowanych w pracy lipopleksów, zbadano ich zdolność do wiązania i uwalniania materiału genetycznego. Proces wiązania DNA zbadano również pod kątem wpływu pH środowiska.

Na podstawie przeprowadzonych testów elektroforetycznych zauważono, że we wszystkich badanych systemach obecność fosfolipidów znacząco obniżała wartość  $p/n$  wymaganą do utworzenia stabilnego kompleksu z materiałem genetycznym. Jednak początkowe przypuszczenia, że skład fosfolipidów, a w szczególności stopień ich zróżnicowania w układzie ma wpływ na wydajność kompleksowania – nie potwierdziły wyniki otrzymane dla układów z surfaktantami TRI\_IMI i TRI\_BEN. Surfaktanty TRI\_IMI i TRI\_BEN kompleksując wysokomolekularne DNA otrzymały najlepsze wyniki (niższy wymagany do kompleksowania stosunek  $p/n$ ) w obecności dwuskładnikowej mieszaniny lipidów - L2, jednak dla mieszaniny o większym zróżnicowaniu lipidów (trójskładnikowej L3) nie zaobserwowano dalszego obniżania wartości  $p/n$ . Natomiast w kompleksach na bazie DNA o długości 185 pz jedynie dla TRI\_BEN odnotowano obniżenie  $p/n$  w przypadku bardziej zróżnicowanej mieszaniny fosfolipidowej. Z kolei dla kompleksów z niskomolekularnym DNA można przyjąć, że nie występuje powiązanie między stopniem zróżnicowania mieszaniny lipidów a efektywnością kompleksowania (nieznacznie niższy wynik  $p/n$  dla TRI\_N/L2/DNA\_21pz).

Analizując zależności kompleksowania od długości użytych fragmentów DNA, otrzymane wyniki dla wszystkich badanych układów również nie potwierdzają jednoznacznie przyjętej początkowo hipotezy. Wysokomolekularne DNA wymaga zdecydowanie niższych stężeń surfaktantów do utworzenia kompleksu niż niskomolekularne DNA, lecz różnica między wartościami  $p/n$  dla układów na bazie DNA o długości 20 kpz i DNA o długości 185 pz jest niewielka lub nie obserwuje się jej. Jedynie dla układów z surfaktantem TRI\_BEN tendencja obniżania  $p/n$  wraz z długością fragmentów DNA jest zachowana we wszystkich systemach na jego bazie. Badania kompleksowania plazmidowego DNA [333] wykazały, że zachodzi przy niższych stężeniach surfaktantu niż kompleksowanie liniowego DNA. Wynika to z super skręconej struktury plazmidu, w której dochodzi do redukcji dostępnej dla surfaktantów powierzchni DNA, a tym samym jednocześnie maleje wypadkowy ujemny ładunek elektryczny DNA. Natomiast cząsteczki niskomolekularnego DNA w roztworach wodnych przyjmują kształt pałeczkowaty (7,2 nm długości i 2,2 nm średnicy) [334], tym samym taka rozwinięta struktura powoduje, że wszystkie ładunki elektryczne są eksponowane na zewnątrz cząsteczki DNA. Wpływ długości DNA na proces kompleksowania zapewne jest związany ze sztywnością cząsteczki DNA – dłuższe fragmenty mogą się swobodnie związać/kondensować samoistnie lub na skutek oddziaływań z surfaktantami, przez co aby utworzyć stabilny kompleks wymagane jest mniej cząsteczek surfaktantu niż w przypadku kompleksowania DNA małowcząsteczkowego, które jest sztywne i niechętnie zmienia swoją strukturę. Jednakże zjawisko to ma pewne ograniczenia, stąd nie obserwuje się różnicy między średnio- i wyskomolekularnym DNA.

Zależność wydajności kompleksowania od rodzaju użytego surfaktantu jest również kwestią niejednoznaczną. W przypadku kompleksów na bazie TRI\_N oraz TRI\_IMI różnice między wartościami  $p/n$  są niewielkie lub nie występują. Z kolei wyniki otrzymane dla TRI\_BEN są wyższe, co pozwala stwierdzić, że jest zdecydowanie najmniej wydajny.

Wyniki sugerują, że olbrzymie znaczenie dla wydajnego procesu wiązania się z kwasem nukleinowym surfaktantów ma budowa chemiczna ich części polarnych, a szczególnie obecność zawady sterycznej oraz możliwość ich ewentualnej deformacji na skutek oddziaływań surfaktant/DNA. Surfaktant o największej i najbardziej sztywnej grupie w części polarnej (TRI\_BEN) ma najniższą wydajność kompleksowania DNA, podczas gdy surfaktant o giętkiej i zdecydowanie mniejszej głowie (TRI\_N) jest najbardziej wydajny.

Aby potwierdzić wcześniejsze hipotezy należałoby badania rozszerzyć zarówno o większą grupę surfaktantów trimerycznych (zróżnicowanych częściami polarnymi), jak i o fragmenty DNA różniące się długością oraz mieszaniny lipidów o bogatszym składzie.

Proces kompleksowania surfaktantu TRI\_N z wysokomolekularnym DNA został również zbadany przy użyciu elektroforetycznego rozpraszania światła w dwóch wariantach pH środowiska. Choć wyniki testów elektroforetycznych dla układów TRI\_N/DNA\_20kbpz i TRI\_N/L1/DNA\_20kbpz nie potwierdziły istotnego wpływu pH środowiska na proces kompleksowania, to wyniki ELS dla pH 5 i pH 8 różniły się. Różnica ta polegała na określeniu momentu kompleksowania surfaktantów z DNA o długości 20 kbpz. W pH 8 punkt neutralizacji ładunku DNA przez cząsteczki surfaktantu obserwowano przy niższej wartości  $p/n$ . W przypadku wyników ELS przeprowadzonych w pH 5 - pokrywały się one w dużej mierze z wynikami z elektroforezy żelowej. Jednak w tym miejscu warto zaznaczyć, że w elektroforezie żelowej wynik uzyskuje się na podstawie oceny wizualnej żelu agarozowego. W obszarze częściowego kompleksowania widoczne są krótkie fragmenty DNA, które nie połączyły się z cząsteczkami surfaktantów. Intensywność obserwowanych prążków jest również zdecydowanie niższa w stosunku do intensywności referencyjnego DNA, co sugeruje, że populacja tych fragmentów jest mała. Technika ELS natomiast generuje wynik na podstawie uśrednionych 100-1000 przebiegów w całej objętości próbki. Tym samym, jeżeli nieskompleksowanych fragmentów DNA było niewiele - ich wkład do wyniku potencjału zeta również był zanedbywalnie mały (nie obserwuje się go w rozkładzie potencjału  $\zeta$ ). Jeżeli do eksperymentu użyte byłoby DNA o małej polidispersyjności masy, prawdopodobnie wyniki elektroforezy żelowej i ELS pokrywałyby się ze sobą jednoznacznie.

Zauważono, że kompleksy TRI\_N/DNA\_20kbpz w środowisku o pH 5 charakteryzowały się wysokim dodatnim potencjałem elektrycznym, zdecydowanie wyższym niż kompleksy w pH 8. Tak wysoki potencjał elektryczny może wskazywać, że utworzyły się stabilne struktury [189], które można trwale przechowywać.

Aby dobrze zaprojektować nośnik materiału genetycznego, należy poznać również jego zdolność do uwalniania transgeny, tak aby maksymalnie wykorzystać jego właściwości terapeutyczne.

We wszystkich analizowanych układach nie obserwowano zmian w stężeniu heparyny dla kompleksów o  $p/n = 5$  i  $p/n = 10$ , natomiast przy  $p/n = 20$  zarówno dla układów z lipidami jak i bez lipidów odnotowano wzrost minimalnego stężenia heparyny wymaganego do uwolnienia DNA z kompleksów. Dlatego można sądzić, że wraz ze wzrostem stężenia związku powierzchniowo czynnego w układzie wzrasta siła wiązania z DNA. Bez względu na skład mieszanin, dodatek lipidów znacząco zwiększał siłę wiązania surfaktant-DNA. Nie obserwowano różnic między otrzymanymi wynikami dla surfaktantów TRI\_N oraz TRI\_IMI, natomiast TRI\_BEN tworzył znacznie słabsze kompleksy z DNA.

Widma dichroizmu kołowego wskazują, że rozważane w pracy kwasy nukleinowe o różnej liczbie par zasad w roztworze występowały w formie B-DNA [193]. W badanych układach z surfaktantami trimerycznymi cząsteczki DNA nie zmieniają swojej struktury

helikalnej - pozostają w formie B-DNA. Na skutek oddziaływania z surfaktantami trimerycznymi dochodzi jedynie do kondensacji kwasu nukleinowego, a świadczy o tym spadek intensywności widma dichroizmu kołowego w odniesieniu do referencyjnego widma zarejestrowanego dla roztworu DNA oraz do przesunięcia maksimum pasma dodatniego w kierunku wyższych długości fali [335]. Spadek intensywności prawdopodobnie związany jest ze zmianą hydratacji helisy DNA w obrębie grupy fosforanowych na skutek oddziaływania z surfaktantami [336]. Natomiast przesunięcie maksimum pasm może wynikać z eksponowania w kierunku rozpuszczalnika hydrofobowych części cząsteczek surfaktantu, przyłączonych do helisy DNA lub z występowania lokalnych zaburzeń w geometrii zasad azotowych [154]. Generalnie surfaktanty trimeryczne nie powodują zmiany konformacji DNA w utworzonych kompleksach, co prawdopodobnie wynika z obecności wody, której cząsteczki dodatkowo stabilizują konformację DNA [130]. Tak jak zostało to już wspomniane, zmiany intensywności i przesunięcie maksimum pasma dodatniego świadczą o kondensacji cząsteczek DNA przez surfaktanty [335]. Natomiast powrót maksimum pasma dodatniego do pozycji odpowiadającej referencyjnemu DNA i odrastanie sygnału mogą świadczyć o częściowej dekondensacji DNA [337], jak np. dla TRI\_N/DNA\_185pz o  $p/n > 14$ , choć zmiany dla tego układu są niewielkie.

Co ciekawe, dla układu TRI\_N/DNA\_21pz zaobserwowano punkt izodichroiczny przy 273 nm, który może sugerować na prosty mechanizm wiązania ligandu [338].

Innym interesującym zjawiskiem było tworzenie silnie upakowanej formy psi [243] dla systemów ze średniomolekularnym DNA i surfaktantem TRI\_IMI dla  $p/n > 2$ .

Uzyskane widma dichroizmu kołowego nie wskazują jednoznacznie momentu tworzenia kompleksów surfaktant-DNA, tak jak ma to miejsce w przypadku elektroforezy żelowej. Proces wiązania cząsteczek surfaktantu do nici kwasu nukleinowego postępuje stopniowo, powodując ciągłą jego kondensację, wraz ze wzrostem stężenia środka powierzchniowo czynnego w układzie.

Surfaktant TRI\_BEN wykazuje silnie oddziaływanie z DNA, kondensując jego strukturę (prawdopodobnie do formy psi) na długo przed powstaniem stabilnych i całkowitych kompleksów. W większości przypadków po osiągnięciu stężenia wymaganego do pełnego kompleksowania, z roztworu wytrącał się osad, zapewne na skutek oddziaływania między kompleksami powodując ich agregację.

Porównując badane surfaktanty między sobą prawdopodobnie najsilniejsze zdolności do kondensacji materiał genetyczny ma surfaktant TRI\_BEN – ponieważ tam zmiany w widmach dichroizmu kołowego są największe. Natomiast surfaktant TRI\_N powodował najmniejszą kondensację DNA. Silne oddziaływanie surfaktantów TRI\_IMI i TRI\_BEN być może związane jest z ich budową chemiczną, czyli posiadaniem struktur cyklicznych, które między sobą silnie oddziaływają – oddziaływanie typu  $\pi$ - $\pi$  [309 – 311]. Jednak oddziaływania te wraz z porządkowaniem się struktur formowanych przez te surfaktanty mogą dawać własny wkład do sygnału CD.

W przypadku układów na bazie fosfolipidów (próbki nieprzezroczyste), niemożliwe były pomiary przy użyciu dichroizmu kołowego, dlatego zdecydowano się na analizę pasm podczerwieni charakterystycznych dla danej formy DNA. Niestety metoda ta dla tak wieloskładnikowych układów nie jest jednoznaczna, a lokalizacja pasm charakterystycznych znacznie utrudniona. Mimo wszystko z dużym prawdopodobieństwem oceniono, że DNA w tych układach przyjmowało strukturę prawoskrętnej helisy (B-DNA).



Kolejnym nieodzownym elementem analizy właściwości lipopleksów pod kątem zastosowania w terapii genowej jest poznanie ich cytotoksyczności, czyli jaki wpływ wywierają na żywotność komórek.

Cytotoksyczność była badana na komórkach nowotworowych linii HeLa przy pomocy testu MTT oraz wybarwiania błękitem trypanu. Na podstawie testu przeżywalności MTT uzyskano wyniki średniego stężenia skutecznej substancji, czyli stężenia które powoduje u połowy komórek śmierć, zauważono, że najwyższą cytotoksyczność indukuje surfaktant TRI\_N, a najmniejszą (4-krotnie niższą niż TRI\_N) – surfaktant TRI\_BEN.

Prawdopodobnie bezpośrednią przyczyną tego zjawiska jest budowa części polarnej surfaktantów wpływająca zarówno na sztywność takiej cząsteczki – łatwość przechodzenia przez błony komórkowe, jak i własności agregacyjne. Cząsteczki o mniejszych częściach polarnych, łatwiej penetrują błonę komórkową, powodując ewentualną jej dezintegrację, a w następstwie śmierć komórki. Surfaktant TRI\_N również wykazuje niskie *CMC*, przez co nawet w niskich stężeniach kationowe micelle i agregaty TRI\_N mogą silnie oddziaływać na błonę komórkową. W małych częściach polarnych wzrasta gęstość ładunku elektrycznego przez co rośnie również cytotoksyczność [43].

Wpływ grupy polarnej może wynikać również bezpośrednio z jej budowy chemicznej. Choć jak zostało to wspomniane w rozdziale 5.1. rozważane grupy cechują się silnymi właściwościami antybakteryjnymi i przeciwgrzybicznymi [224–226], to najprawdopodobniej grupy aromatyczne (imidazol, benzimidazol) w innym stopniu mogą oddziaływać z organizmami żywymi niż związki acykliczne (czwartorzędowe grupy amoniowe). Niektóre badania sugerują, że większe działanie przeciwbakteryjne wykazują surfaktanty, które w części polarnej mają związki aromatyczne w porównaniu do ich homologów o liniowych grupach [339]. Jednak problem jest bardziej złożony. Po pierwsze surfaktant musi wykazywać też inne cechy np. odpowiednia długość łańcucha alkilowego, aby osiągnąć wysoki efekt toksyczny. Po drugie na różne rodzaje bakterii w różnym stopniu działa ten sam surfaktant [339], być może ma to także przełożenie na komórki eukariotyczne.

