

**Štúdium interakcie *n*-dekánu s fosfatidylcholínovými dvojvrstvami pomocou difrakcie rtg. žiarenia**

N. KUČERKA<sup>1</sup>, D. UHRÍKOVÁ<sup>2</sup>, J. KARLOVSKÁ<sup>2</sup>, P. BALGAVÝ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra chemickej teórie liečiv a <sup>2</sup>Katedra fyzikálnej chémie liečiv Farmaceutickej fakulty UK, Bratislava

## **Súhrn**

Študovali sme vplyv *n*-dekánu (C10) na fosfolipidové dvojvrstvy v lamelárnej fluidnej fáze  $L_{\alpha}$  chromatograficky čistého vaječného fosfatidylcholínu (EYPC) pri 20°C a mólových pomeroch  $H_2O:EYPC \approx 20$  a  $C10:EYPC \leq 2,13$  pomocou difracie rtg. žiarenia. Plocha  $A_L$  pripadajúca na jednu molekulu EYPC na medzifázovom rozhraní dvojvrstva – vodná fáza sa pre mólové pomery  $C10:EYPC < 1$  s rastúcim množstvom C10 v dvojvrstve nemení, ale pri vyšších mólových pomeroch až po  $C10:EYPC \leq 2,13$  mierne rastie. Hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy  $d_L$  rastie v celom rozsahu študovaných mólových pomerov až po  $C10:EYPC \leq 2,13$ , ale smernica  $\Delta d_L / \Delta(C10:EYPC)$  sa v oblasti  $C10:EYPC > 1$  znižuje s rastúcou koncentráciou C10. Z výsledkov vyplýva, že C10 je pri  $C10:EYPC < 1$  vytvára hydrofóbnu oblasť v strede dvojvrstvi EYPC, zatiaľ čo pri vyšších mólových pomeroch sa orientuje aj rovnobežne s acylovými reťazcami EYPC.

**Kľúčové slová:** všeobecné anestetiká – fosfolipidová dvojvrstva - *n*-dekán – fosfatidylcholín – rtg difrakcia

Normálne alkány sú všeobecné anestetiká. Ich anestetická účinnosť vykazuje tzv. “cut-off” efekt - rastie s dĺžkou uhl'ovodíkového reťazca, dosahuje maximum pre *n*-dodekán a potom prudko klesá (1). Molekulový mechanizmus ich účinku nie je známy. Haydon a spol. vo svojich prácach (2-4) predpokladajú, že *n*-alkány primárne interagujú s fosfolipidovou dvojvrstvou, menia jej hrúbku a táto zmena hrúbky sekundárne ovplyvňuje vlastnosti sodíkového (či iného iónového) kanála. Cut-off efekt vysvetľujú tým, že *n*-alkány s krátkymi uhl'ovodíkovými reťazcami sa zabudovávajú do stredu hydrofóbnej oblasti fosfolipidovej dvojvrstvy medzi terminálne metylové skupiny uhl'ovodíkových reťazcov fosfolipidov a tým zväčšujú hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy; v prípade *n*-alkánov dlhších ako *n*-dodekán však dochádza k zníženiu ich rozpustnosti, takže hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy sa nemení a preto ani nedochádza k ovplyvneniu kanála, ktorý je v nej zabudovaný. Iný model navrhli Franks a Lieb (5-7). Predpokladajú, že miestom účinku *n*-alkánov nie je fosfolipidová dvojvrstva, ale priamo bielkoviny. Podľa ich súčasnej predstavy sú to geneticky príbuzné, rýchle ligandom riadené iónové kanály v centrálnych synapsiách, ako napr. receptory acetylcholínu (nAChR), kyseliny  $\gamma$ -aminomaslovej (GABA<sub>A</sub>), glycínu a serotonínu (5HT<sub>3</sub>). V týchto bielkovinách sa vyskytujú amfifilné dutiny konečných rozmerov, do ktorých sa anestetiká viažu. Účinnosť anestetík vzrastá, keď sa ich veľkosť postupne približuje veľkosti dutiny, cut-off efekt sa prejaví, keď veľkosť molekuly anestetika prekročí veľkosť tejto dutiny. Väzba anestetika do takejto dutiny stabilizuje štruktúru bielkoviny a bráni tak konformačným zmenám, ktoré sú potrebné pre jej normálnu biologickú funkciu. Túto predstavu podporujú výsledky viacerých autorov, ktorým sa podarilo ovplyvniť bodovými mutáciami veľkosť takýchto väzbových miest a tým aj citlivosť receptorov na anestetiká rôznych rozmerov. Podarilo sa aj pripraviť syntetický polypeptid obsahujúci len 62 aminokyselinových zvyškov, ktorý vytvára diméry so štyrmi  $\alpha$ -špirálami dlhými po 27 aminokyselinových zvyškov; hydrofóbne aminokyselinové zvyšky týchto štyroch špirál sú obrátené k sebe a vytvárajú tak dutinu, do ktorej sa viaže anestetikum (8).

