



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



Mgr. Michal Belička

Autoreferát dizertačnej práce

Štúdium vplyvu prímiesí na štruktúru lipidovej dvojvrstvy
pomocou rozptylu neutrónov

**na získanie akademického titulu Philosophiae doctor
v odbore doktorandského štúdia 4.1.12 Biofyzika**

Bratislava, 2014

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky FMFI UK v Bratislave.

Predkladateľ: Mgr. Michal Belička
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK
Mlynská dolina, 842 48 Bratislava

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

Oponenti: prof. RNDr. Vladimír Lisý, DrSc.
Katedra fyziky, FEI TU
Letná 9, 042 00 Košice

prof. Ing. Július Cirák, CSc.
Katedra fyziky, Ústav jadrového a fyzikálneho inžinierstva, FEI STU
Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava

RNDr. Ľubica Urbaníková, CSc.
Ústav molekulárnej biológie, SAV
Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa o h pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia 4.1.12 Biofyzika študijného programu Biofyzika vymenovanou predsedom odborovej komisie na Fakulte matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 48 Bratislava, miestnosť

Predseda odborovej komisie:

.....
prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Mlynská dolina, 842 48 Bratislava

Abstrakt

Predkladaná dizertačná práca je zameraná na štúdium vplyvov interkalácie amfifilných molekúl na štruktúru lipidových dvojvrstiev. Boli použité amfifilné molekuly s jednoduchou štruktúrou – primárne alifatické alkoholy (C_nOH , $n = 10, 16$) a N,N -dimetyl- N -alkylamín N -oxidy (C_nNO , $n = 12, 14, 16, 18$); n je počet uhlíkov v ich alkylových reťazcoch.

Rozptyl neutrónov pod malými uhlami (SANS) bol použitý ako hlavná experimentálna metóda predkladanej práce. S jej pomocou boli získané závislosti základných štruktúrnych parametrov dvojvrstiev – plochy dvojvrstvy na jednu molekulu lipidu A na medzifázovom rozhraní a hrúbky hydrofóbného jadra $2D_C$ – od množstva amfifilných molekúl interkalovaných do dvojvrstiev. V prípade zmesí C_nNO s dioleoylfosfatidylcholínom (DOPC) bolo zistené, že parciálne molekulové plochy C_nNO \hat{A}_{C_nNO} pre $n = 12, 14$ a 16 sú v rámci experimentálnych neistôt rovnaké v intervale $0,364$ až $0,369$ nm², zatiaľ čo hodnota $\hat{A}_{C_{18NO}} = 0,394 \pm 0,004$ nm² je viditeľne vyššia. Podobnú zmenu tendencie bolo možné pozorovať aj v prípade smerníc závislostí $2D_C(r_{C_nNO})$. Z daného vyplýva, že uvedené efekty sú najpravdepodobnejšie spôsobené zmenou lokalizácie interkalovaného C_{18NO} v porovnaní so zvyškom C_nNO série. Merania SANS na zmesných lipidových dvojvrstvách tvorených palmitoyloleoylfosfatidylcholínom (POPC), palmitoyloleoylfosfatidyletanolamínom (POPE) a palmitoyloleoylfosfatidylserínom (POPS) s a bez prítomnosti C_{10OH} a C_{16OH} ukázali, že v prípade lipidových dvojvrstiev bez interkalovaného alkoholu ich štruktúra závisí od zloženia ich hydrofilných oblastí. Interkalácia C_{10OH} , teda alkoholu s alkylovým reťazcom kratším ako reťazce lipidov v dvojvrstve, bola lipidovým zložením dvojvrstiev ovplyvnená len mierne. Napriek tomu so zvyšujúcim sa obsahom POPE v dvojvrstvách bolo možné v dvojvrstve pozorovať prejavy laterálnej separácie fáz. Interkalácia alkoholu s dĺžkou reťazca porovnateľnou s reťazcami lipidov (C_{16OH}) je lipidovým zložením dvojvrstiev ovplyvnená oveľa výraznejšie a efekty laterálnej separácie bolo možné pozorovať aj pri nižších hodnotách molového zlomku POPE v dvojvrstvách.

Spekulárna neutrónová reflektometria (SNR) bola použitá v predkladanej práci za účelom zistenia jej schopností detegovať vnútornú štruktúru plávajúcich dvojvrstiev. Ako vzorka bol použitý systém plávajúcej deuterovanej d_{62} -dipalmitoylfosfatidylcholínovej dvojvrstvy nad podloženou dibehenoylfosfatidylcholínovou dvojvrstvou. S použitím metódy variácie kontrastu bolo zistené, že pomocou SNR je možné detegovať štruktúru plávajúcej dvojvrstvy na úrovni funkčných skupín len ak je v tekutokryštalickej fáze. V gélovej fáze jej vnútornú štruktúru na danej úrovni sa získať nepodarilo.

1 Úvod

Amfifilné molekuly sú špecifickým typom molekúl, ktoré súčasne obsahujú funkčné skupiny schopné vytvárať vodíkové väzby vody, tzv. *hydrofilné skupiny*, ako aj funkčné skupiny, ktoré touto schopnosťou nedisponujú, tzv. *hydrofóbne skupiny*. V dôsledku prítomnosti hydrofóbných skupín v ich štruktúre, môžeme za určitých podmienok vo vodných roztokoch amfifilných molekúl pozorovať tzv. samoagregačný proces, pri ktorom dochádza k ich zoskupovaniu do priestorových štruktúr rôznych tvarov a veľkostí (micely, lamelárne fázy, hexagonálne fázy, kubické fázy...). Hnacou silou daného procesu je snaha systému o minimalizáciu svojej Gibbsovej voľnej energie. Tvar a veľkosť týchto agregátov sú závislé od veľkého počtu faktorov, ako napr. štruktúra amfifilných molekúl, teplota, tlak, pH... Ich zmenou je možné ovplyvňovať celkovú výslednú štruktúru (Maeda a kol., 2006; Pan a kol., 2008), ako aj spôsobiť úplný rozpad vytvorenej štruktúry (Uhríková a kol., 2001).

Najčastejšie sa vyskytujúcou skupinou amfifilných molekúl sú lipidy, základná zložka bunkových membrán. Biomembrány tvoriace steny buniek, či vylučujúce ich jednotlivé kompartmenty, sú tvorené jednou alebo viacerými lipidovými dvojvrstvami, t. j. súborom lipidov v lamelárnej fáze. V bunkách živých organizmov sa z lipidov najčastejšie vyskytujú fosfolipidy (Mouritsen, 2005). Vzhľadom na svoju štruktúru vytvárajú molekuly fosfolipidov vo vodnom prostredí lamelárnu alebo hexagonálnu fázu. Z biofyzikálneho pohľadu má významnejšie postavenie lamelárna fáza, tvoriaca prirodzené čiastočne priepustné bariéry v bunkách organizmov a slúžiaca ako základ na inkorporáciu zložitejších biomakromolekúl. Podľa dynamického stavu molekúl fosfolipidov tvoriacich lamelárnu fázu rozoznávame niekoľko hlavných skupenstiev lamelárnych fáz: kryštalické (L_C, L_C'), pri ktorom molekuly vykonávajú iba vibračný pohyb, gélové (L_β, L_β'), v ktorom molekuly vykonávajú navyše aj rotačný pohyb a tekutokryštalické (L_α, L_α'), kde molekuly vykonávajú laterálny pohyb v rovine dvojvrstvy, transverzálny pohyb medzi monovrstvami danej dvojvrstvy a dokonca aj vertikálny pohyb medzi susediacimi dvojvrstvami. V prípade tekutokryštalického skupenstva má hydrofóbne jadro lipidových dvojvrstiev tvorené uhlíkovými reťazcami vlastnosti podobné prostrediu tekutých alkánov. V prípade gélového a tekutokryštalického skupenstva sa medzi fosfolipidovými dvojvrstvami nachádzajú tzv. *medzilamelárne vodné vrstvy*, ktorých hrúbka závisí od viacerých faktorov, ako sú napr. typ fosfolipidu, pH, teplota, skupenstvo lamelárnej fázy... Z pohľadu štúdia priestorového usporiadania agregátov fosfolipidov je

momentálne najdôležitejšou metódou röntgenoštruktúrna analýza. Prostredníctvom difrakcie pod malými uhlami umožňuje spoľahlivo identifikovať prítomnosť a typ usporiadania na veľkú vzdialenosť (priestorovú štruktúru fosfolipidových agregátov) a naopak pozorovaním difrakcie pod veľkými uhlami typ usporiadania na malú vzdialenosť (skupenstvo fáz fosfolipidov). Keďže neumožňuje zachytávať objekty s malou elektrónovou hustotou, ako napr. molekuly vody, či metylénové skupiny, je častokrát kombinovaná s ďalšími komplementárnymi metódami. Najčastejšie metódou neutrónového rozptylu.

V predloženej dizertačnej práci sú použité dve experimentálne metódy využívajúce rozptyl neutrónov – malouhlový rozptyl neutrónov (SANS) a spekulárna neutrónová reflektometria (SNR). V oboch metódach sú využívané termálne neutróny, ktoré sa na jadrách ožarovaných atómov rozptyľujú pružne a izotropne. Analýzou neutrónových vln rozptýlených na skúmanom objekte je možné získať informáciu o vnútornej štruktúre ožarovaného objektu. V dôsledku odlišnej geometrie experimentálneho usporiadania pri SANS a SNR sa v rámci neutrónového rozptylu prejavujú odlišné efekty, ktoré je nutné vziať do úvahy pri vyhodnocovaní SANS a SNR kriviek. V oboch prípadoch sa na popis vnútornej štruktúry rozptyľujúcich objektov používa tzv. *hustota rozptylovej dĺžky* $\rho(\vec{r})$ (Feigin a Svergun, 1987; Daillant a Gibaud, 2009), ktorá vyjadruje celkovú rozptylovú dĺžku atómových jadier v infitezimálnom objeme so stredom v bode \vec{r} . Obe metódy zároveň umožňujú aplikovať *techniku variácie kontrastu*, mimoriadne cennú najmä pri štúdiách zameraných na vnútornú štruktúru skúmaných objektov.

