



FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY
UNIVERZITY KOMENSKÉHO
v Bratislave

Mgr. Norbert Kučerka

**MALOUHLOVÝ ROZPTYL NEUTRÓNŮV
NA FOSFOLIPIDOVÝCH DVOJVRSTVÁCH
V UNILAMELÁRNÝCH LIPOZÓMOCH**

Autoreferát na získanie vedecko-akademickej hodnosti
philosophiae doctor

Bratislava, 2002

Vedecká rada Fakulty matematiky, fyziky a informatiky
Univerzity Komenského v Bratislave

Mgr. Norbert Kučerka

Autoreferát dizertačnej práce

MALOUHLOVÝ ROZPTYL NEUTRÓNŮV
NA FOSFOLIPIDOVÝCH DVOJVRSTVÁCH
V UNILAMELÁRNYCH LIPOZÓMOCH

na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
v odbore doktorandského štúdia: 11-57-9 biofyzika

Bratislava, 2002

Dizertačná práca bola vypracovaná v rámci externej formy doktorandského štúdia na Katedre biofyziky a chemickej fyziky FMFI UK v Bratislave

Predkladateľ: Mgr. Norbert Kučerka, Katedra chemickej teórie liečiv,
FaF UK, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava

Školiteľ: Prof. Pavol Balgavý, CSc., Katedra fyzikálnej chémie liečiv,
FaF UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

Oponenti:

Autoreferát bol rozoslaný dňa.....2002.

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa.....2002 ohod pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou predsedom spoločnej odborovej komisie dňa..... 11-57-9 biofyzika na FMFI UK v Bratislave, Mlynská dolina, Bratislava,

Prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.,
predseda spoločnej odborovej komisie
v odbore 11-57-9 biofyzika

I Prehľad o súčasnom stave problematiky

Biologická membrána zohráva v živom organizme nenahraditeľnú úlohu pri oddeľovaní vnútrobunkového priestoru od okolitého prostredia, ohraničuje taktiež jednotlivé organely vo vnútri bunky a tvorí prirodzenú hydrofóbnú bariéru v bunkách v celom organizme. Jej úloha však nie je len deliaca, ale táto bariéra je dynamická a zabezpečuje výmenu látok a informácií potrebných pre fungovanie jednotlivých procesov. Najrozšírenejšou súčasnou predstavou o štruktúre biologických membrán je dnes model fluidnej mozaiky [Singer a Nicolson, 1972], podľa ktorého je základnou zložkou membrány fosfolipidová dvojvrstva s integrálnymi a periférnymi bielkovinami sprostredkujúcimi prenos látok a informácií.

Hoci membránové bielkoviny ovplyvňujú interakcie medzi membránami ako aj medzi membránovými komponentami, je to amfifilný charakter lipidových molekúl, ktorý spôsobuje vytváranie dvojrozmernej kostry biologickej membrány. Navyše, schopnosť väčšiny lipidov zaujímať veľké množstvo rozdielnych konformácií a pohyblivosť ich jednotlivých častí sú predpokladom, prečo je tento systém excelentným prostredím pre zabudovanie membránových bielkovín. Pre porozumenie interakciám ovplyvňujúcim vlastnosti lipidov a dvojvrstiev je preto potrebný výskum systémov čistých fosfolipidových dvojvrstiev.

Je veľmi dobre známe, že hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy výrazne ovplyvňuje vlastnosti transmembránových bielkovín v nej zabudovaných (odkazy pozri v [Balgavý a spol., 2001a]). Najjednoduchšou metódou získavania hrúbky fosfolipidovej membrány je vyhodnocovanie difrakčných kriviek neutrónov, alebo synchrotrónového žiarenia na modelových dvojvrstvách fosfolipidov v lamelárnych fázach. Prítomnosť veľkých fluktuácií v plne hydratovanej lipidovej dvojvrstve v L_α fáze, ktorá je biologicky relevantným stavom lipidovej dvojvrstvy, vedie však v prípade RTG-žiarenia len k získaniu profilu elektrónovej hustoty, ktorý poskytuje dobrú mieru na určenie polohy fosfátovej skupiny a z nej vzdialenosti medzi dvomi píkmi, prislúchajúcimi dvom protihľým fosfátovým skupinám [Nagle a Tristram-Nagle, 2000]. Vedecká skupina na čele s J. F. Naglom už niekoľko rokov pracuje na získaní štruktúry dvojvrstiev zo syntetických lipidov v biologicky relevantnej plne hydratovanej L_α fáze [Nagle a Tristram-Nagle, 2000]. Problém malého počtu

pozorovateľných difrakčných poriadkov v prípade plne hydratovanej vzorky vyvolaný fluktuáciami v štruktúre multilamelárneho systému fosfolipidových dvojvrstiev používaných v týchto experimentoch, rieši použitím teórie tekutých kryštálov navrhutej v práci [Caille, 1972].

Iný prístup v riešení problému fluktuácií štruktúry v multilamelárnom systéme lipidových dvojvrstiev používa skupina O. Mouritsena [Lemmich a spol., 1996]. Oproti predchádzajúcemu prístupu, v ktorom je sledovanie cez fluktácie robené osobitne pre form faktor a štruktúrny faktor popísaný Caillého teóriou tekutých kryštálov, tu sa streduje výsledný produkt týchto dvoch faktorov. Podobný prístup bol aplikovaný aj na vyhodnocovanie rozptylových kriviek RTG-žiarenia na neorientovaných multilamelárnych lipozómoch pri plnej hydratácii v práci skupiny P. Laggenera [Pabst a spol., 2000].

Závažný dôvod prečo takéto systémy nepredstavujú vhodné modely biologickej membrány je, že experimentálne je príliš obtiažne rekonštituovať bielkoviny do lipidových dvojvrstiev v usporiadaných multilamelárnych sústavách a získať tak komplexnejšie modely biologickej membrány. Podstatne jednoduchšie je to možné v prípade unilamelárnych lipozómov.

Lipozómy sú uzatvorené sférické, alebo elipsoidné objekty vytvorené uzavretím lamelárnych fáz, pričom pri spontánnom vzniku lipozómov vznikajú zväčša multilamelárne útvary, ktoré je možné rôznymi experimentálnymi postupmi (ultrazvukovou sonikáciou, extrudovaním) rozbiť na unilamelárne lipozómy, obzvlášť vhodné pre štúdium ako modelové membrány. Takýmto objektom sa zaoberá napríklad prostredníctvom rozptylu RTG-žiarenia aj práca vedeckej skupiny pod vedením P. Laggenera [Laggener a spol., 1979]. Základom pre interpretáciu štruktúry systému je Pattersonova distribučná funkcia vzdialeností v reálnom priestore $p(r)$, ktorá je Fourierovou transformáciou rozptylovej krivky. Nevyžaduje si informáciu o fáze a pre fosfolipidovú dvojvrstvu vedie k pozitívnemu píku vo vzdialenosti, ktorá zodpovedá fosfátovej skupine. Rovnakým postupom vyhodnocujú experimentálne rozptylové krivky aj Lewis a Engelman v práci [Lewis a Engelman, 1983].

Hlavným nedostatkom metódy rozptylu RTG-žiarenia na unilamelárnych lipozómoch je problém s kontrastom vzorky, zvlášť v prípade komplexnejších systémov, v ktorých sú v dvojvrstve umiestnené aj bielkoviny. Bielkoviny aj

fosfolipidy rozptyľujú dopadajúce RTG-žiarenie takmer rovnako a je teda problém ich rozlíšiť. Okrem malej hodnoty kontrastu je teda pri tomto prístupe nevýhodou aj nemožnosť variácie kontrastu, ktoré poskytuje veľmi mocnú aplikáciu v prípade rozptylu neutrónov.