Podobná situácia je aj pri vysvetľovaní účinku *n*-alkánov na aktivitu (Ca-Mg)ATPázy zo sarkoplazmatického retikula. Tento transmembránový enzým je mimoriadne citlivý na hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy, do ktorej je zabudovaný. Keď sa inkorporuje napr. do dvojvrstiev unilamelárnych lipozómov zo syntetických

fosfatidylcholínov s mononenasýtenými acylovými reťazcami, jeho aktivita je najvyššia keď acylové reťazce majú 18-20 atómov uhlíka a klesá s ich skracovaním alebo predlžovaním (9). Účinok *n*-dekánu na aktivitu tohto enzýmu závisí na dĺžke acylového reťazca fosfolipidu - v prípade acylov kratších ako je optimálna dĺžka *n*-dekán aktivitu enzýmu stimuluje, v prípade optimálnych a dlhších acylov aktivitu inhibuje. Johansson a spol. (10) podobne ako Haydon a spol. (2-4) predpokladajú, že *n*-dekán zväčšuje hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy a tým moduluje aktivitu tohto enzýmu. Podarilo sa však experimentálne dokázať, že *n*-dekán sa viaže na hydrofóbne väzbové miesta (Ca-Mg)ATPázy, takže jeho účinok môže byť vyvolaný aj jeho priamou interakciou s bielkovinou a nielen sprostredkované zmenou hrúbky dvojvrstvy (11).

Je prekvapujúce, že hoci sa pri vysvetľovaní biologických účinkov *n*-alkánov operuje s ich vplyvom na hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy, poznatky o tomto vplyve vôbec nie sú jednoznačné. Merania hrúbky planárnych dvojvrstiev vytvorených z roztokov lipidov v *n*-alkánoch na otvoroch v teflónovej prepážke oddeľujúcej dva vodné kompartmenty (12, 13) sú v zhode s modelom Haydona a spol. (2-4). McIntosh a spol. (14) pomocou difrakcie rtg. žiarenia na multilamelách z dipalmitoylfosfatidylcholínu (DPPC), dilauroylfosfatidylcholínu (DLPC) a z vaječného fosfatidylcholínu (EYPC) zistili, že dlhé *n*-alkány (14-16 uhlíkov) prakticky neovplyvňujú hrúbku fosfolipidových dvojvrstiev, zatiaľ čo krátke *n*-alkány ju zvyšujú. Na rozdiel od Haydona a spol. ale predpokladajú, že nie znížená rozpustnosť, ale orientácia dlhých *n*-alkánov paralelne s acylovými reťazcami fosfolipidov je príčinou ich minimálneho vplyvu na hrúbku dvojvrstvy; krátke *n*-alkány by mali hrúbku dvojvrstvy zvyšovať, lebo sú na rozdiel od dlhých lokalizované v strede dvojvrstvy. V rozpore s týmto zistením sú výsledky Pope a spol. (15), ktorí nepozorovali vplyv *n*-hexánu, *n*-oktánu a *n*-dodekánu na mriežkový parameter multilamelárnej fázy z dimyrystoylfosfatidylcholínu (DMPC). V prípade multilamelárnych lipozómov z DMPC Tajima a spol. (16) nedávno zistili, že *n*-oktán a *n*-hexadekán mriežkový parameter dokonca znižujú. Obidve skupiny autorov vysvetľujú svoje výsledky tým, že krátke aj dlhé *n*-alkány sa síce zabudovávajú do fosfolipidovej dvojvrstvy, ale sú v nej orientované paralelne s acylovými reťazcami fosfolipidov, takže nedochádza k zväčšeniu hrúbky dvojvrstvy, výrazne však rastie plocha dvojvrstvy.

V našej práci sme sa rozhodli overiť, ako *n*-dekán (C10) ovplyvňuje mriežkový parameter  $d$ , hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy  $d_L$  a plochu pripadajúcu na jeden

fosfolipid  $A_L$  na medzifázovom rozhraní dvojvrstvy – vodná fáza. Význam parametrov  $d$  a  $d_L$  je zrejmý zo schématického znázornenia fosfolipidových dvojvrstiev v lamelárnej fáze na Obr. 1. V práci používame prírodný fosfatidylcholín izolovaný z vaječných žĺtkov, ktorý sa nachádza vo fyziologicky relevantnom fluidnom stave v širokom rozsahu hydratácie a teploty (17). K stanoveniu  $d$ ,  $d_L$ ,  $d_W$  a  $A_L$  používame difrakciu röntgenového žiarenia.

## **Pokusná časť**

### ***Použité chemikálie***

Fosfatidylcholín z vaječných žĺtkov (EYPC) sme izolovali, purifikovali a analyzovali tenkovrstvovou chromatografiou podľa Singletona a spol. (18). Jeho relatívna mólová hmotnosť 779.7 g/mol bola vypočítaná zo zloženia jeho acylových reťazcov, ako je uvedené v práci Filípka a spol. (19). Použili sme chromatografické fólie Silufol (Kavalier, Sázava), *n*-dekán (Merck, Darmstadt, Nemecko) a organické rozpúšťadlá metanol, etanol, acetón, petroléter a chloroform (Mikrochem, Bratislava). Ostatné chemikálie ( $Al_2O_3$ ) sme zakúpili od firmy Lachema (Brno). Všetky komerčné chemikálie boli čistoty p.a., vodu a organické rozpúšťadlá s výnimkou *n*-dekánu sme pred použitím redestilovali.

