

Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského
Bratislava

Mgr. Norbert Kučerka

**Malouhlový rozptyl neutrónov a synchrotrónového žiarenia
na fosfolipidových dvojvrstvách**

Projekt dizertačnej práce

Školiteľ: doc. Pavol Balgavý, CSc.

Obsah

Obsah	1
Úvod	2
Prehľad stavu riešenia problematiky.....	3
I Biologická membrána	3
I.1 Úvod	3
I.2 Agregáty fosfolipidov	4
I.3 Hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy.....	9
II Rozptyl pod malými uhlami	15
II.1 Rozptyl na jednej častici.....	16
II.2 Systém identických častíc.....	18
II.3 Rozptyl na časticách rôzneho tvaru	19
II.4 Polydisperzný systém	21
II.5 Vyhodnocovanie rozptylových kriviek	24
III Dosiahnuté a rozpracované výsledky práce	27
III.1 Vytvorenie modelu	28
III.2 Navrhnutie vyhodnocovacej procedúry.....	31
Ciele dizertačnej práce	32
Účasť na kurzoch a konferenciách	33
Publikované práce a práce v tlači	34
Zoznam literatúry	36
Príloha	41

Úvod

Táto práca je projektom dizertačnej práce, ktorá sa bude zaoberať štúdiom hrúbky fosfolipidových dvojvrstiev v unilamelárnych lipozómoch pomocou rozptylu neutrónov a synchrotrónového žiarenia. Predpokladá sa, že na základe získaných výsledkov bude možné vytvárať teoretické modely štruktúry a usporiadania týchto objektov. Popri štúdiu čistých fosfolipidových dvojvrstiev zo syntetických a prírodných fosfatidylcholínov je náplňou tejto práce aj sledovanie vplyvu prímiesnych molekúl na ich hrúbku. Na prvom mieste sú to amfifilné N-alkyl-N,N-dimetylamín-N-oxidy s antimikróbnyimi a imunomodulačnými vlastnosťami, ktoré sa syntetizujú na Katedre chemickej teórie liečiv Farmaceutickej fakulty UK. Sledovať sa bude aj vplyv hydrofóbných n-alkánov, ktoré modulujú vlastnosti iónových kanálov a transportných membránových proteínov a sú všeobecnými anestetikami. Predpokladá sa, že N-alkyl-N,N-dimetylamín-N-oxidy aj n-alkány pri nižších koncentráciách budú ovplyvňovať hrúbku fosfolipidových dvojvrstiev a pri vyšších koncentráciách budú ovplyvňovať ich stabilitu a tvoriť s fosfolipidmi rôzne zmesné micely a mikroemulzie (Hornby et al., 1981), (Lafleur et al., 1996), (Rand et al., 1990). Priestor a možnosti na riešenie zadania práce mi boli poskytnuté na Katedre fyzikálnej chémie liečiv Farmaceutickej fakulty UK, kde sa sledujú rôzne fyzikálne vlastnosti modelových membrán.

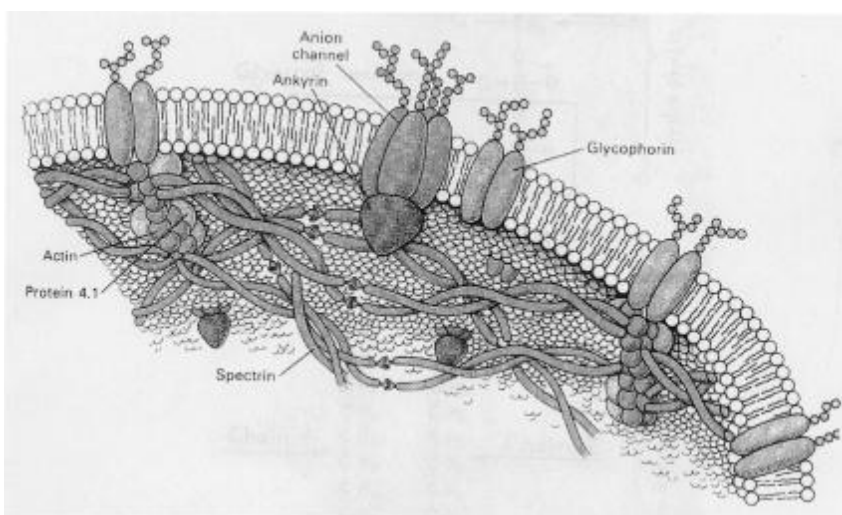
V prvej fáze bude dizertačná práca sústredená na teoretické modelovanie unilamelárnych lipozómov a teoretické simulovanie rozptylových kriviek na týchto modeloch. V druhej fáze budú počas študijných pobytov v Spojenom ústave jadrového výskumu (*OИЯИ - Объединенный институт ядерных исследований*) v Dubne, Rusko, na spektrometri malouhlového rozptylu neutrónov vykonané experimentálne merania pre porovnania s teoretickými odhadmi a predpoveďami. V druhej fáze sa predpokladajú experimenty na niektorom európskom zdroji synchrotrónového žiarenia. Časť cieľov plánovaných na prvú a druhú fázu boli už dosiahnuté a získané výsledky boli opublikované. V dizertačnej práci sa využívajú aj vedomosti získané absolvovaním kurzu pre užívateľov veľkých meracích zariadení (*HERCULES – Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems*) v Grenobli, Francúzsko.

Prehľad stavu riešenia problematiky

I Biologická membrána

I.1 Úvod

Biologická membrána zohráva v živom organizme nenahraditeľnú úlohu pri oddeľovaní vnútrobunkového priestoru od okolitého prostredia, ohraničuje taktiež jednotlivé orgány vo vnútri bunky a tvorí prirodzenú hydrofóbnu bariéru v bunkách v celom organizme. Jej úloha však nie je len deliaca, ale táto bariéra je dynamická a zabezpečuje výmenu látok potrebných pre fungovanie jednotlivých procesov. Prenos látok je sprostredkovaný a kontrolovaný proteínmi integrovanými do membrány - integrálne bielkoviny, alebo na ňu naviazanými - periférne bielkoviny. Vlastnosti a funkčnosť týchto proteínov ovplyvňuje druhá zložka membrány - lipidy, ktoré tvoria kostru a formujú základnú štruktúru biologickej membrány, tak ako je to zobrazené na obrázku mozaikového modelu biologickej membrány (Obr.1) (Büldt, 2001).



Obr.1: Mozaikový model biologickej membrány tvorenej lipidovou kostrou a membránovými bielkovinami. Prevzaté z prednášky Georga Büldta na 11.kurze HERCULES

Úlohy štúdia biologických membrán spočívajú v popísaní komponentov tvoriacich biologickú membránu, určenia ich fyzikálnych vlastností a vzájomných interakcií, určenie vplyvu vonkajšieho prostredia a tiež zmeny vlastností membrány a fyzikálnych veličín, ktoré ju opisujú, vplyvom rôznych prímiesí do jej štruktúry. Skúmanie týchto parametrov potom vyúsťuje do vytvárania modelov, z fyzikálneho hľadiska prehľadných a čo najjednoduchších, ktoré by zároveň čo najvernejšie reprezentovali skutočnú štruktúru membrány. Medzi takéto modely lipidovej časti

membrány patria dnes rôzne fázy fosfolipidov. Fosfolipidy sú povrchovo aktívne amfifilné molekuly zložené z hydrofilnej časti tvorenej polárnou hlavičkou fosfolipidu a z hydrofóbnej časti tvorenej uhl'ovodíkovými reťazcami. Vo vodnom prostredí sa tieto amfifilné molekuly usporiadajú tak, že hydrofóbna časť je lokalizovaná vo vnútri medzi vrstvami vytvorenými z hydrofilnej časti, ktoré sú v styku s vodou. Takto vznikne fosfolipidová dvojvrstva, ktorá v prostredí s dostatočným obsahom vody vytvorí lipozóm.

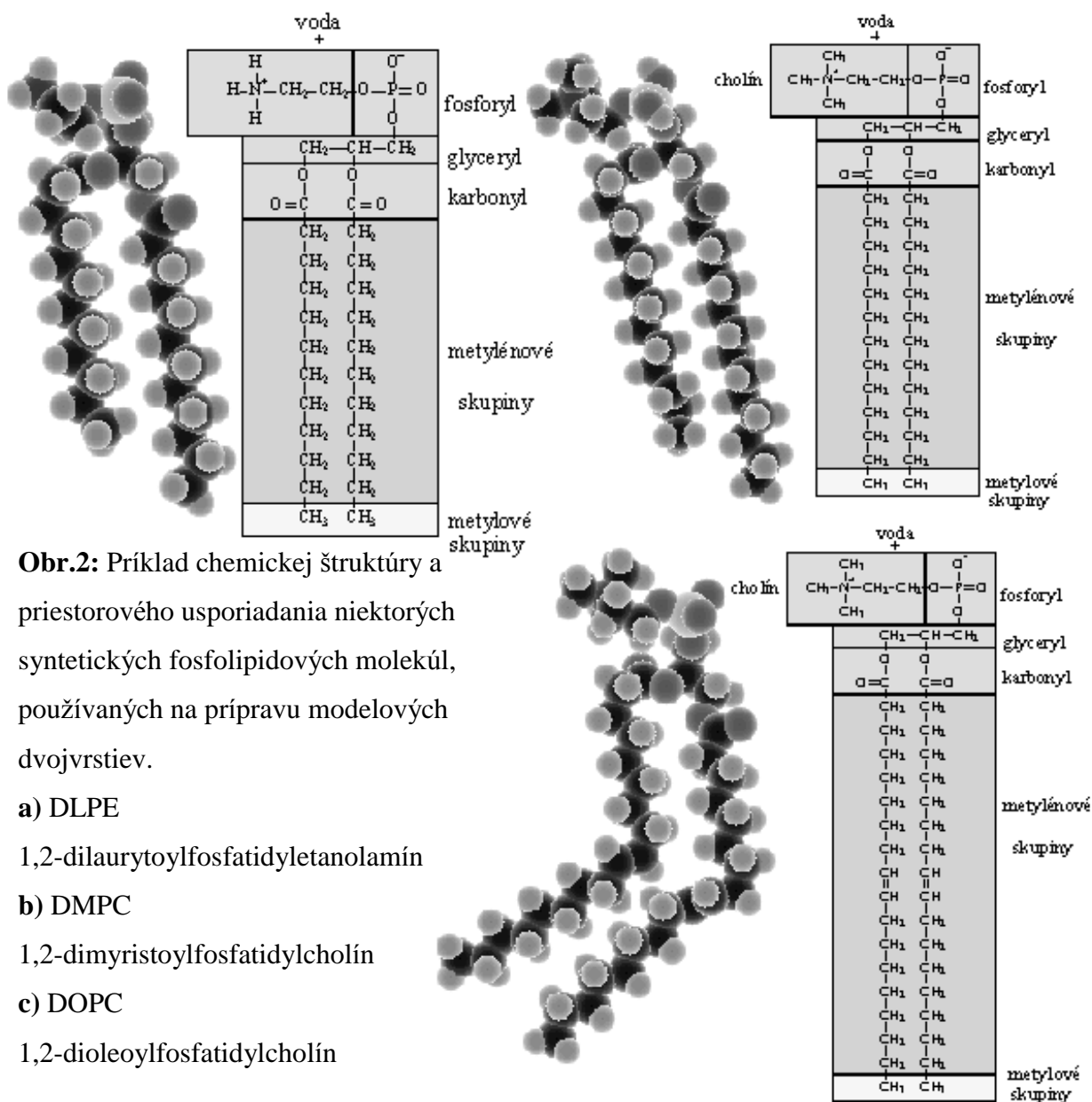
Štúdium fosfolipidových lipozómov je dnes veľmi populárne a dôležité vďaka veľkému významu vo viacerých oblastiach vedy a technológie. V základnom výskume sú používané ako modely pri skúmaní bunkových membrán, veľmi významné miesto však majú aj ako prenášače liečiv, genetického materiálu a enzýmov cez bunkovú membránu, alebo iné hydrofóbne bariéry vo farmácii, medicíne, genetickom inžinierstve, ale aj v kozmetickom, či potravinárskom priemysle.

I.2 Agregáty fosfolipidov

Dvomi základnými komponentami biologickej membrány sú lipidy a proteíny. Hoci membránové proteíny ovplyvňujú interakcie medzi membránami ako aj medzi membránovými komponentami, je to amfifilná stavba lipidovej molekuly, ktorá je zodpovedná za jej geometrické usporiadanie do formy dvojvrstvy. Amfifilný charakter lipidových molekúl s polárnymi hlavičkami a nepolárnymi uhl'ovodíkovými chvostíkmi spôsobuje vytváranie dvojdimenzionálnej 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 proteínov. Pre dôkladné porozumenie silám a interakciám ovplyvňujúcim rôzne vlastnosti lipidov a dvojvrstiev je potrebný výskum systémov čistých fosfolipidových dvojvrstiev.