Prístup variácie kontrastu medzi rozptylom neutrónov na atómoch vzorky a na atómoch okolitého vodného prostredia umožňuje meniť experimentálne podmienky merania tak, že je možné dosiahnuť „zneviditeľnenie“ niektorej jej zložky. Vďaka veľkým rozdielom v rozptylovej amplitúde vodíka a deutéria je možné použiť metódu variácie kontrastu prostredníctvom použitia vodných zmesí s rôznymi zastúpeniami molekúl vody a ľažkej vody. Takto možno napríklad použiť roztok, ktorého rozptylová hustota bude rovnaká ako pre molekuly fosfolipidov dvojvrstvy a tak dosiahnuť „zneviditeľnenie“ dvojvrstvy a študovať len rozptyl na membránovej bielkovine, ako to urobili autori práce [Hunt a spol., 1997]. Metóda variácie kontrastu umožňuje študovať aj vnútornú štruktúru dvojvrstvy. S cieľom zistiť hrúbku polárnej oblasti fosfolipidovej dvojvrstvy ju ako prví použili Sadler a spol. [Sadler a spol., 1990], pričom menili izotopové zloženie aj vodnej aj lipidovej fázy.

Zakladateľom aplikácie malouhlového rozptylu neutrónov na fosfolipidovej dvojvrstve v unilamelárnych lipozómoch na určenie hrúbky dvojvrstvy je skupina pod vedením Sackmanna [Knoll a spol., 1981]. Experimentálne krivky vyhodnocujú v Guinierovej oblasti s použitím jednoduchého modelu. Predpokladajú, že dvojvrstvy v lipozómoch možno aproximovať sústavou náhodne orientovaných tenkých platní, hrúbka ktorých je veľmi malá v porovnaní s ich laterálnymi rozmermi a hustota rozptylu ktorých je v objeme homogénna. Práce založené na tomto metodickom prístupe urobili aj Sadler a spol. [Sadler a spol., 1990], Nawroth a spol. [Nawroth a spol., 1989], Gordeliy a spol. [Gordeliy a spol., 1993], Dubničková a spol. [Dubničková a spol., 1997], Gradzielsky a spol. [Gradzielski a Hoffmann, 1992] a mnohí iní.

Do druhej skupiny možno zaradiť práce, v ktorých sa pri interpretácii experimentálnych výsledkov predpokladá, že lipozómy sú duté gule a z hľadiska ich polomerov sú polydisperzné. Prvou takouto prácou bola práca Komuru a spol. [Komura a spol., 1982]. Zistili, že distribúciu polomerov lipozómov možno popísať Gaussovou funkciou. Pozdejšie iní autori použili na popis tejto distribúcie Schulzovu

rozdeľovaciú funkciu. Model polydisperzných dutých gúľ použili viacerí autori s predpokladom, že hustota rozptylu neutrónov na jadrách atómov dvojvrstvy je homogénna. Komura a spol. [Komura a spol., 1982], Mason a spol. [Mason a spol., 2000], Kiselev a spol. [Schmiedel a spol., 2002] a Pencer a Hallett [Pencer a Hallett, 2000] pomocou tohto modelu fitujú celú rozptylovú krivku a okrem hrúbky dvojvrstvy získavajú aj hodnotu polomeru lipozómov s parametrom charakterizujúcim jeho distribúciu. Balgavý a spol. [Balgavý a spol., 1998] a Pencer a spol. [Pencer a Hallett, 2000] fitujú rozptylovú krivku pomocou tohto modelu v Guinierovej oblasti, Balgavý a spol. pomocou gyračného polomeru a Pencer a Hallett hľadáním prvého maxima krivky vynesenej v grafe závislosti IQ^4 od Q . Pri takomto prístupe je ale potrebné získať hodnoty polomeru lipozómov a jeho rozdelenia z iných experimentov.

Nezávisle na sebe, v nedávnej dobe Balgavý a spol. [Balgavý a spol., 2001b] a Schmiedel a spol. [Schmiedel a spol., 2002] upozornili, že predpoklad homogénnej hustoty rozptylu v dvojvrstve môže viesť ku skresleným výsledkom, keď sú získané takouto interpretáciou rozptylových kriviek. Obidve skupiny preto rozčleňujú dvojvrstvu na polárnu a nepolárnu oblasť a predpokladajú, že polárna oblasť okrem polárnych fragmentov fosfolipidov obsahuje aj molekuly vody. Podobných prác obsahujúcich nové myšlienky a ponúkajúcich presnejšie vyhodnocovanie experimentálnych kriviek relevantnejšími modelmi nie je veľa. Väčšina prác sa uspokojuje s použitím nejjednoduchšieho modelu fosfolipidovej dvojvrstvy, v ktorom sa potláča jej vnútorná štruktúra ako aj rôzne iné dôležité parametre modelu a študujú sa lipozómy dispergované len v ťažkej vode. Situáciu v štúdiu štruktúry plne hydratovaných lipidových dvojvrstiev kriticky zhodnotili ku koncu roku 2000 vo svojej prehľadnej práci Nagle a Tristram-Nagle [Nagle a Tristram-Nagle, 2000].

Okrem štúdia čistých fosfolipidových dvojvrstiev, úlohy štúdia biologických membrán spočívajú v určení vplyvu vonkajšieho prostredia vrátane vplyvu rôznych prímiesí. Malé hydrofóbne a amfifilné molekuly interagujú s fosfolipidovou dvojvrstvou a ako prímiesné molekuly menia jej fyzikálne vlastnosti. Väčšinu chemických liečiv, či inak biologicky aktívnych molekúl možno zaradiť medzi prímiesné molekuly ovplyvňujúce štruktúru dvojvrstiev. Na Farmaceutickej fakulte Univerzity Komenského sa vplyv amfifilných molekúl na štruktúru lipidových

dvojvrstiev študuje niekoľko rokov rôznymi fyzikálnymi metódami, najmä difrakciou RTG-žiarenia, NMR a EPR spektroskopiou, mikrokalorimetriou a inými. Najdôležitejšie výsledky boli zhrnuté v dizertačných prácach Gallovej [Gallová, 1993], Uhríkovej [Uhríková, 1993], Andriamaintyho [Andriamainty, 1996] a Dubničkovej [Dubničková, 2001] a v prehľadnej práci Balgavého a Devínskeho [Balgavý a Devínsky, 1996]. V mojej dizertačnej práci som sa venoval štúdiu vplyvu *n*-dekánu, ako jednoduchej malej hydrofóbnej molekuly, na hrúbku fosfolipidových dvojvrstiev a *N*-alkyl-*N,N*-dimetylamín-*N*-oxidov, ako typických amfifilných molekúl na hrúbku dvojvrstiev a ich stabilitu v unilamelárnych lipozónoch. Výber týchto prímiesnych molekúl mal dve príčiny. Na jednej strane je to ich jednoduchá chemická štruktúra a na druhej strane ich významné biologické účinky. Amfifilné *N*-alkyl-*N,N*-dimetylamín *N*-oxidy majú antimikróbne [Devínsky a spol., 1990], imunomodulačné [Bukovský a spol., 1996] a fytotoxické [Murín a spol., 1990] vlastnosti, a *n*-alkány modulujú vlastnosti iónových kanálov [Elliott a spol., 1985; Haydon a spol., 1977a; Haydon a spol., 1977b], transportných membránových bielkovín [Franks a Lieb, 1978] a sú tiež všeobecnými anestetikami [Balgavý a Devínsky, 1996].

II Ciele dizertačnej práce

Predkladaná dizertačná práca a jej téma bola inšpirovaná štúdiami biologickej membrány a vplyvu rôznych prímiesnych molekúl na jej vlastnosti, stabilitu a funkciu, aké prebiehajú vo farmaceutickom výskume. Ich snahou je pochopiť mechanizmy a účinky molekúl pôsobiacich ako liečivá, či inak biologicky účinné látky. Využitie získaných poznatkov je potom možné použiť pri hľadaní a vývoji nových liečiv s lepšími vlastnosťami pri minimálnych nežiadúcich účinkoch.