### ***Pracovný postup***

K vysušenému EYPC v sklenej skúmavke sme pomocou mikrostriekačky Hamilton pridali C10. Skúmavka bola zatavená a jej obsah homogenizovaný opakovanou centrifugáciou. Po homogenizácii bola skúmavka otvorená, jej obsah prenesený do inej skúmavky a k nemu pridaná redestilovaná voda. Skúmavka bola zatavená a jej obsah homogenizovaný ako je popísané vyššie. Zloženie vzoriek sme po každom kroku kontrolovali gravimetricky.

### ***Prístrojová technika***

Prístrojová technika použitá na meranie röntgenových difraktogramov pripravených vzoriek a postup pri meraní boli rovnaké ako je popísané v práci (20). Difraktogramy boli zmerané pri teplote 20°C. Reciprokú vzdialenosť  $s$  sme kalibrovali pomocou štandardu behenátu strieborného (21).

## Výsledky

### *Mriežkový parameter lamelárnej fázy*

Z reciprokej vzdialenosti difrakčných maxím sme vypočítali mriežkový parameter  $d$  s využitím Braggovho vzťahu. Zmeraná závislosť mriežkového parametra  $d$  na mólovom pomere C10:EYPC pre dva rôzne mólové pomery H<sub>2</sub>O:EYPC je uvedená na Obr. 2. V prípade obidvoch mólových pomerov H<sub>2</sub>O:EYPC bolo možné túto závislosť aproximovať lineárnou funkciou. Smernica tejto lineárnej funkcie  $\Delta d/\Delta(\text{C10:EYPC})$  udáva zmenu  $d$  pre mólový pomer C10:EYPC=1:1. Pre mólový pomer H<sub>2</sub>O:EYPC=100:1 sme dostali  $\Delta d/\Delta(\text{C10:EYPC})=0,081\pm 0,015$  nm a pre mólový pomer H<sub>2</sub>O:EYPC=20:1  $\Delta d/\Delta(\text{C10:EYPC})=0,075\pm 0,006$  nm, čiže v rámci experimentálnej chyby sú tieto smernice rovnaké. Keďže  $n$ -dekán sa ako hydrofóbná molekula inkorporuje do hydrofóbnej oblasti fosfolipidovej dvojvrstvy, tento výsledok naznačuje, že v rozsahu hydratácie dvojvrstvy H<sub>2</sub>O:EYPC od 20:1 do 100:1 je jeho vplyv na dvojvrstvy EYPC rovnaký.

### *Plocha lipidu na medzifázovom rozhraní a hrúbka dvojvrstvy*

Z mriežkového parametra lamelárnej fázy sme vypočítali plochu pripadajúcu na jednu molekulu EYPC na medzifázovom rozhraní dvojvrstvy – vodná fáza podľa Luzzatiho (22) pomocou rovníc

$$A_L = 2(V_L + n'V_D + nV_W) / d \quad (1)$$

$$V_i = M_i / (\rho_i N_A) \quad (2)$$

kde  $n$  a  $n'$  sú mólové pomery H<sub>2</sub>O:EYPC resp. C10:EYPC,  $M_i$  sú mólové hmotnosti,  $V_i$  sú molekulové objemy,  $\rho_i$  sú hustoty,  $N_A$  je Avogadrovo číslo a indexy  $i=L, D$  and  $W$  označujú EYPC,  $n$ -dekán a vodu. Pre hustotu EYPC sme použili hodnotu  $r_L=1,017$  g/cm<sup>3</sup>, ktorú zmerali White a spol. (23) pre lamelárnu fázu a multilamelárne lipozómy z EYPC. Keďže molekulový objem vody lokalizovanej v polárnej oblasti lipidových dvojvrstiev v lamelárnej fáze a v multilamelárnych lipozómoch z fosfatidycholínu je rovnaký, ako keď sa voda nachádza v kvapalnej fáze pri rovnakej teplote (24) mohli sme použiť tabelovanú hodnotu  $r_W=0,998$  g/cm<sup>3</sup> pre H<sub>2</sub>O pri 20°C

(25). Hustota hydrofóbnej oblasti fosfatidylcholínových dvojvrstiev vo fluidnom stave je v rámci experimentálnej chyby rovnaká, ako hustota  $n$ -alkánov (26), predpokladáme preto, že po zabudovaní  $n$ -dekánu do dvojvrstvy nedôjde k zmene jeho parciálneho mólového objemu v porovnaní s jeho kvapalnou fázou pri rovnakej teplote. Pre  $n$ -dekán sme preto použili tabelovanú hodnotu pre jeho kvapalnú stav  $r_D=0,73 \text{ g/cm}^3$  pri  $20^\circ\text{C}$  (25). Keď sa predpokladá, že v lamelárnej fáze voda nepreniká do fosfolipidových dvojvrstiev a nachádza sa medzi nimi, potom možno podľa Luzzatiho (22) z experimentálnych hodnôt  $d$  zistiť aj hrúbku dvojvrstvy  $d_L$  a hrúbku vodnej vrstvy medzi dvojvrstvami  $d_W$ :