Fosfolipidy sú povrchovo aktívne amfifilné molekuly zložené z hydrofilnej časti tvorenej polárnou hlavičkou fosfolipidu, ktorá môže obsahovať zvyšok cholínu, serínu, etanolamínu, alebo inozitolu, zo spojovacej časti tvorenej napríklad glycerolovou skupinou a z hydrofóbnej časti tvorenej karbonylovými skupinami pripojenými uhl'ovodíkovými reťazcami s rôznymi dĺžkami v závislosti od konkrétnej

fosfolipidovej molekuly a jej funkčnosti. Na obrázku (Obr.2) je ukázaný príklad chemickej štruktúry niektorých takýchto molekúl.



Amfifilný charakter lipidových molekúl je spôsobený hydrofóbnymi interakciami nepolárnych častí a hydrofilnosťou polárnych hlavičiek týchto molekúl. Hydrofilnosť je vyvolaná vytvorením parciálneho náboja, ktorého rozloženie podporuje interakciu s dipólovými molekulami vody okolitého rozpúšťadla a takýmto spôsobom ich viaže. Naopak hydrofóbné interakcie spôsobujú tendenciu nepolárnych skupín združovať sa a tým zmenšiť kontakt so susednými molekulami vody. Táto interakcia je hlavne entropického pôvodu. V prostredí CH_2 , CH_3 sa totiž molekuly vody vedú veľmi dobre usporiadať, čím by sa ale znížila entropia systému. Preto v

skutočnosti sú molekuly vody z tohoto systému vytlačené Brownovým pohybom za vzniku oddelených fáz (Vodrážka, 1982).

Vo vodnom prostredí sa teda molekuly fosfolipidu vďaka svojmu amfifilnému charakteru usporiadajú tak, že hydrofóbna časť je lokalizovaná vo vnútri, tak aby nedochádzalo ku styku s vodou a hydrofilná časť je umiestnená na rozhraní v styku s vodnou fázou. Takéto usporiadanie lipidových molekúl potom v priestore vytvára rôzne agregáty.

Micely

Micely sú definované ako termodynamicky stabilné koloidné agregáty, spontánne vytvárané amfifilnými molekulami. Pre fosfolipidy existujú micely obvyklého a inverzného typu, pričom aký typ vznikne závisí na charaktere rozpúšťadla aj na charaktere samotného lipidu. Micely obvyklého typu vytvárajú zväčša fosfolipidy s veľkou nabitou polárnou hlavičkou a s nie príliš dlhým acylovým reťazcom, kým fosfolipidy s malými polárnymi hlavičkami a dlhými acylovými reťazcami majú v nepolárnych rozpúšťadlách tendenciu vytvárať inverzné štruktúry. Vzniknuté micely môžu byť sférického, diskoidného, alebo tubulárneho tvaru (Cevc et al., 1987).

Lamely

Lipidy, ktoré majú prierez polárnej časti približne rovnaký ako prierez hydrofóbnou časťou molekuly tvoria dvojvrstvy, kde hydrofóbna časť je lokalizovaná vo vnútri dvojvrstvy medzi vrstvami vytvorenými z hydrofilnej časti, ktoré sú v styku s vodou (Luzzati, 1968). Takto vznikne fosfolipidová dvojvrstva, ktorá vytvára lamelárnu fázu a v prostredí s dostatočným obsahom vody prechádza do ďalšieho typu agregátu, sférických lipozómov.

Lipozómy

Lipozómy sú uzatvorené sférické, alebo elipsoidné objekty vytvorené uzavretím lamelárnych fáz, pričom môžu vznikať mnohovrstvové - multilamelárne, alebo jednovrstvové - unilamelárne lipozómy. 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.

Nelamelárne fázy

V extrémnych podmienkach možno pozorovať, alebo umelo pripraviť aj iné typy fáz, ktorými sú napríklad hexagonálna, pravouhlá, či kubická. Tieto fázy sa vyskytujú pri niektorých biologických procesoch ako sú fúzia membrán, endocytóza a exocytóza,

alebo pri regulovaní zloženia lipidov v biomembránach. Ich základnými subjednotkami sú izolované alebo vzájomne pospájané micely, ktoré sú v nelamelárnych fázach usporiadané s príslušnou symetriou.

Okrem tvaru formy, ktorú fosfolipidové molekuly vytvárajú pri spájaní sa do agregátov je ich dôležitou charakteristikou aj vnútorná štruktúra a termodynamický stav samotných molekúl. Rôznorodosť stavov je spôsobená najmä vďaka dlhým uhl'ovodíkovým reťazcom, ktoré môžu rotovať okolo jednotlivých jednoduchých väzieb C–C metylénových skupín. Môžu existovať v dvoch základných rotačných izomerických konformáciách: *trans* (*t*) a *gauche* (g^+ a g^- - otočenie doprava, alebo doľava). V *trans* konformácii sú uhly medzi susednými väzbami približne 111° a v prípade *gauche* konforméru sa väzba v acylovom reťazci otočí o 120° a celý uhl'ovodíkový reťazec sa tak ohne o 60° . Vytvorenie dvoch *gauche* konformácií za sebou je nielen energeticky, ale aj stericke nevýhodné z dôvodov silnej sterickej repulzie atómov C a H. Energeticky najvýhodnejšou konformačnou zmenou reťazca je vytvorenie (g^+tg^- , alebo g^-tg^+) konforméru označovaným *kink*. Prítomnosťou *cis*-dvojnej väzby v reťazci dochádza k jeho ohybu asi o 45° uhol a rotácia okolo nej je energeticky nevýhodná. Preto nedochádza k prechodu z *cis* do *trans* konformácie, ale zmena v orientácii reťazca je kompenzovaná *gauche* konformáciou v ďalšej časti reťazca (Uhríková, 1993).

Konformácia fosfolipidovej molekuly a stav membrány úzko súvisí s voľnou energiou systému a teda sú veľmi výrazne ovplyvnené termodynamickými podmienkami. Pri zvyšovaní teploty prechádza membrána nasledujúcimi mezomorfnými stavmi (Uhríková, 1993):

$L_C, L_{C'}$ – kryštalické fázy

-molekuly sú usporiadané podobne ako v bezvodých lipidových kryštáloch

$L_\beta, L_{\beta'}$ – gélové fázy

-reťazce molekúl sú tuhé, vytiahnuté a paralelné, v prípade $L_{\beta'}$ sú naklonené vzhľadom k normále roviny lamely

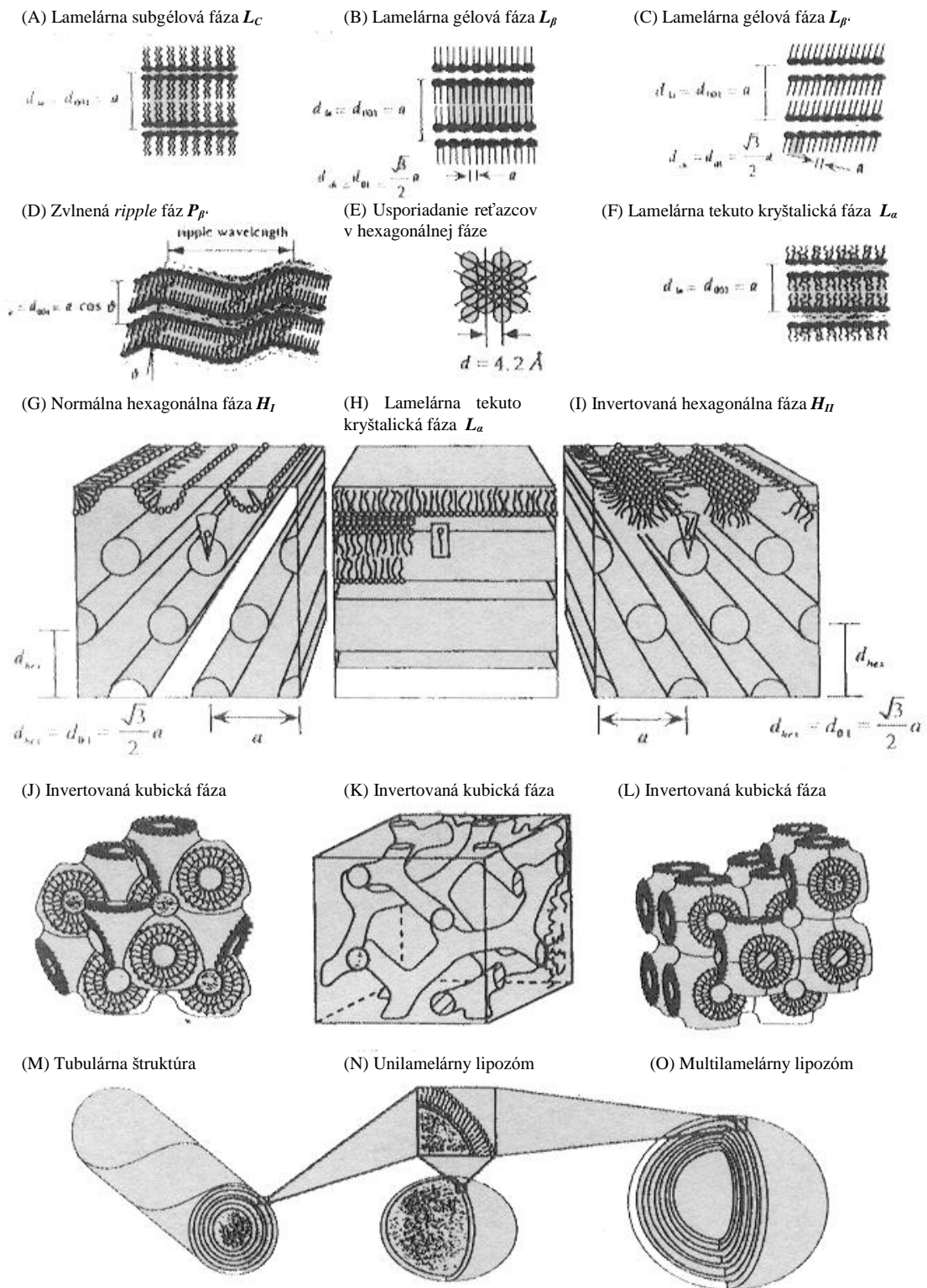
$P_\beta, P_{\beta'}$ – zvlnené gélové fázy

-so zvyšovaním teploty prejdú $L_\beta, L_{\beta'}$ predprechodom do týchto fáz, tvorených zvlnenými lamelami β typu s amplitúdou vlny $\sim 1,5$ nm a periódou vlny ~ 20 nm

L_α – tekutokryštalická fáza

-acylové reťazce lipidov sú vďaka vysokej pravdepodobnosti *trans-gauche* konformácii v neusporiadanom stave.

Niektoré zo spomenutých fosfolipidových fáz sú zobrazené na obrázku (Obr.3).



Obr.3: Schématické zobrazenie niekoľkých fáz a štruktúr, ktoré vytvárajú fosfolipidové molekuly.

Prevzaté z prednášky Geoga Büldta na 11.kurze HERCULES

V rámci vytvárania teoretického modelu fosfolipidovej dvojvrstvy sa musí zobrať do úvahy, že ióny a iné molekuly nachádzajúce sa vo vodnej fáze ako aj samotné molekuly vody susediace s povrchom dvojvrstvy ovplyvňujú fyzikálne vlastnosti membrány a musia byť preto uvažované ako jej súčasť. Je napríklad známe, že istý počet molekúl vody nielenže obklopuje membránu, ale aj penetruje do hydrofilnej oblasti polárnych hlavičiek, čo môže skreslovať výsledky získané rôznymi technikami za použitia bežne používaného predpokladu dvojvrstvy, ktorá molekuly vody neobsahuje (Balgavý et al., 2001a).