Objektom tejto dizertačnej práce sú fosfolipidové dvojvrstvy v unilamelárnych lipozónoch predstavujúcich modelovú štruktúru membrány. Ich charakteristickým fyzikálnym parametrom je najmä hrúbka dvojvrstvy. Ako experimentálna technika vhodná na sledovanie daných objektov bol zvolený rozptyl neutrónov pod malými uhlami, ktorý je schopný poskytnúť informácie aj o vnútornej štruktúre dvojvrstvy. Ako vyplynulo z prehľadu literatúry, na efektívne použitie tejto metódy bolo potrebné

rozpracovať najmä nové modely a metódy vyhodnocovania experimentálnych údajov. Prácu je možné rozdeliť na päť základných častí, ktorých cieľmi je:

1. navrhnuť teoretické modely štruktúry dvojvrstvy v lipozónoch a pomocou matematického aparátu fyziky odvodiť príslušné teoretické vzťahy popisujúce malouhlový rozptyl neutrónov na týchto štruktúrach;
2. vypracovať programy na počítačové vyhodnocovanie experimentálnych kriviek rozptylu neutrónov pomocou odvodených vzťahov;
3. otestovať teoretické modely a počítačové programy pomocou údajov so známou distribúciou hustoty rozptylu neutrónov v dvojvrstve;
4. aplikovať teoretické modely a počítačové programy na vyhodnotenie experimentálnych údajov rozptylu neutrónov na lipozónoch z diacylfosfatidylcholínov;
5. študovať vplyv *n*-dekánu a *N*-alkyl-*N,N*-dimetylamín-*N*-oxidov na unilamelárne fosfatidylcholínové lipozomy.

III Metodická časť

Syntetické 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-fosfocholíny (diC_{n:m}PC, n=počet uhlíkov a m=počet dvojných väzieb v acylovom reťazci) boli od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Od tejto firmy bol získaný aj diC_{16:0}PC_D62; symbol D62 označuje, že 62 vodíkových atómov acylových reťazcov je substituovaných deutériom. Ťažká voda s udávanou izotopovou čistotou 99.98 % ²H₂O bola od Izotopu (Moskva, Ruská Federácia). Cholát sodný a *n*-dekán boli od firmy Sigma (St. Luis, USA). *N*-alkyl-*N,N*-dimetylamín-*N*-oxidy boli pripravené a poskytnuté na štúdium Prof. Ing. Dr.h.c. F. Devínskym, Dr.Sc.. Fosfatidylcholín z vaječných žĺtkov (EYPC) izolovali a prečistili RNDr. J. Gallová, CSc. a RNDr. D. Uhríková, CSc. a poskytlí mi ho k štúdiu. Organické spektrálne čisté rozpúšťadlá boli od firmy Slavus, alebo Mikrochem (Bratislava). Ostatné chemikálie boli od firmy Lachema (Brno, Česká Republika).

Vo väčšine prípadov boli unilamelárne lipozomy pripravené pretláčaním multilamelárnych lipozómov cez dva polykarbonátové filtre s pórmí o priemere 50

nm podľa MacDonalda a spol. [MacDonald a spol., 1991] extrúderom LiposoFast Basic Extruder (Avestin, Ottawa, Canada). Multilamelárne lipozómy boli pripravené dispergováním lipidu vo vodnej fáze. *N*-alkyl-*N,N*-dimetylamín-*N*-oxidy sa pridávali k suchému lipidu v metanole. Následne sa nechalo rozpúšťať adlo odpariť. Pridaním vodnej fázy sa vytvorila disperzia, ktorá sa nakoniec extrudovala ako je popísané vyššie.

V prípade unilamelárnych lipozómov obsahujúcich v dvojvrstve *n*-dekán boli zvolené dva postupy. V jednom sa *n*-dekán pridal priamo k vysušenému lipidu a zmes sa homogenizovala mechanicky centrifugáciou v zatavenej skúmavke. Po homogenizácii sa pripravila disperzia v ťažkej vode a jej extrudovaním unilamelárne lipozómy, tak ako je to popísané vyššie. V druhom postupe sa pripravili unilamelárne lipozómy metódou dilúcie cholátu. Cholát sodný a diC_{18:1}PC boli rozpustené v metanole pri mólovom pomere 1:1. Metanol bol odparený prúdom dusíka a odparok vysušený vo vákuu. Vysušená zmes sa dispergovala v roztoku NaCl (0,135 mol/l) v ťažkej vode tak, aby koncentrácia diC_{18:1}PC bola 0,1 mol/l. Vznikol tak číry roztok zmesných micel lipidu a cholátu. Tento micelárny roztok sa skokom vyriedil v 0,135 mol/l roztoku NaCl v ťažkej vode tak, aby výsledná koncentrácia diC_{18:1}PC bola 8 mmol/l. V priebehu 2-3 hodín po vyriedení postupne rástla opalescencia. Potom vzorky stáli 30 hodín pri laboratórnej teplote. K pripraveným unilamelárnym lipozómom sa pridával *n*-dekán rozpustený v metanole tak, aby objem metanolu (30 μl) bol malý v porovnaní s objemom vzorky (1-2 ml). Po pridaní metanolu boli vzorky premiešané prudkým vortexovaním a potom stáli otvorené pri laboratórnej teplote, aby sa maximálne množstvo metanolu odparilo. Nakoniec boli vzorky prefúkané čistým plynným dusíkom a potom uzavreté.

Lamelárna L_α fáza obsahujúca *n*-dekán bola pripravená takto: K vysušenému EYPC v sklenej skúmavke sme pomocou mikrostriekačky Hamilton pridali *n*-dekán. Skúmavka bola zatavená a jej obsah homogenizovaný opakovanou centrifugáciou. Po homogenizácii bola skúmavka otvorená, jej obsah prenesený do inej čistej skúmavky a k nemu bola mikrostriekačkou pridaná redestilovaná voda. Skúmavka bola zatavená a jej obsah homogenizovaný ako je popísané vyššie. Zloženie vzoriek sme po každom kroku kontrolovali gravimetricky.

Meranie rozptylových kriviek prebiehalo na malouhlovom spektrometri YuMO inštalovanom na pulznom reaktore IBR-2 v Laboratóriu neutrónovej fyziky Spojeného ústavu jadrového výskumu v Dubne (Ruská Federácia) [Ostanevich, 1987; Vagov a spol., 1983]. Použitý spektrometer je zariadením s kruhovými pozičnými detektormi plnenými plynom ^3He [Ananyev a spol., 1978; Ostanevich, 1987]. Meraná rozptylová krivka je korigovaná vzhľadom na efekty od pozadia a účinný prierez neutrónov je získavaný kalibráciou vanádivým štandardom [Ostanevich, 1987]. Vzorky sa počas merania nachádzajú v kremennej kvete s hrúbkou 2 mm, pri meraniach v rôznych kontrastoch 1 mm. Pri týchto hrúbkach vzorky a koncentráciách lipidu do 2 hm. % možno zanedbať absorpciu neutrónov vo vzorke [Cherezov, 1997].

Prístrojová technika použitá na meranie RTG-difraktogramov pripravených vzoriek lamelárnej $L\alpha$ fázy a postup pri meraní boli rovnaké ako je popísané v prácach [Balgavý a spol., 1998; Balgavý a spol., 2001c]. Difraktogramy boli zmerané pri teplote 20°C . Reciprokú vzdialenosť s sme kalibrovali pomocou štandardu behenátu strieborného [Huang a spol., 1993]. Z reciprokej vzdialenosti difrakčných maxím sme vypočítali mriežkový parameter d s využitím Braggovho vzťahu. Z mriežkového parametra lamelárnej fázy sme vypočítali plochu pripadajúcu na jednu molekulu EYPC na medzifázovom rozhraní dvojvrstvy – vodná fáza a hrúbku dvojvrstvy podľa Luzzatiho [Luzzati, 1968].