$$d_L = d - d_W = d - (nV_W / A_L) \quad (3)$$

Je známe, že pri mólových pomeroch väčších ako  $\text{H}_2\text{O}:\text{EYPC}=25:1$  sa lamelárna fáza EYPC mení na sústavu multilamelárnych lipozómov so sférickými multilamelárnymi lipozómami (20, 27). V tejto štruktúre sa molekuly vody nachádzajú na rozdiel od lamelárnej fázy nielen medzi dvojvrstvami EYPC, ale aj mimo lipozómov. Hoci je možné získať aj v prípade multilamelárnych lipozómov dostatočne kvalitné difraktogramy a určiť z nich mriežkový parameter  $d$ , nedá sa použiť pre výpočet geometrických parametrov dvojvrstvy pomocou vzťahov 1-3, lebo množstvo molekúl vody lokalizovaných mimo lipozómov sa nedá presne určiť (20, 27). Z tohoto dôvodu sme ďalej experimentálne výsledky vyhodnocovali len u vzoriek s mólovým pomerom  $\text{H}_2\text{O}:\text{EYPC}=20:1$ . Zistili sme, že plocha  $A_L$  pripadajúca na jednu molekulu EYPC na medzifázovom rozhraní dvojvrstvy – vodná fáza sa pre mólové pomery  $\text{C10}:\text{EYPC}<1:1$  mierne znižuje s rastúcim množstvom  $n$ -dekánu v dvojvrstve (Obr. 2) a potom pri najvyšších mólových pomeroch  $\text{C10}:\text{EYPC}$  rastie. Experimentálna chyba stanovenia  $A_L$  je  $\pm 0,023 \text{ nm}^2$ . Pozorované mierne zníženie  $A_L$  o  $0,012 \text{ nm}^2$  pri mólovom pomere  $\text{C10}:\text{EYPC}=0,86:1$  je menšie v porovnaní s experimentálnou chybou, možno teda konštatovať, že  $A_L$  sa pre mólové pomery  $\text{C10}:\text{EYPC}<1:1$  v rámci experimentálnej chyby nemení. Zvýšenie  $A_L$  o  $0,036 \text{ nm}^2$  pri mólovom pomere  $\text{C10}:\text{EYPC}=2,13:1$  je väčšie v porovnaní s experimentálnou chybou a je preto preukazné. Hodnoty hrúbky fosfolipidovej dvojvrstvy  $d_L$  rastú s mólovým pomerom  $\text{C10}:\text{EYPC}$  (Obr. 2). Zatiaľ čo experimentálne body pre  $\text{C10}:\text{EYPC}<1$  ležia na priamke ( $r^2=0,9999$ ), pri vyšších hodnotách  $\text{C10}:\text{EYPC}$  je nárast  $d_L$  menší v porovnaní s extrapoláciou tejto priamkovej závislosti.

## Diskusia

### *Model lokalizácie *n*-dekánu v dvojvrstve*

Hlavný záver z vyššie uvedených experimentálnych výsledkov je, že *n*-dekán zväčšuje hrúbku fosfolipidovej dvojvrstvy v lamelárnej fáze EYPC. Nelinearitu  $d_L$  a nárast  $A_L$  pri mólových pomeroch C10:EYPC>1 možno vysvetliť jednoduchým modelom schématicky znázorneným na Obr. 3. Pri mólových pomeroch C10:EYPC<1 je *n*-dekán v dvojvrstve lokalizovaný v jej hydrofóbnom strede medzi terminálnymi metylovými skupinami fosfolipidu (Obr. 3A). Pri takejto lokalizácii hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy  $d_L$  s koncentráciou *n*-dekánu rastie, ale plocha pripadajúca na jeden fosfolipid  $A_L$  na medzifázovom rozhraní dvojvrstva – vodná fáza 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 (Obr. 3B). V takomto prípade je nárast hrúbky fosfolipidovej dvojvrstvy menší ako keby bol *n*-dekán lokalizovaný len v strede dvojvrstvy, zároveň však rastie plocha pripadajúca na jeden fosfolipid  $A_L$  na medzifázovom rozhraní dvojvrstva – vodná fáza.

### *Porovnanie s unilamelárnymi lipozómami*

Naše experimenty teda potvrdili, že *n*-dekán zvyšuje hrúbku dvojvrstvy v lamelárnej fáze EYPC, pričom medzi acylové reťazce fosfolipidu preniká len pri vyšších mólových pomeroch. Tento výsledok je v zhode s tým, čo pozorovali v lamelárnych fázach fosfatidylcholínov aj McIntosh a spol. (14). Je to však v príkrom protiklade s výsledkami, ktoré sme získali technikou rozptylu neutrónov na unilamelárnych lipozómoch z dioleoylfosfatidylcholínu (DOPC) (28). V unilamelárnych lipozómoch sa na rozdiel od lamelárnej fázy *n*-dekán lokalizoval pri nižších mólových pomeroch (C10:DOPC<0,5) medzi acylovými reťazcami DOPC a hrúbka dvojvrstvy sa nemenila, zatiaľ čo pri vyšších mólových pomeroch mierne rástla. Gruen a Haydon (29, 30) ukázali, že v nasýtených roztokoch *n*-alkánu vo vode by mala byť zmena hrúbky izolovanej planárnej fosfolipidovej dvojvrstvy väčšia ako sférickej dvojvrstvy v unilamelárnych lipozómoch v dôsledku nižšej adsorpcie alkánu do zakrivenej dvojvrstvy. Z porovnania našich výsledkov pre planárne a sférické dvojvrstvy navyše vyplýva, že dokonca pri rovnakom množstve *n*-dekánu v dvojvrstve