I.3 Hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy

V predchádzajúcom paragrafe boli uvedené rôzne agregáty, ktoré molekuly fosfolipidov vytvárajú pri styku s vodou, z ktorých je z hľadiska membrány ako deliaceho komponentu v živých organizmoch dôležitá dvojdimenziálna štruktúra organizovaná v tvare dvojvrstvy. Charakterizácia štruktúry tejto dvojvrstvy a určovanie jej fyzikálnych vlastností je základom pre pochopenie vzťahu štruktúry a funkcie biologickej membrány. Je veľmi dobre známe, že hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy výrazne ovplyvňuje vlastnosti transmembránových proteínov v nej zabudovaných (odkazy pozri v (Balgavý et al., 2001b)). Konkrétne príklady z literatúry sú znižovanie stability otvoreného gramicidínového kanála A zapríčinené zväčšovaním hrúbky dvojvrstvy, dôležitosť optimálnej hrúbky pre maximálnu aktivitu (Ca-Mg)ATP-ázy a (Na-K)ATP-ázy, alebo blokovanie iónového kanála v prípade väčšej, alebo menšej hrúbky dvojvrstvy ako je jej optimum. Zmena hrúbky dvojvrstvy môže taktiež ovplyvniť konformáciu a laterálnu agregáciu integrálnych bielkovín. Na druhej strane sa hrúbka môže meniť tak, aby zodpovedala hydrofóbnemu povrchu proteínu. Určovanie hrúbky dvojvrstvy je preto jednou z najdôležitejších úloh pre charakterizáciu parametrov ovplyvňujúcich interakciu proteínu s dvojvrstvou v biologickej membráne.

Najjednoduchšou metódou získavania hrúbky fosfolipidovej membrány je vyhodnocovanie difrakčných kriviek neutrónov, alebo synchrotrónového žiarenia na modelových dvojvrstvách fosfolipidov. Často sa predpokladá, že určenie štruktúry pomocou difrakcie znamená robiť kryštalografiu, no biologicko relevantný stav lipidovej dvojvrstvy nie je vždy blízko kryštalickému stavu. Najväčšmi sa od

kryštalického stavu odlišuje plne hydratovaná lipidová dvojvrstva v L_α fáze, kde sú uhl'ovodíkové reťazce neusporiadané v kontraste s lipidovými kryštálmi. Prítomnosť veľkých fluktuácií v tejto fáze, kvôli ktorým nie je možné získať dobrú kvantitatívnu štruktúru, vedie v prípade X-lúčov len k získaniu profilu elektrónovej hustoty. Tento profil však poskytuje dobrú mieru na určenie polohy fosfátovaj skupiny a z nej vzdialenosť medzi dvomi píkmi, prislúchajúcej dvom protiľahlým skupinám (Nagle et al., 2000).

Multilamelárne systémy

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 et al., 1996), (Nagle et al., 2000). Jedným z hlavných problémov pri riešení tejto úlohy je malý počet pozorovateľných difrakčných poriadkov, v prípade plne hydratovanej vzorky, čo je spôsobené fluktuáciami v štruktúre multilamelárneho systému fosfolipidových dvojvrstiev používaných v týchto experimentoch. Mnoho analýz profilu elektrónovej hustoty a dĺžky rozptylu neutrónovov implicitne predpokladá, že systém dvojvrstiev je jednorozmerný kryštál s presne sa opakujúcim uniformným D priestorom. Existuje tu však neusporiadanosť a lokálne fluktuácie molekúl v každej dvojvrstve, ako aj veľkoškálové fluktuácie, ktoré rušia kryštalickú usporiadanosť a zamieňajú ju kváziusporiadaním na dlhé vzdialenosti podobne ako v smektických tekutých kryštáloch. Obidva tieto vplyvy redukujú intenzitu vyšších difrakčných poriadkov, pričom prvý z nich je zaujímavý na úrovni jednej dvojvrstvy a prejavuje sa v širokom profile elektrónovej hustoty Gaussovského tvaru a druhý, spôsobený fluktuáciami v relatívnej polohe jednotkových buniek, je reprezentovaný interferenčným faktorom nazývaným štruktúrny faktor $S(q)$

$$I(q) = s(q) \cdot |f(q)|^2 / C_q, \quad q = |\vec{q}| = \frac{4p \sin(\theta)}{\lambda} \quad (1)$$

kde \vec{q} je vektor rozptylu závisiaci od vlnovej dĺžky žiarenia λ a uhlu rozptylu 2θ , C_q predstavuje Lorentzov faktor, ktorý je pre neorientovanú práškovú vzorku rovný q^2 . Tento štruktúrny faktor rozširuje píky difrakčného obrazca a posúva ich, takže hlavne pre vyššie poriadky nie je jednoduché merať ich malú intenzitu v porovnaní s pozadím. Vyhodnocovanie experimentálnych údajov si preto vyžaduje iný druh predpokladov ako v klasickej kryštalografii. Najčastejšie sa používa teória tekutých

kryštálov rozpracovaná v práci (Caille, 1972). V tejto teórii je hlavným fluktuáčnym parametrom

$$h = \frac{q^2 kT}{8p\sqrt{KB}}; \quad h_h = h \cdot h^2, \quad (2)$$

ktorý obsahuje modul ohybu lipidovej dvojvrstvy K , objemový modul kompresie B , kT je tepelná energia a h v druhom vzťahu predstavuje difrakčný poriadok. Po určení tohoto parametra modelu s opakujúcou sa vzdialenosťou d je potom možné určiť vplyv difúzneho rozptylu v štruktúrnom faktore, ktorý je vyjadrený vzťahom

$$S(q) \propto \left(q - n \frac{2p}{d} \right)^{-2+h_h}. \quad (3)$$

Na tomto základe je možné urobiť korekciu form faktoru a obrátenou Fourierovou transformáciou ho previesť na profil elektrónovej hustoty. Z nej sa zvyčajne extrahuje vzdialenosť fosfátových skupín, ktorá je dobrou charakteristikou hrúbky dvojvrstvy.

Iný prístup v riešení problému fluktuácií štruktúry v multilamellárnom systéme lipidových dvojvrstiev používa skupina O. Mouritsena (Lemmich et al., 1996). Naproti predchádzajúcemu prístupu, v ktorom bolo stredovanie cez fluktácie robené osobitne pre form faktor a štruktúrny faktor popísaný Caillého teóriou tekutých kryštálov, tu sa streduje výsledný produkt týchto dvoch faktorov

$$I(q) = \left\langle s(q) \cdot |f(q)|^2 \right\rangle / C_q. \quad (4)$$

Form faktor v tomto vyjadrení rozdeľujú na základe modelovej reprezentácie na štyri vrstvy predstavujúce dve oblasti hydrofilných polárnych hlavičiek, oblasť hydrofóbných acylových reťazcov a vody. Každá oblasť je charakterizovaná vlastnou rozptylovou hustotou neutrónov b . Pre prvý druh lokálnych fluktuácií používajú predpoklad Gaussovskej distribučnej funkcie jednotlivých hrúbok s hlavnými hodnotami d a štandardnými odchýlkami σ . Aplikovaním Fourierovej transformácie na tieto Gaussove funkcie a po niekoľkých algebraických úpravách získavajú vzťah pre intenzitu rozptylu neutrónov na modeli charakterizovanom hrúbkami vodnej fázy, oblasti lipidových hlavičiek, acylových reťazcov ako aj plochu prierezu fosfolipidovej molekuly na medzifázovom rozhraní A a počet molekúl vody medzi fosfolipidovými dvojvrstvami. Je potrebné poznamenať, že v tomto modeli sa predpokladá striktné oddelenie oblasti lipidových hlavičiek a oblasti vodnej fázy medzi jednotlivými dvojvrstvami v multilamellárnom systéme. Takto odvodené vzťahy sa potom

jednoducho aplikujú na fitovanie experimentálne meranej rozptylovej krivky a extrahujú vyššie popísané modelové parametre.

Podobný prístup bol aplikovaný na vyhodnocovanie rozptylových kriviek X-lúčov na neorientovaných multilamelárnych lipozómoch pri plnej hydratácii v práci skupiny P. Laggnera (Pabst et al., 2000). Po vykonaní ustredzenia výrazu pre intenzitu cez fluktuácie v štruktúre dvojvrstvy získavajú vzťah

$$I(q) \propto \frac{1}{q^2} \left[\langle |f(q)| \rangle^2 \langle s(q) \rangle + N \left(\langle |f(q)|^2 \rangle - \langle |f(q)| \rangle^2 \right) \right], \quad (5)$$

ktorý neskôr ešte upravujú do tvaru

$$I(q) \propto \frac{1}{q^2} \left[\langle |f(q)| \rangle^2 \langle s(q) \rangle + N_{diffuse} \langle |f(q)|^2 \rangle \right], \quad (5a)$$

ktorý vyjadruje difrakciu na multilamelárnom systéme fosfolipidových dvojvrstiev s kváziusporiadaním na dlhé vzdialenosti plus pridaný difúzny rozptyl na jednoduchej nekorelujúcej dvojvrstve. Formula pre form faktor je v tomto prípade rozdelená na tri oblasti, obsahujúce dve oblasti polárnych hlavičiek a konové metylové skupiny, všetky popísané Gaussovými distribučnými funkciami s príslušnými hlavnými hodnotami a hodnotami polšírok. Štruktúrny faktor $S(q)$ je charakterizovaný rovnako ako v prácach Nagla prostredníctvom Caillého teórie tekutých kryštálov. Takýmto postupom teda získali vzťah pre intenzitu rozptylu na tekutokryštalickom systéme, ktorý ešte zvinú s rozlišovacou funkciou inštrumentu započítanou konvolúciou s Gaussovskou distribúciou. Výsledný vzťah pre rozptylovú intenzitu je potom opäť použitý na fitovanie experimentálnych rozptylových kriviek a získanie parametrov modelu charakterizovaného hrúbkami jednotlivých oblastí, plochou molekulového prierezu fosfolipidu a množstva molekúl vody lokalizovaných ako medzi jednotlivými vrstvami, tak aj v oblasti polárnych hlavičiek.

Unilamelárne systémy

Popri fosfolipidových dvojvrstvách organizovaných v multilamelárnych systémoch sú na určovanie hrúbky dvojvrstvy používané aj modely skladajúce sa z jednej dvojvrstvy, ktorá sa pri narastujúcom obsahu vody spontánne spája do sférického objektu unilamelárnych lipozómov. Príkladom riešenia daného problému na takomto systéme prostredníctvom rozptylu X-lúčov je práca vedeckej skupiny pod vedením P. Laggnera (Laggner et al., 1979).

Základom pre interpretáciu štruktúry systému je Pattersonova distribučná funkcia vzdialeností v reálnom priestore $p(r)$, ktorá je Fourierovou transformáciou rozptylovej krivky, podľa vzťahu

$$p(r) = \frac{1}{2p^2} \int_0^{\infty} I(q)qr \sin(qr) dq. \quad (6)$$

Táto funkcia súvisí s frekvenciou výskytu všetkých možných vzdialeností r medzi dvomi objemovými elementami jednej častice, váženými relatívnou elektrónovou hustotou. Hrúbka vrstvy v takomto dutom objekte potom môže byť odhadnutá z hodnoty r , pri ktorej funkcia $p(r)$ prechádza z veľkých počiatočných oscilácií od negatívnych do pozitívnych hodnôt do susednej oblasti stúpajúcich menších oscilácií. Na vyjadrenie priebehu tejto funkcie používajú autori interpoláciu prostredníctvom tridsiatich kubických splinov, takisto ako aj v prípade interpolácie pomocou dvanástich kubických splinov v prípade korelačnej funkcie $\gamma_i(r)$, ktorá súvisí s takzvaným faktorom hrúbky $I(q)q^2$ vzťahom

$$g_i(r) = \frac{1}{p} \int_0^{\infty} I(q)q^2 \cos(qr) dq. \quad (7)$$

Analogicky k priestorovej funkcii $p(r)$ môže byť extrahovaný parameter hrúbky dvojvrstvy aj z tejto jednodimenzionálnej funkcie v mieste, kde táto vymizne. V ideálnom prípade dekonvolúcia funkcie $\gamma_i(r)$ poskytuje priame vyhodnotenie elektrónovej hustoty rozdelenej cez dvojvrstvu, no vzhľadom k požiadavke vysokej presnosti autori uprednostňujú vyhodnotenie prostredníctvom Fourierovej transformácie amplitúdy hrúbky $qI^{1/2}(q)$, ktoré predpokladá symetrický profil, podľa vzťahu

$$\Delta r(r) = Const \cdot \int_0^{\infty} q\sqrt{I(q)} \cos(qr) dq. \quad (8)$$

Z priebehu distribúcie elektrónovej hustoty je možné získať ďalší parameter charakterizujúci hrúbku dvojvrstvy a to vzdialenosť dvoch píkov odpovedajúcich fosfátovým skupinám.

Rovnakým postupom vyhodnocujú experimentálne rozptylové krivky aj Lewis a Engelman v práci (Lewis et al., 1983). Tiež ako vhodnú metódu analýzy spojitéch rozptylových dát používajú Fourierovu transformáciu do Pattersonovej funkcie $p(r)$, ktorá nevyžaduje informáciu o fáze a pre fosfolipidovú dvojvrstvu vedie k pozitívnemu píku vo vzdialenosti d , ktorá zodpovedá fosfátovej skupine. Od každej

experimentálnej krivky rozptylu X-lúčov odpočítavajú pozadie, spôsobené systematickou chybou inštrumentu a to tak, že časť krivky používaná na inverznú Fourierovu transformáciu končí na nulovej hodnote.