Przed przystąpieniem do badania cytotoksyczności lipopleksów na bazie fosfolipidów i surfaktantów trimerycznych, potwierdzono neutralny wpływ fosfolipidów na komórki żywe, oznacza to, że nawet w zdecydowanie wyższych stężeniach nie wykazywały efektów toksycznych. Doniesienia literaturowe dowodzą, że surfaktanty trimeryczne wykazują wyższą cytotoksyczność od form dimerycznych [228]

Testy MTT wskazują, że obecność fosfolipidów wpływa redukująco na cytotoksyczność surfaktantów trimerycznych. Co więcej największy wzrost  $EC_{50}$  odnotowano dla układów na bazie L2 (DMPC/DOPE), a szczególnie dla L2/TRI\_N gdzie uzyskano 50-krotnie wyższą wartość  $EC_{50}$  niż dla samego surfaktantu TRI\_N. Najmniejsze efekty redukujące cytotoksyczność uzyskano dla układów na bazie L3, w szczególności dla L3/TRI\_BEN, gdzie odnotowano jedynie 5-krotny wzrost wartości  $EC_{50}$ . Symulacje molekularne przeprowadzone dla układów fosfolipidów o różnej długości łańcucha alkilowego, ale o podobnej budowie części polarnej wykazały, że takie zróżnicowanie znacząco wpływa na właściwości dwuwarstwy, takie jak: grubość dwuwarstwy, powierzchnia przypadająca na cząsteczkę lipidu oraz dyfuzja boczna [340]. Tym samym być może dla układu L2 redukcja cytotoksyczności przełoży się na wydajność transfekcji.

Obniżanie efektów cytotoksycznych przez lipidy prawdopodobnie może przebiegać na dwa sposoby. Pierwszy sposób polega na tym, że lipidy neutralizują toksyczność surfaktantów poprzez wiązanie się z nimi – efektywne stężenie surfaktantów w próbce,

wtedy znacząco spada. Takie działanie może wykazywać DOPE, który z kationowymi cząsteczkami może tworzyć mostki solne, co postuluje Godbey [341]. Drugim sposobem może być tworzenie przez lipidy fizycznej bariery dla surfaktantów, lipidy otaczają szczelnie komórki, przez co surfaktanty nie może do niej dotrzeć i jej uszkodzić (wniosek na podstawie obserwacji płytki pod mikroskopu).

Aby potwierdzić otrzymane wyniki i postawione powyżej hipotezy przeprowadzono wybarwienie błękitem trypanu komórek HeLa po ekspozycji na toksyczny czynnik, jakim są surfaktanty trimeryczne. Barwienie błękitem trypanu pozwala na identyfikację martwych komórek, u których doszło do przerwania błony komórkowej, co umożliwiło wniknięcie barwnika do wnętrza komórki.

Wyniki sugerowały, że nawet niewielkie stężenie surfaktantu trimerycznego powoduje perforację błony komórkowej i migrację barwnika do wnętrza komórki dla wszystkich komórek w polu widzenia. Jedynie dla surfaktantu TRI\_BEN z dużym przybliżeniem wyznaczono stężenie skuteczne, jednak było ono znacząco niższe w porównaniu do wyników otrzymanych z testu MTT. Tak jak poprzednio obecność fosfolipidów obniżała efekty cytotoksyczne surfaktantów trimerycznych (badane fosfolipidy były neutralne dla komórek HeLa), ale nie odnotowano różnic dla różnych mieszanin lipidowych ani układów z różnymi surfaktantami.

W tym miejscu warto cofnąć się do istoty tych dwóch metod. Wybarwienie błękitem trypanu jest możliwe, gdy perforacji ulega błona komórkowa. Natomiast testy MTT opierają się o monitorowanie prawidłowego funkcjonowania komórki, czyli gdy mitochondria spełniają swoje funkcje, tj. redukują sole tetrazoliowe do formazanu. Dlatego prawdopodobnie surfaktanty trimeryczne efektywnie oddziałują z błoną komórkową, powodując jej przerwanie, ale dopiero w wyższych stężeniach zaburzają funkcjonowanie komórki.

Omawiane powyżej wyniki (testów elektroforetycznych, dichroizmu kołowego, testów MTT) zostały zebrane i przedstawione w publikacji naukowej z roku 2021 pt. „The Process of Binding and Releasing of Genetic Material from Lipoplexes Based on Trimeric Surfactants and Phospholipids” [297].

W kolejnym kroku zdecydowano się na zbadanie struktury lipopleksów na bazie surfaktantów trimerycznych, formułacji lipidowych i kwasu nukleinowego o długości 20 kpz.

W badanym zakresie temperatur nie obserwowano na krzywych DSC wyraźnych przemian fazowych DNA związanych z topnieniem łańcucha nukleotydowego. Jednakże krzywe DSC dla układów surfaktant/DNA znacząco się różniły od referencyjnej krzywej DSC dla czystego roztworu DNA. Dlatego przypuszcza się, że dodatek surfaktantów, spowodował wzrost temperatury topnienia DNA, co też było obserwowane przez Battacharya [267]. Na tej podstawie można wysnuć wniosek, że surfaktanty trimeryczne pełnią rolę ochroną dla DNA przed wysoką temperaturą, która może przyczynić się do degradacji kwasu nukleinowego.

Co do oddziaływania DNA z mieszaninami fosfolipidowymi na termogramach odnotowano spadek entalpii przemiany głównej fosfolipidów, ale wzrost temperatur przemiany głównej obserwuje się jedynie dla układów na bazie DMPC (L1) i DMPC/DOPE (L2). Doniesienia literaturowe skupiają się na interakcjach między DNA a kationowymi lipidami wskutek występowania oddziaływań elektrostatycznych. Struktury mieszane, jakie powstają na skutek tych oddziaływań mogą być bardzo różne i zależeć od wielu czynników, np. od płynności błony lipidowej, od stężenia czy rodzaju kwasu nukleinowego

[342]. Zdecydowane większe różnice w badaniach kalorymetrycznych fosfolipidów obserwuje się dla układów na bazie tRNA niż DNA, co pokazuje Michanek [343]. W przypadku DNA jeżeli występuje w niskim stężeniu, to wiąże się na powierzchni błony lipidowej, natomiast w wyższych stężeniach wnika w strukturę dwuwarstwy. Co więcej DNA może narzucać pewnego rodzaju uprządkowanie cząsteczkom lipidów, a w układach wieloskładnikowych powodować separacje fazową oraz tworzenie domen, a jeśli występuje w bardzo wysokich stężeniach, może zaburzyć dwuwarstwę i wprowadzać nieporządek, co potwierdził Giatrellis [342].

Co ciekawe, DNA może efektywnie łączyć się z neutralnymi fosfolipidami, czyli takimi których wypadkowy ładunek elektryczny równy jest zero. Jedne z badań sugerują, że aby doszło do wiązania z materiałem genetycznym konieczna jest obecność jonów np. wapnia [344, 345], jednak są dowody na brak konieczności wprowadzania do układów dodatkowych jonów, a lipidy zwitterjonowe, czyli amfoteryczne obdarzone grupami naładowanymi zarówno ujemnie jak i dodatnio np. fosfatydylocholino jak DMPC czy DPPC, mogą również łączyć się z DNA, choć siła wiązania jest czterokrotnie mniejsza niż z kationowymi odpowiednikami. Zauważono, że cząsteczki DNA mocniej wiążą się z uporządkowanymi lipidami, a im więcej jest puryn w składzie cząsteczki kwasu nukleinowego, tym silniejsze jest to wiązanie [346].

W świetle przytoczonych doniesień literaturowych wyniki DSC dla układów lipid-DNA, prawdopodobnie potwierdzają, że dochodzi do łączenia się kwasu nukleinowego z dwuwarstwą lipidową. Dodatek DNA w wyniku oddziaływania z fosfolipidami, zaburza strukturę dwuwarstwy przez co spada entalpia przemiany fazowej fosfolipidów. Choć wiązanie DNA przez neutralne lipidy jest możliwe, to proces ten jest bardzo mało wydajny. Należy pamiętać, że w rozważanych układach, formułacje lipidowe pełnią rolę pomocniczą w tworzeniu kompleksów DNA z surfaktantem trimerycznymi, a nie są głównym nośnikiem materiału genetycznego.

W kolejnym korku przeanalizowano krzywe DSC dla układów trójskładnikowych, czyli lipid/surfaktant/DNA. W porównaniu do analogicznych układów bez DNA, nie obserwuje się jednej wiodącej tendencji wpływu DNA na układy lipid/surfaktant.

W zależności od zastosowanego surfaktantu w układach na bazie L1 i DNA o długości 20 kpz w porównaniu do tych samych układów bez DNA, obserwuje się szeroką gamę efektów:

- spadek temperatury i entalpii przemiany głównej zarówno frakcji bogatych jak i ubogich w surfaktant - układ z surfaktantem TRI\_N
- spadek temperatury przemiany wyłącznie frakcji bogatej w surfaktanty - układ z surfaktantem TRI\_IMI
- większą separację pików na krzywej DSC frakcji o różnym stopniu nasycenia surfaktantem - układ z surfaktantem TRI\_N
- zmianę rozkładu udziału entalpii poszczególnych frakcji z tendencją na korzyść frakcji bogatych w surfaktant - układ z surfaktantem TRI\_N
- spadek entalpii przemiany ze zwiększeniem udziału frakcji DMPC\* - układ z surfaktantami TRI\_IMI lub TRI\_BEN

Podobne wnioski można wysnuć na podstawie wyników dla układów trójskładnikowych na bazie formułacji lipidowej L2. Nie obserwuje się jednego trendu, ale największe zmiany w porównaniu do układów dwuskładnikowych lipid/surfaktant obserwuje się w układach trójskładnikowych na bazie surfaktantu TRI\_N. Co niezwykle ciekawe, na krzywych SAXS zarejestrowanych dla układu L2/TRI\_N/DNA\_20kpz

obserwowano separację fazową (podobną jak dla L1/TRI\_N/DNA\_20kpz), której nie było w układzie bez DNA. Utworzyły się frakcje, pomimo obecności DOPE w układzie, który jak wcześniej zakładano miał umożliwiać lepsze, bardziej równomierne rozmieszczenie surfaktantów w dwuwarstwie lipidowej. Być może znaczenie ma również fakt, że badane DNA jest złożone zarówno z krótkich jak i długich odcinków. Dla pozostałych surfaktantów nie obserwowano tak znaczących zmian.

Najmniejsze zmiany na termogramach DSC wśród układów trójskładnikowych w porównaniu do referencyjnych układów lipid/surfaktant obserwowano dla systemów na bazie formułacji lipidowej L3. Jednak tak jak poprzednio największe zmiany indukował surfaktant TRI\_N.

Tym samym można przypuszczać, że to budowa chemiczna surfaktantów (obecność ugrupowań aromatycznych lub ich brak) jest czynnikiem decydującym, w jakim kierunku pójdą zmiany parametrów przemian fazowych fosfolipidów w układach trójskładnikowych. Co więcej, na podstawie wyników można zauważyć, że największe zmiany zwiększające płynność dwuwarstwy lipidowej (spadek entalpii przemiany, obniżenie temperatury przemiany oraz większy udział frakcji bogatych w surfaktanty) obserwuje się dla układów trójskładnikowych z surfaktantem TRI\_N. Dlatego być może to właśnie układy na bazie surfaktantu TRI\_N mają największy potencjał jako niewirusowe nośniki materiału genetycznego.

Otrzymane wyniki DSC nie do końca wyjaśniają sposób, w jaki DNA wpływa na dwuwarstwę lipidową. Wiele zależy od rodzaju zastosowanych lipidów i surfaktantów, niemniej w niektórych układach obserwuje się ciekawe zmiany, które warto zbadać innymi technikami.

Analiza położenia pasm podczerwieni drgań symetrycznych grup metylenowych w funkcji temperatury wykazała, że temperatura przemiany głównej lipidów wzrosła w obecności DNA, ale koniec przemiany fazowej jest zależny od zastosowanego rodzaju formułacji lipidowej. Odnosząc się do wcześniejszych wyników DSC - wzrost kooperatywności w L1/TRI\_N/DNA\_20kpz być może jest związany z większą separacją układu, natomiast dla L2/TRI\_N/DNA\_20kpz - przeciwnie, pojawienie się większej ilości pików na termogramie, a więc frakcji o różnych właściwościach, powoduje, że przejście *trans-gauche* zachodzi stopniowo ze wzrostem temperatury.

Zmiany hydratacyjne w obrębie grup fosforanowych fosfolipidów zbadane dla układu L1/TRI\_N/DNA nie są tak wyraźne jak dla referencyjnego DMPC czy układu L1/TRI\_N. Podobne zjawisko obserwował Pohle [271] porównując zależności dla lipidów i kompleksów lipid/DNA.

Charakterystykę strukturalną układów trójskładnikowych w oparciu o wyniki małąkątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego przeprowadzono dla systemu na bazie fosfolipidu DMPC, surfaktantu TRI\_N i wysokomolekularnego DNA i stosunku  $p/n$  równym 20. Wyniki wskazują, że w układzie występują prawdopodobnie naprzemienne warstwy lipidów i warstwy cząsteczek DNA, co było też obserwowane przez Dittricha dla układów na bazie kationowych lipidów, DOPE i DNA [293]. Wartości odległości międzypłaszczyznowych przypisanych do warstwy lipidów, odpowiadają wartościom dla dwuwarstwy DMPC w fazie żelowej pofałdowanej [279]. Dlatego przypuszcza się, że na skutek wbudowania się cząsteczek surfaktantów w warstwę lipidową doszło do zaburzenia jej struktury - zwiększenia grubości i przejściu łańcuchów alkilowych lipidów w konformację *gauche*. Co więcej, cząsteczki DNA mogą być ułożone w swego rodzaju super sieć [295] o parametrach sieci  $a = 5,5$  nm oraz  $b = 16,1$  nm. Zastanawiający

jest również kształt krzywych SAXS, a szczególnie tej zarejestrowanej w niskiej temperaturze (10°C), który wskazywałby na utworzenie jednowarstwowych (unilamelarnych) struktur, tak jak to obserwowano dla referencyjnego układu L1/TRI\_N. Taka mnogość obserwowanych możliwych form, zapewne jest wynikiem polidispersyjności próbki, stąd ciężko jest zaproponować prawdopodobny model struktury układu trójskładnikowego.

Po scharakteryzowaniu układów zarówno dwu- jak i trójskładnikowych podjęto próbę wyboru najlepszego nośnika, czyli takiego, który najlepiej by spełniał swoje przeznaczenie. Wybór oparto o kilka kluczowych kwestii:

- efektywność wiązania nośnika z materiałem genetycznym,
- stabilność kompleksów,
- siłę wiązania nośnika z materiałem genetycznym,
- cytotoksyczność nośnika,
- właściwości fizyczne nośników takie jak płynność błony lipidowej, wielkość kompleksów czy struktura przestrzenna.

Zdecydowano się na wybór nośnika na bazie mieszaniny L2 oraz surfaktantu TRI\_N, a co więcej układ ten i sposób jego wytwarzania objęto ochroną patentową o nr. PL 241612 pt. „Wieloskładnikowe niewirusowe układy do wiązania i transfekcji kwasów nukleinowych, sposób wytwarzania tych układów oraz zastosowanie do wprowadzania materiału genetycznego do żywych komórek”. Wiązanie materiału genetycznego przez system L2/TRI\_N porównano z komercyjnie dostępnymi preparatami do transfekcji: Lipofectamine® (Thermo Fisher Scientific) oraz Escort IV™ (Sigma Aldrich). Wyniki elektroforezy żelowej wskazują, że wybrany układ L2/TRI\_N zdecydowanie lepiej kompleksuje zarówno plazmidowe DNA jak i linowe cząsteczki DNA o różnej liczbie par zasad niż komercyjne odczynniki.

## 7.5 Dalsze plany badawcze

---

Niniejsza praca w ocenie autora może dać solidne podstawy w projektowaniu niewirusowych nośników do terapii genowej na bazie surfaktantów trimerycznych i formulacji lipidowych. Jednak wiele kwestii pozostaje nadal do wyjaśnienia lub doprecyzowania.