je jeho lokalizácia v dvojvrstve a teda aj zmena jej hrúbky ovplyvnená zakrivením dvojvrstvy. Tento výsledok je dôležitý z metodického hľadiska, keď sa študuje vplyv *n*-alkánov na lipozómy, v ktorých zakrivenie fosfolipidových dvojvrstiev závisí od množstva vody, ale aj od podmienok prípravy lipozómov.

### ***Mechanizmus účinku v biologickej membráne***

Dôsledky našich experimentálnych výsledkov sú nemenej závažné pre úvahy o biologických účinkoch *n*-alkánov. Ak je membrána v mieste účinku planárna, potom zrejme treba brať do úvahy zmeny hrúbky dvojvrstvy vyvolané *n*-alkánom. Naopak, ak je membrána zakrivená, potom treba uvažovať iný mechanizmus účinku, ako vyvolaný zmenou hrúbky fosfolipidovej dvojvrstvy. Gruen a Haydon (29, 30) sa domnievajú, že vo väčšine sú biologické membrány minimálne zakrivené a preto relevantné sú tie výsledky, ktoré boli získané s planárnymi dvojvrstvami v modelových membránach. Zo spôsobu rekonštitúcie (Ca-Mg)ATPázy zo sarkoplazmatického retikula do fosfolipidových dvojvrstiev vyplýva, že ich vlastnosti sú podobné, ako v unilamelárnych lipozómoch – skôr sférické ako planárne (9, 10). V tomto prípade nie je teda možné vysvetľovať účinok *n*-dekánu či iných *n*-alkánov zmenou hrúbky dvojvrstvy a treba konštatovať v zhode s výsledkami získanými pomocou fluorescenčnej spektroskopie (9), že *n*-dekán ovplyvňuje aktivitu (Ca-Mg)ATPázy primárne v dôsledku interakcie s bielkovinou.

### **PodĎakovanie**

Táto práca bola financovaná prostredníctvom grantových úloh VEGA 1/7704/2000, UK/6/2000 a projektu SÚJV 07-4-1031-99/03. Autori ďakujú za pomoc pri experimentoch Dr. A. Islamovovi z SÚJV Dubna.

### **LITERATÚRA**

1. BALGAVÝ, P., DEVÍNSKY, F.: Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Adv Colloid Interface Sci*, 66, 1996, s. 23-63.
2. HAYDON, D. A., HENDRY, B. M., LEVINSON, S. R., REQUENA, J.: Anaesthesia by the *n*-alkanes. A comparative study of nerve impulse blockage and the properties of black lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, 470, 1977, s. 17-34.

3. HAYDON, D. A., HENDRY, B. M., LEVINSON, S. R., REQUENA, J.: The molecular mechanisms of anaesthesia. *Nature*, 268, 1977, s. 356-358.
4. ELLIOTT, J. R., HAYDON, D. A., HENDRY, B. M., NEEDHAM, D.: Inactivation of the sodium current in squid giant axons by hydrocarbons. *Biophys J*, 48, 1985, s. 617-622.
5. FRANKS, N. P., LIEB, W. R.: Where do general anaesthetics act? *Nature*, 274, 1978, s. 339-342.
6. FRANKS, N. P., LIEB, W. R.: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 367, 1994, s. 607-614.
7. FRANKS, N. P., LIEB, W. R.: Which molecular targets are most relevant to general anaesthesia? *Toxicol Lett*, 100-101, 1998, s. 1-8.
8. JOHANSSON, J. S., SCHARF, D., DAVIES, L. A., REDDY, K. S., ECKENHOFF, R. G.: A designed four-alpha-helix bundle that binds the volatile general anesthetic halothane with high affinity. *Biophys J*, 78, 2000, s. 982-993.
9. LEE, A. G., EAST, J. M.: The effects of phospholipid structure on the function of a calcium pump. *Biochem Soc Trans*, 26, 1998, s. 359-365.
10. JOHANSSON, A., KEIGHTLEY, C. A., SMITH, G. A., RICHARDS, C. D., HESKETH, T. R., METCALFE, J. C.: The effect of bilayer thickness and n-alkanes on the activity of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 256, 1981, s. 1643-1650.
11. LEE, A. G., EAST, J. M., BALGAVY, P.: Interaction of insecticides with biological membranes. *Pesticide Sci*, 32, 1991, s. 317-327.
12. WHITE, S. H.: Studies of the physical chemistry of planar bilayer membranes using high-precision measurements of specific capacitance. *Ann N Y Acad Sci*, 303, 1977, s. 243-265.
13. WHITE, S. H.: The physical nature of planar bilayer membranes. In: *Ion Channel Reconstitution* (Ed. C. Miller). 1 vydanie. New York: Plenum, 1986. s. 3-35.
14. MCINTOSH, T. J., SIMON, S. A., MACDONALD, R. C.: The organization of n-alkanes in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 597, 1980, s. 445-463.
15. POPE, J. M., WALKER, L. W., DUBRO, D.: On the ordering of N-alkane and N-alcohol solutes in phospholipid bilayer model membrane systems. *Chem Phys Lipids*, 35, 1984, s. 259-277.