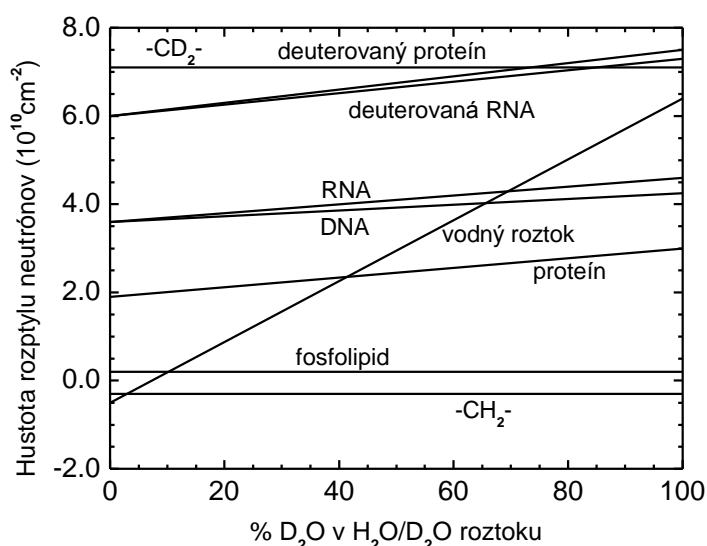
Boli tu rozobraté niektoré prístupy, s ktorými sa môžeme bežne stretnúť v literatúre a ktoré sú založené na vyhodnocovaní experimentálnych kriviek rozptylu synchrotrónového žiarenia a rozptylu neutrónov. Hoci sa týmto metódam merania venujem v ďalšej kapitole, je vhodné spomenúť ešte jeden prístup, ktorého novým prínosom je vylepšenie samotnej meracej procedúry (Kiselev et al., 2000). Hlavným problémom pri meraní rozptylu je totiž správne odčítanie pozadia spôsobené jednak nekoherentným rozptylom, v prípade neutrónov najmä od atómov vodíka, a jednak technickými parametrami prístroja. V mnohých prípadoch sa potom stáva, že signál prichádzajúci z rozptylu žiarenia na vzorke má príliš malú intenzitu a stráca sa v pozadí. Keďže znižovanie pozadového šumu spôsobeného meracím zariadením je technicky limitované, druhou možnosťou riešenia problému je zvýšenie rozdielu rozptylovej amplitúdy pre vzorku a pre prostredie, v ktorom je vzorka dispergovaná. Pre rozptyl neutrónov sa spomenuté ťažkosti riešia zámennou obyčajnej vody v rozpúšťadle za ťažkú vodu, pričom sa predpokladá, že táto zámena neovplyvňuje vlastnosti samotnej vzorky. Rozdiel rozptylovej hustoty potom napríklad predstavuje $|\Delta\rho_n|=0.45\cdot 10^{10}\text{ cm}^{-2}$ pre rozptyl neutrónov na DMPC (*dimyristoylfosfatidylcholín*) molekulách v $L\alpha$ fáze v H_2O a $|\Delta\rho_n|=6.34\cdot 10^{10}\text{ cm}^{-2}$ pre rovnaký rozptyl v D_2O .

Podobný postup je však neúčinný v prípade X-lúčov. So zaujímavým nápadom prichádzajú autori v práci (Kiselev et al., 2000), ktorí navrhujú použiť roztok sacharózy a vody. V spomínanej práci skúmajú zmenu rozdielu rozptylových hustôt, ktorá bola desaťnásobná v prípade sacharózového roztoku s obsahom sacharózy 40 %, a tiež vplyv tohoto roztoku na samotnú vzorku fosfolipidových lipozómov. Tento prístup však zatiaľ zostáva v úrovni výskumu, kde je potrebné preskúmať akým spôsobom interaguje takýto roztok s molekulami fosfolipidu a ako ovplyvňuje vnútornú štruktúru lipidovej dvojvrstvy ako aj ich vzájomnú interakciu.

II Rozptyl pod malými uhlami

Pozorovanie štruktúr fosfolipidových dvojvrstiev a ich vlastností je, vďaka rýchlemu rozvoju techniky, dnes možné širokým spektrom metód a prístupov. Popri pomerne často používaných spektrometrických metódach (EPR – *elektrónová paramagnetická rezonancia*, NMR – *jadrová magnetická rezonancia*, fluorescencia) a kalometrii je to v stále väčšej miere používaný rozptyl vhodného žiarenia, alebo častíc na skúmaných objektoch.

Štúdium štruktúry makromolekúl a ich interakcií v roztoku pomocou rozptylu pod malými uhlami (*SAS - small angle scattering*) môže byť uskutočnené X-lúčmi, alebo neutrónmi, pričom vzhľadom na základné princípy rozptylového experimentu nie je medzi nimi veľký rozdiel. V porovnaní s X-lúčmi, neutróny poskytujú vlnové dĺžky v intervale 1-10 Å, s malými energiami a zanedbateľnou absorpciou vo väčšine materiálov, čo vedie k vysokej penetrácii a malému radiačnému poškodzovaniu vzorky. Ďalšou výhodou je, že zatiaľ čo zväzok X-lúčov je rozptyľovaný len elektrónmi atómov vzorky, neutróny sa rozptyľujú na jadrách atómov s výrazným efektom pri rôznych izotopoch. Najmä vďaka veľkým rozdielom v rozptylovej amplitúde vodíka a deutéria sa využíva metóda variácie kontrastu, ktorú dokresľuje graf na obrázku (Obr.4). Tento efekt umožňuje tiež značenie rôznych častí štruktúry a poskytuje tak mocnú aplikáciu pre experimenty s malým priestorovým rozlíšením akým rozptyl pod malými uhlami je.



Obr.4: Hustota rozptylovej dĺžky neutrónov rôznych biologických zložiek ako funkcia D₂O/ H₂O pomeru vo vodnom roztoku. Prebraté z prednášky Giuseppa Zaccacia na 11. kurze HERCULES.

II.1 Rozptyl na jednej častici

Experimentálne pozorovaná intenzita rozptylu I je výsledkom interakcie neutrónov s jadrami v prípade rozptylu neutrónov, alebo X-lúčov s elektrónmi v prípade rozptylu X-lúčov. Miera tejto interakcie je charakterizovaná pre jadrá atómov rozptylovou amplitúdou b a pre elektróny nábojom e , respektíve objemovou hustotou týchto veličín ρ . V prípade dopadu plochej vlny $A_0 \exp(i\vec{k}_0 \cdot \vec{r})$ na jeden atóm (elektrón), tento sa stáva zdrojom sférického vlnenia a v bode \vec{r} vzniká výsledná vlna ako suma dopadajúcej a rozptýlenej vlny. Interakciu dopadajúcej vlny s poľom $j(\vec{r})$ potom v prvom priblížení nemnohonásobného rozptylu predstavuje superpozícia sférických vln od všetkých jednotlivých atómov, alebo elektrónov, ktorá musí spĺňať bezčasovú Schrödingerovu rovnicu

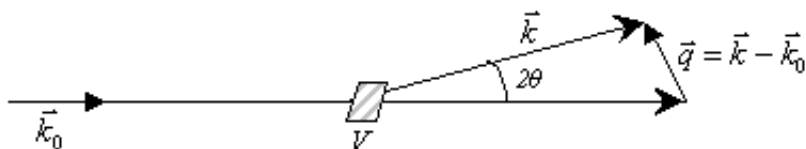
$$[\Delta + k_0^2 + nj(\vec{r})]\psi(\vec{r}) = 0, \quad (9)$$

kde $k_0 = |\vec{k}_0| = \frac{2p}{I}$ je vlnové číslo a v reprezentuje interakciu dopadajúcej vlny s hmotou. Poruchovým riešením tejto rovnice získame amplitúdu rozptylu na skalárnom poli $j(\vec{r})$ v prvom Bornovskom priblížení jednoduchého, teda nemnohonásobného rozptylu v tvare (Pišút et al., 1983)

$$F(\vec{q}) = \frac{n}{4p} \int j(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r}; \quad |\vec{q}| = |\vec{k} - \vec{k}_0| = \frac{4p \sin(\theta)}{I}, \quad (10)$$

kde \vec{q} je rozptylový vektor daný rozdielom vlnového vektora dopadajúcej a rozptýlenej vlny a 2θ je uhol rozptylu zvieraný týmito vektormi (viď Obr.5).

Obr.5: Schématická reprezentácia rozptylu na sledovanej vzorke V



Rovnica (2) predstavuje Fourierov obraz funkcie $j(\vec{r})$, t.j. rozklad funkcie $F(\vec{q})$ do systému básových ortogonálnych funkcií, ktorý je charakteristický pri riešení rozptylových úloh. Tento prístup rozkladu funkcií do sumy série sínusových a

kosínusových vln, ktorých frekvencie sú celočíselné násobky základnej frekvencie rozvinul Joseph Fourier ako matematický aparát na analýzu komplikovaných vln. V kryštalografii je používaný na reprezentáciu spojito sa meniacej funkcie hustoty elektrónov, alebo hustoty dĺžky rozptylu neutrónov a príslušné Fourierove koeficienty sú nazývané form faktorom a jeho absolútna hodnota rozptylovou amplitúdou (Blow, 2001). V skutočnom experimente sa však nemeria rozptylová amplitúda, ale intenzita rozptylu, ktorá je úmerná štvorcu amplitúdy

$$I(\mathbf{q}) = |F(\mathbf{q})|^2 = F \cdot F^* = \iint \mathbf{r}(\mathbf{r}_1) \cdot \mathbf{r}(\mathbf{r}_2) \cdot e^{-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)} dV_1 dV_2. \quad (11)$$

Integrovanie tohoto výrazu sa rozdelí do dvoch krokov (Glatter et al., 1982):

1. spárujú sa body s rovnakou vzájomnou vzdialenosťou (vytvorenie fiktívneho C-priestoru)

$$\tilde{r}^2(\mathbf{r}) = \int \mathbf{r}(\mathbf{r}_1) \mathbf{r}(\mathbf{r}_2) dV_1; \quad \mathbf{r} = \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2 \quad - \text{autokorelačná funkcia} \quad (12)$$

2. integrje sa cez tieto relatívne vzdialenosti (integrovanie cez C-priestor)

$$I(\mathbf{q}) = \int \tilde{r}^2(\mathbf{r}) \cdot e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} dV \quad \wedge \quad \tilde{r}^2(\mathbf{r}) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int I(\mathbf{q}) \cdot e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{q}^3. \quad (13)$$

V ďalšom kroku riešenia rozptylovej úlohy využijeme predpoklady malouhlového rozptylu, ktorý predpokladá štatisticky izotropný systém zostávajúci bezo zmeny napríklad pri rotácii častice, čo je splnené v prípade sféricky symetrického objektu, keď autokorelačná funkcia nezávisí od smeru vektora \mathbf{r} , ale len od jeho veľkosti

$$\tilde{r}^2(\mathbf{r}) \equiv \tilde{r}^2(|\mathbf{r}|) \quad \Rightarrow \quad \langle e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \rangle = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad \text{Debye (1915)}. \quad (14)$$

Ďalej uvažujeme štatisticky neusporiadaný systém bez vzájomnej korelácie medzi dvoma vzdialenými bodmi, čiže bez akejkoľvek formy usporiadanosti systému s náhodne distribuovanými časticami, tak aby hodnota autokorelačnej funkcie bola v každom bode blízka priemernej hodnote hustoty rozptylovej dĺžky

$$\begin{aligned} \tilde{r}^2(r) \approx \bar{r} \quad \Rightarrow \quad \tilde{r}^2(r) &= \int \mathbf{r}(r_1) \mathbf{r}(r_2) dV_1 \xrightarrow{r \rightarrow \infty} \bar{r}^2 V \\ \tilde{r}^2(0) &= \int r^2(r) dV = \overline{r^2} V. \end{aligned} \quad (15)$$

Takže štruktúra je reprezentovaná len konečným priestorom, kde sa \tilde{r}^2 líši od konečnej hodnoty. Tento medzivýsledok je v zhode s faktom, že konštantná hodnota cez celkový objem rozptyluje rovnako ako prázdna vzorka a nemôže prispievať do difrakčného obrazu výslednej rozptylovej intenzity (Glatter et al., 1982). Je zaužívané

odpočítať pozadie a používať rozdiel hustoty $h = r - \bar{r}$, na základe ktorej definujeme korelačnú funkciu ako priemer dvoch fluktuácií vo vzdialenosti r :

$$g(r) = \langle h(r_1)h(r_2) \rangle; \quad r = |r_1 - r_2| \quad \text{Debye \& Bueche (1949)}$$

$$g(0) = \overline{h^2} \quad \wedge \quad g \xrightarrow{r \rightarrow \infty} 0. \quad (16)$$

Výslednú intenzitu rozptylu pod malými uhlami na systéme spĺňajúcom vyššie uvedené podmienky (6) a (7), potom môžeme písať v tvare (Glatter et al., 1982):

$$I(q) = V \int_0^\infty 4\pi r^2 g(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad \wedge \quad g(r) = \frac{1}{2\pi^2 V} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq, \quad (17)$$

alebo po zavedení funkcie distribúcií vzdialeností

$$p(r) = g(r)r^2 \quad \text{distribučná funkcia vzdialeností} \quad (18)$$

v tvare (Glatter et al., 1982):

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad \wedge \quad p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) qr \sin(qr) dq. \quad (19)$$

Uvedené vzťahy boli odvodené pre malouhlový rozptyl na homogénnej izotropnej častici. V reálnom experimente máme, samozrejme, v meranej vzorke viacero častíc, ktoré môžu byť viac, či menej rovnaké, môžu interagovať navzájom a odlišovať sa od predpokladu dokonalej sféry. Poďme sa preto teraz pozrieť na zmeny zapríčinené týmito odlišnosťami.