Pierwszą z nich jest charakterystyka surfaktantów trimerycznych pod kątem wartości krytycznego stężenia micelizacji i agregacji. Surfaktanty oligomeryczne wykazują szereg wyjątkowych właściwości, których nie można badać przy zastosowaniu klasycznych metod, czyli takich które świetnie sprawdzają dla większości monomerycznych surfaktantów. Dlatego analizę samoorganizacji surfaktantów trimerycznych należałoby rozszerzyć o zastosowanie innych bardziej czułych metod np. badając zmiany dyfuzji w funkcji stężenia surfaktantów przy zastosowaniu jądrowego rezonansu magnetycznego NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*). Choć dokładna znajomość *CMC* i *CAC* nie jest niezbędna do prawidłowego zaplanowania procesu kompleksowania materiału genetycznego, to ze względu na to, że są to nowe związki, badania procesu micelizacji i agregacji mogą dostarczyć wielu interesujących informacji o surfaktantach oligomerycznych.

W pracy nie został poruszony niezwykle ważny problem oceny wydajności transfekcji, która jest kluczowa do zweryfikowania zasadności stosowania proponowanych systemów jako niewirusowych nośników. Ocenę wydajności transfekcji rozważanych wektorów można przeprowadzić np. przy użyciu plazmidu pEGFP-C1. Plazmid ten zawiera sekwencję kodującą białko wzmocnionej zielonej fluorescencji (ang. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP), pozyskiwaną z meduzy *Aequorea victoria* (mutant F64L). Ekspresja w komórkach żywych białka EGFP świadczy o skuteczności procesu transfekcji, a miarą tego procesu jest wielkość sygnału fluorescencji.

Mimo, że uzyskano bardzo interesujące wyniki badań SAXS, to niestety aby dobrze scharakteryzować układy należałoby zbadać wszystkie możliwe konfiguracje dla prostszych układów np. oddziaływanie DPPC z surfaktantami trimerycznymi, czy oddziaływanie DNA z czystymi mieszaninami lipidowymi, ewentualnie poszerzyć zakres stężeń surfaktantów w tych układach. Trudność w analizie otrzymanych wyników być może wynikała ze zbyt wysokiego stopnia skomplikowania tych układów, dlatego dalsze kroki powinny się skupić na prześledzeniu stopniowego wpływu (w funkcji stężeń) surfaktantów i DNA na badane mieszaniny lipidowe jak i ich poszczególne składniki. Nie bez znaczenie pozostaje fakt, że wysokomolekularne DNA było pofragmentowane, a to przekładało się na polidispersyjność całego układu. Dlatego w przyszłości warto by zdecydować się na bardziej jednorodne co do wielkości DNA np. oczyszczając komercyjnie dostępne preparaty lub wykorzystując plazmidowe DNA.

Ze względu na wysoką skuteczność nośników na bazie formulacji L2, czyli DMPC/DOPE w stosunku 10:1, warto było by zbadać, jak zwiększenie ilości DOPE w układzie wpłynie na proces kompleksowania i cytotoksyczność tych układów. Badania strukturalne układów DMPC/DOPE w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1 oraz 100:1 wykazały, że przyjmują one strukturę heksagonalną (szczególnie interesujący wydaje się układ o stosunku 5:1) [347], co jest niezwykle porządną cechą w układach do transfekcji materiału genetycznego.

Reasumując, przeprowadzone badania w ocenie autora dają dobry punkt wyjścia zarówno do dalszych badań podstawowych jak i do badań aplikacyjnych, które mogłyby zaowocować własnym komercyjnym systemem do transfekcji.





## 8 Wnioski końcowe

---

### Surfaktanty trimeryczne

- Budowa części polarnej wpływa na wartość krytycznego stężenia micelizacji badanych surfaktantów trimerycznych. Obserwowano wzrost wartości *CMC* wraz ze wzrostem liczby struktur cyklicznych obecnych w cząsteczce surfaktantu, który przekłada się na wielkość części polarnej.
- Wartości *CMC* dla badanych surfaktantów trimerycznych są mniejsze niż dla ich monomerycznych analogów, czyli spada wartość *CMC* wraz ze wzrostem stopnia oligomeryczności surfaktantów.
- Oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  między strukturami aromatycznymi w surfaktantach TRI\_IMI i TRI\_BEN wpływają na wartości krytycznego stężenia agregacji badanych surfaktantów trimerycznych.
- Wyznaczony na podstawie badań SAXS promień hydrodynamiczny miceli surfaktantów trimerycznych wynosił około  $(13,2 \pm 0,2)$  nm. Nie obserwowano znaczących odstępstw od modelu sfery. Rozmiaru miceli mogą potwierdzać wyniki liczby agregacji wyznaczonej przy stężeniu 15 mM, która dla wszystkich surfaktantów wynosiła ona  $30 \pm 3$ . Prawdopodobnie jest to związane z taką samą długością łańcucha alkilowego surfaktantów trimerycznych.

### Formulacje lipidowe

- Wbudowywanie się cząsteczek DOPE między cząsteczki DMPC i DPPC powoduje spadek wartości entalpii przemiany fazowej tych fosfolipidów, zmniejsza się upakowanie lipidów w błonie przez co wrasta jej płynność.
- Dla układów wieloskładnikowych L2, L3 obserwowano poszerzenie zakresu przemiany fazowej, dzięki czemu błona lipidowa jest płynna w niższych temperaturach.
- W przypadku układu L3 prawdopodobnie tworzą się duże obszary: bogate w DMPC i bogate w DPPC, a DOPE wbudowuje się równomiernie w oba te obszary.
- Badania SAXS dla 10% DMPC (L1) potwierdziły formowanie struktur lamelarnych w roztworach wodnych, a odległości międzypłaszczyznowe wykazują termotropowe zachowanie.
- W układach wieloskładnikowych na bazie L2 prawdopodobnie formowana była struktura heksagonalna.

### Układ typu lipid/surfaktant

- Wpływ surfaktantów trimerycznych na błony fosfolipidowe był zależny od rodzaju zastosowanego do badań surfaktantu.
- Separacja fazowa widoczna na krzywych DSC była obecna dla większości badanych układów. Wiązało się to z utworzeniem regionów ubogich i regionów bogatych w surfaktanty trimeryczne.
- Temperatura przemiany fazowej zarejestrowana w badaniach DSC pochodząca od frakcji ubogiej w surfaktanty odpowiadała temperaturze przemiany głównej dla referencyjnych fosfolipidów. Jednak bezwzględna wartość entalpii przemiany

fazowej tej frakcji malała wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu w układzie. Zmiany te wynikają z dominacji oddziaływań elektrostatycznych części polarnych surfaktantów trimerycznych nad oddziaływaniami hydrofobowymi łańcuchów alkilowych.

- Temperatura przemiany fazowej dla frakcji bogatej w surfaktanty malała wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu trimerycznego w układzie, a szerokość połówkowa – wzrastała. Spadek kooperatywności przemiany wynika z niedopasowania łańcuchów alkilowych surfaktantów i fosfolipidów, a przez to osłabieniu oddziaływań między nimi. Obniżenie temperatury przemiany fazowej z kolei wiąże się ze wzrostem płynności błony lipidowej.
- Największe zmiany w parametrach przemian fazowych fosfolipidów obserwowano dla układów na bazie surfaktantu TRI\_N a najmniejsze dla surfaktantu TRI\_BEN.
- Wyniki badań strukturalnych układów lipid/surfaktant nie wskazują jednej wyraźnej tendencji wpływu surfaktantów trimerycznych na fosfolipidy. Wszystko zależy od rodzaju surfaktantu i formulacji lipidowej. Prawdopodobnie największą tendencję do równomiernego wbudowywania się w dwuwarstwę lipidowe ma surfaktant TRI\_BEN.
- Badania SAXS wskazują, że surfaktanty trimeryczne zaburzają strukturę lamelarną DMPC. Indukują powstawanie struktur unilamelarnych typu bicela cylindryczna lub kuboidalna (TRI\_BEN) lub współistnienie struktur lamelarnych i unilamelarnych (TRI\_N, TRI\_IMI).
- Bicele prawdopodobnie składają się z dwuwarstwy DMPC z wbudowanymi w nie surfaktantami TRI\_BEN, oraz krawędzi zamykającej bicele, utworzone głównie z cząsteczek surfaktantu TRI\_BEN.
- Współistnienie struktur lamelarnych i unilamelarnych prawdopodobnie związane jest z układaniem się biceli w stosy lub tworzeniem się wielowarstwowych liposomów.
- Układy na bazie L2 i L3 z surfaktantami trimerycznymi przyjmują struktury heksagonalne lub regularne, ale próbki wykazują też wysoki stopień polidispersyjności i należy poszerzyć zakres badań tych układów, aby dobrze je scharakteryzować. Jednak takie struktury ze względu na obecność kanałów wodnych, są szczególnie cenione w projektowaniu nośników leków.

#### Układ typu lipid/surfaktant/DNA

- Najniższe wartości stosunku  $p/n$ , przy którym obserwowano całkowite kompleksowanie kwasu nukleinowego uzyskano dla układów z surfaktantem TRI\_N, a najwyższe dla TRI\_BEN – wielkość części polarnej surfaktantu ma wpływ na zdolności do kompleksowania DNA
- Dodatek fosfolipidów w układach znacząco obniża  $p/n$  wymagane do utworzenia kompleksu z DNA.
- Sztywność cząsteczki DNA wpływa na proces kompleksowania – długie fragmenty kompleksują przy niższych wartościach stosunku  $p/n$ .
- Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu trimerycznego wzrasta siła wiązania materiału genetycznego. Dodatek lipidów również zwiększa stabilność powstających kompleksów.

- W układach surfaktant/DNA, obserwowano kondensowanie się struktury DNA, ale pozostawały one w formie B-DNA. Silnie skondensowana faza psi obserwowana jest jedynie dla surfaktantu TRI\_BEN.
- W układach lipid/surfaktant/DNA – DNA nie zmienia swojej formy, pozostaje prawoskrętną helisą.
- Surfaktanty trimeryczne wykazują co prawda wysoką cytotoksyczność (najwyższa dla surfaktantu TRI\_N), ale efekty te zostają silnie zredukowane po dodaniu fosfolipidów do układu. Największą redukcję cytotoksyczności obserwowano dla układów na bazie formułacji L2.
- Układy na bazie L3 nie wykazywały takiego spadku cytotoksyczności, ale ze względu na zróżnicowanie długości łańcuchów alkilowych w tym układzie mogą uzyskać wysoką wydajność transfekcji.
- Wbudowywanie się cząsteczek DNA zaburza dodatkowo strukturę fosfolipidów w układach trójskładnikowych. Dochodzi do zwiększenia grubości dwuwarstwy lipidowej i przejścia łańcuchów alkilowych w konformację *gauche*.



## Bibliografia

---

- [1] J. Gayon, From Mendel to epigenetics: History of genetics, *C. R. Biol.* 339 (2016) 225–230. doi: 10.1016/j.crv.2016.05.009.
- [2] T. Wirth, N. Parker, S. Ylä-Herttuala, History of gene therapy, *Gene* 525 (2013) 162–169. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137.
- [3] M. M. Gabryelska, J. Barciszewski, Odyseja 1961: 50 lat kodu genetycznego, *Nauka* 3 (2011) 77–88.
- [4] M. Nirenberg, Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004) 46–54. doi: 10.1016/j.tibs.2003.11.009.
- [5] R. E. Marshall, C. T. Caskey, M. Nirenberg, Fine Structure of RNA Codewords Recognized by Bacterial, Amphibian, and Mammalian Transfer RNA, *Science* 155 (1967) 820–826. doi: 10.1126/science.155.3764.820.
- [6] E. H. Szybalska, W. Szybalski, Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48 (1962) 2026–2034. doi: 10.1073/pnas.48.12.2026.
- [7] C.-C. Ma, Z.-L. Wang, T. Xu, Z.-Y. He, Y.-Q. Wei, The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019, *Biotechnol. Adv.* 40 (2020) 107502. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107502.
- [8] K. B. Kaufmann, H. Büning, A. Galy, A. Schambach, M. Grez, Gene therapy on the move, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 1642–1661. doi: 10.1002/emmm.201202287.
- [9] Strona internetowa Agencji Żywności i Leków, [www.fda.gov](http://www.fda.gov), dostęp: 01.09.2024
- [10] Strona internetowa Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, [www.genetherapynet.com](http://www.genetherapynet.com), dostęp: 01.09.2024
- [11] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, M. R. Abedi, Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update, *J. Gene Med.* 20 (2018) e3015. doi: 10.1002/jgm.3015.
- [12] Gene therapy needs a long-term approach, *Nat. Med.* 27 (2021) 563. doi: 10.1038/s41591-021-01333-6.
- [13] B. Alberts, J. Michejda, J. Augustyniak, Podstawy biologii komórki: wprowadzenie do biologii molekularnej, Wydaw. Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
- [14] A. B. Hill, M. Chen, C.-K. Chen, B. A. Pfeifer, C. H. Jones, Overcoming Gene-Delivery Hurdles: Physiological Considerations for Nonviral Vectors, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 91–105. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.11.004.
- [15] L. Liu, J. Yang, K. Men, Z. He, M. Luo, Z. Qian, X. Wei, Y. Wei, Current Status of Nonviral Vectors for Gene Therapy in China, *Hum. Gene Ther.* 29 (2018) 110–120. doi: 10.1089/hum.2017.226.
- [16] M. Giacca, Ethical and Social Problems of Gene Therapy, in *Gene Therapy*, Springer Milan, Milano, 2010. pp. 283–292. doi: 10.1007/978-88-470-1643-9.
- [17] I. Villate-Beitia, J. Zarate, G. Puras, J. L. Pedraz, Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (2017) 1071–1081. doi: 10.1080/03639045.2017.1298122.
- [18] I. Plavec, M. Agarwal, K. Ho, M. Pineda, J. Auten, J. Baker, H. Matsuzaki, S. Escaich, M. Bonyhadi, E. Böhnlein, High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS, *Gene Ther.* 4 (1997) 128–139. doi: 10.1038/sj.gt.3300369.
- [19] E. J. Mufson, S. E. Counts, S. D. Ginsberg, L. Mahady, S. E. Perez, S. M. Massa, F. M. Longo, M. D. Ikonovic, Nerve Growth Factor Pathobiology During the Progression of Alzheimer's Disease, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 533. doi: 10.3389/fnins.2019.00533.