16. TAJIMA, K., IMAI, Y., NAKAMURA, A., KOSHINUMA, M.: Solubilization of hydrocarbons into a bilayer assembly of dimyristoylphosphatidylcholine in water. *Colloids Surf A*, 155, 1999, s. 311-322.
17. TARDIEU, A., LUZZATI, V., REMAN, F. C.: Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *J Mol Biol*, 75, 1973, s. 711-733.
18. SINGLETON, W. S., GRAY, M. S., BROWN, M. L., WHITE, J. L.: Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids. *J Amer Oil Chem Soc*, 42, 1965, s. 53-56.
19. FILÍPEK, J., GELIENOVÁ, K., KOVÁCS, P., BALGAVÝ, P.: Effect of lipid autoperoxidation on the activity of the sarcoplasmic reticulum (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)ATPase reconstituted into egg yolk phosphatidylcholine bilayers. *Gen Physiol Biophys*, 12, 1993, s. 55-68.
20. BALGAVÝ, P., DUBNIČKOVÁ, M., UHRÍKOVÁ, D., YARADAIKIN, S., KISELEV, M., GORDELIY, V.: Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: A small angle neutron scattering study. *Acta Physica Slovaca*, 48, 1998, s. 509-533.
21. HUANG, T. C., TORAYA, H., BLANTON, T. N., WU, Y.: X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *J Appl Crystallogr*, 26, 1993, s. 180-184.
22. LUZZATI, V.: X-Ray Diffraction Studies of Lipid-Water Systems. In: *Biological Membranes* (Ed. D. Chapman). 1 vydanie. London: Academic Press, 1968. s. 71-124.
23. WHITE, S. H., JACOBS, R. E., KING, G. I.: Partial specific volumes of lipid and water in mixtures of egg lecithin and water. *Biophys J*, 52, 1987, s. 663-665.
24. WIENER, M. C., TRISTRAM-NAGLE, S., WILKINSON, D. A., CAMPBELL, L. E., NAGLE, J. F.: Specific volumes of lipids in fully hydrated bilayer dispersions. *Biochim Biophys Acta*, 938, 1988, s. 135-142.
25. WEAST, R. C.: In: *Handbook of Chemistry and Physics* (Ed. R.C.Weast). 50. vydanie. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1969, s. C264, F5.
26. NAGLE, J. F., WILKINSON, D. A.: Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys J*, 23, 1978, s. 159-175.

27. GAWRISCH, K., RICHTER, W., MÖPPS, A., BALGAVÝ, P., ARNOLD, K., KLOSE, G.: The influence of water concentration on the structure of egg yolk phospholipid/water dispersions. *Stud Biophys* , 108, 1985, s. 5-16.
28. 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, s. 165-170.
29. GRUEN, D. W. R., HAYDON, D. A.: The adsorption of n-alkanes into bimolecular lipid layers: theory and experiment. *Pure Appl Chem*, 52, 1980, s. 1229-1240.
30. GRUEN, D. W. R., HAYDON, D. A.: The adsorption of nonpolar molecules into lipid bilayer membranes. *Biophys J*, 30, 1980, s. 129-136.