II.2 Systém identických častíc

Prvým závažným rozdielom reálneho experimentu od vyššie odvodených vzťahov je počet častíc vo vzorke. V predchádzajúcom sme uvažovali rozptyl na jednom objekte, no pri štúdiu biologických objektov je potrebné používať biologicky relevantné prostredie, ktorým je v prípade fosfolipidovej dvojvrstvy vodný roztok, v ktorom nie je možné pripraviť vzorku s jediným lipozómom. Najjednoduchším prípadom je vzorka identicky rovnakých častíc, ktoré navzájom neinteragujú a výslednú intenzitu rozptylu môžeme jednoducho vyjadriť ako súčin počtu častíc N a intenzity od jednej častice I_0

$$I(q) = N \cdot I_0(q). \quad (20)$$

Predpoklad o neinteragujúcich časticiach je však príliš zjednodušujúci a s narastajúcou koncentráciou častíc prestáva byť úplne platný. Preto je pre vzorky s koncentráciou lipidu väčšou než 2 hmotnostné % nutné zahrnúť aj korekciu spôsobenú týmto faktorom, ktorú reprezentuje štruktúrny faktor $S(c,q)$, závisiaci od rozptylového vektora q a koncentrácie c

$$I(q) = N \cdot S(c, q) \cdot I(q). \quad (21)$$

Štúdiu štruktúrneho faktora sa dnes venuje rovnako veľká pozornosť ako štúdiu samotného formfaktora popisujúceho rozptyl na jednom objekte, nakoľko tento člen je v mnohých prípadoch nezanedbateľný a v oblastiach malých hodnôt rozptylového vektora je dokonca jeho vklad podstatný. Jeho priebeh je však závislý na mnohých faktoroch a charakteristikách vzorky, z ktorých snáď najväčší vplyv má usporiadanie častíc na veľké vzdialenosti, čo priamo súvisí s charakterom skúmaných častíc a ich koncentráciou vo vzorke (Vachette et al., 2000).

Pre rozriedený a veľmi slabo interagujúci systém, čo dobre spĺňa vodný roztok nenabitých unilamelárnych lipozómov pri koncentrácii fosfolipidu menšej ako 2 hmotnostné %, je však hodnota štruktúrneho faktora rovná jednej a teda pre výslednú intenzitu rozptylu na takomto systéme nie je potrebné ho uvažovať (Nawroth et al., 1989), (Kiselev et al., 2001).

II.3 Rozptyl na časticiach rôzneho tvaru

V prípade charakterizácie tvaru častice rozlišujeme v prípade lipidových agregátov tri základné geometrie, ktoré môžu nadobudnúť: guľu, elipsoid a tyčinkovitý útvar, ktoré sa líšia v platnosti predpokladov použitých v predchádzajúcom odvodení a teda aj v konečnom analytickom vyjadrení pre intenzitu rozptylu. Preto je potrebné pri takomto odvodení prihliadať na konkrétny tvar a usporiadanie sledovaného objektu a postupovať v každom prípade individuálne.

Guľa

Predchádzajúce odvodenie bolo urobené pre sféricky symetrické častice a teda pre objekt vo forme gule zostáva kompletne platný. Za predpokladu homogénnej hustoty rozptylovej amplitúdy ρ v dvojvrstve môžeme písať (Feigin et al., 1987), takzvanú Rayleigh-Gans-Debye formulu:

$$I(q) = N \cdot (4p)^2 [\Delta r (A_2 - A_1)]^2; \quad A_k = \frac{\sin qR_k - qR_k \cos(qR_k)}{(qR_k)^3}, \quad (22)$$

kde $\Delta r = r - r_s$ predstavuje rozdiel hustoty rozptylu na častici a na prostredí a R_1, R_2 reprezentuje vnútorný a vonkajší polomer častice. Tento jednoduchý model, nazývaný aj *singleshell model*, približne vystihuje skutočnú situáciu, hoci zároveň potláča informáciu o vnútornej štruktúre, ktorá prichádza z rozptylovej krivky.

Elipsoid

Pre nesférické deformácie prestáva byť platná podmienka (14) a ustrednenie, ktoré sa v danom kroku robí, musí byť urobené s ohľadom na tento fakt. Tento krok si môžeme predstaviť na príklade vzorky rovnakých elíps, ktoré sú identické, ale náhodne orientované. Keďže výsledná intenzita je superpozíciou všetkých rozptýlených vlnení, ustrednenie musí byť zobrazené cez všetky možné orientácie týchto elipsoidov. V praxi to znamená stredovanie cez uhol ν a φ od 0° do 90° , takže intenzita rozptylu pod malými uhlami na elipsoidných časticiach s poloosami a, b, c má tvar (Feigin et al., 1987):

$$I(q) = N \cdot (4pabc)^2 \int_0^1 \int_0^1 [\Delta r (a_2 b_2 c_2 A_2 - a_1 b_1 c_1 A_1)]^2 dx dy; \quad (23)$$

$$A_k = \frac{\sin qt_k - qt_k \cos(qt_k)}{(qt_k)^3}; \quad t_k = \sqrt{(a_k^2 \cos^2(\frac{\nu}{2} x) + b_k^2 \sin^2(\frac{\nu}{2} x))(1 - y^2) + c_k^2 y^2}.$$

Posledný vzťah vlastne predstavuje konvolúciu intenzity rozptylu pre guľu s polomerom t_k a funkcie tohoto polomeru nadobúdajúcej hodnoty od najmenšieho po najväčší rozmer elipsoidu, čo je spomínané ustrednenie cez uhly ν a φ .

Tubula

Podobný vzťah ako pre intenzitu rozptylu na elipsoidných časticiach získame aj pre rozptyl na časticiach tvaru valca, s výškou H a kruhovou základňou s polomerom r (Feigin et al., 1987)

$$I(q) = N \cdot \left(\frac{2p}{q^2}\right)^2 \int_0^1 \left[\Delta r \left(\frac{R_2 J_1(qR_2 \sqrt{1-x^2})}{\sqrt{1-x^2}} - \frac{R_1 J_1(qR_1 \sqrt{1-x^2})}{\sqrt{1-x^2}} \right) \frac{\sin(qH \frac{x}{2})}{\frac{x}{2}} \right]^2 dx$$

$$J_n(x) = \frac{1}{2\pi i^n} \int_0^{2\pi} \exp(ix \cos(j) + inj) dj, \quad (24)$$

kde $J_n(x)$ je Besselova funkcia n -tého poriadku.

Všetky doteraz odvodzované vzťahy rozptylu na sféricky symetrických objektoch a ich deformáciách boli privedené s ohľadom na guľovitý a guľe podobný

tvár lipozómov v uzavretej forme. Na fosfolipidovú dvojvrstvu tvoriacu takýto lipozóm je však možné nahliadať aj iným spôsobom. Z bežne používaných, biologicky relevantných fosfolipidových molekúl vytvorená dvojvrstva je v porovnaní s veľkosťou gule lipozómu, v ktorom je usporiadaná dostatočne malá a teda na malých úsekoch môže byť reprezentovaná plochou rovinou. Celý systém guľovitých lipozómov potom môže byť z hľadiska malouhlového rozptylu reprezentovaný systémom náhodne orientovaných fosfolipidových dvojvrstiev. Takýto prístup je nazývaný aproximáciou Kratkeho-Poroda (Sadler et al., 1982) a intenzita rozptylu na takomto systéme je Fourierovou transformáciou hustoty rozptylu na náhodne orientovaných tenkých rovinách a pre *singleshell model* nadobúda tvar:

$$I(q) = N \frac{4}{q^4} \cdot [\Delta r \cdot \sin(qa)]^2, \quad (25)$$

kde sa integrovalo od stredu dvojvrstvy, považovanej za homogénnu, po jej hranicu označenú a . Tento vzťah charakterizuje unilamelárny lipozóm ako systém tenkých listov náhodne distribuovaných v roztoku, čo je druhá možnosť ako opísať tenkú dvojvrstvu organizovanú vo veľkých dutých sférických objektoch. Môžeme si všimnúť, že vo vzťahu skutočne nie je žiadna závislosť od polomeru lipozómu, ale len od hrúbky dvojvrstvy.

II.4 Polydisperzný systém

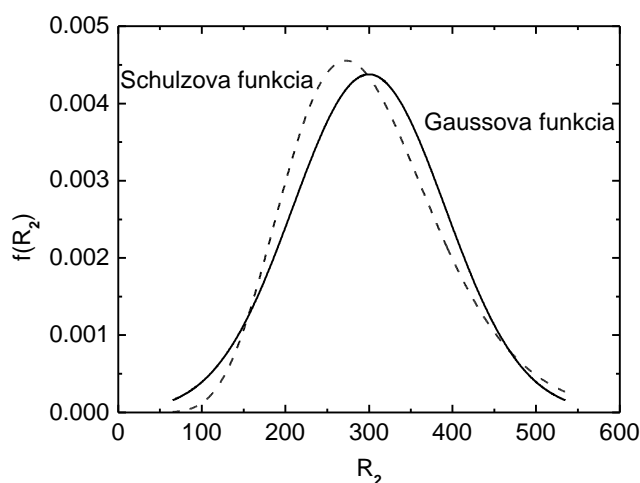
Ďalším obmedzením, ktoré bolo doteraz predpokladané je monodisperznosť skúmaného systému. V monodisperznom roztoku sú všetky častice identické, čo platí pre častice s dobre definovaným tvarom, ako je natívny proteín, alebo vírus. V prípade roztoku úsekov DNA (*deoxyribonukleová kyselina*), alebo denaturovaných proteínov, roztok je chemicky monodisperzný (priestor jednej molekuly), ale polydisperzný z hľadiska tvaru (molekuly zaujímajú veľa rôznych konformácií). Polydisperzia vo veľkosti môže byť pozorovaná v prípade častíc rovnakého tvaru, ako je to pri suspenziách micel, a polydisperzia aj v tvare aj vo veľkosti je prítomná v prípade rôznych agregátov (Vachette et al., 2000).

Vo vodnom roztoku unilamelárnych lipozómov dochádza pri príprave vzorky taktiež k rozdielom a to najmä vo veľkostiach jednotlivých objektov vo vzorke. Preto je potrebné urobiť korekcie vzhľadom na túto deformáciu vzorky, kde už nemôžeme

uvažovať systém identických častíc. To znamená, že je nutné vyjadriť výslednú intenzitu rozptylu na celej vzorke ako sumu príspevkov od jednotlivých lipozómov s rôznymi veľkosťami. Z doterajších štúdií je známe, že systém extrudovaním pripravených unilamelárnych lipozómov obsahuje sférické častice rôzneho polomeru, pri konštantnej hrúbke dvojvrstvy, ktorých rozdelenie sa dá štatisticky dobre popísať niektorou rozdeľovacou funkciou, charakterizovanou strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou. Komura a spoluautori (Komura et al., 1982) ako prví navrhli, že ako distribučná funkcia môže byť použitá Gaussova rozdeľovacia funkcia (Obr.6) v tvare:

$$f(R_2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot S_R} \cdot \exp\left[-\frac{(R_2 - R_{2,mean})^2}{2S_R^2}\right], \quad (26)$$

kde $R_{2,mean}$ je hlavná hodnota vonkajšieho polomeru lipozómov a polydisperzia veľkosti lipozómov je vyjadrená cez parameter S_R .



