

Marta ORCZYK, Kamil WOJCIECHOWSKI

e-mail: morczyk@ch.pw.edu.pl

Zakład Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

Porównanie wpływu naturalnych oraz syntetycznych surfaktantów na monowarstwę DPPC

Wstęp

Surfaktanty są amfipatycznymi cząsteczkami powszechnie stosowanymi m.in. jako emulgatory, detergenty oraz środki zwilżające i pianotwórcze. Ogólnoswiatowy rynek środków powierzchniowo czynnych wart jest 9,4 miliardów USD rocznie i szacuje się, że do końca tego wieku jego wartość wzrośnie o 35%. Współcześnie wykorzystywane środki powierzchniowo czynne są otrzymywane głównie na drodze syntetycznej. Jednak w niedalekiej przyszłości ze względu na wciąż rosnące wymagania ekologiczne należy oczekiwać odejścia od syntetycznych związków chemicznych i skierowania większej uwagi na substancje pochodzenia naturalnego [Desai i in., 1997].

Obecnie w szerokim zakresie prowadzone są badania, których celem jest określenie dokładnego wpływu surfaktantów pozyskiwanych z naturalnych źródeł (biosurfaktantów) zarówno na środowisko jak i organizm ludzki. Biosurfaktanty wykazują kilka korzystnych właściwości w stosunku do ich syntetycznych odpowiedników, m.in. niższą toksyczność, biokompatybilność, lepsze właściwości pianotwórcze, wysoką efektywność nawet przy skrajnych temperaturach, pH i zasoleniu, a także możliwość pozyskiwania z odnawialnych źródeł [Nitschke i in., 2007].

Ciekawą grupę biosurfaktantów rokujących duże nadzieje związane z zastąpieniem syntetycznych surfaktantów stanowią saponiny. Związki te należą do naturalnych związków chemicznych o charakterze glikozydowym. W ich strukturze wyróżnia się hydrofobowy aglikon (sapogeni-na) i hydrofilowy glikon (sacharyd) [Güçlü-Üstünda i in., 2007]. Związki te dzięki swojej amfifilowej budowie wykazują szereg przydatnych właściwości. Charakteryzują się silnymi właściwościami pianiącymi i emulgującymi. Dla wielu saponin pozyskanych z roślin stwierdzono także potencjalne działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe. Z tego powodu saponiny stanowią coraz częstszy obiekt badań w poszukiwaniu nowych farmaceutyków. Mimo potencjalnych zastosowań farmakologicznych niektóre saponiny posiadają niebezpieczną właściwość hemolityczną, wykluczającą na tym etapie zastosowanie ich jako farmaceutyków [Augustin i in., 2011]. Podsumowując można stwierdzić, że oddziaływanie saponin na organizm ludzki nie jest w pełni poznane i wynika konieczność prowadzenia badań nad jego mechanizmem.

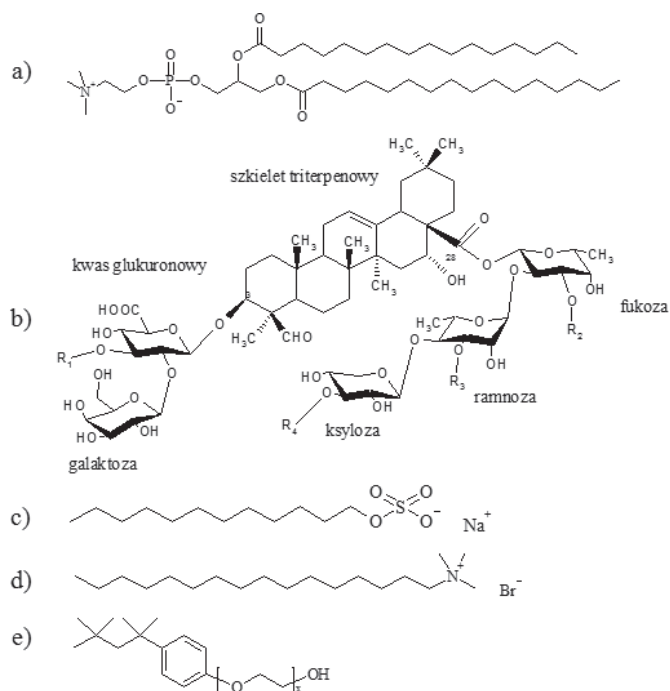
Procesy zachodzące w błonach lipidowych w istotnym stopniu decydują o funkcjonowaniu każdego organizmu komórkowego. Niewielkie nieprawidłowości w ich przebiegu i związane z nimi zmiany w budowie błony mogą mieć ogromne znaczenie dla życia komórek. Z tego powodu zrozumienie procesów samoorganizacji struktur w błonie lipidowej oraz ich wzajemnych zależności fizyko-chemicznych na różnym poziomie organizacji błony stanowi wciąż otwarty i inspirujący obszar badań naukowych. Posłużenie się modelowymi analogami w postaci np. SLB (Supported Lipid Bilayer), liposomów bądź warstw Langmuira może dostarczyć cennych informacji odnośnie procesów zachodzących na powierzchni membran biologicznych [Chan i in., 2007]. Monowarstwy Langmuira są wygodnym modelem pozwalającym badać właściwości, a także zachowanie się poszczególnych składników błon biologicznych przy wykorzystaniu szeregu technik np. mikroskopowych, spektroskopowych czy optycznych [Petty, 1996].

Celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływania surfaktantów syntetycznych (SDS, CTAB, Triton X-100) oraz biosurfaktantu – saponiny – *Quillaja saponaria* Molina (QBS) na monowarstwę modelowego fosfolipidu DPPC jako najprostszego układu symulującego błonę lipidową.

Badania doświadczalne

Materialy

Ekspertymy dotyczące wpływu (bio)surfaktantów na monowarstwy fosfolipidowe utworzone za pomocą techniki Langmuira przeprowadzono dla monowarstw fosfolipidu obojętnego - DPPC (dipalmitylofosfatydylocholina o czystości 99%), którego strukturę przedstawiono na rys. 1a. Do badań wykorzystano anionowy biosurfaktant pozyskiwany z kory drzewa *Quillaja saponaria* Molina (*Quillaja* bark saponin, QBS, 8–20% sapogenu) – rys. 1b oraz surfaktanty syntetyczne: anionowy laurylosiarczan sodu (SDS o czystości 99%) – rys. 1c, kationowy bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB o czystości 99%) – rys. 1d, oraz niejonowy Triton X-100 (9002-93-1) – rys. 1e. Wszystkie odczynniki użyte w eksperymentach zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich.



Rys. 1. Wzory strukturalne odczynników chemicznych używanych w doświadczeniach: a) DPPC, b) QBS, c) SDS, d) CTAB ($x = 9-10$), e) Triton X-100

Aparatura i metodyka

Ekspertymy przeprowadzono przy użyciu wanny Langmuira – Blodgett o powierzchni aktywnej $77,5 \text{ cm}^2$ (KSV NIMA). Pomiar zmian ciśnienia powierzchniowego w czasie (relaksacji ciśnienia powierzchniowego) prowadzono zarówno dla surfaktantów, tworzących w tym układzie warstwy Gibbsa, jak i dla monowarstw DPPC w obecności tychże surfaktantów. W trakcie pomiaru utrzymywano pozycje barier na stałym poziomie, a zmiany ciśnienia powierzchniowego monitorowane były przez godzinę. Podczas prowadzenia badań układ był termostatowany ($t = 21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$).

W przypadku pomiaru zdolności adsorpcyjnych surfaktantów (bez monowarstwy DPPC) wanna była napełniana roztworem odpowiedniego surfaktantu, po czym rozpoczynano pomiar ciśnienia powierzchniowego w czasie. W przypadku pomiarów w obecności DPPC, znaną ilość roztworu DPPC rozpuszczonego w chloroformie nanoszono najpierw na powierzchnię ultraczystej wody za pomocą mikrostrzykawki. Po od-

parowaniu rozpuszczalnika (15 min) monowarstwa była sprężana do ciśnienia początkowego $32,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Według doniesień literaturowych przy tym ciśnieniu upakowanie lipidów w monowarstwie jest porównywalne z tym, które występuje w naturalnych błonach komórkowych [Terzi i in., 1997]. W celu zbadania wpływu poszczególnych surfaktantów na monowarstwę DPPC utworzoną na granicy faz woda – powietrze, subfaza była wymieniana przy użyciu pompy perystaltycznej zaraz po odparowaniu chloroformu.