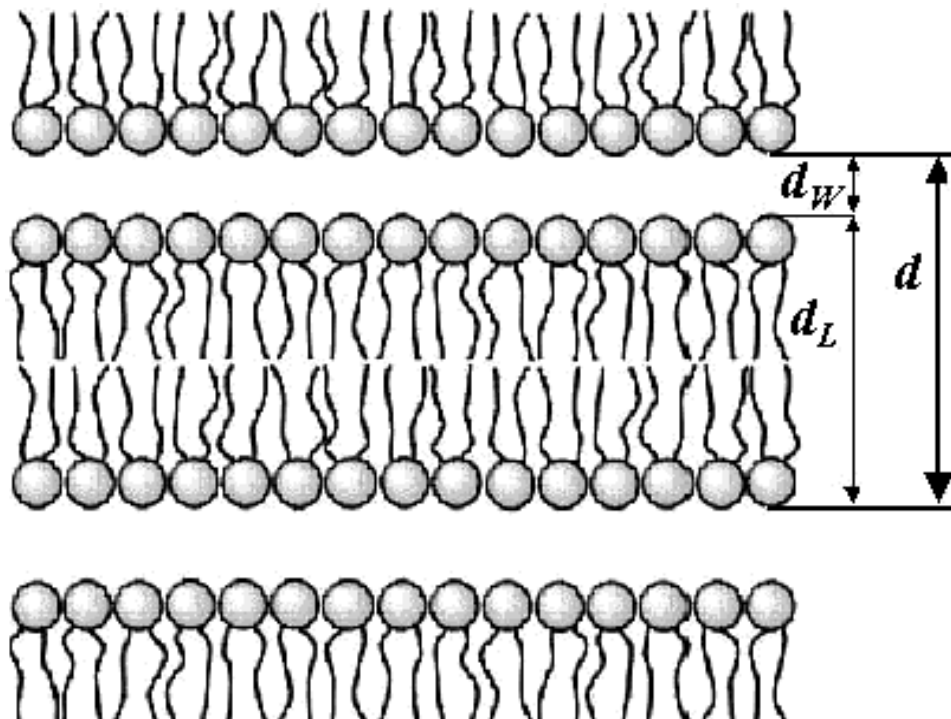
## SUMMARY

N. Kučerka, D. Uhríková, J. Karlovská, P. Balgavý

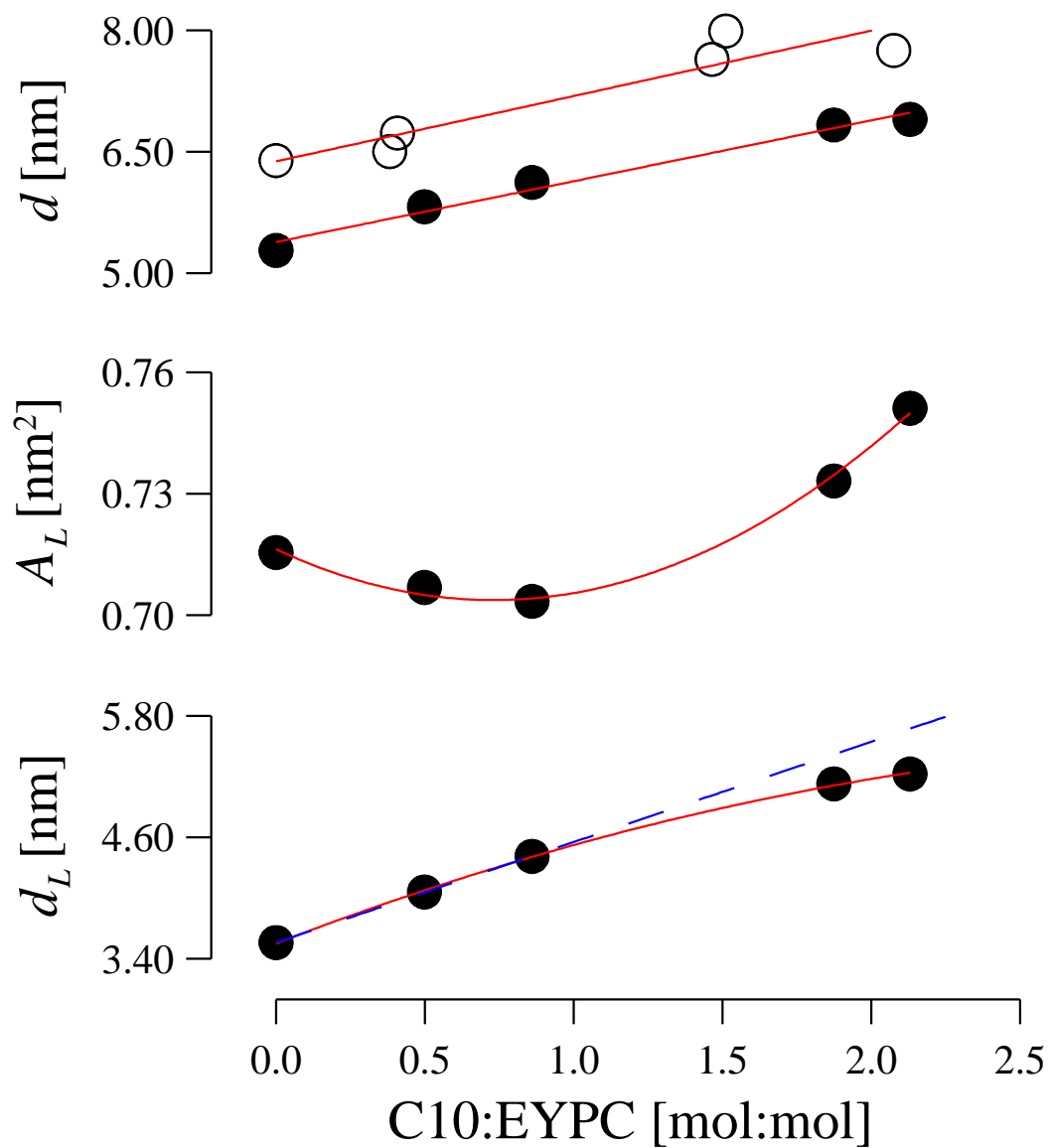
### X-RAY DIFFRACTION STUDY OF *n*-DECANE INTERACTION WITH PHOSPHATIDYLCHOLINE BILAYERS