Obr.6: Zobrazenie a porovnanie tvaru rozdeľovacích funkcií Gaussovskej a Schulzovskej distribúcie okolo hlavnej hodnoty $R_2=300 \text{ \AA}$ a s distribučným parametrom $\sigma(R_2)=91,15$.

Výhodou tejto funkcie je rýchle klesanie do nuly so vzdáľovaním sa od strednej hodnoty a naopak jej nedostatkom je, že nulovú hodnotu dosiahne až v nekonečne veľkej vzdialenosti od hlavnej hodnoty, čo je z hľadiska skutočného systému lipozómov nereálne. Navyše z experimentálnych štúdií venujúcich sa výskumu polydisperzie takýchto systémov vyplýva, že hodnoty veľkostí polomerov sfér nie sú rozdelené symetricky okolo stredného polomeru. Preto sa dá predpokladať, že na opísanie polydisperzity veľkosti lipozómov je vhodnejšie použiť rozdeľovaciu

funkciu známu pod menom Schulzova distribučná funkcia (Gradzielski et al., 1992) (vid' Obr.6), ktorá má tvar:

$$f(R_2) = \left(\frac{t+1}{R_{2,mean}} \right)^{t+1} \cdot \frac{R_2^t}{\Gamma(t+1)} \cdot \exp\left[-\frac{t+1}{R_{2,mean}} r \right]; \quad (27)$$

$$t = \left(\frac{R_{2,mean}}{S} \right)^2 - 1,$$

kde je použité rovnaké označenie ako v prípade Gaussovej rozdeľovacej funkcie.

Vďaka tomu, že poznáme analytické vyjadrenie distribučnej funkcie veľkostí objektov, môžeme pokračovať v úprave vzťahu pre výpočet výslednej intenzity. Za týmto účelom použijeme konvolučný teorém, ktorý hovorí: Ak funkcia C je produktom súčinu funkcií A a B , tak potom Fourierova transformácia funkcie C je rovná konvolúcii Fourierových transformácií funkcií A a B , čo platí taktiež aj naopak (Squire, 2000).

$$C = A \times B \quad \Rightarrow \quad F(C) = F(A) * F(B) \quad (28)$$

To znamená, že rozptylovú intenzitu pre polydisperzný systém charakterizovaný v rozdelení veľkostí distribučnou funkciou $f(R)$ získame ako konvolúciu intenzity rozptylu na jednej častici s touto rozdeľovacou funkciou

$$I(q) = I_0(q) * f(R). \quad (29)$$

Iným prístupom k riešeniu tohoto problému je spôsob, ktorý rozpracoval vo svojich prácach Moody (Moody, 1975). Tento sa zakladá na aproximatívnom vyjadrení formuly pre rozptyl na sférických objektoch priamo obsahujúci korekciu na polydisperziu veľkostí

$$I(q) = N \frac{(R^2 + \Delta^2)}{q^4} \cdot [\Delta r \cdot \sin(qa)]^2 + \frac{1}{q^6} \cdot [\Delta r \cdot A(a)]^2; \quad (30)$$

$$A(a) = \frac{\sin qa - qa \cos(qa)}{(qa)^3}$$

kde sa integrovalo od stredu dvojvrstvy, považovanej za homogénnu, po jej hranicu označenú a , takisto ako je to v prípade aproximácie Kratkeho-Poroda (25), ktorá je v skutočnosti prvým členom tohoto vyjadrenia bez uvažovania polydisperzie.

II.5 Vyhodnocovanie rozptylových kriviek

Základnými parametrami popisujúcimi agregáty fosfolipidových molekúl sú tvar vzniknutého objektu, jeho veľkosť a z biologického hľadiska azda najvýznamnejším je hrúbka fosfolipidovej dvojvrstvy, ktorá určuje základné biologické vlastnosti membrány. Na meranie týchto parametrov sa používajú rozptylové experimenty, kde sa získava intenzita rozptylu ako funkcia rozptylového vektora, čo je rozptylová krivka. Vyhodnocovanie takto nameraných experimentálnych dát je možné urobiť niekoľkými základnými spôsobmi.

Guinierova aproximácia

Analytická funkcia intenzity rozptylu, ktorá bola odvodená vyššie sa vyznačuje asymptotickým správaním v oblasti malých hodnôt rozptylového vektora, kde môžeme výraz $\frac{\sin(qr)}{qr}$ rozložiť do McLaurinovho radu. Ak sa obmedzíme len na

prvé dva členy tohoto rozvoja, rovnica (19) prejde do tvaru

$$I(q) \approx I(0) \cdot \left(1 - \frac{q^{r-3} R_g^2}{r}\right) \approx I(0) \cdot \exp\left(-\frac{q^{r-3} R_g^2}{r}\right); \quad (31)$$

$$R_g^2 = \frac{\int_V r(r) r^2 dr}{\int_V r(r) dr},$$

kde R_g je gyračný polomer a r je parameter určujúci formu objektu (Feigin et al., 1987). Bolo ukázané, že gyračný polomer veľmi úzko súvisí s hrúbkou dvojvrstvy pre lamelárne fázy fosfolipidov, ale aj s charakteristikami veľkostí ostatných útvarov a parameter r zase veľmi dobre popisuje tvar, aký fosfolipidová dvojvrstva zaujme, napríklad (Feigin et al., 1987):

tenká platňa hrúbky h	$R_g^2 = \frac{h^2}{12}$	$r=1$
plná guľa polomeru R	$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$	$r=3$
dutá guľa polomerov R_1, R_2	$R_g^2 = \frac{3}{5} \frac{R_2^5 - R_1^5}{R_2^3 - R_1^3}$	$r \approx 1$ pre tenkú vrstvu
plný valec polomeru R a výšky H	$R_g^2 = \frac{R^2}{2} + \frac{H^2}{12}$	$r=2$

Experimentálne sa gyračný polomer získava pre známy tvar objektu a teda známy parameter r z grafu Kratkeho-Poroda $\ln(Iq^{r-3})$ versus q^2 na intervale malých hodnôt rozptylového vektora, kde je táto funkcia približne lineárna. Tento postup je však exaktne platný len pre prípad tenkej plochej platne s laterálnymi rozmermi ďaleko väčšími ako je jej hrúbka. Ostatné príklady sú len dobrými aproximáciami, pričom so zväčšujúcou sa hrúbkou sa zhoršuje presnosť získavaných údajov.

Danou problematikou sa zaoberali tímy na čele s Komurom (Komura et al., 1982) a Balgavým (Balgavý et al., 1998), ktorí vo svojich úvahách predpokladali, že pre lipozómy dispergované v ľažkej vode možno použiť model *singleshell*, v ktorom je hustota rozptylovej amplitúdy v dvojvrstve homogénna. Tento model však neuvažuje o vnútornej štruktúre lipozómu, ale systém rozdeľuje len na oblasť dvojvrstvy a okolitej vody.

Pencerova aproximácia

Pencer a Hallet (Pencer et al., 2000) navrhujú alternatívnu metódu založenú na hľadaní prvého lokálneho maxima na grafe závislosti Iq^4 versus q na intervale $q\hat{\Gamma}(0.03;0.10) \text{ \AA}$. Tento postup môže byť skutočne veľmi užitočný a úspešný, pretože vyplýva z teoretického zákona asymptotického správania sa rozptylovej krivky. Avšak táto metóda je veľmi citlivá na presnosť experimentálnych bodov. Špeciálne nekoherentné pozadie ovplyvňuje koniec krivky, takže tento prístup nemôže byť použitý na zle kalibrovaných experimentálnych dátach. Na druhej strane, tento parameter priamo súvisí s hrúbkou fosfolipidovej dvojvrstvy, takže táto metóda je vhodná na vyhodnocovanie rozptylových experimentov rovnako ako predchádzajúca Guinierova aproximácia.

Fitovanie experimentálnej krivky

Ďalším možným prístupom vo vyhodnocovaní experimentálne získaných rozptylových kriviek je použiť exaktnú formulu pre funkciu intenzity rozptylu a ňou nafitovať vyhodnocovanú krivku. V tomto postupe nie sú potrebné žiadne aproximácie a priblíženia, ktoré boli použité v predchádzajúcom a nie je ani potrebné dôsledné zvažovanie použitia vyhodnocovaného intervalu rozptylového vektora. Nevýhodou však je množstvo použitých voľných parametrov, pretože s ich narastajúcim počtom rastie počet lokálnych miním funkcie χ^2 a teda klesá spoľahlivosť, že fit skonverguje ku správnej kombinácii parametrov. Napriek všetkému je táto metóda dnes veľmi často používaná, pretože je veľmi flexibilná v

použití modelu, na základe ktorého je privedená analytická formula rozptylovej intenzity.

Treba podotknúť, že tu nestačí použiť vzťahy, ktoré sme odvodili vyššie a ktoré sú v podstate teoretickými vzťahmi pre prípad ideálneho meracieho zariadenia, ale je potrebné vziať do úvahy aj skutočnú rozlišovaciu schopnosť zariadenia ako aj ďalšie korekcie, ktoré ovplyvňujú merané dáta. Tieto úpravy je tak ako v prípade korekcie polydisperzity systému (28) možné započítať do výsledneho výrazu ako konvolúciu neskazenej funkcie intenzity s príslušnými korekčnými funkciami.

Výsledná formula, vhodná na použitie pri fitovaní má potom tvar:

$$I(q) = N \cdot S(c, q) \cdot \int_{q-k \cdot dq}^{q+k \cdot dq} G(q') \int_{R_{mean}-ks}^{R_{mean}+ks} G(R) \cdot I(q', R) \cdot dR dq' + I_{BACK}, \quad (32)$$

kde funkcie G predstavujú korekčné funkcie parametrov q a R , $G(R)$ je distribučná funkcia rozdelenia veľkostí lipozómov, tak ako to bolo diskutované v predošlom texte a $G(q)$ je rozlišovacia funkcia spektrometra charakterizovaného pomerom $\frac{\Delta q}{q}$.

Posledný člen výrazu I_{BACK} je potrebný kvôli odpočítaniu intenzity pozadia, ktorá vzniká nekoherentným rozptylom a tým, že detektory zachytávajú signály z okolia.

Ostanevich vo svojej práci (Ostanevich, 1987) predkladá iný spôsob započítania rozlišovacej funkcie a to prostredníctvom druhého momentu funkcie intenzity v tvare:

$$I_{exp}(q) = I_{theor} + \frac{1}{2} \cdot \sigma^2(q) \cdot \frac{\partial^2 I_{theor}(q)}{\partial q^2} + \mathbf{K}, \quad (33)$$

kde $\sigma(q)$ reprezentuje polšírku v rozdeľovacej funkcii pre jednotlivé hodnoty q . Hoci by sa očakávala jej konštantná hodnota, v experimentoch toto nebolo potvrdené (Ostanevich, 1987).

III Dosiahnuté a rozpracované výsledky práce

Prvým krokom pri riešení zvoleného problému bolo navrhnutie a vytvorenie procedúry určovania základných parametrov charakterizujúcich vlastnosti fosfolipidovej dvojvrstvy v unilamelárnych lipozómoch a s tým spojené vytvorenie zjednodušujúceho modelu, ktorý čo najlepšie vystihuje skutočný objekt. Navrhnutie vhodného modelu musí podliehať reálnym podmienkam a možnostiam, ktoré poskytuje použitá meracia technika. V našom prípade bol zvolený malouhlový rozptyl neutrónov a synchrotrónového žiarenia, pričom doterajšie experimentálne merania boli vykonané na spektrometri malouhlového rozptylu neutrónov (YUMO v SÚJV Dubna, Ruská Federácia) (Obr.7).