V SANS experimentoch boli ako forma vzoriek použité lipidové dvojvrstvy v tvare unilamelárných vezikúl (ULV). Pri SANS uvažujeme len jednoduchý rozptyl neutrónových vln na jadrách ožarovaných atómov a ako ukázali Kučerka a kol. (2011), je možné v prípade SANS na ULV zanedbať i negatívny vplyv absorpcie neutrónovej vlny pri jej prechode cez lipidovú dvojvrstvu ULV. Hoci v sebe SANS nesie modelovo nezávislú informáciu o štruktúre ožarovaného objektu vo forme štruktúrnych invariantov, tzv. integrálov, akým je napr. gyračný polomer R_g (Kiselev a kol., 2006), ale aj mnohé ďalšie (Feigin a Svergun, 1987), táto nie je vzhľadom na kladené otázky dostatočná. Ako už bolo povedané, pri SANS uvažujeme len jednoduchý rozptyl neutrónových vln, v dôsledku čoho má výsledná rozptýlená vlna tvar Fourierovej transformácie $\rho(\vec{r})$. Inverznú Fourierovou transformáciu však nie je možné na získaných experimentálnych dát vykonať, pretože je možné detegovať iba amplitúdu výslednej rozptýlenej neutrónovej vlny vo forme druhej mocniny jej modulu predstavujúcej pravdepodobnosť výskytu neutrónu v danom mieste. Informáciu o fázovej

zložke amplitúdy rozptýlenej neutrónovej vlny však nie je možné získať. Z tohto dôvodu je nutné na vyhodnocovanie SANS kriviek použiť modely zahŕňajúce súčasné poznatky o štruktúre skúmaných objektov, ako aj ohraničenia dané rozlišovacou schopnosťou zariadenia na meranie SANS. Intenzita SANS na súbore ožarovaných objektov je priamo úmerná počtu ožarovaných objektov. Okrem počtu ožarovaných objektov je výsledná SANS intenzita faktorizovaná na súčin tzv. *štruktúrneho faktora*, vyjadrujúceho vplyv vzájomného priestorového usporiadania ožarovaných objektov na výslednú intenzitu, a tzv. *formfaktora*, vyjadrujúceho príspevok k výslednej nameranej intenzite od vnútornej štruktúry spriemerovaného ožarovaného objektu. Vplyv vzájomného priestorového usporiadania objektov v ožarovanom objeme možno vylúčiť zriadeným skúmaného systému na dostatočne nízku hodnotu ich koncentrácie (Nawroth a kol., 1989; Kiselev a kol., 2003). Ak totiž priemerná vzájomná vzdialenosť jednotlivých ULV presiahne danú korelačnú dĺžku, potom pre meraný interval q platí $S(q) \equiv 1$.

ULV pripravené opakovanou extrúziou cez uhlíkové filtre vykazujú polydisperzitu svojich polomerov, ktorú je možné veľmi dobre popísať fyzikálne relevantnou Schulz-Floryho distribúciou (Egelhaaf a kol., 1996; Hunter a Frisken, 1998; Balgavý a kol., 2001; Kučerka a kol., 2007). Ako model ULV je dodnes úspešne aplikovaný tzv. *trojvrstvový model* ULV, ktorý bol navrhnutý Kučerkom (Kučerka a kol., 2004; Tristram-Nagle a kol., 2010; Klacsová a kol., 2011; Belička a kol., 2014a). Vznikol ako modifikácia jednoduchšieho jednovrstvového modelu ULV (Komura a kol., 1982; Balgavý a kol., 1998; Mason a kol., 1999), v ktorom je lipidová dvojvrstva považovaná za homogénnu bez akejkoľvek vnútornej štruktúry. V trojvrstvovom modeli je dvojvrstva rozdelená na tri vzájomne oddelené oblasti – hydrofóbnu v strede a dve hydrofilné na vonkajších stranách dvojvrstvy, rovnako ako bolo jej delenie predstavené v časti venovanej molekulovým objemom systému lipid-voda. Okrem diverzifikácie dvojvrstvy vzhľadom na amfifilnú povahu lipidových molekúl uvedený model zároveň zachytáva aj prítomnosť interkalovaných vodných molekúl v hydrofilných oblastiach lipidových dvojvrstiev, čo umožňuje na jednej strane presnejšie vyhodnotenie hrúbky hydrofilnej oblasti a na druhej strane umožňuje skúmať prostredníctvom SANS faktory vplývajúce na hydratáciu lipidových dvojvrstiev.

Interakcie termálnych neutrónov pri SNR je identická s ich interakciami pri SANS, avšak z dôvodu odlišnej geometrie skúmaných vzoriek je navyše prítomný viacnásobný rozptyl. Vzorky merané prostredníctvom SNR majú najčastejšie formu vrstvy (vrstiev) umiestnenej buď na rozhraní dvoch fáz, napr. vzduch-voda (Zhang a kol., 2011), či voda-olej (Tucker a kol., 2012), alebo ako v prípade predkladanej práce na rozhraní pevného povrchu s vodným

prostredím (Wacklin, 2010). Pevným podkladom najčastejšie býva kremíkový blok, do ktorého cez bočnú stenu vstupuje zväzok dopadajúcich neutrónov zvierajúci so základňou bloku, na ktorej je nanosený skúmaný materiál, malé uhly, v dôsledku čoho je optická dráha neutrónov dostatočne dlhá na to, aby sa prejavil ich viacnásobný rozptyl.

Primárnym typom vzoriek, ktoré používajú sa pri štúdiu lipidových dvojvrstiev pomocou SNR, sú podložené lipidové dvojvrstvy. Tie možno vytvoriť prostredníctvom kombinácie Langmuir-Blodgettovej a Langmuir-Schaeferovej depozície lipidových monovrstiev vytvorených na rozhraní voda-vzduch. Pri niektorých lipidoch je možné podložené dvojvrstvy vytvárať aj pomocou metódy fúzie ULV (Gerelli a kol., 2012), ale aplikovateľnosť tejto metódy závisí od typu lipidu, respektíve od zloženia lipidovej zmesi. Takto pripravené lipidové dvojvrstvy môžu slúžiť ako modelové membrány napr. pri analýze zloženia lipidových dvojvrstiev (Vacklin a kol., 2005), či pri štúdiu enzýmov interagujúcich s lipidmi (Wacklin a kol., 2007). V dôsledku vzájomného silového pôsobenia medzi lipidovou dvojvrstvou a Si/SiO₂ podkladom, nie je podložená dvojvrstva v rovnakom stave ako v prípade ULV, či sústavy orientovaných lipidových dvojvrstiev. Veľkým impulzom, nielen pre aplikácie SNR, preto bolo objavenie metódy prípravy plávajúcich dvojvrstiev (Charitat a kol., 1999; Fragneto a kol., 2001, 2012). Tie sú pripravované, podobne ako podložené dvojvrstvy prostredníctvom kombinácie Langmuir-Blodgettových a Langmuir-Schaeferových depozícií povrchových lipidových monovrstiev v gélovo-kryštalickom stave. Hoci je proces ich prípravy časovo aj technicky náročný, v priebehu uplynulých rokov preukázali svoj význam aj v prípadoch komplikovanejších viacvrstvových systémov (Stidder a kol., 2005; Talbot a kol., 2009; Rondelli a kol., 2012).

Keďže sú pri SNR analyzované iba neutróny odrazené od skúmanej vrstvy, ktoré ležia v rovine dopadu a majú odrazový uhol zhodný s uhlom dopadajúceho neutrónového zväzku, závisí výsledná SNR krivka len od priemernej laterálnej štruktúry na normále odrážajúceho povrchu bloku s nanosenou lipidovou vrstvou, popr. vrstvami. Na opis systému pri SNR tak stačí použiť jedinu súradnicu. Štruktúru na povrchu kremíkoveho bloku si tak možno predstaviť ako súbor vrstiev vo všeobecnosti s rôznou hodnotou ρ a rôznou hrúbkou. Na základe hodnoty ρ je možné každej spomínanej vrstve priradiť index lomu n pre neutrónové vlny (Daillant a Gibaud, 2009). Dopadajúca neutrónová vlna sa na každom rozhraní vrstiev s odlišnými hodnotami n čiastočne odráža a čiastočne prechádza do nasledujúcej vrstvy plne v súlade s optickou analógiou. V dôsledku prítomnosti už spomínaného viacnásobného rozptylu nemá výsledná odrazená neutrónová vlna formu

Fourierovej transformácie, ako je tomu v prípade SANS. Pri vyhodnocovaní SNR kriviek sa preto ako výhodná ukazuje optická analógia SNR, kde je rovnaký problém explicitne riešiteľný buď prostredníctvom Parrattovej rekurzie, alebo Abelesovho maticového formalizmu. Obe metódy výpočtu $R(q)$ sú navzájom ekvivalentné a umožňujú zohľadniť aj prirodzene sa vyskytujúce nerovnosti jednotlivých rovinných rozhraní v systéme. V predkladanej práci bola pri výpočte modelovej reflektivity použitá metóda Parrattovej rekurzie. Bližšie detaily o Abelesovom maticovom formalizme, ale aj o Parrattovej rekurzii, možno nájsť v základnej literatúre venovanej optike (Born a Wolf, 1999).

Pri vyhodnocovaní je uvedený *vrstvomý model* vyšetrovanej vzorky aplikovaný najčastejšie vo forme, v ktorej jednotlivé vrstvy predstavujú celé hydrofilné a hydrofóbne oblasti. Pri fitovaní sú voľnými parametrami hustoty rozptylovej dĺžky a rozmery jednotlivých vrstiev, ako aj miery nerovností jednotlivých medzivrstvových rozhraní. Parametre získané fitovaním experimentálnej reflektivity modelovou krivkou, získanou jedným z vyššie uvedených postupov, sa porovnávajú s predpokladanou štruktúrou na základe predchádzajúcich experimentov, resp. s parametrami získanými komplementárnymi experimentálnymi technikami, a ak sú s nimi v rozpore, je nutné experimentálne dáta fitovať nanovo. Postup kontroly je nutný v dôsledku chýbajúcej fázovej informácie výslednej odrazenej neutrónovej vlny. V predloženej dizertačnej práci bol uvedený vrstvomý model využitý odlišným spôsobom. Na popis vnútornej štruktúry podloženej resp. plávajúcej dvojvrstvy na normále odrážajúceho povrchu bol použitý modifikovaný komponentný model, ktorý vznikol modifikáciou modelu použitého Kučerkom a kol. (2008, 2009, 2011) založenom na modeli pôvodne navrhnutom Wienerom a Whiteom (1992). Lipidové dvojvrstvy sú v ňom na svojich normálach popísané súborom gaussovských distribúcií predstavujúcich funkčné skupiny v ich hydrofilných častiach, či terminálne metylové skupiny ich uhľovodíkových reťazcov, a súbormi *plateau*-funkcií predstavujúcich hydrofóbne jadrá dvojvrstiev tvorené uhľovodíkovými reťazcami lipidov. „Prázdny priestor“ v okolí molekúl lipidu je ideálne vyplnený vodou. Takto upravený model bol už úspešne aplikovaný pri vyhodnocovaní SANS a SAXS na ULV tvorených ako mononenasýtenými (Kučerka a kol., 2009), tak aj nasýtenými fosfolipidmi (Kučerka a kol., 2011a) a po úpravách i na ULV tvorenými fosfatidylglycerolmi (Kučerka a kol., 2011b). Profil hustoty rozptylovej dĺžky na normále dvojvrstvy(-iev) prislúchajúci danému modelu bol následne rozdelený na tenké vrstvy s hrúbkou 0,02 nm, v rámci ktorých bolo možné považovať hustotu rozptylovej dĺžky za konštantnú, na dané delenie bol aplikovaný vyššie spomínaná Parrattova rekurzia.