- [20] S. Sathasivam, P. J. Shaw, Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis—what is the evidence?, *Lancet Neurol.* 4 (2005) 500–509. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70142-3.
- [21] S. Scheiblhofer, J. Thalhamer, R. Weiss, DNA and mRNA vaccination against allergies, *Pediatr. Allergy Immunol.* 29 (2018) 679–688. doi: 10.1111/pai.12964.
- [22] K. N. Chi, E. Y. Yu, C. Jacobs, J. Bazov, C. Kollmannsberger, C. S. Higano, S. D. Mukherjee, M. E. Gleave, P. S. Stewart, S. J. Hotte, A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers, *Ann. Oncol.* 27 (2016) 1116–1122. doi: 10.1093/annonc/mdw068.
- [23] M. Kashani-Sabet, Non-viral delivery of ribozymes for cancer gene therapy, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4 (2004) 1749–1755. doi: 10.1517/14712598.4.11.1749.
- [24] R. Rupaimoole, F. J. Slack, MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 203–222. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
- [25] A. Singh, P. Trivedi, N. K. Jain, Advances in siRNA delivery in cancer therapy, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 274–283. doi: 10.1080/21691401.2017.1307210.
- [26] R. R. Nikam, K. R. Gore, Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery, *Nucleic Acid Ther.* 28 (2018) 209–224. doi: 10.1089/nat.2017.0715.
- [27] X. Zhang, J. Zhang, L. Wang, H. Wei, Z. Tian, Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice, *BMC Cancer* 7 (2007) 149. doi: 10.1186/1471-2407-7-149.
- [28] S. M. Nimjee, R. R. White, R. C. Becker, B. A. Sullenger, Aptamers as Therapeutics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57 (2017) 61–79. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.
- [29] K. A. High, M. G. Roncarolo, Gene Therapy, *N. Engl. J. Med.* 381 (2019) 455–464. doi: 10.1056/NEJMra1706910.
- [30] J. L. Shirley, Y. P. de Jong, C. Terhorst, R. W. Herzog, Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors, *Mol. Ther.* 28 (2020) 709–722. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.01.001.
- [31] D. M. O'Connor, N. M. Boulis, Gene therapy for neurodegenerative diseases, *Trends Mol. Med.* 21 (2015) 504–512. doi: 10.1016/j.molmed.2015.06.001.
- [32] T. Athanasopoulos, M. M. Munye, R. J. Yáñez-Muñoz, Nonintegrating Gene Therapy Vectors, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 31 (2017) 753–770. doi: 10.1016/j.hoc.2017.06.007.
- [33] G. A. R. Gonçalves, R. de M. A. Paiva, Gene therapy: advances, challenges and perspectives, *Einstein São Paulo* 15 (2017) 369–375. doi: 10.1590/s1679-45082017rb4024.
- [34] W.-W. Zhang, L. Li, D. Li, J. Liu, X. Li, W. Li, X. Xu, M. J. Zhang, L. A. Chandler, H. Lin, A. Hu, W. Xu, D. M.-K. Lam, The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad- *p53* (Gendicine): 12 Years in the Clinic, *Hum. Gene Ther.* 29 (2018) 160–179. doi: 10.1089/hum.2017.218.
- [35] R. T. Bartus, L. Brown, A. Wilson, B. Kruegel, J. Siffert, E. M. Johnson, J. H. Kordower, C. D. Herzog, Properly scaled and targeted AAV2-NRTN (neurturin) to the substantia nigra is safe, effective and causes no weight loss: Support for nigral targeting in Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.* 44 (2011) 38–52. doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.026.
- [36] C.-L. Lim, Y.-J. Lee, J.-H. Cho, H. Choi, B. Lee, M. C. Lee, S. Kim, Immunogenicity and immunomodulatory effects of the human chondrocytes, hChonJ, *BMC Musculoskelet. Disord.* 18 (2017) 199. doi: 10.1186/s12891-017-1547-8.
- [37] O. Negre, A.-V. Eggimann, Y. Beuzard, J.-A. Ribeil, P. Bourget, S. Borwornpinyo, S. Hongeng, S. Hacein-Bey, M. Cavazzana, P. Leboulch, E. Payen, Gene Therapy of the  $\beta$ -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the  $\beta^{A(T87Q)}$  - *Globin* Gene, *Hum. Gene Ther.* 27 (2016) 148–165. doi: 10.1089/hum.2016.007.

- [38] R. Pérez-González, M. X. Alvira-Botero, O. Robayo, D. Antequera, M. Garzón, A. M. Martín-Moreno, B. Brera, M. L. de Ceballos, E. Carro, Leptin gene therapy attenuates neuronal damages evoked by amyloid- $\beta$  and rescues memory deficits in APP/PS1 mice, *Gene Ther.* 21 (2014) 298–308. doi: 10.1038/gt.2013.85.
- [39] A. Gangi, J. S. Zager, The safety of talimogene laherparepvec for the treatment of advanced melanoma, *Expert Opin. Drug Saf.* 16 (2017) 265–269. doi: 10.1080/14740338.2017.1274729.
- [40] R. Steinbrook, The Gelsinger case, in: E. J. Emanuel (Ed.), *Oxf. Textb. Clin. Res. Ethics*, Oxford University Press, 2008: p. 110.
- [41] C. Guo, H. Yuan, Y. Wang, Y. Feng, Y. Zhang, T. Yin, H. He, J. Gou, X. Tang, The interplay between PEGylated nanoparticles and blood immune system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 200 (2023) 115044. doi: 10.1016/j.addr.2023.115044.
- [42] Z. Chu, S. Zhang, B. Zhang, C. Zhang, C.-Y. Fang, I. Rehor, P. Cigler, H.-C. Chang, G. Lin, R. Liu, Q. Li, Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles, *Sci. Rep.* 4 (2015) 4495. doi: 10.1038/srep04495.
- [43] H. Xing, M. Lu, T. Yang, H. Liu, Y. Sun, X. Zhao, H. Xu, L. Yang, P. Ding, Structure-function relationships of nonviral gene vectors: Lessons from antimicrobial polymers, *Acta Biomater.* 86 (2019) 15–40. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.041.
- [44] T. Goodwin, L. Huang, Nonviral Vectors, in: *Adv. Genet.*, Elsevier, 2014: pp. 1–12. doi: 10.1016/B978-0-12-800148-6.00001-8.
- [45] W.T. Godbey, Gene Delivery, in: *Introd. Biotechnol.*, Elsevier, 2014: pp. 275–312. doi: 10.1016/B978-1-907568-28-2.00013-7.
- [46] D. Sun, Z.-R. Lu, Structure and Function of Cationic and Ionizable Lipids for Nucleic Acid Delivery, *Pharm. Res.* 40 (2023) 27–46. doi: 10.1007/s11095-022-03460-2.
- [47] M. Langner, Liposomowe nośniki materiału genetycznego, *Postępy biochemii*, 44 (1998) 299–305.
- [48] P. Midoux, G. Breuzard, J. Gomez, C. Pichon, Polymer-Based Gene Delivery: A Current Review on the Uptake and Intracellular Trafficking of Polyplexes, *Curr. Gene Ther.* 8 (2008) 335–352. doi: 10.2174/156652308786071014.
- [49] R. V. Benjaminsen, M. A. Matthebjerg, J. R. Henriksen, S. M. Moghimi, T. L. Andresen, The Possible “Proton Sponge” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH, *Mol. Ther.* 21 (2013) 149–157. doi: 10.1038/mt.2012.185.
- [50] L. Palmerston Mendes, J. Pan, V. Torchilin, Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy, *Molecules* 22 (2017) 1401. doi: 10.3390/molecules22091401.
- [51] E. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, Dendrimer-based metal chelates: A new class of magnetic resonance imaging contrast agents, *Magn. Reson. Med.* 31 (1994) 1–8. doi: 10.1002/mrm.1910310102.
- [52] E. Uchida, H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, T. Hayakawa, Comparison of the Efficiency and Safety of Non-viral Vector-Mediated Gene Transfer into a Wide Range of Human Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 891–897. doi: 10.1248/bpb.25.891.
- [53] V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan, Chitosan as a starting material for wound healing applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 417–426. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.08.004.
- [54] K. Roy, H.-Q. Mao, S.-K. Huang, K. W. Leong, Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy, *Nat. Med.* 5 (1999) 387–391. doi: 10.1038/7385.
- [55] X. J. Loh, T.-C. Lee, Q. Dou, G. R. Deen, Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery, *Biomater. Sci.* 4 (2016) 70–86. doi: 10.1039/C5BM00277J.

- [56] R. Mendes, A. Fernandes, P. Baptista, Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer—The Case for Combined Delivery?, *Genes* 8 (2017) 94. doi: 10.3390/genes8030094.
- [57] N. Ivanova, V. Gugleva, M. Dobreva, I. Pehlivanov, S. Stefanov, V. Andonova, Silver Nanoparticles as Multi-Functional Drug Delivery Systems, in: M. Akhyar Farrukh (Ed.), *Nanomedicines*, IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.80238.
- [58] J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, D. G. Wingett, Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 1063–1077. doi: 10.1517/17425247.2010.502560.
- [59] S. Zhang, Y. Wang, H. Song, J. Lu, Z. Yuan, J. Guo, Copper nanoparticles and copper ions promote horizontal transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes across bacterial genera, *Environ. Int.* 129 (2019) 478–487. doi: 10.1016/j.envint.2019.05.054.
- [60] R. E. Taylor, M. Zahid, Cell Penetrating Peptides, Novel Vectors for Gene Therapy, *Pharmaceutics* 12 (2020) 225. doi: 10.3390/pharmaceutics12030225.
- [61] L. Chen, S. Fang, X. Xiao, B. Zheng, M. Zhao, Single-Stranded DNA Assisted Cell Penetrating Peptide–DNA Conjugation Strategy for Intracellular Imaging of Nucleases, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11306–11309. doi: 10.1021/acs.analchem.6b03743.
- [62] A. Mishra, V. D. Gordon, L. Yang, R. Coridan, G. C. L. Wong, HIV TAT Forms Pores in Membranes by Inducing Saddle-Splay Curvature: Potential Role of Bidentate Hydrogen Bonding, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 2986–2989. doi: 10.1002/anie.200704444.
- [63] A. Mishra, G. H. Lai, N. W. Schmidt, V. Z. Sun, A. R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T. J. Deming, D.T. Kamei, G. C. L. Wong, Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 16883–16888. doi: 10.1073/pnas.1108795108.
- [64] T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, 1st ed., Wiley, Wiedeń, 2007. doi: 10.1002/9783527611591.
- [65] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Biochemia*, IV, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [66] W. Stillwell, Membrane Transport, in: *Introd. Biol. Membr.*, Elsevier, 2016: pp. 423–451. doi: 10.1016/B978-0-444-63772-7.00019-1.
- [67] J. D. Enderle, Compartmental Modeling, in: *Introd. Biomed. Eng.*, Elsevier, 2012: pp. 359–445. doi: 10.1016/B978-0-12-374979-6.00007-1.
- [68] A. L. Kiss, E. Botos, Endocytosis *via* caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1228–1237. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00754.x.
- [69] L. Lambricht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr eat, G. Vandermeulen, Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 295–310. doi: 10.1517/17425247.2016.1121990.
- [70] L. Rinaldi, V. Folliero, L. Palomba, C. Zannella, R. Isticato, R. Di Francia, M. Berretta, I. de Sio, L. E. Adinolfi, G. Morelli, S. Lastoria, L. Altucci, C. Pedone, M. Galdiero, G. Franci, Sonoporation by microbubbles as gene therapy approach against liver cancer, *Oncotarget* 9 (2018) 32182–32190. doi: 10.18632/oncotarget.25875.
- [71] W. Xu, Microinjection and Micromanipulation: A Historical Perspective, in: C. Liu, Y. Du (Eds.), *Microinjection*, Springer New York, New York, 2019: pp. 1–16. doi: 10.1007/978-1-4939-8831-0\_1.
- [72] M. Gotesman, S. A. Williams, Using a Handheld Gene Gun for Genetic Transformation of *Tetrahymena thermophila*, in: R. H. Gavin (Ed.), *Cytoskelet. Methods Protoc.*, Springer New York, New York, 2016: pp. 373–383. doi: 10.1007/978-1-4939-3124-8\_22.



- [73] A. Elouahabi, J.-M. Ruyschaert, Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes, *Mol. Ther.* 11 (2005) 336–347. doi: 10.1016/j.yymthe.2004.12.006.
- [74] A. Bunton, L. Robinson, J. Schaak, M. F. Stam, Catalysis of Nucleophilic Substitutions by Micelles of Dicationic Detergents, *J. Org. Chem* 36 (1971) 2346-2350. doi: 10.1021/jo00815a033
- [75] F. Devinsky, L. Masarova, I. Lacko, Surface Activity and Micelle Formation of Some New Bisquaternary Ammonium Salts, *J. Colloid Interface Sci.* 105 (1985) 235-239. doi: 10.1016/0021-9797(85)90363-7
- [76] Y. P. Zhu, A. Masuyama, M. Okahara, Preparation and surface active properties of amphipathic compounds with two sulfate groups and two lipophilic alkyl chains, 67 (1990) 459-463. doi: 10.1007/BF02638962
- [77] D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, Higher Oligomeric Surfactants — From Fundamentals to Applications, in: C. Lesieur (Ed.), *Oligomerization Chem. Biol. Compd.*, InTech, 2014. doi: 10.5772/57655.
- [78] J. Chen, M. Qiao, N. Gao, Q. Ran, J. Wu, G. Shan, S. Qi, S. Wu, Cationic oligomeric surfactants as novel air entraining agents for concrete, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 686–693. doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.11.065.
- [79] L. Zhu, Y. Tang, Y. Wang, Constructing Surfactant Systems with the Characteristics of Gemini and Oligomeric Surfactants Through Noncovalent Interaction, *J. Surfactants Deterg.* 19 (2016) 237–247. doi: 10.1007/s11743-016-1790-2.
- [80] R. Zieliński, *Surfaktanty: budowa, właściwości, zastosowania*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, Poznań, 2017.
- [81] O. Regev, R. Zana, Aggregation Behavior of Tyloxapol, a Nonionic Surfactant Oligomer, in Aqueous Solution, *J. Colloid Interface Sci.* 210(1999) 8-17. doi: 10.1006/jcis.1998.5776
- [82] R. A. Khalil, F. A. Saadon, Effect of presence of benzene ring in surfactant hydrophobic chain on the transformation towards one dimensional aggregate, *J. Saudi Chem. Soc.* 19 (2015) 423–428. doi: 10.1016/j.jscs.2014.05.008.
- [83] R. Zana, Dimeric and oligomeric surfactants. Behavior at interfaces and in aqueous solution: a review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 97 (2002) 205-253. doi: 10.1016/S0001-8686(01)00069-0.
- [84] F.M. Menger, J.S. Keiper, Gemini Surfactants, *Angew Chem Int Ed Engl.* 39 (2000) 1906-1920. doi: 10.1002/1521-3773(20000602)39:11<1906::aid-anie1906>3.0.co;2-q
- [85] A. Jakubowska, *Surfaktanty - ich zastosowanie i tworzenie układów micelarnych*, *Wiad. Chem.* 66 (2012) 209-226.
- [86] R. Zana, Critical Micellization Concentration of Surfactants in Aqueous Solution and Free Energy of Micellization, *Langmuir* 12 (1996) 1208–1211. doi: 10.1021/la950691q.
- [87] S. Kolay, K. K. Ghosh, P. Quagliotto, Micellization behavior of [C16-12-C16], 2Br- gemini surfactant in binary aqueous-solvent mixtures, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 348 (2009) 234–239. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.07.027.
- [88] M. Usman, M. A. Cheema, A. Khan, Z. H. Farooqi, V. Mosquera, M. Siddiq, A comparative study of thermodynamic properties of structurally related phenothiazine drugs in aqueous solution, *J. Chil. Chem. Soc.* 58 (2013) 1842–1845. doi: 10.4067/S0717-97072013000300010.
- [89] K. Gracie, D. Turner, R. Palepu, Thermodynamic properties of micellization of sodium dodecyl sulfate in binary mixtures of ethylene glycol with water, *Can. J. Chem.* 74 (1996) 1616–1625. doi: 10.1139/v96-179.
- [90] B. Brycki, A. Szulc, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, S. Górka, Effect of the alkyl chain length on micelle formation for bis(N-alkyl-N,N-dimethylethylammonium)ether dibromides, *Comptes Rendus Chim.* 22 (2019) 386–392. doi: 10.1016/j.crci.2019.04.002.