Obr.7: Spektrometer rozptylu neutrónov YUMO:

1-aktívna zóna reaktoru IBR-2

2-hrebeňový vodný spomaľovač neutrónov

3-prerušovač

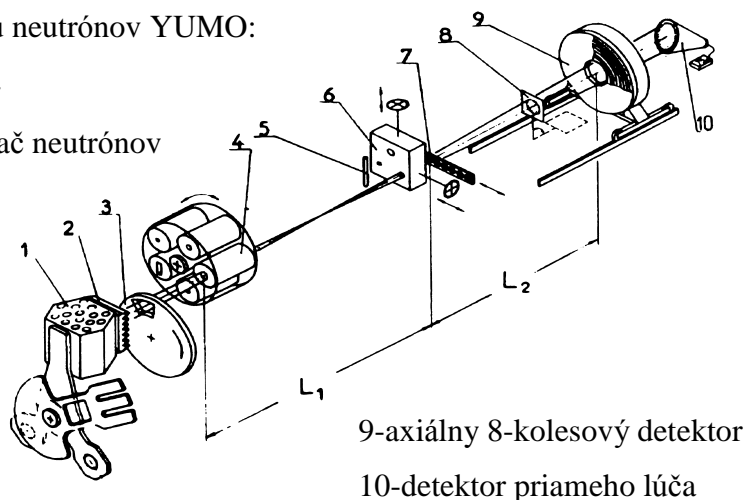
4-prvý kolimátor

5-monitor zväzku

6-druhý kolimátor

7-zásobník so vzorkami

8-vanádový štandard



9-axiálny 8-kolesový detektor

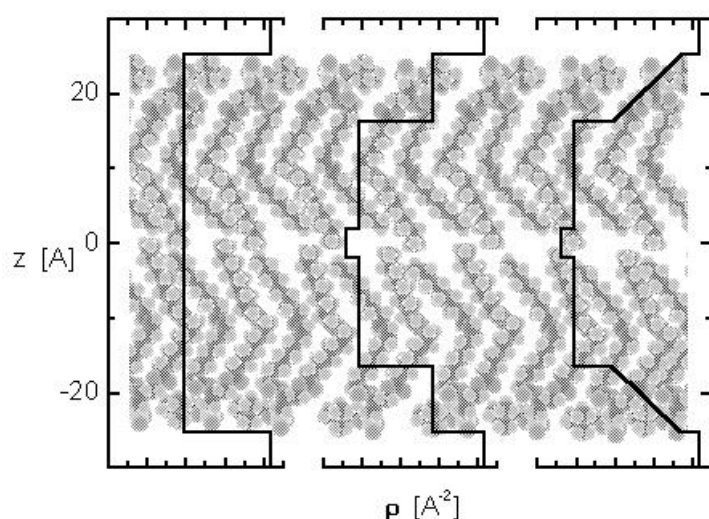
10-detektor priameho lúča

Jedným z najdôležitejších parametrov charakterizujúcich fosfolipidovú dvojvrstvu biologickej membrány je jej hrúbka, ktorá podmieňuje konformáciu transmembránových bielkovín a teda ich prenosové vlastnosti. Doterajšie postupy určenia tohoto parametra, založené na analýze rozptylových experimentov, obsahujú obmedzenie, ktoré predpokladá, že molekuly vody do dvojvrstvy neprenikajú. Dnes je už tento predpoklad prekonaný a preto je nutné vyvinúť nový postup na získavanie hrúbky dvojvrstvy a počtu molekúl vody v dvojvrstve z experimentu.

III.1 Vytvorenie modelu

V doterajšej praxi bolo zaužívané reprezentovať fosfolipidovú dvojvrstvu modelom *singleshell* (Balgavý et al., 1998), (Komura et al., 1982), (Mason et al., 1999), (Pencer et al., 2000), ktorý je najjednoduchším popisom tohoto objektu. Hoci pomerne dobre vystihuje skutočnú situáciu, predsa len potláča informáciu o vnútornej štruktúre, ktorá prichádza z rozptylovej krivky. Model navyše predpokladá suchú dvojvrstvu, bez uvažovania molekúl vody, ktoré membránu obklopujú a dokonca prenikajú do jej hydrofilnej časti, čo môže značne skresľovať získavané výsledky. Preto pri vytváraní modelu v mojej dizertácii sme zvolili podrobnejšie členenie a navrhli sme model *multi shell*, ktorý uvažuje istý počet molekúl vody lokalizovaných vo vnútri oblasti fosfolipidových hlavičiek dvojvrstvy. Dvojvrstvu samotnú model rozdeľuje na päť vrstiev homogénnych vzhľadom na charakteristický parameter. Neskôr bol tento model ešte vylepšený predpokladom o lineárnom náraste obsahu molekúl vody penetrovaných do vnútra dvojvrstvy, ktorý vyplýva z prác skupiny Johna F. Nagla (Nagle et al., 2000).

Z hľadiska použitia rozptylu neutrónov ako meracej techniky sú dvojvrstvy charakterizované hustotou dĺžky rozptylu neutrónov. Jej priebeh cez lipidovú dvojvrstvu zobrazujeme na grafe (Obr.8) pre všetky tri vyššie spomenuté modely spolu s chemickou štruktúrou fosfolipidu.



Obr.8: Graf priebehu hustoty dĺžky rozptylu neutrónov cez model fosfolipidovej dvojvrstvy vytvorenej z DOPC. Zľava do prava: 1.) *single shell* model 2.) *multi shell* model 3.) *multi shell* model s lineárnym nárastom obsahu penetrovanej vody.

Pre takýto model delený na niekoľko vrstiev, pre ktoré je hustota rozptylovej amplitúdy konštantná, ale navzájom rôzna môžeme písať pozmenené vzťahy pre výpočet intenzity rozptylu ((22) – (25) a (30)) v tvare:

Gul'a

$$I(q) = N \cdot (4p)^2 \left[\sum \Delta r_k (A_k - A_{k-1}) \right]^2; \quad A_k = \frac{\sin qR_k - qR_k \cos(qR_k)}{(qR_k)^3}, \quad (22a)$$

Elipsoid

$$I(q) = N \cdot (4pabc)^2 \int_0^1 \int_0^1 \left[\sum \Delta r_k (a_k b_k c_k A_k - a_{k-1} b_{k-1} c_{k-1} A_{k-1}) \right]^2 dx dy; \quad (23a)$$

$$A_k = \frac{\sin qt_k - qt_k \cos(qt_k)}{(qt_k)^3}; \quad t_k = \sqrt{(a_k^2 \cos^2(\frac{p}{2}x) + b_k^2 \sin^2(\frac{p}{2}x))(1-y^2) + c_k^2 y^2},$$

Tubula

$$I(q) = N \cdot \left(\frac{2p}{q^2} \right)^2 \int_0^1 \left[\sum \Delta r_k \left(\frac{R_k J_1(qR_k \sqrt{1-x^2})}{\sqrt{1-x^2}} - \frac{R_{k-1} J_1(qR_{k-1} \sqrt{1-x^2})}{\sqrt{1-x^2}} \right) \frac{\sin(qH \frac{x}{2})}{\frac{x}{2}} \right]^2 dx$$

$$J_n(x) = \frac{1}{2\pi i^n} \int_0^{2\pi} \exp(ix \cos(j) + inj) dj, \quad (24a)$$

Kratky-Porod aproximácia

$$I(q) = N \frac{4}{q^4} \cdot \left[\sum \Delta r_i (\sin(qa_i) - \sin(qa_{i-1})) \right]^2, \quad (25a)$$

Moodyho aproximácia

$$I(q) = N \frac{(R^2 + \Delta^2)}{q^4} \cdot \left[\sum \Delta r_i (\sin(qa_i) - \sin(qa_{i-1})) \right]^2 +$$

$$+ \frac{1}{q^6} \cdot \left[\sum \Delta r_i (A(a_i) - A(a_{i-1})) \right]^2 \quad (30a)$$

a pre polárnu oblasť s predpokladom lineárneho nárastu obsahu penetrovanej vody od hranice tejto oblasti R_1 po hranicu R_2 :

Rayleigh-Gans-Debye formula

$$P(q) = \left[\frac{4p}{q^3} \left\{ \frac{k_1}{q} [2 \cos(qR_2) + 2qR_2 \sin(qR_2) - (qR_2)^2 \cos(qR_2) - \right.$$

$$\begin{aligned}
& -2\cos(qR_1) - 2qR_1 \sin(qR_1) + (qR_1)^2 \cos(qR_1)] + \\
& + (k_2 - r_w) [\sin(qR_2) - (qR_2) \cos(qR_2) - \sin(qR_1) + (qR_1) \cos(qR_1)]^2, \quad (34)
\end{aligned}$$

Kratky-Porod aproximácia

$$\begin{aligned}
P(q) = & \left[\frac{2}{q^2} \left\{ \frac{k_1}{q} [\cos(qR_2) + qR_2 \sin(qR_2) - \cos(qR_1) - qR_1 \sin(qR_1)] + \right. \right. \\
& \left. \left. + (k_2 - r_w) [\sin(qR_2) - \sin(qR_1)] \right\} \right]^2, \quad (35)
\end{aligned}$$

Moodyho aproximácia

$$\begin{aligned}
P(q) = & \frac{1}{q^4} \left\{ (R^2 + \Delta^2) \cdot \left(\frac{k_1}{q} [\cos(qR_2) + qR_2 \sin(qR_2) - \cos(qR_1) - qR_1 \sin(qR_1)] + \right. \right. \\
& \left. \left. + (k_2 - r_w) \cdot [\sin(qR_2) - \sin(qR_1)] + SumSin0 \right)^2 + \right. \\
& \left. + \frac{1}{q^2} \left(\frac{k_1}{q} [2\cos(qR_2) + 2qR_2 \sin(qR_2) - (qR_2)^2 \cos(qR_2) - \right. \right. \\
& \left. \left. - 2\cos(qR_1) - 2qR_1 \sin(qR_1) + (qR_1)^2 \cos(qR_1)] + \right. \right. \\
& \left. \left. + (k_2 - r_w) [\sin(qR_2) - (qR_2) \cos(qR_2) - \sin(qR_1) + (qR_1) \cos(qR_1)] + \right. \right. \\
& \left. \left. + \sum \Delta r_i (A_i - A_{i-1})^2 \right\}. \quad (36)
\end{aligned}$$

Toto sú teda vzťahy, ktoré môžu byť použité na simuláciu rozptylovej krivky na modeli, charakterizovanom parametrami: hrúbka dvojvrstvy d_L , hrúbka polárnej oblasti skupiny fosfolipidových hlavičiek d_p , hrúbka metylénovej časti reťazca d_N , hrúbka metylovej časti d_S , plocha pripadajúca na jednu fosfolipidovú molekulu v smere normály dvojvrstvy A_L a počet penetrovaných molekúl vody N_L . Získané výsledky boli čiastočne opublikované a sú podrobne popísané v prácach (Balgavý et al., 2001a), (Balgavý et al., 2001b), (Balgavý et al., 2001c). V posledne menovanej práci sme testovali vplyv použitia rôznych modelov a formúl pre intenzitu rozptylu, ako aj použitie rôznych vyhodnocovacích procedúr, ktoré popisujem v ďalšom. Spomenuté práce sú uvedené v prílohe.

III.2 Navrhnutie vyhodnocovacej procedúry

Doteraz som sa snažil na vyhodnocovanie rozptylových kriviek použiť čo najjednoduchšiu procedúru postavenú na parametri, ktorý možno veľmi ľahko získať z nameranej experimentálnej krivky. Podľa očakávania bolo potvrdené, že bežne používaný tzv. gyačný polomer, výhodný vzhľadom na jeho jednoduchú možnosť získania z experimentálnej krivky, súvisí s hrúbkou dvojvrstvy, no aj s množstvom vody lokalizovanej v jej polárnej časti. To znamená, že jeho použitím je možné získať oba tieto parametre, no vzhľadom na používané predpoklady o suchej dvojvrstve nie spôsobom, aký sa bežne aplikuje v literatúre. Za účelom získania poznatkov o týchto závislostiach bolo vykonaných veľké množstvo teoretických simulácií rozptylových kriviek pri použití rôznych hodnôt vstupných údajov a druhov modelov.

Tento parameter sa získava ako smernica lineárnej aproximácie grafu Kratkeho-Poroda $\ln(Iq^2)$ versus q^2 na intervale malých hodnôt rozptylového vektora (takzvaná Guinierova aproximácia). Na základe tejto charakteristiky rozptylovej krivky sme porovnávali experimentálnu závislosť intenzity od vektora rozptylu s krivkami, ktoré boli simulované s použitím vyššie popísaného modelu. Po dosiahnutí žiadanej presnosti zhody sme potom parametre modelu priradili experimentálnej vzorke (Balgavý et al., 2001a). Výhodou tohoto postupu je, že nepotrebujeme získavať čo najväčší interval za cenu zväčšovania experimentálnej chyby, ale vystačíme s časťou intervalu, na ktorej sa získavajú experimentálne body s vysokou presnosťou.

Pri modeli s členenou vnútornou štruktúrou však nebol postačujúci len jeden charakterizujúci parameter, preto bolo potrebné modifikovať uvedený postup. Prvou obmenou bolo použitie dodatočnej informácie a zafixovanie niektorého modelového parametra známeho z iných prác, pričom najlepšie sa osvedčilo použiť hodnoty pre hrúbku polárnej vrstvy ($d_p = 9 \pm 1 \text{ \AA}$), alebo počtu molekúl vody lokalizovaných v tejto vrstve ($N_L \approx 7$), ktoré sú relatívne dobre známe. Metóda bola publikovaná v (Balgavý et al., 2001b).