Dôležitou etapou v mojej práci bol výber vyhodnocovacej procedúry. Venoval som sa najmä trom postupom vyhodnocovania. Prvý z nich je založený na Guinierovej aproximácii rozptylovej krivky, kde možno priamo získať parameter hrúbky dvojvrstvy. Tento postup sa však viaže na použitie jednoduchého modelu dvojvrstvy, ktorý potláča informáciu o jej vnútornej štruktúre. Druhým skúmaným postupom vyhodnocovania experimentálnych rozptylových kriviek bol prevzatý od Pencera a Halletta [Pencer a Hallett, 2000], ktorý navrhli alternatívnu metódu založenú na hľadaní prvého lokálneho maxima na grafe závislosti Iq^4 versus q na intervale $q \in (0.03; 0.10) \text{ \AA}^{-1}$. Tento postup vyplýva z teoretického zákona asymptotického správania sa rozptylovej krivky. V treťom prístupe vo vyhodnocovaní experimentálne získaných rozptylových kriviek bolo použitie exaktnej formuly pre funkciu intenzity rozptylu a ňou sme fitovali rozptylovú krivku na celom intervale zmeraných hodnôt rozptylového vektora.

IV Výsledky a diskusia

IV.1 Modely fosfolipidovej dvojvrstvy

Najjednoduchším a v literatúre najčastejšie používaným modelom fosfolipidovej dvojvrstvy je tzv. „single-shell“ model (model 1). Ide o model predstavovaný jednou vrstvou s hodnotou hustoty rozptylovej dĺžky neutrónov vzatou ako priemer cez dvojvrstvu. Prvá korekcia k tomuto modelu vychádzala z hydrofóbných interakcií amfifilných molekúl fosfolipidu, tvorených hydrofóbnou a hydrofilnou časťou, čím vznikol model s tromi rozdielnymi homogénnymi vrstvami (model 3). Opierajúc sa o chemickú štruktúru molekúl fosfolipidov sme doplnili rozdelenie hydrofóbných uhl'ovodíkových reťazcov na oblasť metylénových skupín a oblasť terminálnych metylových skupín (model 5). Ďalšia korekcia predpokladá v priebehu hustoty rozptylovej dĺžky neutrónov v polárnej oblasti dvojvrstvy lineárnu funkciu zapríčinenú postupným narastaním množstva prítomných molekúl vody (modely 3L a 5L). Vylepšením tejto korekcie bolo ďalej uvažovať nielen s lineárne sa meniacou koncentráciou molekúl vody vo vnútri dvojvrstvy, ale aj s trojuholníkovým profilom samotného polárneho fragmentu molekuly lipidu (modely 3T a 5T).

Vhodnosť navrhovaných modelov sme zisťovali porovnávaním profilu fosfolipidovej dvojvrstvy reprezentovanej príslušným modelom s predlohovým profilom získaným z teoretickej simulácie dvojvrstvy postupmi molekulovej dynamiky skupinou Feller [Armen a spol., 1998]. Vstupné údaje boli distribučné funkcie pre jednotlivé funkčné skupiny diC_{16:0}PC vo fluidnej dvojvrstve pri 50°C. Z týchto distribučných funkcií bol vypočítaný profil rozptylovej hustoty v dvojvrstve s krokom približne 0,1 Å. Z porovnania s týmto profilom vyplynulo, že najbližšie reálnej dvojvrstve je najčlenitejší model s trojuholníkovým profilom polárneho fragmentu molekuly.

IV.2 Testovanie vyhodnocovacích postupov a modelov dvojvrstvy

Vyhodnocovacie postupy a modely dvojvrstvy sme testovali vyhodnocovaním rozptylovej krivky simulovanej počítačom. Krivka sa simulovala pre unilamelárne lipozómy so stredným polomerom 300 Å, Gaussovou distribúciou polomerov 91,15 Å a s profilom rozptylovej hustoty dvojvrstvy získaným z údajov molekulej dynamiky ako je uvedené vyššie. Takto simulovanú rozptylovú krivku sme vyhodnocovali ako experimentálnu krivku a porovnávali sme údaje získané vyhodnocovaním (hrúbka dvojvrstvy d_L , plocha lipidu A_L , počet molekúl vody na lipid v polárnej oblasti N_L) so vstupnými údajmi.

Bežne používaný prístup pri Guinierovej aproximácii rozptylovej krivky je vyhodnocovanie postavené na gyačnom polomeri, ktorý sa získa podľa Kratkeho a Poroda z lineárnej aproximácie závislosti Iq^2 versus q^2 na vhodnom intervale q . Týmto spôsobom je možné priamo určiť hrúbku dvojvrstvy len na úrovni modelu I . Pri detailnejšie delenom modeli je už nutné použiť väčšie množstvo vstupných údajov, alebo systém parametrizovať zařixovaním hodnoty jedného z parametrov. Nezávisle na použitom modeli dvojvrstvy (okrem modelu I) sme zistili, že vyhodnocovanie rozptylovej krivky založené na Guinierovej aproximácii je možné úspešne použiť, keď sa systém parametrizuje známymi údajmi o objemoch jednotlivých fragmentov molekuly, konštantnou známou hodnotou hrúbky polárnej oblasti, známou strednou hodnotou polomeru lipozómov a disperziou charakterizujúcou ich polydisperznosť. Svedčí o tom relatívna odchýlka získaných výsledkov od vstupných hodnôt parametrov, ktorá najväčšiu hodnotu dosahovala na úrovni 10 %.

Druhou použitou metódou vyhodnocovania simulovaných dát bolo fitovanie rozptylovej krivky na celom intervale hodnôt rozptylového vektora $\frac{1}{q}$. Vyhodnotením získaných výsledkov sme zistili, že opäť sa od ostatných hodnôt výrazne líšia hodnoty parametrov získané prostredníctvom modelu I , ktorého vnútorná štruktúra je príliš nedokonalá. Pri použití členitejších modelov boli získané súbory hodnôt s malými rozptylmi, pre ktoré platia rovnaké závery ako v predchádzajúcom odseku. Vyplýva z nich, že testovanú metódu je možné, rovnako ako predchádzajúci prístup, úspešne použiť pri vyhodnocovaní experimentálnych údajov. Jej výhodou navyše je, že

v tomto prípade boli hodnoty parametrov získané bez obmedzovacieho fixovania viacerých parametrov a teda pri väčšej voľnosti modelu.

Porovnanie výsledkov získaných použitím Guinierovej aproximácie a fitovaním rozptylovej krivky potvrdzuje zhodu medzi výsledkami získanými dvomi rozličnými postupmi. Tento fakt zobrazuje nezávislosť výsledkov na použití jednej z týchto dvoch techník, ale rozdielnosť pri zvolených modeloch reprezentácie vnútornej štruktúry fosfolipidovej dvojvrstvy. Výsledkom tohto testovania je preto záver, že výber modelu dvojvrstvy bude pri získavaní hodnoverných údajov najdôležitejším faktorom.

Variácia kontrastu

Našou snahou bolo modifikovať z literatúry známy postup a využiť dôkladnejšiu reprezentáciu študovaného objektu prostredníctvom nami navrhnutých modelov. Pri testovaní metódy Guinierovej aproximácie sme zistili, že navrhovaný postup vyhodnocovania SANS experimentov je metódou s veľmi vysokou senzitivitou v parametri R_g . S ohľadom na tento fakt by bolo potrebné získať hodnotu gyračného polomeru s takou presnosťou, ktorá presahuje možnosti experimentálneho merania.