2 Ciele dizertačnej práce

Denzitometria

- Zistiť objemy molekúl homologického radu *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamín *N*-oxidov interkalovaných do fosfolipidových dvojvrstiev a porovnať ich s ich objemami vo forme monomérov a micíel vo vodnom prostredí.
- Zo získaných molekulových objemov určiť objemy hydrofilných a hydrofóbných častí *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamín *N*-oxidov

Malouhlový rozptyl neutrónov (SANS)

- Zmerať krivky SANS na unilamelárnych lipozómoch tvorených dioleoylfosfatidylcholínom s meniacim sa množstvom interkalovaných *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamín *N*-oxidov.
- Vyhodnotiť zmerané krivky SANS pomocou trojvrstvého modelu hustoty rozptylovej dĺžky neutrónov a príslušných objemov *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamín *N*-oxidov získaných denzitometricky.
- Zmerať krivky SANS na unilamelárnych lipozómoch tvorených meniacou sa zmesou palmitoyloleoylfosfatidylcholínu a palmitoyloleoylfosfatidyletanolamínu s rastúcim obsahom dekanolu resp. hexadekanolu.
- Vyhodnotiť zmerané krivky SANS pomocou trojvrstvého modelu hustoty rozptylovej dĺžky neutrónov a príslušných objemov alkoholov získaných denzitometricky.

Spekulárna neutrónová reflektometria (SNR)

- Zmerať krivky SNR na systéme podloženej lipidovej dvojvrstvy tvorenej dibehenoylfosfatidylcholínom a na systéme plávajúcej dvojvrstvy tvorenej dipalmitoylfosfatidylcholínom v gélovej a tekutokryštalickej fáze.
- Aplikovať komponentný model lipidovej dvojvrstvy na metódu SNR a vyhodnotiť pomocou neho krivky SNR podloženej dvojvrstvy tvorenej dibehenoylfosfatidylcholínom.
- Získané štruktúrne parametre podloženej dibehenoylfosfatidylcholínovej dvojvrstvy použiť ako vstupné parametre pri vyhodnocovaní SNR kriviek systému plávajúcej dipalmitoylfosfatidylcholínovej dvojvrstvy pomocou komponentného modelu lipidovej dvojvrstvy.

3 Metodika práce a metódy skúmania

3.1 Chemikálie

1,2-dipalmitoyl-d62-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholín (d62-DPPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholín (POPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholín (DOPC), 1,2-dibehenoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholín (DBPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidyletanolamín (POPE) a 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidyl-L-serín (POPS) boli zakúpené v práškovej forme od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamín *N*-oxidy (C_nNO , $n = 6, 10, 12, 14, 16, 18$) syntetizoval oxidáciou príslušných *N,N*-dimetyl-*N*-alkylamínov pomocou peroxidu vodíka a vyčistil na použitú úroveň Prof. Devínsky postupom popísaným v práci (Devínsky a kol., 1978). Dekanol (C10OH) a hexadekanol (C16OH) 99%-nou čistotou boli kúpené v Sigma Aldrich (St. Luis, USA). Ako H₂O bola použitá čerstvo pripravená Milli-Q voda (18,2 MΩ.cm pri 25 °C) a ²H₂O (99,96% ²H₂O) bola zakúpená od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Organické rozpúšťadlá boli zakúpené od firmy Slavus (Bratislava, Slovensko) a pred použitím redestilované.

3.2 Denzitometrické merania zmesí DOPC+C_nNO

Na začiatku bol pripravený zásobný roztok DOPC v metanol-chloroformovej zmesi. V prvom kroku sa do vyčistených, prázdnych a zvážených skúmaviek preniesli potrebné objemy roztoku DOPC. Po ich prenesení bolo prítomné rozpúšťadlo odparené prúdom plynného dusíka a jeho zbytky boli odstránené pomocou vákuovej pumpy (vákuovanie trvalo 8 h pri tlaku 7 Pa). Počas vákuovania boli pripravené, podobne ako v prípade DOPC, metanol-chloroformové zásobné roztoky jednotlivých C_nNO . Po vákuovaní boli skúmavky so suchým DOPC opäť zvážené a podľa prítomného množstva DOPC k nim boli pridané príslušné množstvá zásobných roztokov C_nNO tak, aby sa v skúmavkách získali požadované hmotnostné zlomky jednotlivých C_nNO v intervale 0 až 30 (w/w)%. Po pridaní C_nNO roztokov boli zmesi v skúmavkách dôkladne premiešané a prítomné rozpúšťadlo opäť odparené najprv prúdom plynného dusíka a v druhom kroku i vákuovaním (pri tlaku 7 Pa po dobu 6 h). Skúmavky s vysušenými zmesami DOPC+C_nNO boli opäť zvážené a bol určený presný obsah C_nNO , a tým aj príslušný hmotnostný zlomok C_nNO , v jednotlivých skúmavkách. Po zvážení bola do každej skúmavky pridaná H₂O tak, aby obsah lipidu v každej

vzorke bol v intervale $1,5 \pm 0,1$ (w/w)%. Po hydratácii zmesí $C_nNO+DOPC$ boli vzorky homogenizované intenzívnym premiešavaním na laboratórnom mixéri. Po príprave boli vzorky uskladnené po dobu 24 h v chladiacom boxe. Pred samotným meraním boli voľne ohriate na izbovú teplotu a v ultrazvukovom kúpeli zbavené rozpusteného vzduchu (3 – 5 min), aby sa zabránilo tvorbe nežiaducich vzduchových bubliniek.

Merania hustoty pripravených vzoriek boli vykonané na digitálnom vibračnom denzitometri DMA 602 (Anton Paar, Graz, Austria). Dĺžka jednotlivých meraní bola minimálne 5 min, pričom meranie jednej vzorky prebiehalo až pokiaľ nedošlo k ustáleniu hodnoty rezonančnej frekvencie vzorky f_s , čo zároveň označovalo teplotnú rovnováhu vzorky a denzitometra. Každá zo vzoriek bola zmeraná pri 20 °C, 30 °C, 40 °C a 50 °C. Teplota merania bola regulovaná RC termostatom (Lauda, Lauda-Königshofen, Nemecko) s presnosťou $\pm 0,01$ °C a meraná bola v blízkosti U-trubice teplomerom s presnosťou $\pm 0,001$ °C. Uvedeným spôsobom bolo možné merať špecifický objem vzoriek s presnosťou 5×10^{-6} cm³/g.

Z nameraných hodnôt boli určené závislosti parciálneho špecifického objemu zmesí $DOPC+C_nNO$ $\bar{v}_{C_nNO+DOPC}(w_{C_nNO})$ ako funkcie hmotnostného zlomku prítomného C_nNO . Všetky vykazovali lineárny charakter a boli vyhodnotené postupom použitým napr. Greenwoodom a kol. (2006), či Klacsovou a kol. (2010), čím boli z daných závislostí získané parciálne molekulové objemy $DOPC$ a jednotlivých C_nNO v zmesiach $DOPC+C_nNO$ ako funkcie teploty. Fakt, že použité C_nNO tvorili homologický rad, umožnil získať aj parciálne komponentné objemy funkčných skupín C_nNO ako funkcie teploty.

3.3 SANS na ULV

V prípade vzoriek $DOPC+C_nNO$ boli pripravené zásobné roztoky $DOPC$ a jednotlivých C_nNO v metanol-chloroformovej zmesi. Prostredníctvom sklenenej Hamiltonovej striekačky boli do sklenených skúmaviek prenesené požadované množstvá $DOPC$ a C_nNO tak, aby v skúmavkách vznikli molové pomery $r_{C_nNO} = n_{C_nNO} : n_{DOPC}$ v intervale 0,1 až 1,3 pre každé n a jedna referenčná vzorka čistého $DOPC$. Organické rozpúšťadlo bolo odparené prúdom plynného dusíka a jeho zvyšky boli odstránené vákuovaním olejovou pumpou po dobu 5 h pri tlaku 7 Pa. Množstvá zmesí $C_nNO+DOPC$ v skúmavkách boli zvážené, aby sa vylúčil možný únik materiálu počas vákuovania. Následne boli vzorky hydratované s ²H₂O tak, aby bol obsah $DOPC$ vo výsledných vzorkách ~ 1 (w/w)%, a ručne a strojovo homogenizované. Po

vizuálnej kontrole homogenity bola každá zo suspenzií 51-krát extrudovaná cez 50 nm uhlíkový filter (Nucleopore, Pleasanton, USA) pomocou dvojice Hamiltonových striekačiek upevnených na extrúder LiposoFast Basic (Avestin, Ottawa, Canada) podľa procedúry popísanej (MacDonald a kol., 1991). Bol zvolený nepárny počet extrúzií, aby sa zabránilo kontaminácii vzoriek obsahujúcich ULV multilamelárnymi vezikulami, ktoré filtrom neprejdú. Extrúzie všetkých vzoriek boli vykonané pri izbovej teplote. Po extrudovaní boli vzorky zapečatené v dusíkovej atmosfére Parafilmom M (American National Can, Greenwich, USA) v plastových skúmavkách Eppendorf. Vzorky použité pri metóde variácie kontrastu boli pripravené z referenčnej vzorky prenesením jej rovnakých množstiev a pridaním vhodných množstiev H_2O a 2H_2O tak, aby boli získané požadované kontrasty. Vzorky boli uskladnené v chladiacom boxe a pred meraním postupne ohriate na izbovú teplotu.