- [91] T. Yoshimura, H. Yoshida, A. Ohno, K. Esumi, Physicochemical properties of quaternary ammonium bromide-type trimeric surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 267 (2003) 167–172. doi: 10.1016/S0021-9797(03)00694-5.
- [92] J. Oremusová, Z. Vitková, A. Vitko, M. Tárník, E. Miklovičová, O. Ivánková, J. Murgaš, D. Krchňák, Effect of Molecular Composition of Head Group and Temperature on Micellar Properties of Ionic Surfactants with C12 Alkyl Chain, *Molecules* 24 (2019) 651. doi: 10.3390/molecules24030651.
- [93] Z. Hafidi, M. El Achouri, The Effect of Polar Head and Chain Length on the Physicochemical Properties of Micellization and Adsorption of Amino Alcohol-Based Surfactants, *J. Surfactants Deterg.* 22 (2019) 663–672. doi: 10.1002/jsde.12241.
- [94] M. H. Ropers, G. Czichocki, G. Brezesinski, Counterion Effect on the Thermodynamics of Micellization of Alkyl Sulfates, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5281–5288. doi: 10.1021/jp0264329.
- [95] S. Manet, Y. Karpichev, D. Bassani, R. Kiagus-Ahmad, R. Oda, Counteranion Effect on Micellization of Cationic Gemini Surfactants 14-2-14: Hofmeister and Other Counterions, *Langmuir* 26 (2010) 10645–10656. doi: 10.1021/la1008768.
- [96] C. Oelschlaeger, P. Suwita, N. Willenbacher, Effect of Counterion Binding Efficiency on Structure and Dynamics of Wormlike Micelles, *Langmuir* 26 (2010) 7045–7053. doi: 10.1021/la9043705.
- [97] M. In, V. Bec, O. Aguerre-Chariol, R. Zana, Quaternary Ammonium Bromide Surfactant Oligomers in Aqueous Solution: Self-Association and Microstructure, *Langmuir* 16 (2000) 141–148. doi: 10.1021/la990645g.
- [98] A. Laschewsky, L. Wattebled, M. Arotçaréna, J.-L. Habib-Jiwan, R. H. Rakotoaly, Synthesis and Properties of Cationic Oligomeric Surfactants, *Langmuir* 21 (2005) 7170–7179. doi: 10.1021/la050952o.
- [99] H. Maeda, S. Muroi, R. Kakehashi, Effects of Ionic Strength on the Critical Micelle Concentration and the Surface Excess of Dodecyltrimethylamine Oxide, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 7378–7382. doi: 10.1021/jp9633815.
- [100] A. Rahman, C. W. Brown, Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate, *J. Appl. Polym. Sci.* 28 (1983) 1331–1334. doi: 10.1002/app.1983.070280407.
- [101] M. Tanaka, S. Kaneshina, T. Tomida, K. Noda, K. Aoki, The effect of pressure on solubilities of ionic surfactants in water, *J. Colloid Interface Sci.* 44 (1973) 525–531. doi: 10.1016/0021-9797(73)90331-7.
- [102] M. Yamanaka, M. Aratono, K. Motomura, R. Matuura, Effect of pressure on the adsorption and micelle formation of aqueous dodecyltrimethylammonium chloride solution-hexane system, *Colloid Polym. Sci.* 262 (1984) 338–341. doi: 10.1007/BF01410472.
- [103] V. Abbot, P. Sharma, Investigating thermodynamic, acoustic and spectroscopic parameters of rutin trihydrate with cationic surfactant CTAB in hydro-ethanolic solvent systems, *J. Mol. Liq.* 328 (2021) 115489. doi: 10.1016/j.molliq.2021.115489.
- [104] Y. Yamashita, Recent Dispersion Technology Using Liquid Crystal, in: P. K. Choudhury (Ed.), *Liq. Cryst. - Recent Adv. Fundam. Device Technol.*, InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.74156.
- [105] S. Sarfraz, S. Ali, S. A. Khan, K. H. Shah, S. Amin, M. Mujahid, S. Jamil, M. R. S. A. Janjua, Phase diagram and surface adsorption behavior of benzyl dimethyl hexadecyl ammonium bromide in a binary surfactant-water system, *J. Mol. Liq.* 285 (2019) 403–407. doi: 10.1016/j.molliq.2019.04.131.
- [106] T. Hegmann, H. Qi, V. M. Marx, Nanoparticles in Liquid Crystals: Synthesis, Self-Assembly, Defect Formation and Potential Applications, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 17 (2007) 483–508. doi: 10.1007/s10904-007-9140-5.

- [107] D. Jurašin, A. Pustak, I. Habuš, I. Šmit, N. Filipović-Vinceković, Polymorphism and Mesomorphism of Oligomeric Surfactants: Effect of the Degree of Oligomerization, *Langmuir* 27 (2011) 14118–14130. doi: 10.1021/la203777c.
- [108] D. Jurašin, I. Habuš, N. Filipović-Vinceković, Role of the alkyl chain number and head groups location on surfactants self-assembly in aqueous solutions, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 368 (2010) 119–128. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.07.025.
- [109] B. Dong, N. Li, L. Zheng, L. Yu, T. Inoue, Surface Adsorption and Micelle Formation of Surface Active Ionic Liquids in Aqueous Solution, *Langmuir* 23 (2007) 4178–4182. doi: 10.1021/la0633029.
- [110] L. Feng, D. Xie, B. Song, J. Zhang, X. Pei, Z. Cui, Aggregate evolution in aqueous solutions of a Gemini surfactant derived from dehydroabiatic acid, *Soft Matter* 14 (2018) 1210–1218. doi: 10.1039/C7SM02173A.
- [111] A. Salonen, M. In, J. Emile, A. Saint-Jalmes, Solutions of surfactant oligomers: a model system for tuning foam stability by the surfactant structure, *Soft Matter* 6 (2010) 2271–2281. doi: 10.1039/b924410g.
- [112] J.-M. Lagleize, P. Richetti, C. Drummond, Effect of Surfactant Oligomerization Degree on Lubricant Properties of Mixed Surfactant-Diblock Copolymer Films, *Tribol. Lett.* 39 (2010) 31–38. doi: 10.1007/s11249-009-9553-0.
- [113] Y. Hou, M. Cao, M. Deng, Y. Wang, Highly-Ordered Selective Self-Assembly of a Trimeric Cationic Surfactant on a Mica Surface, *Langmuir* 24 (2008) 10572–10574. doi: 10.1021/la802021b.
- [114] F.-Y. Tsai, H.-L. Tu, C.-Y. Mou, Nonionic fluorescent oligomeric surfactant for ordered mesoporous silica structure, *J Mater Chem* 16 (2006) 348–350. doi: 10.1039/B515072H.
- [115] A. Dazzazi, Y. Coppel, M. In, C. Chassenieux, P. Mascalchi, L. Salomé, A. Bouhaouss, M. L. Kahn, F. Gauffre, Oligomeric and polymeric surfactants for the transfer of luminescent ZnO nanocrystals to water, *J. Mater. Chem. C* 1 (2013) 2158–2165. doi: 10.1039/c3tc00877k.
- [116] N. A. Falk, Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity, *J. Surfactants Deterg.* 22 (2019) 1119–1127. doi: 10.1002/jsde.12293.
- [117] C. Zhou, F. Wang, H. Chen, M. Li, F. Qiao, Z. Liu, Y. Hou, C. Wu, Y. Fan, L. Liu, S. Wang, Y. Wang, Selective Antimicrobial Activities and Action Mechanism of Micelles Self-Assembled by Cationic Oligomeric Surfactants, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 4242–4249. doi: 10.1021/acsami.5b12688.
- [118] B. Das, B. Kumar, W. Begum, A. Bhattarai, M. H. Mondal, B. Saha, Comprehensive Review on Applications of Surfactants in Vaccine Formulation, Therapeutic and Cosmetic Pharmacy and Prevention of Pulmonary Failure due to COVID-19, *Chem. Afr.* 5 (2022) 459–480. doi: 10.1007/s42250-022-00345-0.
- [119] K. M. Damer, C. M. Jung, Vaccines, in: *Side Eff. Drugs Annu.*, Elsevier, 2016: pp. 307–334. doi: 10.1016/bs.seda.2016.07.011.
- [120] A. Makhlof, I. Hajdu, I. Badea, Gemini surfactant-based systems for drug and gene delivery, in: *Org. Mater. Smart Nanocarriers Drug Deliv.*, Elsevier, 2018: pp. 561–600. doi: 10.1016/B978-0-12-813663-8.00013-0.
- [121] Y. Fan, H. Wang, C. He, F. Qiao, S. Wang, Y. Wang, DNA Condensation Induced by a Star-Shaped Hexameric Cationic Surfactant, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 23333–23341. doi: 10.1021/acsami.7b04317.
- [122] B. Lindman, R. Dias, eds., *DNA interactions with polymers and surfactants*, John Wiley, Hoboken, New York, 2008.

- [123] R. Ghirlando, E. J. Wachtel, T. Arad, A. Minsky, DNA packaging induced by micellar aggregates: a novel in vitro DNA condensation system, *Biochemistry* 31 (1992) 7110–7119. doi: 10.1021/bi00146a012.
- [124] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev, K. Yoshikawa, Discrete Coil-Globule Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2401–2408. doi: 10.1021/ja00114a004.
- [125] V. A. Bloomfield, DNA condensation by multivalent cations, *Biopolymers* 44 (1997) 269–282. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T.
- [126] M. V. Pattarkine, K. N. Ganesh, DNA–Surfactant Interactions: Coupled Cooperativity in Ligand Binding Leads to Duplex Stabilization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263 (1999) 41–46. doi: 10.1006/bbrc.1999.1266.
- [127] P. Shi, H. Zhang, L. Lin, C. Song, Q. Chen, Z. Li, Molecular dynamics simulation of four typical surfactants in aqueous solution, *RSC Adv.* 9 (2019) 3224–3231. doi: 10.1039/C8RA09670H.
- [128] C. Wang, X. Li, S. D. Wettig, I. Badea, M. Foldvari, R. E. Verrall, Investigation of complexes formed by interaction of cationic gemini surfactants with deoxyribonucleic acid, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 1616–1628. doi: 10.1039/b618579g.
- [129] T. Ahmed, A. O. Kamel, S. D. Wettig, Interactions between DNA and Gemini surfactant: impact on gene therapy: part I, *Nanomed.* 11 (2016) 289–306. doi: 10.2217/nnm.15.203.
- [130] E. Nowak, A. Wisła-Świder, G. Khachatryan, M. Fiedorowicz, K. Danel, Possible sensor applications of selected DNA–surfactant complexes, *Eur. Biophys. J.* 48 (2019) 371–381. doi: 10.1007/s00249-019-01367-2.
- [131] E. Grueso, F. Sanchez, DNA–Surfactant Interactions: A Procedure for Determination Group Contributions, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 698–702. doi: 10.1021/jp0738457.
- [132] N. Jiang, J. Wang, Y. Wang, H. Yan, R. K. Thomas, Microcalorimetric study on the interaction of dissymmetric gemini surfactants with DNA, *J. Colloid Interface Sci.* 284 (2005) 759–764. doi: 10.1016/j.jcis.2004.10.055.
- [133] C. Bombelli, S. Borocci, M. Diociaiuti, F. Faggioli, L. Galantini, P. Luciani, G. Mancini, M. G. Sacco, Role of the Spacer of Cationic Gemini Amphiphiles in the Condensation of DNA, *Langmuir* 21 (2005) 10271–10274. doi: 10.1021/la051324+
- [134] Y. Fan, Y. Hou, J. Xiang, D. Yu, C. Wu, M. Tian, Y. Han, Y. Wang, Synthesis and Aggregation Behavior of a Hexameric Quaternary Ammonium Surfactant, *Langmuir* 27 (2011) 10570–10579. doi: 10.1021/la202453c.
- [135] E. Grueso, E. Kuliszewska, E. Roldan, P. Perez-Tejeda, R. Prado-Gotor, L. Brecker, DNA conformational changes induced by cationic gemini surfactants: the key to switching DNA compact structures into elongated forms, *RSC Adv.* 5 (2015) 29433–29446. doi: 10.1039/C5RA03944D.
- [136] M. C. Morán, M. G. Miguel, B. Lindman, DNA gel particles from single and double-tail surfactants: supramolecular assemblies and release characteristics, *Soft Matter* 7 (2011) 2001–2010. doi: 10.1039/c0sm00988a.
- [137] A. Wagner, K. Vorauer-Uhl, Liposome Technology for Industrial Purposes, *J. Drug Deliv.* 1 (2011) 2090–3014. doi: 10.1155/2011/591325.
- [138] S. Zalba, T. L. M. ten Hagen, Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy, *Cancer Treat. Rev.* 52 (2017) 48–57. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.10.008.
- [139] J. Startek, B. Boonen, K. Talavera, V. Meseguer, TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 371. doi: 10.3390/ijms20020371.
- [140] A. Radaic, L. R. S. Barbosa, C. Jaime, Y. L. Kapila, F. B. T. Pessine, M. B. de Jesus, How Lipid Cores Affect Lipid Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems, in: *Adv. Biomembr. Lipid Self-Assem.*, Elsevier, 2016: pp. 1–42. doi: 10.1016/bs.abl.2016.04.001.

- [141] D. Marsh, Lateral order in gel, subgel and crystalline phases of lipid membranes: Wide-angle X-ray scattering, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 59–76.  
doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.11.001.
- [142] F. M. Goñi, The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838 (2014) 1467–1476.  
doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.006.
- [143] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828 (2013) 2347–2358. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.018.
- [144] E. London, How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1746 (2005) 203–220. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.09.002.
- [145] J. E. Houston, M. Kraft, U. Scherf, R. C. Evans, Sequential detection of multiple phase transitions in model biological membranes using a red-emitting conjugated polyelectrolyte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 12423–12427. doi: 10.1039/C6CP01553K.
- [146] E. A. Smith, P. K. Dea, Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase, in: A. A. Elkordy (Ed.), *Appl. Calorim. Wide Context - Differ. Scanning Calorim. Isothermal Titration Calorim. Microcalorim.*, InTech, 2013.  
doi: 10.5772/51882.
- [147] K. Ke, Z.I. Strango, P. E. Harper, M. Zhao, Influence of Phosphatidylethanolamine Concentration and Composition on the Detection of Antiphosphatidylethanolamine Antibodies by ELISA: PE properties impact aPE ELISA, *J. Clin. Lab. Anal.* 30 (2016) 689–696.  
doi: 10.1002/jcla.21923.
- [148] P. E. Harper, D. A. Mannock, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, S. M. Gruner, X-Ray Diffraction Structures of Some Phosphatidylethanolamine Lamellar and Inverted Hexagonal Phases\*, *Biophys. J.* 81 (2001) 2693–2706. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75912-7.
- [149] C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, C. Wölk, Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes, *Soft Matter* 12 (2016) 5854–5866. doi: 10.1039/c6sm00807k.
- [150] D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F. M. Goñi, The Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers, *Biophys. J.* 105 (2013) 289–299. doi: 10.1016/j.bpj.2013.06.007.
- [151] D. Lichtenberg, R. J. Robson, E. A. Dennis, Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 737 (1983) 285–304. doi: 10.1016/0304-4157(83)90004-7.
- [152] Y. Chen, F. Qiao, Y. Fan, Y. Han, Y. Wang, Interactions of Phospholipid Vesicles with Cationic and Anionic Oligomeric Surfactants, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 7122–7132.  
doi: 10.1021/acs.jpcc.7b05297.
- [153] W. Kida, M. Kozak, Structural Changes of DPPC Bilayers Induced by Gemini Surfactant, *Acta Phys. Pol. A* 121 (2012) 893–898. doi: 10.12693/APhysPolA.121.893.
- [154] Z. Pietralik, R. Krzysztoń, W. Kida, W. Andrzejewska, M. Kozak, Structure and Conformational Dynamics of DMPC/Dicationic Surfactant and DMPC/Dicationic Surfactant/DNA Systems, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 7642–7659. doi: 10.3390/ijms14047642.
- [155] T. Piskorska, E. Obłąk, Surfaktanty gemini jako nośniki genów, *Postepy Hig Med Dosw* 64 (2010) 161–166.
- [156] A. Bilalov, U. Olsson, B. Lindman, DNA–lipidself-assembly: phase behavior and phase structures of a DNA–surfactant complex mixed with lecithin and water, *Soft Matter* 7 (2011) 730–742. doi: 10.1039/C0SM00650E.
- [157] T. Owen, *Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy : A Workbook*, 1st edition, Hewlett Packard Company, Berlin. 1998.