Základnú myšlienku predchádzajúceho prístupu sme využili v procedúre vyhodnocovania dát fitovaním rozptylovej krivky na celom intervale hodnôt rozptylového vektora \vec{q} . Modifikácia metódy na použitie viacerých kontrastov v rozptylovej hustote spočívala v simultánnom fitovaní všetkých experimentálnych kriviek. Zhodnotením získaných výsledkov sme pozorovali zlepšenie ich zhody so vstupnými hodnotami parametrov modelu, čo sa prejavilo poklesom relatívnej hodnoty tohto rozdielu. Najväčšia relatívna odchýlka, ktorú sme zistili bola len necelé 4 %.

Záverom je zhodnotenie, že použitie experimentálnej techniky variácie kontrastu a vyhodnocovanie metódou fitovania rozptylovej krivky je prístupom, ktorý spomedzi testovaných prístupov poskytuje najpresnejšie výsledky. Podľa očakávania sa táto presnosť zlepšuje s množstvom použitých kontrastov.

IV.3 Experimentálne výsledky

IV.3.1 Unilamelárne lipozómy z diacylfosfatidylcholínov

Zo systematického sledovania vplyvu použitia rôznych vyhodnocovacích postupov, modelov dvojvrstvy a vstupných parametrov sme vyhodnocovaním experimentálnej rozptylovej krivky unilamelárnych lipozómov z diC_{14:0}PC pri teplote 30 °C zistili nasledovné výsledky. Ak sa vyhodnocuje rozptylová krivka v Guinierovej oblasti, potom konečný výsledok nezávisí na tom, či sa popíše rozptyl na lipozómoch ako na polydisperzných dutých guľiach, alebo ako na náhodne orientovaných tenkých vrstvách. V prípade modelu polydisperzných dutých guľí nemá na konečný výsledok vplyv model akým sa popíše ich polydisperzia. Pri rovnakej zafixovanej hrúbke polárnej oblasti dvojvrstvy sa pomocou modelov $5L$ a $5T$ dvojvrstvy získa rovnaká plocha A_L , ale v prípade $5T$ sú hodnoty N_L a d_L signifikantne nižšie. Pomocou modelov 5 a $5L$ sa síce získajú blízke intervaly hodnôt N_L , ale hodnoty A_L a d_L sa signifikantne odlišujú. Nakoniec, z porovnania výsledkov získaných vyhodnocovaním metódami podľa Kratkeho a Poroda (KP) a Pencera a Hallea (MKP) vyplýva, že stredné hodnoty parametrov N_L , A_L a d_L sú blízke, ale výsledky získané metódou MKP sú zaťažené väčšou experimentálnou chybou.

V ďalšom experimente sme použili experimentálnu techniku variácie kontrastu. Z nameraných rozptylových kriviek unilamelárnych lipozómov z diC_{14:0}PC a diC_{16:0}PC pri teplote 65 °C sme získali hodnoty $d_L=41.2$ Å, $A_L=59.0$ Å² a $N_L=3.2$ pre diC_{14:0}PC a $d_L=45.1$ Å, $A_L=62.7$ Å² a $N_L=5.9$ pre diC_{16:0}PC.

Pre nasledujúci experiment sme zvolili postup merania rozptylových kriviek, keď sa mení kontrast nielen zmenou vo vodnej fáze, ale aj v lipidovej fáze. Použili sme unilamelárne lipozómy z diC_{16:0}PC dispergované v zmesiach ²H₂O a H₂O s rôznym pomerom a rovnako aj unilamelárne lipozómy z diC_{16:0}PC-D62 dispergované v rovnakých zmesiach. Z výsledkov sme zistili, že s prechodom dvojvrstvy z gélového do fluidného tekuto-kryštalického stavu rastie A_L , znižuje sa d_L , rastie N_L a d_P mierne poklesne.

V ďalšom experimente sme sa zamerali na vplyv dĺžky acylových reťazcov fosfolipidov tvoriacich dvojvrstvu. Zmerali sme krivky rozptylu neutrónov na

extrúdovalých lipozómoch z diC_{12:0}PC, diC_{14:0}PC a diC_{18:0}PC pri rovnakej redukovanej teplote, ako boli v práci [Lewis a Engelman, 1983] zmerané rozptylové krivky RTG-žiarenia. Zistili sme, že jednoduchým spôsobom získaná hodnota d_L priamo z experimentálnych údajov bez toho, aby sa pri vyhodnocovaní brali do úvahy objemové parametre fragmentov molekúl lipidov a prenikanie molekúl vody do polárnej oblasti dvojvrstvy, je vhodná na sledovanie relatívnych zmien hrúbky dvojvrstvy, prinajmenšom rovnako dobre ako hodnota d_{HH} (vzdialenosť fosfátových skupín na protiľahlých stranách dvojvrstvy) získaná z rozptylu RTG-žiarenia. Z vyhodnotenia zmeraných kriviek stupňovitým modelom profilu dvojvrstvy sme zistili, že vzdialenosť fosfátovej skupiny d_{H1} od hranice s hydrofóbnou oblasťou dvojvrstvy rastie s rastom dĺžky acylového reťazca od $d_{H1}=4,30\pm 0,20$ Å pre diC_{10:0}PC až po $d_{H1}=5,32\pm 0,11$ Å pre diC_{18:0}PC, z čoho vyplýva, že dĺžka acylového reťazca má vplyv nielen na hrúbku dvojvrstvy, ale aj na konformáciu polárneho fragmentu.

Na rozdiel od predchádzajúceho sme ďalší experiment uskutočnili nie pri rovnakej redukovanej teplote, ale v rovnakej fáze (fluidnej) a rovnakej teplote, čo sú podmienky rovnakého termodynamického stavu dvojvrstiev z rôznych fosfolipidov [Nagle a Tristram-Nagle, 2000]. Použili sme extrúdované lipozómy z diC_{12:0}PC, diC_{14:0}PC, diC_{16:0}PC a diC_{18:0}PC pri teplote 65 °C, keď sú dvojvrstvy pre všetky štyri použité molekuly vo fluidnej fáze. Keď sme hrúbku dvojvrstvy vyhodnotili tým najjednoduchším spôsobom priamo z R_g , z lineárnej závislosti d_L na počte atómov uhlíka sme dostali hrúbku polárnej oblasti $d_p=12,3\pm 3,2$ Å a zmenu hrúbky dvojvrstvy na jednu metylénovú skupinu acylového reťazca $\Delta d_L=1,78\pm 0,21$ Å. Keď sme reprezentovali dvojvrstvu modelom $5T$, dostali sme hodnotu $\Delta d_L=1,73\pm 0,16$ Å. Z týchto údajov vidieť, že pokiaľ je potrebné sledovať len relatívne zmeny v hrúbke dvojvrstvy, plne postačuje počítat' d_L priamo z R_g a netreba používať komplikované modely. Hodnoty N_L a A_L vykazujú maximum pre diC_{16:0}PC. Navyše sme zistili, že hodnota hrúbky polárnej oblasti dvojvrstvy klesá s rastom dĺžky acylového reťazca. Z toho jasne vyplýva, že dĺžka acylového reťazca vplyva na usporiadanie fosfolipidu v polárnej oblasti dvojvrstvy a plocha pripadajúca na jednu molekulu sa pri rovnakej teplote (65 °C) zväčšuje s predlžovaním molekuly.

V ďalšom experimente sme sa zamerali na časť homologického radu molekúl diC_{n:1}PC. Meranie rozptylových kriviek bolo uskutočnené pri teplote 30 °C. Opäť sme overili dôležitý záver, že keď je potrebné získať len relatívne zmeny d_L, postačuje vyhodnocovať rozptylové krivky aj len tým najjednoduchším spôsobom priamo z R_g. Rovnako ako v predošlom experimente aj v tomto prípade hodnoty N_L a A_L vykazovali maximum pri diC_{18:1}PC a fitovaním celej experimentálnej krivky sme zistili, že hrúbka polárnej oblasti ani v tomto prípade nemusí byť konštantná d_p od diC_{14:1}PC po diC_{16:1}PC najprv poklesla, ale potom po diC_{20:1}PC rástla podobne ako v prípade diC_{n:0}PC.