Meranie SANS na ULV tvorených zmesou DOPC+CnNO bolo vykonané na neutrónovom spektrometri YuMO s dvojicou 3He -detektorov fungujúcom v režime doby preletu (Kuklin a kol., 2005, 2006) nachádzajúci sa vo Frankovom Laboratóriu neutrónovej fyziky (SÚJV, Dubna, Rusko). Ako zdroj neutrónov slúži vysokorýchlostný pulzný reaktor IBR-2. Vzďialenosť vzorka-detektor bola pri prvom detektore 5,28 m a pri druhom 13,04 m. Vzorky boli počas meraní umiestnené do kyviet z kremenného skla (Hellma, Müllheim, Nemecko) s 2 mm vnútornou hrúbkou a teplotne temperované na požadovanú hodnotu počas 1 h pred samotným meraním. Teplota vzoriek bola elektronicky regulovaná na $25,0 \pm 0,1$ °C. Zo získaných rozptylových dát boli odstránené efekty pozadia a následne boli normalizované pomocou vanádiového etalónu podľa štandardných procedúr (Kuklin a kol., 2013; Ostanevich, 1988).

Podobne aj v prípade zmesí POPC/POPE/POPS+CnOH boli najprv pripravené zásobné roztoky jednotlivých lipidov (POPC, POPE, POPS) a alkoholov (C10OH a C16OH) v metanol-chloroformovej zmesi. V prvom kroku bolo z lipidových zásobných roztokov v sklenených skúmavkách pripravených päť sérií po deviatich identických vzorkách. Prenesené množstvá zásobných roztokov boli zvolené tak, aby každá vzorka obsahovala z celkového množstva prítomného lipidu 4 molové % POPS a aby molový zlomok POPC s meniacou sa sériou postupne klesal z 96 percent na 0 a obsah POPE naopak postupne rástol v totožných krokoch. V rámci každej série bola vyčlenená jedna kontrolná vzorka obsahujúca čisto lipidovú zmes. Do štvorice zostávajúcich vzoriek v sérii boli pridané množstvá zásobného roztoku C10OH tak, aby sa jeho molový pomer k prítomnému lipidu $r_{C10OH} = n_{C10OH} : n_{lip}$

postupne menil od 0,1 po 0,4. Do zostávajúcej štvorice bol podobne pridávaný zásobný roztok C16OH tak, aby r_{C16OH} rástol postupne od 0,1 po 0,4. Po premiešaní pripravených zmesí bolo organické rozpúšťadlo odparené prúdom plynného dusíka a jeho zbytky odstránené vákuovaním olejovou pumpou po dobu 6 h pri tlaku 7 Pa. Aby sa počas vákuovania zamedzilo odparovaniu alkoholov zo vzoriek, bola banka so vzorkami pri zníženom tlaku chladená tekutým dusíkom. Po odstránení organického rozpúšťadla boli vzorky odvážené, aby sa vylúčil prípadný únik zmesi lipid+C n OH. Následne boli vzorky hydratované 2H_2O tak, aby obsah tuhej zložky predstavoval ~ 1 (w/w)%. Vzorky boli strojovo homogenizované a po vizuálnej kontrole homogenity boli extrudované 51-krát vyššie spomínaným postupom cez 50 nm uhlíkové filtre. Niektoré vzorky, najmä s vyšším obsahom POPE a C16OH, bolo nutné počas extrúzie ohriať vo vodnom kúpeli, aby bolo možné samotnú extrúziu vykonať. Po extrudovaní boli vzorky uschované v plastových skúmavkách Eppendorf v ochrannej dusíkovej atmosfére, zapečatené Parafilmom M a uskladnené v chladiacom boxe. Pred meraním boli vzorky postupne ohriate na izbovú teplotu.

Rozptylové krivky SANS na ULV tvorených zmesou POPC/POPE/POPS s prímiesou C10OH resp. C16OH boli zmerané na spektrometri PAXE umiestnenom na neutrónovode chladných neutrónov G5 reaktora Orphée (Laboratoire Léon Brillouin, Saclay, Francúzsko) (Chaboussant a kol., 2012). Spektrometer pracoval v monochromatickom režime s vlnovou dĺžkou neutrónov 0,6 nm. Rozptyl neutrónov bol meraný detektorom v dvoch polohách – vo vzdialenostiach 1,3 m a 5,05 m od vzorky. Vzorky boli počas meraní umiestnené do kyviet z kremenného skla (Hellma, Müllheim, Nemecko) s 2 mm vnútornou hrúbkou a merané pri teplote 25 ± 1 °C, kontrolovanej elektronicky. 1 h pred samotným meraním boli vzorky temperované na požadovanú teplotu. Normalizovaná intenzita $I(q)$ bola z integrálnej intenzity $I_{int}(q)$ pre jednotlivé hodnoty q získaná postupom popísaným v práci Beličku a kol. (2014).

Zmerané SANS krivky boli v oboch SANS experimentoch vyhodnotené tzv. *3-vrstvovým modelom ULV* navrhnutým a prvý krát použitým Kučerkom a kol. (2004). Lipidová dvojvrstva ULV je v tomto modeli rozdelená na tri navzájom oddelené oblasti – *dve hydrofilné oblasti* s hrúbkou D_h , obsahujúce polárne časti prítomných amfifilov a interkalované molekuly vody, a *hydrofóbne jadro* s hrúbkou $2D_c$ (v súlade s označením zavedeným Nagleom a Tristram-Nagleovou (2000)), tvorené uhl'ovodíkovými reťazcami molekúl tvoriacich dvojvrstvu. Ako tretí štruktúrny parameter dvojvrstvy vystupuje *plocha dvojvrstvy na jednu molekulu lipidu A na medzifázovom rozhraní*. Rozptylové dĺžky pružného rozptylu termálnych neutrónov a objemy molekulových častí v použitom modeli vystupujú

ako vnútorné parametre. Rozptylové dĺžky jednotlivých molekúl, či ich častí boli vypočítané na základe ich štruktúry a hodnôt rozptylových dĺžok prítomných atómov (Dianoux a Lander, 2003). Parciálne molekulové objemy hydrofóbných častí fosfolipidov boli čerpané z práce Uhríkovej a kol. (2007). Uvedená práca bola taktiež použitá ako zdroj koeficientov izobarickej teplotnej rozťažnosti objemov jednotlivých komponentov uhlíkovodíkových reťazcov a na základe nich bol v prípade potreby vykonaný výpočet ich objemov pre požadovanú teplotu. Z uvedenej práce bol taktiež prevzatý objem polárnej časti fosfatidylcholínov. Objem polárnej časti POPE bol prevzatý z práce Rappolta a kol. (2008). Objem polárnej časti POPS spolu s objemom polárnej časti C_nOH boli prevzaté z práce Klacsovej a kol. (2010). Objem polárnej časti C_nNO bol získaný experimentálne v práci Beličku a kol. (2014b). Polydisperzita systému ULV bola do modelu zahrnutá prostredníctvom konvolúcie modelovej intenzity monodisperzného systému so Schulz-Floryho distribúciou. Pomocou konvolúcie bol do modelovej SANS intenzity zahrnutý aj vplyv konečného rozlíšenia použitého meracieho zariadenia. Hodnoty parametrov modelu a ich neistoty boli z danej SANS krivky (systému kriviek) získané pomocou jej fitovania modelovou intenzitou programom využívajúcim CERN-knižnicu MINUIT (James a Roos, 1975).

V prvom kroku bola vyhodnotená séria kontrastných kriviek ULV tvorených čistým DOPC, z ktorých bola získaná hodnota hrúbky hydrofilných oblastí dvojvrstiev D_h . Tá bola pri vyhodnocovaní jednokontrastných SANS kriviek použitá ako vnútorný parameter modelu. Ako parametre modelu vystupujú hrúbka hydrofóbného jadra $2D_c$, stredná hodnota polomeru vezikuly R , jej štandardná odchýlka σ , počet vezikúl v ožiarenom objeme N_p a intenzita pozadia I_{pozd} .

3.4 Systém plávajúcej deuterovanej DPPC dvojvrstvy

Základný substrát vzorky tvoril kremíkový blok s rozmermi $8 \times 5 \times 2 \text{ cm}^3$ s jednou priemyselne vyrovnanou a vyhladenou stranou, na ktorej sa nachádzala hydrofilná vrstva SiO_2 . Táto strana bola použitá na prípravu systému plávajúcej dvojvrstvy. Kremíkový blok bol pred depozíciami postupne očistený v 15 minútových ultrazvukových kúpeľoch v chloroforme, acetóne a etanole a nakoniec bol po dobu 30 minút vystavený pôsobeniu ozónu a omytý Milli-Q vodou. Proces prípravy plávajúcej dvojvrstvy bol vykonaný v Langmuirevej vaničke Nima 1212D (Nima Technology, Coventry, UK) naplnenej Milli-Q

vodou, ktorá bola pred použitím zbavená rozpusteného vzduchu premiešavaním plynným dusíkom. Pred depozíciu a počas nej bola Langmuirova vanička chladená na 13 °C. Povrchové monovrstvy, ktoré boli deponované na kremíkový blok, sa vytvorili na vodnej hladine nanosením drobných kvapôčok metanol-chloroformových zmesí príslušných lipidov, ktoré boli po odparení organického rozpúšťadla (15 min) pomaly stláčané, až kým nebolo dosiahnuté povrchové napätie $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, pri ktorom je povrchová monovrstva v tuhom skupenstve. Po 5 minútovom ustálení, aby došlo k vyrovnaniu prípadných laterálnych nehomogenít, boli vykonané jednotlivé depozície. Počas Langmuir-Blodgettovej vertikálnej depozície bolo povrchové napätie neustále udržiavané na $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Celý proces prípravy systému plávajúcej dvojvrstvy pozostával z kombinácie troch vertikálnych depozícií (2×DBPC monovrstva + d62-DPPC monovrstva) a jednej horizontálnej Langmuir-Schaeferovej depozície (vonkajšia d62-DPPC monovrstva), ktoré detailnejšie popísali Fragneto a kol. (2001). Po nanosení všetkých štyroch monovrstiev bola vzorka zapečatená plastovým krytom tak, aby vo vnútri ani v prírodných trubiciach neboli prítomné vzduchové bubliny, ktoré by plávajúcu dvojvrstvu zničili. Kryt bol vybavený trubičkami na výmenu vodného prostredia vzorky (kontrastu), ako aj trubičkami slúžiacimi na ohrev vzorky na požadovanú teplotu. Vzorka bola pripravená 24 h pred meraním a uskladnená v chladnej miestnosti pri teplote 12 °C.