- [158] M. Hof, Basics of Optical Spectroscopy. In Handbook of Spectroscopy; G. Gauglitz, T.Vo-Dinh, Eds.; Wiley, Weinheim 2003; pp. 37–47.
- [159] Z. Kęcki, Podstawy spektroskopii molekularnej, Wyd. 4.; Wydaw. Naukowe PWN, Warszawa, 1998.
- [160] R. M. Silverstein, S. Jankowski, D. J. Kiemle, M. Potrzebowski, M. Sochacki, F. X. Webster, Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych; Wyd. 2., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.
- [161] W. W. Parson, Modern optical spectroscopy, Springer Berlin Heidelberg, New York, 2015.
- [162] J. R. Lakowicz, ed., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer US, Boston, MA, 2006. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [163] S. Kumar Organic Chemistry. Spectroscopy of Organic Compounds, Department of Chemistry Guru Nanak Dev University: Amritsar, India, 26 (2006) pp. 1–36.
- [164] A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, J. Chem. Educ. 74 (1997) 1227. doi: 10.1021/ed074p1227.
- [165] E. Iglesias, Enolization of Benzoylacetone in Aqueous Surfactant Solutions: A Novel Method for Determining Enolization Constants, J. Phys. Chem. 100 (1996) 12592–12599. doi: 10.1021/jp960473l.
- [166] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
- [167] A. M. T. M. do Canto, J. R. Robalo, P. D. Santos, A. J. P. Carvalho, J. P. P. Ramalho, L. M. S. Loura, Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1858 (2016) 2647–2661. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.07.013.
- [168] N. P. E. Barry, B. Therrien, Pyrene: The Guest of Honor, in: Org. Nanoreactors, Elsevier, 2016; pp. 421–461. doi: 10.1016/B978-0-12-801713-5.00013-6.
- [169] A. V. Popova, A. S. Andreeva,  $\beta$ -Carotene–Lipid Interactions in Liposomes with Different Lipid Composition, in: Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes, Elsevier, 2011; pp. 293–307. doi: 10.1016/B978-0-12-387720-8.00010-8.
- [170] A. Galameau, D. Lemer, M. F. Ottaviani, F. Di Renzo, F. Fajui, EPR and UV-Visible Fluorescence Spectroscopic Evidences for Intermediate Phases during the Formation of Micelle-Templated Silicas. In: Studies in Surface Science and Catalysis; Elsevier, 1998; Vol. 117, pp. 405–412.
- [171] L. Piñeiro, M. Novo, W. Al-Soufi, Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions, Adv. Colloid Interface Sci. 215 (2015) 1–12. doi: 10.1016/j.cis.2014.10.010.
- [172] P. J. Tummino, A. Gafni, Determination of the aggregation number of detergent micelles using steady-state fluorescence quenching, Biophys. J. 64 (1993) 1580–1587. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81528-5.
- [173] S. Li, A. Yu, R. Lu, Fluorescence quenching of coumarin 153 by hydroxyl-functionalized room temperature ionic liquids, Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. 165 (2016) 161–166. doi: 10.1016/j.saa.2016.04.039.
- [174] J. van Stam, S. Depaemelaere, F. C. De Schryver, Micellar Aggregation Numbers - A Fluorescence Study, J. Chem. Educ. 75 (1998) 93. doi: 10.1021/ed075p93.
- [175] N. Scholz, T. Behnke, U. Resch-Genger, Determination of the Critical Micelle Concentration of Neutral and Ionic Surfactants with Fluorometry, Conductometry, and Surface Tension—A Method Comparison, J. Fluoresc. 28 (2018) 465–476. doi: 10.1007/s10895-018-2209-4.
- [176] R. J. Williams, J. N. Phillips, K. J. Mysels, The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25° C, Trans Faraday Soc 51 (1955) 728–737. doi: 10.1039/TF9555100728.

- [177] I. Garcia-Mateos, M. Mercedes Velazquez, L. J. Rodriguez, Critical micelle concentration determination in binary mixtures of ionic surfactants by deconvolution of conductivity/concentration curves, *Langmuir* 6 (1990) 1078–1083. doi: 10.1021/la00096a009
- [178] P. Carpena, J. Aguiar, P. Bernaola-Galván, C. Carnero Ruiz, Problems Associated with the Treatment of Conductivity–Concentration Data in Surfactant Solutions: Simulations and Experiments, *Langmuir* 18 (2002) 6054–6058. doi: 10.1021/la025770y.
- [179] E. H. M. Sakho, E. Allahyari, O. S. Oluwafemi, S. Thomas, N. Kalarikkal, Dynamic Light Scattering (DLS), in: *Therm. Rheol. Meas. Tech. Nanomater. Charact.*, Elsevier, 2017: pp. 37–49. doi: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5.
- [180] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8 (2016) 409–427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [181] M. Pisárčik, F. Devínsky, M. Pupák, Determination of micelle aggregation numbers of alkyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate surfactants using time-resolved fluorescence quenching, *Open Chem.* 13 (2015) 922–931. doi: 10.1515/chem-2015-0103.
- [182] A. M. Stalcup, Chiral separations by capillary electrophoresis, in: *Chiral Anal.*, Elsevier, 2006: pp. 241–275. doi: 10.1016/B978-044451669-5/50008-9.
- [183] R. S. Dias, R. Svingen, B. Gustavsson, B. Lindman, M. G. Miguel, B. Åkerman, Electrophoretic properties of complexes between DNA and the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide, *Electrophoresis* 26 (2005) 2908–2917. doi: 10.1002/elps.200400182.
- [184] S. J. Paluck, T. H. Nguyen, H. D. Maynard, Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications, *Biomacromolecules* 17 (2016) 3417–3440. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01147.
- [185] L. Zang, H. Zhu, K. Wang, Y. Liu, F. Yu, W. Zhao, Not Just Anticoagulation—New and Old Applications of Heparin, *Molecules* 27 (2022) 6968. doi: 10.3390/molecules27206968.
- [186] R. J. Linhardt, Heparin and anticoagulation, *Front. Biosci.* 21 (2016) 1372–1392. doi: 10.2741/4462.
- [187] M.-L. Ainalem, A. Bartles, J. Muck, R. S. Dias, A. M. Carnerup, D. Zink, T. Nylander, DNA Compaction Induced by a Cationic Polymer or Surfactant Impact Gene Expression and DNA Degradation, *PLoS ONE* 9 (2014) e92692. doi: 10.1371/journal.pone.0092692.
- [188] M. C. Smith, R. M. Crist, J. D. Clogston, S. E. McNeil, Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5779–5787. doi: 10.1007/s00216-017-0527-z.
- [189] J. D. Clogston, A. K. Patri, Zeta Potential Measurement, in: S. E. McNeil (Ed.), *Charact. Nanoparticles Intend. Drug Deliv.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011: pp. 63–70. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1\_6.
- [190] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *J. Controlled Release* 235 (2016) 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [191] B. Banerjee, G. Misra, M. T. Ashraf, Circular dichroism, in: *Data Process. Handb. Complex Biol. Data Sources*, Elsevier, 2019: pp. 21–30. doi: 10.1016/B978-0-12-816548-5.00002-2.
- [192] W. W. Parson, *Modern optical spectroscopy*, Springer Berlin Heidelberg, New York, 2015.
- [193] A. Rodger, Circular Dichroism and Linear Dichroism, in: R. A. Meyers (Ed.), *Encycl. Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2014: pp. 1–34. doi: 10.1002/9780470027318.a5402.pub2.
- [194] J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova, Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1713–1725. doi: 10.1093/nar/gkp026.

- [195] A. Rodger, UV Absorbance Spectroscopy of Biological Macromolecules, in: G. C. K. Roberts (Ed.), *Encycl. Biophys.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013: pp. 2714–2718. doi: 10.1007/978-3-642-16712-6\_780.
- [196] M. Wanunu, Y. Tor, Eds., *Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions*, CRC Press: Boca Raton, 2012.
- [197] Z. Pietralik, A. Skrzypczak, M. Kozak, Dicationic Surfactants with Glycine Counter Ions for Oligonucleotide Transportation, *ChemPhysChem* 17 (2016) 2424–2433. doi: 10.1002/cphc.201600175.
- [198] B. R. Wood, The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 1980–1998. doi: 10.1039/C5CS00511F.
- [199] Ö. S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: M. L. Larramendy, S. Soloneski (Eds.), *Genotoxicity - Predict. Risk Our Actual World*, InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.71923.
- [200] A. Zaborowski, M. Klink, M. Różga, Cytometryczna metoda oznaczania żywotności komórek limfoidalnych w warunkach stresu temperaturowego, *Acta Univ. Lodz. Folia Biochim. Biophys.* 10 (1994) 87-95.
- [201] F. A. Barile, Continuous Cell Lines as a Model for Drug Toxicity Assessment, in: *Vitro Methods Pharm. Res.*, Elsevier, 1997: pp. 33–54. doi: 10.1016/B978-012163390-5.50004-1.
- [202] J. R. Masters, HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 315–319. doi: 10.1038/nrc775.
- [203] P. Gill, T. T. Moghadam, B. Ranjbar, Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience, *J. Biomol. Tech.* 21 (2010) 167–193.
- [204] C. Demetzos, Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability, *J. Liposome Res.* 18 (2008) 159–173. doi: 10.1080/08982100802310261.
- [205] S. Tanaka, Theory of power-compensated DSC, *Thermochim. Acta* 210 (1992) 67–76. doi: 10.1016/0040-6031(92)80277-4.
- [206] E. Prenner, M. Chiu, Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 39-59. doi: 10.4103/0975-7406.76463.
- [207] S. M. Ohline, M. L. Campbell, M. T. Turnbull, S. J. Kohler, Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1251. doi: 10.1021/ed078p1251.
- [208] N. Kasian, O. Vashchenko, L. Budianska, R. Brodskii, L. Lisetski, Cooperative domains in lipid membranes: Size determination by calorimetry, *J. Therm. Anal. Calorim.* 136 (2019) 795–801. doi: 10.1007/s10973-018-7695-8.
- [209] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes, in: A. M. Dopico (Ed.), *Meth Membr. Lipids*, Humana Press, Totowa, NJ, 2007: pp. 207–226. doi: 10.1007/978-1-59745-519-0\_14.
- [210] L. Boldon, F. Laliberte, L. Liu, Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application, *Nano Rev.* 6 (2015) 25661. doi: 10.3402/nano.v6.25661.
- [211] H. Schnablegger, Y. Singh, H. Schnablegger, Y. Singh, *The SAXS Guide: Getting Acquainted With the Principles*, Anton Parr, Austria. 2017.
- [212] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution, *Rep. Prog. Phys.* 66 (2003) 1735–1782. doi: 10.1088/0034-4885/66/10/R05.



- [213] O. Kratky, P. Laggner, X-Ray Small-Angle Scattering, in: *Encycl. Phys. Sci. Technol.*, Elsevier, 2003: pp. 939–988. doi: 10.1016/B0-12-227410-5/00832-2.
- [214] R. P. Rambo, J. A. Tainer, Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law, *Biopolymers* 95 (2011) 559–571. doi: 10.1002/bip.21638.
- [215] R. Rajabalaya, M. N. Musa, N. Kifli, S. R. David, Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals, *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (2017) 393–406. doi: 10.2147/DDDT.S103505.
- [216] R. Howland, L. Benatar, *Mikroskopy ze skanującą sondą*, Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2002.
- [217] N. Mourougou-Candoni, Tapping Mode AFM Imaging for Functionalized Surfaces, in: C. Frewin (Ed.), *At. Force Microsc. Investig. Biol. - Cell Protein*, InTech, 2012. doi: 10.5772/36425.
- [218] W. Liang, H. Shi, X. Yang, J. Wang, W. Yang, H. Zhang, L. Liu, Recent advances in AFM-based biological characterization and applications at multiple levels, *Soft Matter* 16 (2020) 8962–8984. doi: 10.1039/D0SM01106A.
- [219] P. E. Milhiet, M.-C. Giocondi, C. Le Grimellec, AFM Imaging of Lipid Domains in Model Membranes, *Sci. World J.* 3 (2003) 59–74. doi: 10.1100/tsw.2003.12.
- [220] Z. Al-Rekabi, S. Contera, Multifrequency AFM reveals lipid membrane mechanical properties and the effect of cholesterol in modulating viscoelasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115 (2018) 2658–2663. doi: 10.1073/pnas.1719065115.
- [221] D. J. Muller, AFM: A Nanotool in Membrane Biology, *Biochemistry* 47 (2008) 7986–7998. doi: 10.1021/bi800753x.
- [222] J. Pernak, A. Skrzypczak, G. Lota, E. Frackowiak, Synthesis and Properties of Trigeminal Tricationic Ionic Liquids, *Chem. - Eur. J.* 13 (2007) 3106–3112. doi: 10.1002/chem.200601243.
- [223] G. M. Cooper, *The cell: a molecular approach*, 2. ed, ASM Press, Washington, DC, 2000.
- [224] E. Obłąk, A. Gamian, The biological activity of quaternary ammonium salts (QASs), *Postepy Hig Med Dosw Postepy Hig Med Dosw* 64 (2010) 201-11
- [225] Salahuddin, M. Shaharyar, A. Mazumder, Benzimidazoles: A biologically active compounds, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S157–S173. doi: 10.1016/j.arabjc.2012.07.017.
- [226] U. Sahoo, S. Biswal, S. Sathy, H. K. S. Kumar, M. Banerjee. Imidazole and its Biological Activities: A Review. *Asian J. Research Chem.* 5(2012) 171-182
- [227] Z. Pietralik, *Badania struktury i dynamiki konformacyjnej lipopleksów na bazie surfaktantów gemini jako nanonośników do terapii genowej*, praca doktorska (2013).
- [228] Z. Pietralik, Ż. Kołodziejska, M. Weiss, M. Kozak, Gemini Surfactants Based on Bis-Imidazolium Alkoxy Derivatives as Effective Agents for Delivery of Nucleic Acids: A Structural and Spectroscopic Study, *PLOS ONE* 10 (2015) e0144373. doi: 10.1371/journal.pone.0144373.
- [229] W. Andrzejewska, M. Wilkowska, B. Peplińska, A. Skrzypczak, M. Kozak, Structural characterization of transfection nanosystems based on tricationic surfactants and short double stranded oligonucleotides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 518 (2019) 706–711. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.114.
- [230] Strona internetowa Avanti Research, [www.avantiresearch.com](http://www.avantiresearch.com), dostęp: 16.09.2024
- [231] Strona internetowa pakietu ASTATS 3.0, [www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html](http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html), dostęp: 01.09.2024
- [232] R. Kamboj, S. Singh, A. Bhadani, H. Kataria, G. Kaur, Gemini Imidazolium Surfactants: Synthesis and Their Biophysicochemical Study, *Langmuir* 28 (2012) 11969–11978. doi: 10.1021/la300920p.