Napriek problémom s parametrizáciou vyhodnocovacích postupov, ktoré sú rovnaké ako pri vyhodnocovaní difrakčných experimentov v prácach renomovaných autorov, výsledky predchádzajúcich experimentov jednoznačne svedčia o tom, že metóda malouhlového rozptylu neutrónov je schopná poskytnúť výsledky nielen porovnateľné, ale v mnohých smeroch hlbšie, ako difrakčné metódy.

IV.3.2 Vplyv prímiesnych molekúl na štruktúru fosfolipidovej dvojvrstvy

N-alkyl-N,N-dimetylamin-N-oxidy

V prvom experimente sme sledovali vplyv molekuly *N*-oxidu so stredne dlhým alkylovým reťazcom (C₁₂NO) na hrúbku a stabilitu fosfolipidovej dvojvrstvy tvorenej molekulami diC_{18:1}PC v unilamelárnych lipozómoch. Zistili sme, že s rastom koncentrácie C₁₂NO sa dvojvrstvy destabilizovali a vznikali z nich postupne najprv tubulárne zmesné micely a nakoniec aj sféroidné zmesné micely. Na základe vyhodnocovania však nebolo možné vylúčiť, že tubulárne zmesné micely vznikajú nie priamo z dvojvrstiev unilamelárnych lipozómov, ale z dvojvrstiev veľkých diskoidných zmesných miciel. V intervale pomeru koncentrácií, kde sme predpokladali unilamelárne lipozómy resp. zmesné diskoidné micely s veľkými laterálnymi rozmermi, sme určili parameter hrúbky dvojvrstvy d_g. Jeho hodnoty v intervale pomerov koncentrácií C₁₂NO:diC_{18:1}PC=<0,25; 1,5> klesali, v intervale <0,25; 1,0> približne lineárne. Smernica tejto lineárnej závislosti bola Δd_g=-2,9±0,6 Å.

Rovnaký experiment sme uskutočnili s *N*-oxidom s dlhým alkylovým reťazcom ($C_{18}NO$). Z grafu vynesenej závislosti bolo možné vidieť postupný plynulý prechod od dvojvrstiev v unilamelárnych lipozómoch, respektíve v diskoidných zmesných micelách, až po objekty tubulového tvaru. Ďalej sme pozorovali, že s rastom pomeru koncentrácií d_g zvolna klesá, čo poukazuje na postupné zmenšovanie sa hrúbky dvojvrstvy. Keď sme fitovali hodnoty d_g podobne ako v predchádzajúcom prípade, dostali sme smernicu $\Delta d_g = -1.24 \pm 0.15 \text{ \AA}$, ktorej absolútna hodnota je menšia ako pre $C_{12}NO$, ale aj tak svedčí o výraznom zmenšení hrúbky dvojvrstvy.

V ďalších pokusoch bol rovnakým postupom sledovaný vplyv C_nNO ($n=6, 8, 10, 12, 14, 16$ a 18) na dvojvrstvy $diC_{18:1}PC$ pri hodnotách pomerov koncentrácií $C_nNO:diC_{18:1}PC=0,4$ a $6,0$. Výsledky získané rovnakým vyhodnocovacím postupom ako v predošlých experimentoch sú v zhode s predpokladom, že pri nízkej koncentrácii C_nNO sa ich vplyv na dvojvrstvu neprejaví jej destabilizáciou a vznikom zmesných miciel. Bolo vidieť, že pri zvolenom pomere parameter d_g od $n=6$ po $n=8$ vzrástol a potom po $n=18$ klesal. Pre systémy pri vysokom pomere koncentrácií $C_nNO:diC_{18:1}PC$ sme zistili, že nie je možné jednoznačne rozhodnúť o tvare objektov sledovaného systému. Z výsledkov vyplynulo, že prítomnosť molekúl C_nNO vo vysokej koncentrácii výrazne ovplyvňuje vlastnosti štruktúry dvojvrstvy a jej stabilitu v unilamelárnych lipozómoch.

n-dekán

V experimentoch zameraných na štúdium vplyvu *n*-alkánov na fosfolipidové dvojvrstvy sme sa venovali *n*-dekánu (C_{10}). Študovali sme jeho vplyv na fosfolipidové dvojvrstvy v lamelárnej fluidnej fáze L_α z EYPC pri teplote $20^\circ C$ a mólových pomeroch $H_2O:EYPC \approx 20$ a $C_{10}:EYPC \leq 2,13$ pomocou difracie RTG-žiarenia. Hodnota A_L sa pre mólové pomery $C_{10}:EYPC < 1$ s rastúcim množstvom C_{10} v dvojvrstve nemenila, ale pri vyšších mólových pomeroch až po $C_{10}:EYPC \leq 2,13$ mierne rástla, hodnota d_L rástla v celom rozsahu študovaných mólových pomerov až po $C_{10}:EYPC \leq 2,13$, ale smernica $\Delta d_L / \Delta(C_{10}:EYPC)$ sa v oblasti $C_{10}:EYPC > 1$ zmenšovala s rastúcou koncentráciou C_{10} . Hlavný záver je, že *n*-dekán zväčšuje hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy v lamelárnej fáze EYPC. Nelinearitu d_L a nárast A_L možno vysvetliť jednoduchým schématickým modelom, podľa ktorého sa *n*-dekán v dvojvrstve lokalizuje najprv v jej hydrofóbnom strede, čím d_L s koncentráciou

n-dekánu rastie, ale A_L sa nemení. S ďalším rastom koncentrácie *n*-dekánu sa väčšina jeho molekúl lokalizuje v strede fosfolipidovej dvojvrstvy ako v predošlom prípade, ale zvyšná časť aj medzi acylovými reťazcami fosfolipidov, čoho dôsledkom je menší nárast d_L a zároveň rastie A_L .

Aký je vplyv *n*-dekánu na fosfolipidovú dvojvrstvu, najmä na jej hrúbku, v unilamelárnych lipozómoch z diC_{18:1}PC sme sledovali v ďalšom experimente. Hodnoty d_g indikovali, že hrúbka dvojvrstvy ostáva na intervale pomerov koncentrácií C₁₀:diC_{18:1}PC < 0,5 konštantná v rámci experimentálnej chyby a pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie C₁₀ až po mólový pomer C₁₀:diC_{18:1}PC = 1,2 rastie. Predpokladáme preto, že na rozdiel od lamelárnej fázy sú molekuly *n*-dekánu lokalizované pri C₁₀:diC_{18:1}PC < 0,5 pravažne paralelne s acylovými reťazcami lipidu a až pri vyšších mólových pomeroch v jej hydrofóbnom strede.

Porovnaním výsledkov získaných z experimentov na lamelárnych fázach a z experimentov so sférickými lipozómami bolo možné vidieť rôzny vplyv *n*-dekánu na hrúbku dvojvrstvy. Kým v planárnych dvojvrstvách sa vplyvom *n*-dekánu ich hrúbka menila výrazne, v zakrivených dvojvrstvách bol tento efekt podstatne menší. Tento výsledok naznačuje, že rozdiel medzi unilamelárnymi lipozómami a multilamelárnymi systémami môže byť v zakrivení dvojvrstvy, ktorá spôsobuje inú lokalizáciu alkánu.

V Závery

1.) Modely fosfolipidovej dvojvrstvy

Na základe počítačových simulácií boli postupne navrhnuté modely: „single-shell“, „multi-shell“ (3 a 5), „multi-shell“ s lineárnym profilom polárnej oblasti (3L a 5L) a „multi-shell“ s trojuholníkovým profilom polárnej oblasti (3T a 5T).