Merania SNR na systéme plávajúcej d62-DPPC dvojvrstvy boli uskutočnené na reflektometri D17 s horizontálnou geometriou (Cubitt a Fragneto, 2002) v Inštitúte Laue-Langevin (Grenoble, Francúzsko) v režime doby preletu. Vlnové dĺžky neutrónov použitých pri meraniach ležali v intervale 0,2 až 1,8 nm pri uhloch dopadu $0,8^\circ$ a $3,2^\circ$, čo pokrýva interval prenesených hybností q od 0,05 po 2 nm^{-1} . Vzorka bola zmeraná pri 25 °C a 55 °C (pod hlavným fázovým prechodom DBPC a pod a nad hlavným fázovým prechodom d62-DPPC (Marsh, 2013)) vždy v troch rôznych zmesiach $^2\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (kontrastoch). Získané experimentálne dáta boli spracované pomocou programového balíka LAMP (Richard a kol., 1996), vyvinutého priamo v ILL, pomocou ktorého bola vykonaná normalizácia dát i určené rozlíšenie prislúchajúce jednotlivým bodom kriviek reflektivity.

Pri konštrukcii modelových SNR kriviek bol použitý pásový model („box model“) profilu hustoty rozptylovej dĺžky na normále k povrchu kremíkového bloku. Modelový profil hustoty rozptylovej dĺžky bol rozdelený na dostatočne tenké (0,02 nm) vrstvy, v rámci ktorých bolo možné považovať hustotu rozptylovej dĺžky za konštantnú. Uvedený spôsob aplikácie pásového modelu, napriek svojej výpočtovej náročnosti, umožňuje získať výslednú reflektivitu vrstvy s ľubovoľným profilom hustoty rozptylovej dĺžky.

Na výpočet celkovej reflektivity od súboru všetkých spomínaných vrstiev bol použitý Parratov rekurzívny formalizmus (Parratt, 1954). Ako model profilu hustoty rozptylovej dĺžky lipidovej dvojvrstvy bol zvolený *modifikovaný komponentný model* lipidovej dvojvrstvy (MKM), ktorý je založený na pôvodnom komponentnom modeli navrhnutom Wienerom a Whiteom (1992). Wiener a White popísali štruktúru fosfolipidovej dvojvrstvy na jej normále prostredníctvom Gaussových distribúcií predstavujúcich funkčné skupiny polárnej časti, či oblasť metylových skupín, a páru chybových funkcií reprezentujúceho centrálne „plateau“ hydrofóbneho jadra dvojvrstvy. V predkladanej práci bol uvedený model modifikovaný združením karbonylových skupín a glycerolovej skupiny v rámci monovrstvy do jednej – karbonyl-glycerolovej skupiny.

V prípade podložených a plávajúcich dvojvrstiev je dôležitým parametrom tzv. *miera pokrytia* ožiareného povrchu vzorky, t. j. miera ožiarenej plochy, ktorú pokrýva skúmaná dvojvrstva. Pri depozíciách lipidových dvojvrstiev môže totiž dochádzať k nedokonalému nanieseniu materiálu, v dôsledku čoho sa vo finálnych dvojvrstvách tvoria defekty, ktoré sú okamžite vyplnené vodným prostredím a majú tvar hydrofilných pórov. Táto skutočnosť je v použitom modeli zohľadnená zavedením parametra *hydratácie monovrstvy* – E , ktorý udáva mieru spomínaných vodných defektov v danej monovrstve. Ako objemy funkčných skupín v polárnej časti fosfolipidov a štandardné odchýlky ich distribúcií boli použité ich priemerné hodnoty z výsledkov simulácií molekulovej dynamiky vykonaných Kludom a kol. (2006) pri rôznych teplotách v rozmedzí 55 – 65 °C. Použitie daných objemov aj pri vyhodnocovaní meraní pri teplote 25 °C je možné vďaka malej hodnote koeficientu izobarickej teplotnej rozťažnosti polárnej časti fosfatidylcholínov (Uhríková a kol., 2007). Molekulové objemy metylénovej skupiny V_{CH_2} pri 25 a 55 °C boli prevzaté z práce Uhríkovej a kol. (2007). Objem metylovej skupiny bol určený na základe výsledkov publikovaných prác (Marsh, 2013) ako dvojnásobok objemu metylénovej skupiny. Molekulové objemy vody pri meraných teplotách, potrebné na výpočet kontrastnej hustoty rozptylovej dĺžky, boli prevzaté zo štandardných fyzikálno-chemických tabuliek (Lide, 2009). Rozlíšenie meracej aparatúry $\Delta q(q)$ bolo do modelovej reflektivity vložené analogicky ako v prípade vyhodnocovanie kriviek SANS. Hodnoty parametrov prislúchajúcich jednotlivým SNR krivkám boli získané ich fitovaním modelovou reflektivitou programom napísaným autorom špeciálne pre danú prácu, ktorý využíva CERN-knižnicu MINUIT (James a Roos, 1975).

4 Zhrnutie výsledkov

4.1 Denzitometrické merania zmesí DOPC+C_nNO

Všetky získané závislosti zdanlivého špecifického objemu $\bar{V}_{C_nNO+DOPC}$ zmesí DOPC+C_nNO vykazovali lineárny charakter. Pri teplote 50 °C bol zaznamenaný zvýšený rozptyl získaných hodnôt, čoho najpravdepodobnejšou príčinou bola zrejme tvorba vzduchových bubliniek vo vzorkách. Získané hodnoty parciálnych molekulových objemov \hat{V}_{C_nNO} v zmesiach s DOPC sú vo veľmi dobrej zhode s výsledkami Benjamina (1966) pre monomér, a nižšie ako ním získané hodnoty pre C_nNO vo forme micíel. Z podobnosti hodnôt \hat{V}_{C_nNO} v DOPC+C_nNO zmesiach a vo forme čistého monoméru je možné predpokladať, že medzi molekulami DOPC a C_nNO v nenabitej forme nedochádza k žiadnemu špecifickému typu interakcií, čo je taktiež podporené len malými rozdielmi medzi parciálnymi molekulovými objemami \hat{V}_{DOPC} v DOPC+C_nNO zmesiach a zdanlivým molekulovým objemom \bar{V}_{DOPC} čistého DOPC v kontrolnej vzorke. Mierne vyššie hodnoty \hat{V}_{C_nNO} vo forme micíel oproti hodnotám v zmesiach DOPC+C_nNO sú pravdepodobne dôsledkom vyššej neusporiadanosti molekúl v micelách v porovnaní s lipidovými dvojvrstvami. Z teplotných závislostí \hat{V}_{C_nNO} a \hat{V}_{DOPC} boli určené ich koeficienty izobarickej teplotnej rozťažnosti γ . V prípade C₁₀NO a C₁₈NO γ_{C_nNO} vykazuje výrazne vyššie hodnoty v porovnaní so zvyškom C_nNO. Daný fakt je pravdepodobne spôsobený väčším rozptylom hodnôt ich teplotných závislostí $\hat{V}_{C_{10}NO}(t)$ a $\hat{V}_{C_{18}NO}(t)$. Hodnoty γ_{DOPC} v zmesiach DOPC+C_nNO ako aj v kontrolnej vzorke sú vo veľmi dobrej zhode s hodnotami publikovanými inými autorskými kolektívami (Tristram-Nagle a kol., 1998; Uhríková a kol., 2007; Klacsová a kol., 2010). Skutočnosť, že merané C_nNO ($n = 6, 10, 12, 14, 16, 18$) tvoria homologický rad, umožňuje získať komponentný objem metylénovej CH₂ skupiny C_nNO \hat{V}_{CH_2} a polárnej časti C_nNO \hat{V}_{NO} pomocou váženého lineárneho fitu závislosti \hat{V}_{C_nNO} od počtu uhlíkových atómov v alkylovom reťazci C_nNO pri danej teplote. Hodnotu \hat{V}_{CH_2} pri 30 °C je možné porovnať s hodnotami získanými Benjaminom (1966) pre čisté C_nNO vo forme monoméru a micíel. Hodnota $\hat{V}_{CH_2} = (25,6 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ získaná v dizertačnej práci zo zmesí DOPC+C_nNO je mierne

vyššia ako hodnota $\hat{V}_{CH_2} = (25,3 \pm 1,0) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ monomérov C_nNO . Na druhej strane je nižšia ako hodnota $\hat{V}_{CH_2} = (28,8 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ C_nNO vo forme micíel. Táto skutočnosť je pravdepodobne dôsledkom štruktúry hydrofóbneho jadra micíel, ktoré vykazuje vyššiu mieru neusporiadanosti ako hydrofóbna oblasť DOPC dvojvrstiev. Hodnota \hat{V}_{CH_2} v DOPC+ C_nNO zmesiach je taktiež vo veľmi dobrej zhode s hodnotami \hat{V}_{CH_2} iných amfifílných molekúl interkalovaných do lipidových dvojvrstiev, ako napr. primárnych alifatických alkoholov v DOPC+DOPS dvojvrstvách (Klacsóvá a kol., 2010), ktorých $\hat{V}_{CH_2} = (25,8 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ pri 30 °C, alebo $\hat{V}_{CH_2} = (24,7 \pm 0,5) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ v DMPC dvojvrstvách (Aagaard a kol., 2006) taktiež pri 30 °C. Naproti tomu komponentný objem metylénovej skupiny mononenásýtených acylových reťazcov v čistých fosfatidylcholinových dvojvrstvách je pri 30 °C mierne vyšší $\hat{V}_{CH_2} = 27,68 \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ (Uhríková a kol., 2007). Tento fakt podporuje predstavu o hydrofóbnej oblasti lipidových dvojvrstiev v tekuto-kryštalickom stave ako o prostredí s podobnými vlastnosťami ako má prostredie tekutých alkánov. Hodnota $\hat{V}_{NO} = (73,9 \pm 2,8) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ pri 30 °C je blízka hodnote $\hat{V}_{NO} = (79,3 \pm 6,2) \times 10^{-3} \text{ nm}^3$ získanej Benjaminom (1966) pre C_nNO vo forme monomérov.