Na koniec każdego procesu relaksacji prowadzony był pomiar reologii powierzchniowej. Pozwalało to potwierdzić czy dany surfaktant wnika w monowarstwę czy raczej powoduje jej zniszczenie. W trakcie takiego pomiaru wywoływały cykliczne sprężanie i rozprężanie monowarstwy z określoną częstotliwością (0,1 Hz) oraz amplitudą (5%) i mierzony wywołane tym zmiany ciśnienia powierzchniowego. Moduł lepko-sprężystości powierzchniowej zdefiniowany jest jako:

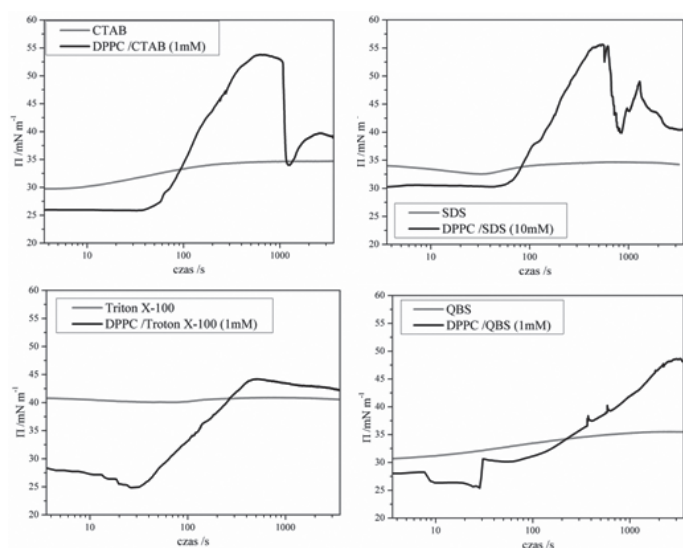
$$|E| = -\frac{d\pi}{dA} A \quad (1)$$

gdzie A oznacza powierzchnię przypadającą na jedną cząsteczkę przy danym ciśnieniu powierzchniowym π .

Wyniki badań i ich analiza

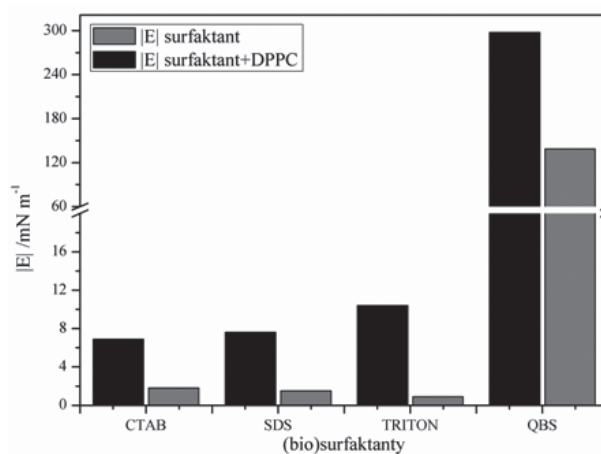
W ramach niniejszej pracy analizowano zdolność biosurfaktantu - saponiny QBS oraz surfaktantów syntetycznych – CTAB, Tritonu X-100 i SDS do adsorpcji na granicy faz ciecz/gaz (warstwy Gibbsa) oraz ich oddziaływanie z monowarstwami Langmuira zawierającymi modelowy fosfolipid DPPC. Otrzymane w ten sposób dane, opublikowane w pracy Wojciechowskiego i in. [2014], dotyczące właściwości powierzchniowych warstw Gibbsa dla roztworu saponiny QBS wskazują na jej znaczną aktywność powierzchniową, zbliżoną do aktywności powierzchniowej surfaktantów syntetycznych takich jak SDS, Triton X-100 i CTAB.