2.) Testovanie vyhodnocovacích postupov a modelov dvojvrstvy

Zistili sme, že vyhodnocovanie rozptylovej krivky založené na Guinierovej aproximácii je možné úspešne použiť, rovnako je vhodná aj metóda fitovania celej krivky rozptylu. Jej výhodou navyše je, že hodnoty parametrov môžu byť získané bez ďalšej obmedzujúcej parametrizácie. Modifikácia týchto prístupov pre techniku variácie kontrastu sa v použitých podmienkach ukázala ako nevhodná pre metódu

Guinierovej aproximácie a v prípade fitovania celej experimentálnej krivky sa ukázala ako prístup, ktorý spomedzi testovaných procedúr poskytuje najpresnejšie výsledky.

3.) Experimentálne výsledky

Unilamelárne lipozómy z diacylfosfatidylcholínov

Meraním extrúdovaných lipozómov z fosfolipidov $diC_{n,0}PC$ a $diC_{n,1}PC$ pri rôznych teplotách sme zistili, že:

- výsledky nezávisia na použitom modeli lipozómov a ich polydisperzie, ale rozdiely sú vo výsledkoch získaných použitím rôznych modelov reprezentácie dvojvrstvy;
- dĺžka acylového reťazca má vplyv nielen na hrúbku dvojvrstvy, ale aj na konformáciu polárneho fragmentu a vplýva tiež na usporiadanie fosfolipidu v dvojvrstve; plocha pripadajúca na jednu molekulu sa pri rovnakej teplote (65 °C) zväčšuje s predlžovaním molekuly;
- s prechodom dvojvrstvy z gélového do fluidného tekuto-kryštalického stavu rastie A_L , znižuje sa d_L , rastie N_L a d_P mierne poklesne.

Vplyv prímiesnych molekúl na štruktúru fosfolipidovej dvojvrstvy

N-alkyl-N,N-dimetylamín-N-oxidy

- s rastom koncentrácie C_nNO sa dvojvrstvy destabilizujú a vznikajú z dvojvrstiev v unilamelárnych lipozómoch, respektíve v diskoidných zmesných micelách postupne najprv tubulárne zmesné micely a nakoniec aj sféroidné zmesné micely;
- pri nízkej koncentrácii C_nNO sa ich vplyv na dvojvrstvu neprejavil jej destabilizáciou a pri vysokom pomere koncentrácií nebolo možné jednoznačne rozhodnúť o tvare objektov sledovaného systému, ale len o výraznom vplyve na štruktúru dvojvrstvy a jej stabilitu.

n-dekán

- v planárnych dvojvrstvách sa vplyvom *n*-dekánu ich hrúbka menila výrazne;
- v zakrivených dvojvrstvách bol tento efekt podstatne menší.

Tieto výsledky naznačujú, že rozdiel medzi unilamelárnymi lipozómami a multilamelárnymi systémami môže byť v zakrivení dvojvrstvy, ktorá spôsobuje inú lokalizáciu alkánu.

VI Zoznam literatúry citovanej v autoreferáte

- Ananyev, B.N., A.B.Kunchenko, V.I.Lazin a E.Ya.Pikelner 1978 JINR Communication 3-11502.
- Andriamainty, F. 1996 PhD. Thesis, Faculty of Pharmacy, J. A. Comenius University, Bratislava.
- Armen, R.S., O.D.Uitto a S.E.Feller 1998 Biophys.J. 75: 734-744.
- Balgavý, P. a F.Devínsky 1996 Adv.Colloid Interface Sci. 66: 23-63.
- Balgavý, P., M.Dubničková, N.Kučerka, M.A.Kiselev, S.P.Yaradaikin a D.Uhríková 2001a Biochim.Biophys.Acta 1512: 40-52.
- Balgavý, P., M.Dubničková, D.Uhríková, S.P.Yaradaikin, M.A.Kiselev a V.I.Gordeliy 1998 Acta Phys.Slov. 48: 509-533.
- Balgavý, P., N.Kučerka, V.I.Gordeliy a V.G.Cherezov 2001b Acta Phys.Slov. 51: 53-68.
- Balgavý, P., D.Uhríková, J.Karlovská, M.Dubničková, N.Kučerka, F.Devínsky, I.Lacko, J.Čižmárik, K.Lohner, G.Degovics, G.Rapp, S.P.Yaradaikin, M.Kiselev, A.Islamov a V.Gordeliy 2001c Cell Mol.Biol.Lett. 6: 283-290.
- Bukovský, M., D.Mlynarčík a V.Ondračková 1996 Int.J.Immunopharmacol. 18: 423-426.
- Caille, A. 1972 C.R.Acad.Sc.Paris Série B 274: 891-893.
- Cherezov, V.G. 1997 PhD. Thesis, Moscow Physico-Technical Institute.
- Devínsky, F., A.Kopecká-Leitmanová, F.Šeršeň a P.Balgavý 1990 J.Pharm.Pharmacol. 42: 790-794.
- Dubničková, M. 2001 PhD. Thesis, Faculty of Pharmacy, J. A. Comenius University, Bratislava.
- Dubničková, M., M.Kiselev, S.Kutuzov, F.Devínsky, V.Gordeliy a P.Balgavý 1997 Gen.Physiol Biophys. 16: 175-188.
- Elliott, J.R., D.A.Haydon, B.M.Hendry a D.Needham 1985 Biophys.J. 48: 617-622.
- Franks, N.P. a W.R.Lieb 1978 Nature 274: 339-342.
- Gallová, J. 1993 PhD. Thesis, Faculty of Mathematics and Physics, Comenius University, Bratislava.

- Gordeliy, V.I., L.V. Golubchikova, A. Kuklin, A.G. Strykh a A. Watts 1993
 Progr. Colloid Polym. Sci. 93: 252-257.
- Gradzielski, M. a H. Hoffmann 1992 Adv. Colloid Interface Sci. 42: 149-173.
- Haydon, D.A., B.M. Hendry, S.R. Levinson a J. Requena 1977a Biochim. Biophys. Acta
 470: 17-34.
- Haydon, D.A., B.M. Hendry, S.R. Levinson a J. Requena 1977b Nature 268: 356-358.
- Huang, T.C., H. Toraya, T.N. Blanton a Y. Wu 1993 J. Appl. Crystallogr. 26: 180-184.
- Hunt, J.F., P.D. McCrea, G. Zaccai a D.M. Engelman 1997 J. Mol. Biol. 273: 1004-1019.
- Knoll, W., K. Ibel a E. Sackman 1981 Biochemistry 20: 6379-6383.
- Komura, S., Y. Toyoshima a T. Takeda 1982 Jpn. J. Appl. Phys. 21: 1370-1372.
- Laggner, P., A.M. Gotto, Jr. a J.D. Morrisett 1979 Biochemistry 18: 164-171.
- Lemmich, J., K. Mortensen, J.H. Ipsen, T. Honger, R. Bauer a O.G. Mouritsen 1996
 Phys. Rev. E 53: 5169-5180.
- Lewis, B.A. a D.M. Engelman 1983 J. Mol. Biol. 166: 211-217.
- Luzzati, V. 1968: X-Ray Diffraction Studies of Lipid-Water Systems. Biological
 membranes. (Ed.: D. Chapman), Academic Press, London, 71-124.
- MacDonald, R.C., R.I. MacDonald, B.P. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao a L.R. Hu
 1991 Biochim. Biophys. Acta 1061: 297-303.
- Mason, P.C., B.D. Gaulin, R.M. Epand a J. Katsaras 2000 Phys. Rev. E 61: 5634-5639.
- Murín, A., F. Devínsky, A. Koleková a I. Lacko 1990 Biológia (Bratislava) 45: 521-
 531.
- Nagle, J.F. a S. Tristram-Nagle 2000 Biochim. Biophys. Acta 1469: 159-195.
- Nawroth, T., H. Conrad a K. Dose 1989 Physica B (Amsterdam): 477-480.
- Ostanevich, Yu.M. 1987 JINR-Dubna: 1-14.
- Pabst, G., M. Rappolt, H. Amenitsch a P. Laggner 2000 Phys. Rev. E 62: 4000-4009.
- Pencer, J. a F.R. Hallett 2000 Phys. Rev. E 61: 3003-3008.
- Sadler, D.M., F. Reiss-Husson a E. Rivas 1990 Chem. Phys. Lipids 52: 41-48.
- Schmiedel, H., P. Jörchel, M. Kiselev a G. Klose 2002 J. Phys. Chem. B 105: 111-117.
- Singer, S.J. a G.L. Nicolson 1972 Science 175: 720-731.
- Uhríková, D. 1993 PhD Thesis, Univerzita Komenského, Bratislava.
- Vagov, V.A., A.B. Kunchenko, Yu.M. Ostanevich a I.M. Salamatin 1983 JINR
 Communication P14-83-898.