The interaction of *n*-decane (C10) with phospholipid bilayers in the lamellar fluid  $L_\alpha$  phase of chromatographically pure egg phosphatidylcholine (EYPC) has been studied by the use of X-ray diffraction at 20°C and molar ratios  $\text{H}_2\text{O}:\text{EYPC}\approx 20$  and  $\text{C10}:\text{EYPC}\leq 2,13$ . The surface area  $A_L$  per one EYPC molecule at the bilayer – aqueous phase interface does not change with the increasing C10 bilayer concentration at molar ratios  $\text{C10}:\text{EYPC}<1$ . At higher molar ratios up to  $\text{C10}:\text{EYPC}\leq 2,13$ , the value of  $A_L$  slightly increases. The bilayer thickness  $d_L$  increases up to  $\text{C10}:\text{EYPC}\leq 2,13$ , but the slope  $\Delta d_L/\Delta(\text{C10}:\text{EYPC})$  decreases with increasing C10 bilayer concentration at  $\text{C10}:\text{EYPC}>1$ . The results indicate that C10 forms a hydrophobic region localized in the center of bilayer at  $\text{C10}:\text{EYPC}<1$ , while it aligns also parallel to the EYPC acyl chains at higher molar ratios.

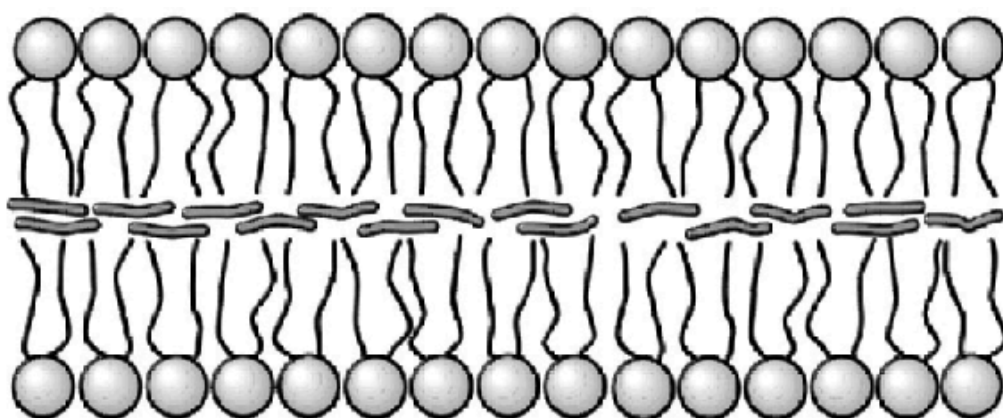
**Key words:** general anesthetics – phospholipid bilayer - *n*-decane – phosphatidylcholine – X-ray diffraction



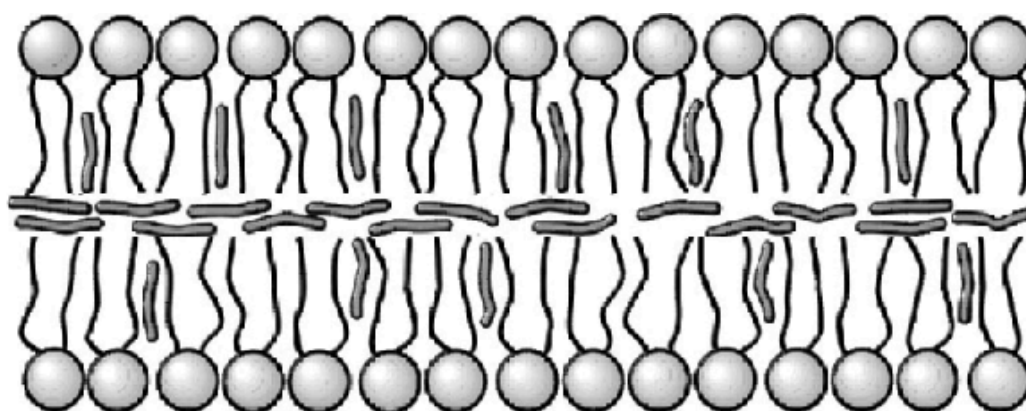
Obr. 1. Schématické znázornenie lamelárnej fázy fosfolipidov.  $d$  - mriežkový parameter,  $d_L$  - hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy,  $d_W$  - hrúbka vodnej vrstvy medzi fosfolipidovými dvojvrstvami.



Obr. 2. Závislosť mriežkového parametra  $d$ , hrúbky fosfolipidovej dvojvrstvy  $d_L$  a plochy pripadajúcej na jeden fosfolipid  $A_L$  na medzifázovom rozhraní dvojvrstvy – vodná fáza na mólovom pomere  $n$ -dekán:EYPC (C10:EYPC) pri mólovom pomere H<sub>2</sub>O:EYPC 100:1 (○) a 20:1 (●).



**A**



**B**

Obr. 3. Schématické znázornenie lokalizácie *n*-dekánu vo fosfolipidovej dvojvrstve pri mólových pomeroch C10:EYPC<1 (A) a C10:EYPC>1 (B).