Pri druhej modifikácii bol využitý fenomén rôzneho rozptylu neutrónov na atómoch vodíka a deutéria, spomenutý v predchádzajúcom texte. Základom bol predpoklad, že zmenou vodného prostredia z ľahkej vody na roztok zmesi ľahkej a obvyčajnej vody sa nezmenia fosfolipidové lipozómy v nej dispergované, ale zmení sa len priebeh krivky intenzity rozptylu na týchto vzorkách. Získané experimentálne

krivky sú potom vyhodnocované rovnakým postup ako bol popísaný vyššie, pričom sa žiada, aby vo všetkých prípadoch boli hodnoty parametrov modelu rovnaké. Uvedený postup bol publikovaný v prácach (Balgavý et al., 2001a), (Kučerka, 2000), (Kučerka et al., 2000).

Experimentálne získané výsledky sú podrobne popísané v citovaných publikáciách, ktoré sú uvedené v prílohe.

Ciele dizertačnej práce

Táto dizertačná práca bude štúdiom hrúbky fosfolipidových dvojvrstiev v unilamelárnych lipozómoch pomocou rozptylu neutrónov a synchrotrónového žiarenia. Predpokladá sa, že na základe získaných výsledkov bude možné vytvárať teoretické modely štruktúry a usporiadania týchto objektov. Hlavným cieľom práce je poskytnúť aparát na vyhodnocovanie kriviek rozptylu neutrónov, alebo synchrotrónového žiarenia na skúmaných objektoch. V tejto chvíli je už na dostatočne vysokej úrovni a je schopný použitia v praxi. Jeho aplikácia nie je limitovaná len na čistú fosfolipidovú dvojvrstvu, ale môže poskytnúť hodnotné informácie aj o vplyve rôznych prímiesí do tejto štruktúry.

Popri štúdiu čistých fosfolipidových dvojvrstiev zo syntetických a prírodných fosfatidylcholínov je teda náplňou tejto práce aj sledovanie vplyvu prímiesných molekúl na ich hrúbku. Na prvom mieste sú to amfifilné N-alkyl-N,N-dimetylamín-N-oxidy s antimikróbnyimi a imunomodulačnými vlastnosťami. Sledovať sa bude aj vplyv hydrofóbných n-alkánov, ktoré modulujú vlastnosti iónových kanálov a transportných membránových proteínov a sú všeobecnými anestetikami. Zatiaľ boli uskutočnené experimentálne merania vplyvu *n*-dekánu (Uhríková et al., 2000a) a surfaktantu N-dodecyl-N,N-dimetylamín-N-oxidu (Uhríková et al., 2000b), (Kučerka et al., 2001a), (Kučerka et al., 2001b). Tieto práce sú uvedené v prílohe.

Účast' na kurzoch a konferenciách

2000

7th International Summer School on Biophysics, Rovinj, Croatia, September 14-25

2001

HERCULES 11th session - Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems, Grenoble, France, March 4 - April 11 2001

2001

XXIV. Dny lékařské biofyziky – Konferencia s medzinárodnou účasťou, Mozolov, Česká republika, 30.Máj – 1.Jún 2001

Publikované práce a práce v tlači

2000-09

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

(7th International Summer School on Biophysics, Rovinj, Croatia, September 14-25, 2000, *poster*)

2000-09

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)

2000-12

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**

(Biophysical Chemistry 88 (2000) 165-170)

2001-02

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 vol. 51 No.1 (2001) 53-68)

2001-03

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**

(Biochimica et Biophysica Acta vol. 1512(1) (2001) 40-52)

2001-03

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, French, March 4 - April 11, 2001, *poster*)

2001-05

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**

(Sborník abstrakt, XXIV. dny lékařské biofyziky, Mozolov, Česká republika, 30.Máj-1.Jún, 2001)

2000

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., *v tlači*)

2000-08

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

(Annual Report, JINR, Dubna, *zaslané*)

2001-05

P.Balgavý, N.Kučerka, M.A.Kiselev, **Unilamellar vesicles membrane thickness determination from small-angle neutron scattering curves**

(European Biophysical Journal, *v přípravě*)

Zoznam literatúry

1. Balgavý,P., M.Dubničková, N.Kučerka, M.A.Kiselev, S.P.Yaradaikin, and D.Uhríková 2001b: Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2- diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Biochim.Biophys.Acta* 1512: 40-52.
2. Balgavý,P., M.Dubničková, D.Uhríková, S.P.Yaradaikin, M.A.Kiselev, and V.I.Gordeliy 1998: Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Acta Phys.Slov.* 48: 509-533.
3. Balgavý,P., N.Kučerka, V.I.Gordeliy, and V.G.Cherezov 2001a: Evaluation of small-angle neutron scattering curves of unilamellar phosphatidylcholine liposomes using a multishell model of bilayer neutron scattering length density. *Acta Phys.Slov.* 51: 53-68.
4. Balgavý,P., N.Kučerka, and M.A.Kiselev 2001c: Unilamellar vesicles membrane thickness determination from small-angle neutron scattering curves. *Eur.Biophys.J. in preparation:*
5. Blow,D. 2001: Mathematics. Lecture at HERCULES - 2001
6. Büldt,G. 2001: Membrane diffraction. Lecture at HERCULES - 2001
7. Caille,A. 1972: Physique cristalline - Remarques sur la diffusion des rayons X dans les smectiques. *C.R.Acad.Sc.Paris Série B* 274: 891-893.
8. Cevc,G. and D.Marsh 1987: Phospholipid bilayers. Physical principles and models. New York
9. Feigin,L.A. and D.I.Svergun 1987: Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. Plenum Publishing Corporation, New York

10. Glatter, O. and O. Kratky 1982: Small angle X-ray scattering. Academic Press, New York
11. Gradzielski, M. and H. Hoffmann 1992: Structural investigations of charged o/w microemulsion droplets. *Adv. Colloid Interface Sci.* 42: 149-173.
12. Hornby, A. P. and P. R. Cullis 1981: Influence of local and neutral anaesthetics on the polymorphic phase preferences of egg yolk phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* 647: 285-292.
13. Kiselev, M. A., P. Lesieur, A. M. Kiselev, D. Lombardo, M. Killany, and S. Lesieur 2000: Sucrose buffer as perspective medium to study the vesicle structure: SAXS and SANS study.
14. Kiselev, M. A., D. Lombardo, A. M. Kiselev, and P. Lesieur 2001: Structure factor of DMPC unilamellar vesicles: SAXS study at synchrotron. Report Dubna: 136-138.
15. Komura, S., Y. Toyoshima, and T. Takeda 1982: Neutron small-angle scattering from single-walled liposomes of egg phosphatidylcholine. *Jpn. J. Appl. Phys.* 21: 1370-1372.
16. Kučerka, N. 2000: Bilayer thickness and penetrated water in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. Book of abstracts, 7th International Summer School on Biophysics
17. Kučerka, N., D. Uhríková, F. Devínský, V. I. Gordeliy, and P. Balgavý 2001b: *N*-Dodecyl-*N,N*-dimethylamine-*N*-Oxide - Induced Solubilization of lipid Bilayers in Liposomes. HERCULES - 2001
18. Kučerka, N., D. Uhríková, F. Devínský, V. I. Gordeliy, and P. Balgavý 2001a: *N*-Dodecyl-*N,N*-dimethylamine-*N*-Oxide - Induced Solubilization of lipid Bilayers in Liposomes. Sborník abstrakt, XXIV. dny lékařské biofyziky

19. Kučerka,N., D.Uhríková, A.Islamov, and P.Balgavý 2000: Thickness of lipid bilayer and lipid surface area in unilamellar DMPC and DPPC liposomes evaluated from small-angle neutron scattering curves measured at different contrasts. Report JINR, Dubna: *submitted*
20. Lafleur,M., M.Bloom, E.F.Eikenberry, S.M.Gruner, Y.Han, and P.R.Cullis 1996: Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order. *Biophys.J.* 70: 2747-2757.
21. Laggner,P., A.M.Gotto, Jr., and J.D.Morrisett 1979: Structure of the dimyristoylphosphatidylcholine vesicle and the complex formed by its interaction with apolipoprotein C-III: X-ray small-angle scattering studies. *Biochemistry* 18: 164-171.
22. Lemmich,J., K.Mortensen, J.H.Ipsen, T.Honger, R.Bauer, and O.G.Mouritsen 1996: Small-angle neutron scattering from multilamellar lipid bilayers: Theory, model and experiment. *Phys.Rev.E* 53: 5169-5180.
23. Lewis,B.A. and D.M.Engelman 1983: Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J.Mol.Biol.* 166: 211-217.
24. Luzzati,V. 1968 *Biological membranes*. Academic Press, London
25. Mason,P.C., P.D.Gaulin, R.M.Epand, G.D.Wignall, and J.S.Lin 1999: Small angle neutron scattering and calorimetric studies of large unilamellar vesicles of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine. *Phys.Rev.E* 59: 3361-3367.
26. Moody,M.F. 1975: Diffraction by dispersions of spherical membrane vesicles. I. The basic equations. *Acta Crystallogr., Sect.A: Found.Crystallogr.* 31: 8-15.
27. Nagle,J.F. and S.T.Nagle 2000: Structure of Lipid Bilayers. *Biochim.Biophys.Acta* 1469: 159-195.

28. Nagle, J.F., R.Zhang, S.Tristram-Nagle, W.Sun, H.I.Petrache, and R.M.Suter 1996: X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys.J.* 70: 1419-1431.
29. Nawroth, T., H.Conrad, and K.Dose 1989: Neutron small angle scattering of liposomes in the presence of detergents. *Physica B (Amsterdam)* 477-480.
30. Ostanevich, Yu.M. 1987: Time-of-flight small-angle scattering spectrometers on pulsed neutron sources. Report JINR-Dubna: 1-14.
31. Pabst, G., M.Rappolt, H.Amenitsch, and P.Laggner 2000: Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full q-range fitting with high quality x-ray data. *Phys.Rev.E* 62: 4000-4009.
32. Pencer, J. and F.R.Hallett 2000: Small-angle neutron scattering from large unilamellar vesicles: An improved method for membrane thickness determination. *Phys.Rev.E* 61: 3003-3008.
33. Pišút, J., L.Gomolčák, and V.Černý 1983: Úvod do kvantovej mechaniky. 2. Alfa, Bratislava
34. Rand, R.P., N.L.Fuller, S.M.Gruner, and V.A.Parsegian 1990: Membrane curvature, lipid segregation, and structural transitions for phospholipids under dual-solvent stress. *Biochemistry* 29: 76-87.
35. Sadler, D.M. and D.L.Worcester 1982: Neutron scattering studies of photosynthetic membranes in aqueous dispersion. *J.Mol.Biol.* 159: 485-499.
36. Squire, J.M. 2000: Fibre and muscle diffraction. *Structure and Dynamics of Biomolecules*. Oxford University Press, New York
37. Uhríková, D. 1993: Štruktúrne zmeny lipidových dvojvrstiev vplyvom hydratácie, teploty a amfifilných prímiesí. PhD Thesis, Univerzita Komenského, Bratislava

38. Uhríková,D., P.Balgavý, N.Kučerka, A.Islamov, V.I.Gordeliy, and A.Kuklin 2000a: Small-angle neutron scattering study of the n-decane effect on the bilayer thickness in extruded unilamellar dioleoylphosphatidylcholine liposomes. *Biophys Chem.* 88: 165-170.
39. Uhríková,D., N.Kučerka, A.Islamov, V.I.Gordeliy, and P.Balgavý 2000b: Small-angle neutron scattering study of N-dodecyl-N,N-dimethylamine N-oxide induced solubilization of dioleoylphosphatidylcholine bilayers in liposomes. *Gen.Physiol Biophys.* *submitted*:
40. Vachette,P. and D.Svergun 2000: Small-angle X-ray scattering by solutions of biological macromolecules. *Structure and Dynamics of Biomolecules.* Oxford University Press, New York
41. Vodrážka,Z. 1982: *Fyzikální chemie pro biologické vědy.* Academia, Praha

Príloha

2000-09

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)

2000-12

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**

(Biophysical Chemistry 88 (2000) 165-170)

2001-02

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 vol. 51 No.1 (2001) 53-68)

2001-03

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**

(Biochimica et Biophysica Acta vol. 1512(1) (2001) 40-52)

2001-05

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**

(Sborník abstrakt, XXIV. dny lékařské biofyziky, Mozolov, Česká republika, 30.Máj-1.Jún, 2001)

2000

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., *v tlači*)

2000-08

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

(Annual Report, JINR, Dubna, *zaslané*)

2001-05

P.Balgavý, N.Kučerka, M.A.Kiselev, **Unilamellar vesicles membrane thickness determination from small-angle neutron scattering curves**

(European Biophysical Journal, *v přípravě*)