VII Zoznam publikácií autora dizertácie súvisiacich s danou problematikou

N.Kučerka, **Bilayer thickness and penetrated water in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine liposomes.**

(Book of Abstracts, 7th International Summer School on Biophysics, Rovinj, September, 14-25, 2000, p.: 101).

Uhríková, D., Balgavý, P., Kučerka, N., Islamov, A., Gordeliy, V., Kuklin, A. **Small-angle neutron scattering study of the *n*-decane effect on the bilayer thickness in extruded unilamellar dioleoylphosphatidylcholine liposomes.**

(Biophys. Chem. 88 (2000) 165-170).

P.Balgavý, N.Kučerka, V.I.Gordeliy, V.G.Cherezov, **Evaluation of small-angle neutron scattering curves of unilamellar phosphatidylcholine liposomes using a multishell model of bilayer neutron scattering length density.**

(Acta Physica Slovaca 51 No.1 (2001) 53-68) .

P. Balgavý, M. Dubničková, N. Kučerka, M.A. Kiselev, S.P. Yaradaikin and D. Uhríková, **Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: A small-angle neutron scattering study.**

(Biochim. et Biophys. Acta 1512(1) (2001) 40-52).

N. Kučerka, D. Uhríková, I. Lacko, F. Devínsky, P. Balgavý, **Small angle neutron scattering study of the effects of N-dodecyl-N,N-dimethylamine N-oxide on the unilamellar liposome solubilization and lipid bilayer thickness.**

(HERCULES, Grenoble, France, March 4 - April 11, 2001, *poster*).

N. Kučerka, D. Uhríková, I. Lacko, F. Devínsky, P. Balgavý, **Small angle neutron scattering study of the effects of N-dodecyl-N,N-dimethylamine N-oxide on the unilamellar liposome solubilization and lipid bilayer thickness.**

(Book of Abstracts, XXIV. Medical Biophysics Days, Mozolov, Czech Republik, May 30 – June 1, 2001, p.: 63).

D.Uhríková, N. Kučerka, A. Islamov, V. Gordeliy, P. Balgavý, **Small-Angle Neutron Scattering Study of *N*-Dodecyl-*N,N*-dimethylamine *N*-Oxide Induced Solubilization of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers in Liposomes.**

(Gen. Physiol. Biophys. 20 (2001) 183-189).

P. Balgavý, D. Uhríková, J. Karlovská, M. Dubničková, N. Kučerka, F. Devínsky, I. Lacko, J. Čižmárik, K. Lohner, G. Degovics, G. Rapp, S. Yaradaikin, M. Kiselev, A. Islamov, V. Gordeliy, **X-ray diffraction and neutron scattering studies of amphiphile-lipid bilayer organization.**

(Cell. Molec. Biol. Letters 6 (2001) 283-290).

N. Kučerka, D.Uhríková, A. Islamov, V. Gordeliy, P. Balgavý, **Lipid bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar DPPC liposomes evaluated from small-angle neutron scattering curves measured at different contrasts.**

(ChemistryPreprintServer(2002) <http://preprint.chemweb.com/physchem/0201012>).

N.Kučerka, J.Gorshkova, A.Islamov, V.Gordeliy, P.Balgavý, F.Devínsky, **Determination of DMPC surface area and bilayer thickness from SANS on unilamellar vesicles.**

(Book of abstracts, XIV International Biophysics Congress, Buenos Aires, Argentina, April 27 - May 1, 2002, p.: 28).

P.Balgavý, D.Uhríková, N.Kučerka, A.Islamov, A.Kuklin and V.Gordeliy, **Effect of *n*-decane on the lipid bilayer thickness in unilamellar dioleoylphosphatidylcholine liposomes prepared by the cholate dilution method: small-angle neutron scattering study.**

(ChemistryPreprintServer(2002) <http://preprint.chemweb.com/physchem/0206002>).

N.Kučerka, A.Islamov, V.Gordeliy, P.Balgavý, **DPPC bilayer thickness and surface area in unilamellar liposomes: SANS results obtained by contrast variation.**

(XII International Conference on Small-Angle Scattering, Venice, Italy, August 25-29, 2002, p.: 107).

N.Kučerka, M.A.Kiselev, P.Balgavý, **Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods.**

(European Biophysical Journal, *in preparation*).

N.Kučerka, D.Uhříková, J.Karlovská, P.Balgavý, **Interakcia n-dekánu s fosfatidylcholínovými dvojrstvami.**

(Farmaceutický Obzor, *in press*).

VIII Summary

The presented thesis deals with the study of properties of phospholipid bilayer in unilamellar liposomes used as model of lipid part of biological membranes, and with their interaction with small amphiphilic and hydrophobic molecules.

The simplest method of obtaining bilayer thickness is the evaluation of small-angle X-ray scattering or small-angle neutron scattering (SANS) on lamellar phases of phospholipids according to Luzzati. In this approach, the scattering length density across the bilayer is constant and the water molecules do not penetrate into the inside of bilayers. This single shell model neglects the inner structure of the bilayer. Therefore, it was developed a more realistic model of phospholipid bilayer in the present study. It is a multishell model, which divides the bilayer into several parts: the polar head group region and the nonpolar hydrocarbon region, not necessarily homogenous. It is assumed, that some limited number of water molecules penetrate the head group region, too.

Another aim of the thesis was to develop a procedure for evaluation of experimentally measured scattering curves. Different vesicle models and polydispersity of their sizes used in SANS data evaluation were tested, as well as different methods of fitting of experimental data. It was shown, that the polydispersity representation affects the obtained values minimally, but the choice of bilayer model representation affects the results crucially. Tested procedure based on parameter of Guinier approximation – radius of gyration R_g and using the single shell model according to Luzzati provides the bilayer thickness which is a good measure when

studying its relative changes. To obtain more precise results, it is necessary to use more precise models.

It was found that the relevant information about phospholipid molecule hydration is located in the part of scattering curve with not good enough statistics. Therefore, to increase incoming information and to obtain more precise bilayer parameters, a new modification of experimental measurements was proposed. It is based on the contrast variation technique, which is a powerful application for experiments with low spatial resolution such as SANS. In this modification, the scattering curves of the same object are obtained at several contrasts and then fitted simultaneously with values of bilayer model parameters to be the same for all measured samples.

Using the proposed bilayer model, evaluation procedure and experimental technique, the basic physical parameters of bilayer were obtained – bilayer thickness, polar region thickness, lipid surface area and number of water molecules located in the polar region. These parameters were obtained for unilamellar liposomes prepared from several diacylphosphatidylcholines with saturated and monounsaturated acyl chains and measured at different thermodynamic conditions (gel and/or fluid state).

The interactions between the phospholipid bilayer and small molecules and their effect on the properties and stability of the bilayer were studied too. Since the procedure according to Luzzati gives a good measure of bilayer thickness, it was possible to monitor relative changes in bilayer thickness. Using these data, the effects of *N*-alkyl-*N,N*-dimethylamine-*N*-oxides and *n*-decane were studied and their location in the bilayer was proposed.