- [233] M. Milanović, V. Krstonošić, L. Dokić, M. Hadnađev, T. Dapčević Hadnađev, Insight into the Interaction Between Carbopol® 940 and Ionic/Nonionic Surfactant, *J. Surfactants Deterg.* 18 (2015) 505–516. doi: 10.1007/s11743-015-1677-7.
- [234] M. J. Qazi, S. J. Schlegel, E. H. G. Backus, M. Bonn, D. Bonn, N. Shahidzadeh, Dynamic Surface Tension of Surfactants in the Presence of High Salt Concentrations, *Langmuir* 36 (2020) 7956–7964. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c01211.
- [235] R. Mao, M.-T. Lee, A. Vishnyakov, A. V. Neimark, Modeling Aggregation of Ionic Surfactants Using a Smeared Charge Approximation in Dissipative Particle Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 11673–11683. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b05630.
- [236] Á. González García, E. M. Timmers, N. Romijn, S. Song, S. Sahebali, R. Tuinier, I. K. Voets, Micellization of a weakly charged surfactant in aqueous salt solution: Self-consistent field theory and experiments, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 561 (2019) 201–208. doi: 10.1016/j.colsurfa.2018.10.039.
- [237] M. Ageno, E. Dore, C. Frontali, The Alkaline Denaturation of DNA, *Biophys. J.* 9 (1969) 1281–1311. doi: 10.1016/S0006-3495(69)86452-0.
- [238] P. Ehrlich, P. Doty, The Alkaline Denaturation of Deoxyribose Nucleic Acid, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 4251–4255. doi: 10.1021/ja01549a033.
- [239] A. M. Smith, A. A. Lee, S. Perkin, The Electrostatic Screening Length in Concentrated Electrolytes Increases with Concentration, *J. Phys. Chem. Lett.*, 7 (2016) 2157–2163. doi: 10.1021/acs.jpcclett.6b00867.
- [240] T. Kawachi, Y. Matsuura, F. Iyoda, S. Arakawa, M. Okamoto, Preparation and characterization of DNA/allophane composite hydrogels, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112 (2013) 429–434. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.011.
- [241] A. Disalvo, M. A. Frias, Surface Characterization of Lipid Biomimetic Systems, *Membranes* 11 (2021) 821. doi: 10.3390/membranes11110821.
- [242] M. A. Morini, M. B. Sierra, V. I. Pedroni, L. M. Alarcon, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo, Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 131 (2015) 54–58. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.054.
- [243] X. Zhao, Y. Shang, H. Liu, Y. Hu, J. Jiang, Interaction of DNA with Cationic Gemini Surfactant Trimethylene-1,3-bis (dodecyldimethyl-ammonium bromide) and Anionic Surfactant SDS Mixed System, *Chin. J. Chem. Eng.* 16 (2008) 923–928. doi: 10.1016/S1004-9541(09)60017-3.
- [244] S. Cinelli, G. Onori, A. Santucci, Solvent isotope effects on the phase-transition properties of lipid bilayers, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 20 (2001) 297–302. doi: 10.1016/S0927-7765(00)00138-7.
- [245] J. Meineke, M. Weik, G. Zaccai, G. Fragneto, Behavior of Hydrated Lipid Bilayers at Cryogenic Temperatures, *Front. Chem.* 8 (2020) 455. doi: 10.3389/fchem.2020.00455.
- [246] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 1376 (1998) 91–145. doi: 10.1016/S0304-4157(98)00006-9.
- [247] F.-G. Wu, Q. Jia, R.-G. Wu, Z.-W. Yu, Regional Cooperativity in the Phase Transitions of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: The Lipid Tail Triggers the Isothermal Crystallization Process, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 8559–8568. doi: 10.1021/jp200733y.
- [248] S. Mabrey, J. M. Sturtevant, Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (1976) 3862–3866. doi: 10.1073/pnas.73.11.3862.
- [249] P. Yeagle, ed., *The Structure of biological membranes*, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, Fla, 2005.

- [250] B. Peng, X.-Y. Ding, C. Sun, Y.-N. Yang, Y.-J. Gao, X. Zhao, The chain order of binary unsaturated lipid bilayers modulated by aromatic-residue-containing peptides: an ATR-FTIR spectroscopy study, *RSC Adv.* 7 (2017) 29386–29394. doi: 10.1039/C7RA01145H.
- [251] M. C. Klaiss-Luna, M. Manrique-Moreno, Infrared Spectroscopic Study of Multi-Component Lipid Systems: A Closer Approximation to Biological Membrane Fluidity, *Membranes* 12 (2022) 534. doi: 10.3390/membranes12050534.
- [252] E. H. Mojumdar, G. S. Gooris, J. A. Bouwstra, Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization, *Soft Matter* 11 (2015) 4326–4336. doi: 10.1039/C4SM02786H.
- [253] M. Boncheva, F. Damien, V. Normand, Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778 (2008) 1344–1355. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.01.022.
- [254] D. de Sousa Neto, G. Gooris, J. Bouwstra, Effect of the  $\omega$ -acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I), *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 184–195. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.12.007.
- [255] A. Oleszko, S. Olsztyńska-Janus, T. Walski, K. Grzeszczuk-Kuć, J. Bujok, K. Gałęcka, A. Czerski, W. Witkiewicz, M. Komorowska, Application of FTIR-ATR Spectroscopy to Determine the Extent of Lipid Peroxidation in Plasma during Haemodialysis, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015) 1–8. doi: 10.1155/2015/245607.
- [256] M. Fernandes Queiroz, K. Melo, D. Sabry, G. Sasaki, H. Rocha, Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?, *Mar. Drugs* 13 (2014) 141–158. doi: 10.3390/md13010141.
- [257] A. Barth, The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74 (2000) 141–173. doi: 10.1016/S0079-6107(00)00021-3.
- [258] R. Geisler, S. Prévost, R. Dattani, T. Hellweg, Effect of Cholesterol and Ibuprofen on DMPC- $\beta$ -Aescin Bicelles: A Temperature-Dependent Wide-Angle X-ray Scattering Study, *Crystals* 10 (2020) 401. doi: 10.3390/cryst10050401.
- [259] R. Sreij, C. Dargel, R. Schweins, S. Prévost, R. Dattani, T. Hellweg, Aescin-Cholesterol Complexes in DMPC Model Membranes: A DSC and Temperature-Dependent Scattering Study, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5542. doi: 10.1038/s41598-019-41865-z.
- [260] G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, B. W. Barry, Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes, *Int. J. Pharm.* 276 (2004) 143–161. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.02.024.
- [261] O. Cañadas, C. Casals, Differential Scanning Calorimetry of Protein–Lipid Interactions, in: J. H. Kleinschmidt (Ed.), *Lipid-Protein Interact.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013: pp. 55–71. doi: 10.1007/978-1-62703-275-9\_4.
- [262] A. N. Bullock, J. Henckel, B. S. DeDecker, C. M. Johnson, P. V. Nikolova, M. R. Proctor, D. P. Lane, A. R. Fersht, Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 14338–14342. doi: 10.1073/pnas.94.26.14338.
- [263] J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas, DNA melting investigated by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy, *Biophys. J.* 71 (1996) 3350–3360. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79528-0.
- [264] F. Manyanga, Use of Differential Scanning Calorimetry (DSC) to Study the Thermodynamics of DNA-Based Interactions and Nucleic Acid-Based Therapeutics, *J. Anal. Pharm. Res.* 2 (2016) 30–42. doi: 10.15406/japlr.2016.02.00013.
- [265] C. M. Olsen, R. Shikiya, R. Ganugula, C. Reiling-Steffensmeier, I. Khutsishvili, S. E. Johnson, L. A. Marky, Application of differential scanning calorimetry to measure the differential binding of ions, water and protons in the unfolding of DNA molecules, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1860 (2016) 990–998. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.10.002.

- [266] M. Rosa, R. Dias, M. Da Graça Miguel, B. Lindman, DNA–Cationic Surfactant Interactions Are Different for Double- and Single-Stranded DNA, *Biomacromolecules* 6 (2005) 2164–2171. doi: 10.1021/bm050137n.
- [267] S. Bhattacharya, S. S. Mandal, Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1323 (1997) 29–44. doi: 10.1016/S0005-2736(96)00171-X.
- [268] E. A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini, E. Tymczyszyn, M. Frías, H. Almaleck, G. J. Gordillo, Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778 (2008) 2655–2670. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.025.
- [269] S. Roldán-Vargas, R. Barnadas-Rodríguez, M. Quesada-Pérez, J. Estelrich, J. Callejas-Fernández, Surface fractals in liposome aggregation, *Phys. Rev. E* 79 (2009) 011905. doi: 10.1103/PhysRevE.79.011905.
- [270] A. S. Rosa, E. A. Disalvo, M. A. Frias, Water Behavior at the Phase Transition of Phospholipid Matrixes Assessed by FTIR Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 6236–6244. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c03719.
- [271] W. Pohle, C. Selle, D. R. Gauger, R. Zantl, F. Artzner, J. O. Rädler, FTIR spectroscopic characterization of a cationic lipid–DNA complex and its components, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000) 4642–4650. doi: 10.1039/b003898i.
- [272] A. Bhadani, T. Okano, T. Ogura, T. Misono, K. Sakai, M. Abe, H. Sakai, Structural features and surfactant properties of core–shell type micellar aggregates formed by gemini piperidinium surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 494 (2016) 147–155. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.11.073.
- [273] P. Mahapatra, Structure of Micelles Calcium Didodecyl Sulfate: A SAXS Study, *J. Nanomedicine Nanotechnol.* 06 (2015). doi: 10.4172/2157-7439.1000307.
- [274] X. Wang, S. Tan, X.-Q. Yang, E. Hu, Pair distribution function analysis: Fundamentals and application to battery materials, *Chin. Phys. B* 29 (2020) 028802. doi: 10.1088/1674-1056/ab6656.
- [275] A. N. Goltsov, L. I. Barsukov, Synergetics of the Membrane Self-Assembly: A Micelle-to-Vesicle Transition, *J. Biol. Phys.* 26 (2000) 27–41. doi: 10.1023/A:1005139631164.
- [276] G. V. Jensen, R. Lund, J. Gummel, T. Narayanan, J. S. Pedersen, Monitoring the Transition from Spherical to Polymer-like Surfactant Micelles Using Small-Angle X-Ray Scattering, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 11524–11528. doi: 10.1002/anie.201406489.
- [277] R. S. Atri, A. Sanchez-Fernandez, O. S. Hammond, I. Manasi, J. Douth, J. P. Tellam, K. J. Edler, Morphology Modulation of Ionic Surfactant Micelles in Ternary Deep Eutectic Solvents, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 6004–6014. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c03876.
- [278] Oprogramowanie SasView 5.0.6, [sasview.org](http://sasview.org), dostęp: 02.09.2024
- [279] Z. Pietralik, M. Taube, A. Skrzypczak, M. Kozak, SAXS Study of Influence of Gemini Surfactant, 1,1'-(1,4-butanediyl)bis 3-cyclododecyloxymethylimidazolium di-chloride, on the Fully Hydrated DMPC, *Acta Phys. Pol. A* 117 (2010) 311–314. doi: 10.12693/APhysPolA.117.311.
- [280] T. N. Murugova, O. I. Ivankov, Y. L. Ryzhykau, D. V. Soloviov, K. V. Kovalev, D. V. Skachkova, A. Round, C. Baeken, A. V. Ishchenko, O. A. Volkov, A. V. Rogachev, A. V. Vlasov, A. I. Kuklin, V. I. Gordeliy, Mechanisms of membrane protein crystallization in 'bicelles,' *Sci. Rep.* 12 (2022) 11109. doi: 10.1038/s41598-022-13945-0.
- [281] S. Taguchi, K. Suga, K. Hayashi, Y. Okamoto, H.-S. Jung, H. Nakamura, H. Umakoshi, Systematic Characterization of DMPC/DHPC Self-Assemblies and Their Phase Behaviors in Aqueous Solution, *Colloids Interfaces* 2 (2018) 73. doi: 10.3390/colloids2040073.

- [282] I. Alahmadi, D. Hoy, A. Tahmasbi Rad, S. Patil, A. Alahmadi, J. Kinnun, H. L. Scott, J. Katsaras, M.-P. Nieh, Changes Experienced by Low-Concentration Lipid Bicelles as a Function of Temperature, *Langmuir* 38 (2022) 4332–4340. doi: 10.1021/acs.langmuir.2c00078.
- [283] H. G. Mortensen, G. V. Jensen, S. K. Hansen, T. Vosegaard, J. S. Pedersen, Structure of Phospholipid Mixed Micelles (Bicelles) Studied by Small-Angle X-ray Scattering, *Langmuir* 34 (2018) 14597–14607. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02704.
- [284] R. D. Giudice, N. Paracini, T. Laursen, C. Blanchet, F. Roosen-Runge, M. Cárdenas, Expanding the Toolbox for Bicelle-Forming Surfactant–Lipid Mixtures, *Molecules* 27 (2022) 7628. doi: 10.3390/molecules27217628.
- [285] Q. Li, X. Han, Self-Assembled “Breathing” Grana-Like Cisternae Stacks, *Adv. Mater.* 30 (2018) 1707482. doi: 10.1002/adma.201707482.
- [286] Y. Po-Wei, L. Tsang-Lang, H. Yuan, J. U-Ser, Small-Angle X-ray Scattering Studies on the Structure of Mixed DPPC/diC7PC Micelles in Aqueous Solutions, *Chin. J. Phys.* 50 (2012) 349–356.
- [287] R. D. De Castro, B. R. Casadei, B. V. Santana, M. Lotierzo, N. F. De Oliveira, B. Malheiros, P. Mariani, R. C. K. Kaminski, L. R. S. Barbosa, *SCryPTA*: A web-based platform for analyzing Small-Angle Scattering curves of lyotropic liquid crystals, *bioRxiv* (2019) 791848. doi: 10.1101/791848.
- [288] L. Tayebi, Y. Ma, D. Vashae, G. Chen, S. K. Sinha, A. N. Parikh, Long-range interlayer alignment of intralayer domains in stacked lipid bilayers, *Nat. Mater.* 11 (2012) 1074–1080. doi: 10.1038/nmat3451.
- [289] C. J. Garvey, S. J. Bryant, A. Elbourne, T. Hunt, B. Kent, M. Kreuzer, M. Strobl, R. Steitz, G. Bryant, Phase separation in a ternary DPPC/DOPC/POPC system with reducing hydration, *J. Colloid Interface Sci.* 638 (2023) 719–732. doi: 10.1016/j.jcis.2023.01.145.
- [290] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto, S. Engelskirchen, S. Ahualli, Monoolein: a magic lipid?, *Phys Chem Chem Phys* 13 (2011) 3004–3021. doi: 10.1039/C0CP01539C.
- [291] A. V. Vlasov, S. D. Osipov, N. A. Bondarev, V. N. Uversky, V. I. Borshchevskiy, M. F. Yanyushin, I. V. Manukhov, A. V. Rogachev, A. D. Vlasova, N. S. Ilyinsky, A. I. Kuklin, N. A. Dencher, V. I. Gordeliy, ATP synthase FOF1 structure, function, and structure-based drug design, *Cell. Mol. Life Sci.* 79 (2022) 179. doi: 10.1007/s00018-022-04153-0.
- [292] D. Uhríková, Phospholipid bilayers in model membranes and drug delivery systems: from physics to pharmacy, *Eur. Pharm. J.* 68 (2021) 66–71. doi: 10.2478/afpuc-2021-0008.
- [293] M. Dittrich, C. Brauer, S. S. Funari, B. Dobner, G. Brezesinski, C. Wölk, Interactions of Cationic Lipids with DNA: A Structural Approach, *Langmuir* 34 (2018) 14858–14868. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b01635.
- [294] B. G. Tenchov, R. C. MacDonald, D. P. Siegel, Cubic Phases in Phosphatidylcholine-Cholesterol Mixtures: Cholesterol as Membrane “Fusogen,” *Biophys. J.* 91 (2006) 2508–2516. doi: 10.1529/biophysj.106.083766.
- [295] R. Koynova, Lipid Phases Eye View to Lipofection. Cationic Phosphatidylcholine Derivatives as Efficient DNA Carriers for Gene Delivery, *Lipid Insights* 2 (2008) LPI.S864. doi: 10.4137/LPI.S864.
- [296] F. Artzner, R. Zantl, G. Rapp, J. O. Rädler, Observation of a Rectangular Columnar Phase in Condensed Lamellar Cationic Lipid-DNA Complexes, *Phys. Rev. Lett.* 81 (1998) 5015–5018. doi: 10.1103/PhysRevLett.81.5015.
- [297] Ż. Polańska, Z. Pietralik-Molińska, D. Wojciechowska, A. Moliński, M. Weiss, A. Skrzypczak, M. Kozak, The Process of Binding and Releasing of Genetic Material from Lipoplexes Based on Trimeric Surfactants and Phospholipids, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 7744. doi: 10.3390/ijms22147744.