4.2 Meranie SANS na ULV tvorených zmesou DOPC+ C_nNO

Ako prvá bola vyhodnotená séria SANS kriviek prislúchajúca variácii kontrastu na ULV tvorených čistým DOPC. Najlepším súčasným fitom všetkých troch kontrastných kriviek bola získaná hrúbka hydrofilnej oblasti ULV tvorených DOPC $D_h = 0,98 \pm 0,06 \text{ nm}$. Získaná hodnota je v rámci chyby zhodná s hodnotou $D_h = 0,99 \pm 0,05 \text{ nm}$ získanou pomocou SANS na DOPC ULV detailnejším modelom Kučerkom a kol. (2009) pri 30 °C. Taktiež Pabst a kol. (2000) analyzovali nanovo dáta z neutrónovej difrakcie na orientovaných systémoch DPPC dvojvrstiev pri zníženej hydratácii (10 a 25 (w/w)%) pôvodne zmeraných Büldtom a kol. (1979) a Zaccaiom a kol. (1979). Na vyhodnotenie rozptylových kriviek použili model profilu lipidovej dvojvrstvy, v ktorom sú polárne časti i centrálna oblasť uhlíkovodíkových reťazcov reprezentované Gaussovými distribučnými funkciami. Uvedeným spôsobom určili hrúbky hydrofilnej oblasti na $D_h = 0,9 \pm 0,1 \text{ nm}$. Hodnoty D_h v porovnaných prácach sú v zhode s hodnotou získanou v rámci predloženej dizertačnej práce.

Všetky závislosti $A(r_{CnNO})$, kde r_{CnNO} je molový pomer $n_{CnNO} : n_{DOPC}$ v DOPC+CnNO dvojrstvách, majú rastúci charakter, ktorý je možné v rámci študovaného intervalu hodnôt r_{CnNO} úspešne popísať lineárnou funkciou. Zatiaľ čo pre $n = 12, 14$ a 16 rastú všetky tri závislosti približne rovnako rýchlo, v prípade C18NO A rastie viditeľne rýchlejšie. Analógiou so zdanlivými a parciálnymi molekulovými objemami molekúl v zmesiach boli získané zdanlivé (\bar{A}) a parciálne plochy (\hat{A}) CnNO a DOPC v dvojrstvách. Hodnoty $\hat{A}_{C12NO} = 0,364 \pm 0,004 \text{ nm}^2$, $\hat{A}_{C14NO} = 0,366 \pm 0,004 \text{ nm}^2$ a $\hat{A}_{C16NO} = 0,367 \pm 0,004 \text{ nm}^2$ sú v rámci svojich neistôt rovnaké, zatiaľ čo v prípade $\hat{A}_{C18NO} = 0,394 \pm 0,009 \text{ nm}^2$ je možné pozorovať výrazný nárast. Všetky hodnoty príslušných \hat{A}_{DOPC} ležia v intervale $0,698 - 0,701 \text{ nm}^2$, sú si navzájom rovné v rámci svojich neistôt o veľkosti $\pm 0,002 \text{ nm}^2$ a v porovnaní s hodnotou $\bar{A}_{DOPC} = 0,708 \pm 0,004 \text{ nm}^2$ získanou z kontrolnej vzorky len mierne nižšie. Hodnoty zdanlivých plôch \bar{A}_{CnNO} sú všetky nižšie ako k nim prislúchajúce \hat{A}_{CnNO} , ale vykazujú rovnakú tendenciu ako \hat{A}_{CnNO} . Blízkosť hodnôt \hat{A}_{DOPC} a \bar{A}_{DOPC} podporuje vhodnosť voľby lineárnych aproximácií na charakterizáciu závislostí $A(r_{CnNO})$ a $2D_C(r_{CnNO})$, a taktiež správnosť získaných trendov a hodnôt v rámci trojvrstvého modelu použitého na opis ULV. Hodnoty \hat{A}_{CnNO} získané pomocou SANS v predloženej dizertačnej práci sa pohybujú v intervale $0,35 - 0,382 \text{ nm}^2$, zatiaľ čo hodnoty získané pomocou SAXS Karlovskou a kol. (2004) na multilamelárnych dvojrstvách tvorených zmesou fosfatidylcholínu z vaječných žĺtkov (EYPC) a CnNO pokrývajú interval $0,237 - 0,256 \text{ nm}^2$. Tento rozpor je najpravdepodobnejšie spôsobený rozdielnymi hydratáciami porovnávaných systémov. Prípadný vplyv rozdielnosti lipidov použitých v porovnávaných prácach na pozorovaný rozdiel možno zanedbať, keďže oba lipidy majú identickú polárnu časť a priemerné zloženie acylových reťazcov EYPC [C17,8:1,2PC; referencie pozri v práci Karlovskej a kol. (2004)] je veľmi podobné zloženiu acylových reťazcov DOPC [C18:1PC]. Aj napriek hodnotovému rozdielu oboch sérií \hat{A}_{CnNO} však môžeme u oboch pozorovať rovnakú tendenciu – zmenu trendu medzi $n = 16$ a 18 . Hodnoty \hat{A}_{CnNO} v DOPC dvojrstvách získané v predkladanej dizertačnej práci je taktiež možné porovnať s ich hodnotami v prípadoch, keď sú CnNO agregované do formy micel vo vodnom prostredí. Barlow a kol. (2000) vykonali merania SANS micelách tvorených C12NO. Pre vonkajší povrch micely pripadajúci na jednu molekulu C12NO získali hodnotu $\bar{A}_{C12NO} = 0,71 \text{ nm}^2$. Gorski a kol. (1994) vykonali obdobné

merania na micelách tvorených C14NO. Najlepší dosiahnutý fit poskytol plochu vonkajšieho povrchu na molekulu C14NO $\bar{A}_{C14NO} = 0,458 \text{ nm}^2$. Garamus a kol. (1999) zmerali a vyhodnotili SANS na micelách tvorených C12NO. Tak získali hodnotu molekulovej plochy $\bar{A}_{C12NO} = 1,2 \pm 0,2 \text{ nm}^2$. Okrem použitia metódy SANS je možné získať cennú informáciu o ploche vonkajšieho povrchu micely pripadajúcu na jednu molekulu aj pomocou simulácií molekulovej dynamiky. Uvedený prístup zvolili aj Lorenz a kol. (2011), ktorí prostredníctvom simulácií molekulovej dynamiky študovali chovanie sa miciel tvorených molekulami nenabitého C12NO vo vode. Z publikovaných štruktúrnych parametrov modelovej micely vyplýva, plocha vonkajšieho povrchu jednej molekuly C12NO mala veľkosť $\bar{A}_{C12NO} = 0,984 \text{ nm}^2$. Hoci hodnoty plôch \bar{A}_{CnNO} získané v uvedených experimentoch vykazujú pomerne široký rozptyl, v porovnaní s hodnotami \hat{A}_{CnNO} v DOPC dvojvrstvách sú jednoznačne vyššie, čo podporuje predstavu lepšieho usporiadania molekúl CnNO v DOPC dvojvrstvách v porovnaní s micelami.

Okrem závislostí $A(r_{CnNO})$ boli vyhodnocované i závislosti $2D_C(r_{CnNO})$. Bolo zistené, že veľkosť poklesu $2D_C$ v porovnaní s jej hodnotou v prípade dvojvrstiev tvorených čistým DOPC narastá s rastúcim r_{CnNO} a klesá s rastúcou dĺžkou alkylového reťazca CnNO. Závislosti $2D_C(r_{CnNO})$ všetkých študovaných CnNO majú klesajúci charakter, ktorý je možné dobre popísať lineárnymi funkciami. Smernica Δd rastie od $n = 12$ po $n = 16$ takmer lineárne, zatiaľ čo jej hodnota pre $n = 18$ je viditeľne nižšia, než očakávaná hodnota z tendencie predchádzajúcich CnNO a veľmi blízka nule. Hodnoty interpolovaných hodnôt $2D_C$ pri $r_{CnNO} = 0,0$ sú vo veľmi dobrej zhode s hodnotou získanou z kontrolnej vzorky obsahujúcej čisté DOPC. Pozorovaný účinok interkalácie CnNO na hrúbku DOPC dvojvrstiev je možné vysvetliť elimináciou „voľného objemu“ v centre hydrofóbnej oblasti dvojvrstvy, ktorý je spôsobený rozdielnymi dĺžkami uhl'ovodíkových reťazcov DOPC a CnNO. Vyplnený je uhl'ovodíkovými reťazcami okolitých molekúl DOPC, ktoré za týmto účelom podliehajú *trans-gauche* izomerizácii a prípadne prenikajú medzi reťazce protiľahlej monovrstvy (Devínsky a kol., 1990; Balgavý a Devínsky, 1996). Výsledky získané metódou SANS sú vo veľmi dobrej zhode s výsledkami zo SAXS získanými Karlovskou a kol. (2004) a to aj napriek odlišnosti použitých metód a modelov lipidovej dvojvrstvy.