W kolejnym etapie porównano wpływ surfaktantów syntetycznych i biosurfaktanta na monowarstwę fosfolipidu DPPC (Rys. 2). By zapewnić szybką adsorpcję surfaktantów oraz istnienie miceli w subfazie zastosowano stężenia surfaktantów przekraczające ich cmc: 10^{-3} M dla Tritonu X-100, CTAB i QBS oraz 10^{-2} M dla SDS. Z rys. 2 widać, że wprowadzenie surfaktantów jonowych (SDS i CTAB) prowadzi do załamania monowarstwy DPPC, w przeciwieństwie do QBS i Tritonu X-100. W przypadku SDS i CTAB obserwowano nagły wzrost ciśnienia powierzchniowego jeszcze zanim doszło do całkowitej wymiany subfazy (co trwa ok. 15 min.). Po przekroczeniu ciśnienia przy którym czysta monowarstwa DPPC ulega załamaniu tj. $\approx 53 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, obserwowano drastyczne zmniejszenie wartości ciśnienia powierzchniowego. W przypadku Tritonu X-100 i QBS wzrost ciśnienia powierzchniowego jest zdecydowanie mniej znaczący.



Rys. 2. Relaksacja ciśnienia powierzchniowego dla monowarstwy DPPC sprężonej do ciśnienia początkowego $\Pi_0 = 32,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na subfazie wymienianej na QBS, Triton X-100, CTAB i SDS. Dla porównania na wykresach zamieszczono także zależność czasową ciśnienia powierzchniowego dla samych surfaktantów

Z kolei w przypadku właściwości reologicznych (Rys. 3) warstw surfaktantów oraz monowarstw DPPC w obecności surfaktantów obserwowano, że wartości modułu lepkości powierzchniowej, $|E|$, dla surfaktantów syntetycznych tj. SDS, Tritonu X-100 i CTAB są podobne do tych w obecności DPPC. Może to świadczyć o tym, że cząsteczki fosfolipidu są solubilizowane przez surfaktanty i usuwane z powierzchni. W przypadku surfaktantu QBS zaobserwowano odmienną odpowiedź, tj. wzrost wartości modułu $|E|$ w porównaniu z warstwą Gibbsa dla samego QBS oraz czystą monowarstwą DPPC ($204 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Wyniki te świadczą o tym, że cząsteczki QBS nie wymywają monowarstwy DPPC, a wręcz przeciwnie – wbudowują się w nią.



Rys. 3. Moduł lepko-sprężystości powierzchniowej $|E|$ warstw Gibbsa dla QBS (10^{-3} M), SDS (10^{-2} M), CTAB (10^{-3} M), Triton X-100 (10^{-3} M) w porównaniu z $|E|$ dla monowarstw DPPC w obecności tych samych surfaktantów

Wnioski

Analiza uzyskanych wyników $\Pi = f(t)$ pozwala stwierdzić, że surfaktanty syntetyczne oddziałują na modelową błonę utworzoną z DPPC w porównywalny sposób, tzn. usuwają DPPC z monowarstwy. W przeciwieństwie do nich, cząsteczki QBS wbudowują się w monowarstwę bez jej niszczenia. Potwierdzają to także wyniki uzyskane z pomiarów reologii powierzchniowej.

Na tym etapie jednak nie można stwierdzić jakie konsekwencje dla błony lipidowej ma wbudowanie się saponin. Ponadto ze względu na jej nietypowe, a zarazem interesujące zachowanie się, w stosunku do surfaktantów syntetycznych, niewątpliwie koniecznym jest prowadzenie pomiarów z użyciem monowarstw w lepszym stopniu odwzorowującym warstwę błony komórkowej. Jest to niezwykle istotne ze względu na fakt, że wciąż brakuje obiektywnych dowodów potwierdzających skuteczność i mechanizm działania tych związków.

LITERATURA

- Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B, Bak S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochem.*, **72**, 435-457. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015
- Chan Y.H.M., Boxer S.G., 2007. Model membrane systems and their applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 581-587. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.09.020
- Desai J.D., Banat I. M., 1997. Production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 47-64
- Güçlü-Üstünda Ö, Mazza G., 2007. Saponins: properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**, 231-258. DOI: 10.1080/10408390600698197
- Nitschke M., Costa S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 252-259. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.002
- Wojciechowski K., Orczyk M., Gutberlet T., Trapp M., Marcinkowski K., Kobiela T., Geue T., 2014. Unusual penetration of phospholipid mono- and bilayers by *Quillaja* bark saponin biosurfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 1931-1940. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.04.008
- Petty M.C., 1996. *Langmuir-Blodgett films*. CUP, Cambridge
- Terzi E., Hölzemann G., Seelig J., 1997. Interaction of Alzheimer β -amyloid peptide (1-40) with lipid membranes. *Biochemistry*, **36**, 14845-14852. DOI: 10.1021/bi971843e