- [298] U. Maver, T. Maver, Z. Persin, M. Mozetic, A. Vesel, M. Gaberscek, K. Stana-Kleinschek, Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope, in: F. Ylmaz (Ed.), *Polym. Sci., InTech*, 2013. doi: 10.5772/51060.
- [299] B. Yang, Z. Liu, H. Liu, M. A. Nash, Next Generation Methods for Single-Molecule Force Spectroscopy on Polyproteins and Receptor-Ligand Complexes, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2020) 85. doi: 10.3389/fmolb.2020.00085.
- [300] L. S. Shlyakhtenko, A. A. Gall, Y. L. Lyubchenko, Mica Functionalization for Imaging of DNA and Protein-DNA Complexes with Atomic Force Microscopy, in: D. J. Taatjes, J. Roth (Eds.), *Cell Imaging Tech., Humana Press, Totowa, NJ*, 2012: pp. 295–312. doi: 10.1007/978-1-62703-056-4\_14.
- [301] Y. Chen, T. Gao, Y. Wang, G. Yang, Investigating the Influence of Magnesium Ions on p53–DNA Binding Using Atomic Force Microscopy, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1585. doi: 10.3390/ijms18071585.
- [302] G. Witz, K. Rechendorff, J. Adamcik, G. Dietler, Conformation of Circular DNA in Two Dimensions, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 148103. doi: 10.1103/PhysRevLett.101.148103.
- [303] D. Pastré, O. Piétrement, S. Fusil, F. Landousy, J. Jeusset, M.-O. David, L. Hamon, E. Le Cam, A. Zozime, Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study, *Biophys. J.* 85 (2003) 2507–2518. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74673-6.
- [304] M. Allen, AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 2221–2226. doi: 10.1093/nar/25.11.2221.
- [305] Y. L. Lyubchenko, Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging, *Micron* 42 (2011) 196–206. doi: 10.1016/j.micron.2010.08.011.
- [306] C. Leung, A. Bestembayeva, R. Thorogate, J. Stinson, A. Pyne, C. Marcovich, J. Yang, U. Drechsler, M. Despont, T. Jankowski, M. Tschöpe, B.W. Hoogenboom, Atomic Force Microscopy with Nanoscale Cantilevers Resolves Different Structural Conformations of the DNA Double Helix, *Nano Lett.* 12 (2012) 3846–3850. doi: 10.1021/nl301857p.
- [307] H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada, Molecular-scale visualization and surface charge density measurement of Z-DNA in aqueous solution, *Sci. Rep.* 9 (2019) 6851. doi: 10.1038/s41598-019-42394-5.
- [308] E. Nagao, J. A. Dvorak, Phase Imaging by Atomic Force Microscopy: Analysis of Living Homoiothermic Vertebrate Cells, *Biophys. J.* 76 (1999) 3289–3297. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77481-3.
- [309] J. Ma, P. Xiao, P. Wang, X. Han, J. Luo, R. Shi, X. Wang, X. Song, S. Zhao, Molecular dynamics simulation study on  $\pi$ - $\pi$  stacking of Gemini surfactants in oil/water systems, *Chin. J. Chem. Eng.* 50 (2022) 335–346. doi: 10.1016/j.cjche.2022.06.010.
- [310] L. Zhao, H. Zhang, W. Wang,  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction in mixed surfactant solutions assembled by cationic surfactant and organic salt with a naphthalene nucleus, *J. Mol. Liq.* 240 (2017) 14–20. doi: 10.1016/j.molliq.2017.05.048.
- [311] T. F. Headen, C. A. Howard, N. T. Skipper, M. A. Wilkinson, D. T. Bowron, A. K. Soper, Structure of  $\pi$ - $\pi$  Interactions in Aromatic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 5735–5742. doi: 10.1021/ja909084e.
- [312] Z. Sun, V. Nicolosi, D. Rickard, S. D. Bergin, D. Aherne, J. N. Coleman, Quantitative Evaluation of Surfactant-stabilized Single-walled Carbon Nanotubes: Dispersion Quality and Its Correlation with Zeta Potential, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 10692–10699. doi: 10.1021/jp8021634.
- [313] S. M. Shakil Hussain, M. S. Kamal, M. Murtaza, Effect of aromatic spacer groups and counterions on aqueous micellar and thermal properties of the synthesized quaternary ammonium gemini surfactants, *J. Mol. Liq.* 296 (2019) 111837. doi: 10.1016/j.molliq.2019.111837.

- [314] H. Kumar, A. Katal, Analysis of the micellar properties of surfactants dodecyl trimethylammonium bromide and dodecyl trimethylammonium chloride in aqueous ionic liquids solution, *J. Dispers. Sci. Technol.* 43 (2022) 419–438. doi: 10.1080/01932691.2020.1842758.
- [315] R. Kaur, H. Kumar, M. Singla, Micellization studies of selected imidazolium based ionic liquid in aqueous solution and in presence of different additives: A review, *J. Ion. Liq.* 2 (2022) 100036. doi: 10.1016/j.jil.2022.100036.
- [316] Md. S. Alam, V. Nareshkumar, N. Vijayakumar, K. Madhavan, A. B. Mandal, Effect of additives on the cloud point of mixed surfactant (non-ionic Triton X-114+cationic gemini 16-6-16) solutions, *J. Mol. Liq.* 194 (2014) 206–211. doi: 10.1016/j.molliq.2014.02.042.
- [317] D. R. Perinelli, M. Cespi, N. Lorusso, G. F. Palmieri, G. Bonacucina, P. Blasi, Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All?, *Langmuir* 36 (2020) 5745–5753. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c00420.
- [318] J. Drazenovic, H. Wang, K. Roth, J. Zhang, S. Ahmed, Y. Chen, G. Bothun, S. L. Wunder, Effect of lamellarity and size on calorimetric phase transitions in single component phosphatidylcholine vesicles, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848 (2015) 532–543. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.003.
- [319] S. Savarala, S. Ahmed, M. A. Ilies, S. L. Wunder, Formation and Colloidal Stability of DMPC Supported Lipid Bilayers on SiO<sub>2</sub> Nanobeads, *Langmuir* 26 (2010) 12081–12088. doi: 10.1021/la101304v.
- [320] Strona internetowa Avanti lipids, [avantilipids.com](http://avantilipids.com), dostęp: 15.09.2024
- [321] E. Y. Shalaev, P. L. Steponkus, Phase behavior and glass transition of 1,2-dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) dehydrated in the presence of sucrose, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1514 (2001) 100–116. doi: 10.1016/S0005-2736(01)00372-8.
- [322] F. M. Goñi, A. Alonso, Differential Scanning Calorimetry in the Study of Lipid Structures, in: B. Larjani, Colin. A. Rosser, R. Woscholski (Eds.), *Chem. Biol.*, 1st ed., Wiley, 2006: pp. 47–66. doi: 10.1002/9780470319253.ch4.
- [323] P. Losada-Pérez, N. Mertens, B. de Medio-Vasconcelos, E. Slenders, J. Leys, M. Peeters, B. van Grinsven, J. Gruber, C. Glorieux, H. Pfeiffer, P. Wagner, J. Thoen, Phase Transitions of Binary Lipid Mixtures: A Combined Study by Adiabatic Scanning Calorimetry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, *Adv. Condens. Matter Phys.* 2015 (2015) 1–14. doi: 10.1155/2015/479318.
- [324] K. Turjeman, Y. Bavli, P. Kizelsztejn, Y. Schilt, N. Allon, T. B. Katzir, E. Sasson, U. Raviv, H. Ovadia, Y. Barenholz, Nano-Drugs Based on Nano Sterically Stabilized Liposomes for the Treatment of Inflammatory Neurodegenerative Diseases, *PLOS ONE* 10 (2015) e0130442. doi: 10.1371/journal.pone.0130442.
- [325] H. L. Scott, K. B. Kennison, T. A. Enoki, M. Doktorova, J. J. Kinnun, F. A. Heberle, J. Katsaras, Model Membrane Systems Used to Study Plasma Membrane Lipid Asymmetry, *Symmetry* 13 (2021) 1356. doi: 10.3390/sym13081356.
- [326] F. A. Heberle, D. Marquardt, M. Doktorova, B. Geier, R. F. Standaert, P. Heftberger, B. Kollmitzer, J. D. Nickels, R. A. Dick, G. W. Feigenson, J. Katsaras, E. London, G. Pabst, Subnanometer Structure of an Asymmetric Model Membrane: Interleaflet Coupling Influences Domain Properties, *Langmuir* 32 (2016) 5195–5200. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b04562.
- [327] M. Uematsu, T. Shimizu, Raman microscopy-based quantification of the physical properties of intracellular lipids, *Commun. Biol.* 4 (2021) 1176. doi: 10.1038/s42003-021-02679-w.
- [328] R. D. Pensack, B. B. Michniak, D. J. Moore, R. Mendelsohn, Infrared Kinetic/Structural Studies of Barrier Reformation in Intact Stratum Corneum following Thermal Perturbation, *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 1399–1404. doi: 10.1366/000370206779321445.

- [329] C. Casals, O. Cañadas, Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818 (2012) 2550–2562. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.05.024.
- [330] B. Różycka-Roszak, P. Misiak, E. Woźniak, E. Zaczyńska, A. Czarny, K. A. Wilk, Effect of biocompatible gluconamide-type cationic surfactants on thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine/cholesterol bilayers, *Thermochim. Acta* 590 (2014) 219–225. doi: 10.1016/j.tca.2014.07.005.
- [331] S. Aleandri, M. G. Bonicelli, L. Giansanti, C. Giuliani, M. Ierino, G. Mancini, A. Martino, A. Scipioni, A DSC investigation on the influence of gemini surfactant stereochemistry on the organization of lipoplexes and on their interaction with model membranes, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 838–844. doi: j.chemphyslip.2012.11.003.
- [332] K. Komorowski, A. Salditt, Y. Xu, H. Yavuz, M. Brennich, R. Jahn, T. Salditt, Vesicle Adhesion and Fusion Studied by Small-Angle X-Ray Scattering, *Biophys. J.* 114 (2018) 1908–1920. doi: 10.1016/j.bpj.2018.02.040.
- [333] M. Muñoz-Úbeda, S. K. Misra, A. L. Barrán-Berdón, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, Why Is Less Cationic Lipid Required To Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA than Linear DNA in Gene Therapy?, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 18014–18017. doi: 10.1021/ja204693f.
- [334] W. Andrzejewska, M. Wilkowska, M. Chrabąszczewska, M. Kozak, The study of complexation between dicationic surfactants and the DNA duplex using structural and spectroscopic methods, *RSC Adv.* 7 (2017) 26006–26018. doi: 10.1039/C6RA24978G.
- [335] J. Carlstedt, D. Lundberg, R. S. Dias, B. Lindman, Condensation and Decondensation of DNA by Cationic Surfactant, Spermine, or Cationic Surfactant–Cyclodextrin Mixtures: Macroscopic Phase Behavior, Aggregate Properties, and Dissolution Mechanisms, *Langmuir* 28 (2012) 7976–7989. doi: 10.1021/la300266h.
- [336] T. Zhou, G. Xu, M. Ao, Y. Yang, C. Wang, DNA compaction to multi-molecular DNA condensation induced by cationic imidazolium gemini surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 414 (2012) 33–40. doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.08.060.
- [337] L. Feng, L. Xu, J. Hao, S. Dong, Controlled compaction and decompaction of DNA by zwitterionic surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 501 (2016) 65–74. doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.04.052.
- [338] E. R. Lacy, Recognition of Tmiddle dotG mismatched base pairs in DNA by stacked imidazole-containing polyamides: surface plasmon resonance and circular dichroism studies, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 1834–1841. doi: 10.1093/nar/30.8.1834.
- [339] L. Pérez, M. T. García, A. Pinazo, E. Pérez-Matas, Z. Hafidi, E. Bautista, Cationic Surfactants Based on Arginine-Phenylalanine and Arginine-Tryptophan: Synthesis, Aggregation Behavior, Antimicrobial Activity, and Biodegradation, *Pharmaceutics* 14 (2022) 2602. doi: 10.3390/pharmaceutics14122602.
- [340] R. Abedi Karjiban, N. S. Shaari, U. V. Gunasakaran, M. Basri, A Coarse-Grained Molecular Dynamics Study of DLPC, DMPC, DPPC, and DSPC Mixtures in Aqueous Solution, *J. Chem.* 2013 (2013) 1–6. doi: 10.1155/2013/931051.
- [341] W.T. Godbey, *An introduction to biotechnology: the science, technology and medical applications*, Elsevier/Academic Press, London, 2014.
- [342] S. Giatrellis, G. Nounesis, Nucleic acid-lipid membrane interactions studied by DSC, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3 (2011) 70–76. doi: 10.4103/0975-7406.76470.
- [343] A. Michanek, N. Kristen, F. Höök, T. Nylander, E. Sparr, RNA and DNA interactions with zwitterionic and charged lipid membranes — A DSC and QCM-D study, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1798 (2010) 829–838. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.12.009.



- [344] A. Yu. Antipina, A. A. Gurtovenko, Molecular-level insight into the interactions of DNA with phospholipid bilayers: barriers and triggers, *RSC Adv.* 6 (2016) 36425–36432. doi: 10.1039/C6RA05607E.
- [345] G. Angelini, M. Pisani, G. Mobbili, M. Marini, C. Gasbarri, Neutral liposomes containing crown ether-lipids as potential DNA vectors, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828 (2013) 2506–2512. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.06.003.
- [346] D. Lu, D. G. Rhodes, Binding of phosphorothioate oligonucleotides to zwitterionic liposomes, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1563 (2002) 45–52. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00384-X.
- [347] M. Nowakowski, A. Wiśniewska-Becker, J. Czapla-Masztafiak, J. Szlachetko, A. Budziak, Ż. Polańska, Z. Pietralik-Molińska, M. Kozak, W. M. Kwiatek, Cr(VI) permanently binds to the lipid bilayer in an inverted hexagonal phase throughout the reduction process, *RSC Adv.* 13 (2023) 18854–18863. doi: 10.1039/D2RA07851A.