4.3 Meranie SANS na ULV tvorených zmesou lipidov POPC/POPE/POPS s prímiesami C10OH a C16OH

V prvom kroku boli získané rozptylové krivky na ULV tvorených len zmesou lipidov POPC, POPE, POPS bez prítomnosti prímiesných alkoholov (kontrolné vzorky). Pri vyhodnocovaní jednodkontrastných SANS kriviek kontrolných vzoriek, ale aj vzoriek s interkalovanými alkoholmi, bola hrúbka hydrofilných oblastí lipidovej dvojvrstvy fixovaná na hodnote $D_h = 0,98$ nm. Ako bolo zistené hodnota $2D_C$ s narastajúcim molovým zlomkom POPE v dvojvrstve, x_{POPE} , postupne narastá a to aj napriek tomu, že všetky prítomné lipidy majú rovnakú skladbu uhlíkovodíkových reťazcov. Keďže jediným faktorom, ktorý sa v dvojvrstvách kontrolných vzoriek mení je priemerná polárna časť lipidu, možno danú zmenu prisúdiť práve vplyvu štruktúry polárnej časti. Uvedený vplyv polárnej časti na štruktúru primitívnej bunky lipidovej dvojvrstvy je možné pozorovať aj v prípade nasýtených lipidov v tekutokryštalickom stave. Ak sa porovnajú napr. hodnota $2D_C = 3,08 \pm 0,03$ nm získaná Pabstom a kol. (2000) v prípade ULV tvorených DPPE pri teplote 75 °C a hodnota $2D_C = 2,7 \pm 0,06$ nm extrapolovaná z hodnôt $2D_C = 2,79 \pm 0,09$ nm a koeficientu teplotnej kontrakcie hydrofóbneho jadra $\alpha_{DC}^T = 0,0022$ K⁻¹ DPPC dvojvrstiev pri teplote 60 °C získaných Kučerkom a kol. (2011a), je možné vidieť podobný vplyv zámény $PC \rightarrow PE$ na štruktúru primitívnej bunky lipidovej dvojvrstvy ako v predkladanej dizertačnej práci. Hodnota plochy primitívnej bunky $A = 0,635 \pm 0,013$ nm² čistej POPC dvojvrstvy pri 25 °C vyplývajúca z výsledkov práce Kučerku a kol. (2011a) je mierne vyššia, no v rámci neistoty totožná, s hodnotou A zodpovedajúcou $x_{POPE} = 0$ získanou v predkladanej práci. Navyše, ako bolo pozorované Klacsovou a kol. (2011) v prípade 4 molových % dioleoylfosfatidylserínu (DOPS) v DOPC dvojvrstvách, a taktiež ako vyplýva z plochy $A = 0,627$ nm² čistých POPS dvojvrstiev získaných kombináciou metód SANS a SAXS Panom a kol. (2014) pri 25 °C, prítomnosť 4 molových % fosfatidylserínov vo fosfatidylcholínach znižuje hodnotu A oproti čistým fosfatidylcholínom len zanedbateľne. Získané závislosti $A(x_{POPE})$, $2D_C(x_{POPE})$, a vďaka linearite závislosti $\hat{V}_{PL}(x_{POPE})$ aj závislosť $N_W(x_{POPE})$, vykazujú lineárny charakter, čo potvrdzuje predpoklad o ideálnom zmiešavaní prítomných lipidov, nutnú podmienku aplikácie trojvrstvého modelu ULV. Získaná hodnota $\hat{A}_{POPC} = 0,623 \pm 0,003$ nm² je

v dobrej zhode s hodnotou $A = 0,635 \pm 0,013 \text{ nm}^2$ vyplývajúcou z práce Kučerku a kol. (2011a).

V druhej etape bol meraný SANS na ULV obsahujúcich C10OH alebo C16OH. Bolo zistené, že interkalácia CnOH má na štruktúru POPC/POPE/POPS dvojvrstiev rozdielny vplyv nielen v závislosti od dĺžky alkylového reťazca alkoholu, ale výsledný efekt výrazne závisí aj od lipidového zloženia POPC/POPE/POPS dvojvrstiev. Zatiaľ čo závislosti $A(r_{C10OH})$ pre všetky študované dvojvrstvy vykazujú priebehy dobre opísateľné lineárnymi aproximáciami, v prípade C16OH je viditeľný nárast rozptylu experimentálnych hodnôt $A(r_{C16OH})$ s narastajúcim x_{POPE} . Rovnaký rozdiel možno vidieť pri porovnaní závislostí $2D_C(r_{C10OH})$ a $2D_C(r_{C16OH})$. Zvyšujúci sa rozptyl hodnôt štruktúrnych závislostí $A(r_{C16OH})$ a $2D_C(r_{C16OH})$ s narastajúcim x_{POPE} pravdepodobne priamo súvisí s poklesom plochy primitívnej bunky A lipidovej dvojvrstvy v kontrolných vzorkách s narastajúcou hodnotou x_{POPE} . Získané hodnoty \hat{A}_{C10OH} sú približne rovnaké vo všetkých lipidových zmesiach a ležia v intervale 0,2 až 0,24 nm^2 , pričom od bodu $x_{POPE} = 0,5$ je možné zaznamenať ich mierny nárast. Získané hodnoty \hat{A}_{C10OH} sú o 0,02 až 0,06 nm^2 vyššie ako hodnota $\bar{A}_{C10OH} = 0,174 \pm 0,04 \text{ nm}^2$ získaná Klacsovou a kol. (2011) metódou SANS na ULV tvorených zmesou (96%)DOPC+(4%)DOPS+C10OH. Vyššia hodnota \hat{A}_{C10OH} i \bar{A}_{C10OH} oproti výsledku Klacsovej a kol. však môže byť prirodzeným dôsledkom rozdielneho zloženia lipidových dvojvrstiev porovnávaných experimentov. Pri hodnotách \hat{A}_{C16OH} ako aj \bar{A}_{C16OH} je v porovnaní s priebehom hodnôt \hat{A}_{C10OH} resp. \bar{A}_{C10OH} badateľný výrazný pokles s narastajúcou hodnotou x_{POPE} a na prvý pohľad je zarážajúci aj interval ich hodnôt. Viditeľný nesúlad vykazujú aj prislúchajúce hodnoty \hat{A}_{lipid} v porovnaní s priebehom plochy POPC/POPE/POPS molekuly v ideálne zmiešaných kontrolných vzorkách. Jedným z možných vysvetlení takéhoto chovania môže byť interkalácia C16OH do hlbších oblastí lipidovej dvojvrstvy. Inklináciu alkoholu, konkrétne C14OH, k takémuto chovaniu pozorovali pri simuláciách molekulovej dynamiky zmesných DMPC dvojvrstiev Griepnera a kol. (2007). Daný efekt pozorovali iba v prípade C14OH, teda pri alkohole s dĺžkou alkylového reťazca porovnateľnou s dĺžkou uhl'ovodíkového reťazca lipidu. Rovnaký spôsob vyhodnotenia, akým boli vyhodnotené závislosti $A(r_{CnOH})$, bol použitý aj v prípade závislostí $2D_C(r_{CnOH})$. Hodnoty smerníc Δd_{C10OH} sú v rámci svojich neistôt rovnaké okrem hodnoty prislúchajúcej

$x_{POPE} = 0,75$, ktorá je v porovnaní s ostatnými nižšia. Daný fakt je pravdepodobne dôsledkom prítomnosti fázovej separácie v rámci lipidovej dvojvrstvy spôsobenej interkaláciou alkoholu. Jej prítomnosť identifikovali aj Klacsová a kol. (2010) v rámci denzitometrických meraní zmesí (96%)DOPC+(4%)DOPS s homologickým radom alkoholov C_nOH ($n = 10 - 16$) nad molovým zlomkom alkoholu v dvojvrstvách $r_{C_nOH} > 0,4$. V prípade C16OH sa svojou hodnotou smernice $\Delta d_{C16OH} = 9,2 \pm 0,7$ nm závislosti $2D_C(r_{C16OH})$ od zvyšku získaných smerníc odlišuje séria vzoriek neobsahujúca POPE. Smernice Δd_{C16OH} zvyšku sérií sú v rámci svojich neistôt rovnaké. Na základe daného faktu je možné usudzovať, že nesúlad hodnôt $2D_C(0)$ s hodnotami ideálneho priebehu $2D_C(x_{POPE})$ v kontrolných vzorkách je dôsledok prejavu fázovej separácie v dvojvrstvách POPC/POPE/POPS+C16OH pri nižších hodnotách r_{C16OH} , než pozorovali Klacsová a kol. (2010).

4.4 Meranie SNR na systéme plávajúce d62-DPPC dvojvrstvy

V prvej časti bol MKM použitý na vyhodnotenie SNR kriviek získaných z podloženej DBPC dvojvrstvy na kremíkovom bloku pri 25 °C. Experimentálne SNR krivky bolo možné popísať pomocou modelovej reflektivity veľmi dobre. Rozptyl hodnôt $(R_{exp,i} - R_{total}(q_i)) / \Delta R_{exp,i}$ bol takmer na celom intervale meraných hodnôt q v intervale (-2, 2). Na rozdiel od prác (König a kol., 1996; Charitat a kol., 1999; Gutberlet a kol., 2004), v ktorých bola meraná SNR na podložených fosfatidylcholínových dvojvrstvách, a práce Stiddera a kol. (2007), v rámci ktorej bola meraná SNR na podloženej DPPE dvojvrstve, v predkladanej práci nebola zaznamenaná prítomnosť vodnej vrstvy medzi polárnymi časťami monovrstvy orientovanej smerom ku kremíkovému bloku a SiO₂-vrstvou. Z polohy cholínovej skupiny danej monovrstvy preto vyplýva, že podložená vrstva je v priamom kontakte s kremíkovým blokom. Uvedené zistenie je v súlade s výsledkami prác Gerelliho a kol. (2012, 2013). Bolo zistené, hydratácia monovrstvy v kontakte s SiO₂-vrstvou je mierne vyššia ako hydratácia monovrstvy v kontakte s vodnou fázou. Rozdiel v hydratáciách bol však menší ako 2%. Z pohľadu celkového vyhodnocovania SNR je však oveľa dôležitejšia hodnota celkového pokrytia povrchu bloku, doplnok k celkovej hydratácii, ktorá dosiahla 90%. Plocha na lipid v monovrstve v kontakte s povrchovou SiO₂-vrstvou mala hodnotu $A = 0,555 \pm 0,001$ nm², zatiaľ čo v prípade monovrstvy v kontakte s vodnou fázou mala hodnotu $A = 0,529 \pm 0,001$ nm². Tento rozdiel môže byť spôsobený jednak už spomínanou

odlišnosťou v interakciách, ktorými pôsobí na jednotlivé monovrstvy ich okolie, ale taktiež aj odlišnými depozíciami, ktorými boli jednotlivé monovrstvy nanášané na blok. Uvedené zistenie korešponduje s výsledkami Charitata a kol. (1999) a Gutberleta a kol. (2004), ktorí vyhodnocovali SNR na podložených dvojvrstvách pomocou vrstvomého modelu a v hydrofilných oblastiach zistili podobnú asymetriu.

Meranie SNR na systéme plávajúcej d62-DPPC dvojvrstvy nad DBPC dvojvrstvou bolo vykonané v troch rôznych kontrastoch a pri teplotách 25 a 55 °C, teda pod a nad hlavným fázovým prechodom DPPC dvojvrstiev. Pri teplote 25 °C nebolo možné volený model úspešne aplikovať. Za účelom lepšej aplikácie modelu bola taktiež napr. uvažovaná asymetrická hydratácia monovrstiev plávajúcej dvojvrstvy, či zvýšená drsnosť hraníc jej hydrofóbneho jadra, ktoré by mohli byť spôsobené odlišnými typmi depozícií, ktorými boli jej monovrstvy nanášané, avšak ani jeden z použitých prístupov nevedol k výraznému zlepšeniu fitu. Ako vhodné vysvetlenie tejto skutočnosti sa preto javí zvýšená miera neusporiadanosti plávajúcej lipidovej dvojvrstvy po jej depozícii. Toto vysvetlenie je podporené aj faktom, že hrúbka hydrofóbneho jadra plávajúcej dvojvrstvy $2D_C = 3,59 \pm 0,01$ nm je väčšia ako jeho hrúbka v rovnakej fáze $2D_C = 3,4$ nm získaná Charitatom a kol. (1999), či hrúbka $2D_C = 3,2 \pm 0,2$ nm získaná Fragneto a kol. (2003) taktiež z plávajúcej DPPC dvojvrstvy v gélovej fáze.

Kvalita fitu pri teplote 50 °C bola výrazne lepšia a na jej dosiahnutie bol aplikovaný celý proces fitovania. Najviditeľnejšia zmena oproti fitu pri 25 °C nastala v prípade hrúbky hydrofóbnej oblasti. Uvedený fakt je prejavom zmeny fázy d62-DPPC dvojvrstvy do tekutokryštalického stavu. Získaná hodnota hrúbky hydrofóbnej oblasti $2D_C = 2,72 \pm 0,01$ nm je vo veľmi dobrej zhode s hodnotou $2D_C = 2,79 \pm 0,06$ nm získaná Kučerkom a kol. (2011a) obdobným modelom, ale metódou SANS na ULV tvorených DPPC dvojvrstvami pri teplote 60 °C. Avšak v predkladanej práci je drsnosť hraníc hydrofóbnej oblasti plávajúcej dvojvrstvy $\sigma_{CH_2} = 0,48$ nm vyššia, ako je tomu v prípade Kučerku a kol. (2011a) $\sigma_{CH_2} = 0,25$ nm. Daný fakt je pravdepodobne spôsobený zvlínenosťou plávajúcej dvojvrstvy v dôsledku jej väčšej voľnosti v porovnaní s dvojvrstvou v ULV. Ak porovnáme získanú hydratáciu plávajúcej dvojvrstvy pri teplotách 25 a 55 °C, je vidieť jej pokles o viac ako 15%. Keďže ide o tú istú vzorku, je z uvedeného možné uzatvárať, že ide zrejme o dôsledok lepšieho usporiadania molekúl v tekutokryštalickej fáze, keďže sa v nej molekuly lipidov vyznačujú v porovnaní s gélovou fázou vyššou pohyblivosťou i väčšou paletou možných pohybov.

Plocha vonkajšieho povrchu dvojvrstvy pripadajúca na jednu molekulu lipidu je pri 55 °C $A = 0,666 \pm 0,002 \text{ nm}^2$ mierne väčšia ako jej hodnota $A = 0,65 \pm 0,013 \text{ nm}^2$ získaná obdobným modelom, ale metódou SANS na DPPC ULV pri 60 °C (Kučerka a kol., 2011a). Vnútna štruktúra hydrofilných oblastí plávajúcej dvojvrstvy sa mierne líši od usporiadania funkčných skupín získaných Kučerkom a kol. (2011a). U všetkých fitovaných skupín možno pozorovať pri porovnaní s výsledkami Kučerku a kol. posun komponentov smerom od centra dvojvrstvy. Zatiaľ čo v prípade karbonyl-glycerolovej skupiny je posun len o 0,05 nm, s narastajúcou vzdialenosťou funkčnej skupiny od hydrofóbneho jadra narastá. Na základe tohto faktu možno predpokladať, že pozorovaný posun je dôsledkom zvlnenia plávajúcej dvojvrstvy. Ako príčinu by bolo možné uvažovať aj mierne odlišnú definíciu komponentov polárnych častí lipidov v predkladanej práci a v prácach Kučerku a kol. (2008, 2011a). Ako je ale možné vidieť v práci Heberleho a kol. (2012), zmena spôsobená preusporiadaním komponentov polárnych častí prinesie zmenu len na úrovni 0,1 nm. Preto je ako vysvetlenie narastajúceho posunu polôh komponentov polárnych častí lipidov pravdepodobnejšie zvlnenie plávajúcej dvojvrstvy.

5 Záver

Najdôležitejšie výsledky predkladanej práce je možné zhrnúť do nasledovných bodov:

Denzitometria

- Všetky skúmané zmesi DOPC+C_nNO boli v použítom intervale hodnôt r_{C_nNO} ideálne miešateľné a vyhodnotením meraní boli získané hodnoty molekulových objemov C_nNO a DOPC.
- Získané parciálne molekulové objemy \hat{V}_{C_nNO} v DOPC dvojvrstvách pri 30 °C sú vo veľmi dobrej zhode s ich hodnotami získanými Benjaminom (1966) pre monoméry a nižšie ako ním získané hodnoty V_{C_nNO} pre micely.

Malouhlový rozptyl neutrónov (SANS)

- Metódou variácie kontrastu bola stanovená hrúbka hydrofilných oblastí DOPC dvojvrstiev na $D_h = 0,98 \pm 0,06$ nm.
- Hodnoty $\hat{A}_{C_{12}NO}$, $\hat{A}_{C_{14}NO}$ a $\hat{A}_{C_{16}NO}$ v DOPC dvojvrstvách sú v rámci experimentálnych neistôt rovnaké. Zvýšenú hodnotu vykazuje $\hat{A}_{C_{18}NO}$. Zmenu tendencie medzi $n = 16$ a 18 vykazujú i hodnoty smerníc závislostí $2D_C(r_{C_nNO})$.
- Meraním SANS bolo zistené ideálne zmiešavanie POPC/POPE/POPS zmesí bez prítomnosti alkoholov.
- Interkalácie C10OH a C16OH do POPC/POPE/POPS dvojvrstiev vykazujú odlišný charakter. Získané hodnoty $\hat{A}_{C_{16}OH}$ sú výrazne nižšie v porovnaní s inými lipidovými zmesami. Viditeľný je vplyv množstva POPE v dvojvrstvách na sledované charakteristiky interkalovaných alkoholov.

Spekulárna neutrónová reflektometria

- Zvolený MKM bol úspešne aplikovaný na systém podloženej DBPC dvojvrstvy a systém plávajúcej d62-DPPC dvojvrstvy v tekutokryštalickej fáze.

6 Použitá literatúra

AAGAARD, T.H., KRISTENSEN, M.N., WESTH, P., 2006: Packing properties of 1-alkanols and alkanes in a phospholipid membrane. *Biophys. Chem.* **119**, 61–68.

BALGAVÝ, P., DEVÍNSKY, F., 1996: Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Adv. Colloid. Int. Sci.* **66**, 23–63.

BALGAVÝ, P., DUBNIČKOVÁ, M., UHRÍKOVÁ, D., YARADAIKIN, S., KISELEV, M., GORDELIY, V., 1998: Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Acta Phys. Slovaca* **48**, 509–533.

BALGAVÝ, P., KUČERKA, N., GORDELIY, V.I., CHEREZOV, V.G., 2001: Evaluation of small-angle neutron scattering curves of unilamellar phosphatidylcholine liposomes using a multishell model of bilayer neutron scattering length density. *Acta Phys. Slovaca* **51**, 53–68.

BARLOW, D.J., LAWRENCE, M.J., ZUBERI, T., ZUBERI, S., HEENAN, R.K., 2000: Small-angle neutron-scattering studies on the nature of the incorporation of polar oils into aggregates of *N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide. *Langmuir* **16**, 10398–10403.

BELIČKA, M., KUČERKA, N., UHRÍKOVÁ, D., ISLAMOV, A.K., KUKLIN, A.I., DEVÍNSKY, F., BALGAVÝ, P., 2014a: Effects of *N,N*-dimethyl-*N*-alkylamine *N*-oxides on DOPC bilayers in unilamellar vesicles: small-angle neutron scattering study. *Eur. Biophys. J.*, 1–11.

BELIČKA, M., KLACSOVÁ, M., KARLOVSKÁ, J., WESTH, P., DEVÍNSKY, F., BALGAVÝ, P., 2014b: Molecular and component volumes of *N,N*-dimethyl-*N*-alkylamine-*N*-oxides in DOPC bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **180**, 1–6.

BENJAMIN, L., 1966: Partial molal volume changes during micellization and solution of nonionic surfactants and perfluorocarboxylates using a magnetic density balance. *J. Phys. Chem.* **70**, 3790–3797.

BORN, M., WOLF, E., 1999: Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light, Cambridge University Press, Cambridge.

BÜLDT, G., GALLY, H.U., SEELIG, J., ZACCAI, G., 1979: Neutron diffraction studies on phosphatidylcholine model membranes: I. Head group conformation. *J. Mol. Biol.* **134**, 673–691.

CHABOUSSANT, G., DÉSSERT, S., BRÛLET, A., 2012: Recent developments and projects in SANS instrumentation at LLB-Orphée. *Eur. Phys. J.: Spec. Top.* **213**, 313–325.

CHARITAT, T., BELLET-AMALRIC, E., FRAGNETO, G., GRANER, F., 1999: Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *Eur. Phys. J. B* **8**, 583–593.

CUBITT, R., FRAGNETO, G., 2002: D17: the new reflectometer at the ILL. *Appl. Phys. A* **74**, 329–331.

- DAILLANT, J., GIBAUD, A., 2009: X-ray and neutron reflectivity: principles and applications, 2. vyd., Springer, Berlin.
- DEVÍNSKY, F., LACKO, I., NAGY, A., KRASNEC, L., 1978: Amine oxides. I. Synthesis, $^1\text{H-NMR}$, and infrared spectra of 4-alkylmorpholine-*N*-oxides. *Chem. Zvesti - Chem. Pap.* **32**, 106–115.
- DEVÍNSKY, F., KOPECKÁ-LEITMANOVÁ, A., ŠERŠEŇ, F., BALGAVÝ, P., 1990: Cut-off effect in antimicrobial activity and in membrane perturbation efficiency of the homologous series of *N,N*-dimethylalkylamine oxides. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 790–794.
- DIANOUX, A.J., LANDER, G.H., 2003: Neutron data booklet, 2. vyd., Old City, Philadelphia, PA.
- EGELHAAF, S.U., WEHRLI, E., MÜLLER, M., ADRIAN, M., SCHURTENBERGER, P., 1996: Determination of the size distribution of lecithin liposomes: a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. *J. Microsc.* **184**, 214–228.
- FEIGIN, L.A., SVERGUN, D.I., 1987: Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering, Plenum Press, New York.
- FRAGNETO, G., CHARITAT, T., GRANER, F., MECKE, K., PERINO-GALLICE, L., BELLET-AMALRIC, E., 2001: A fluid floating bilayer. *Europhys. Lett.* **53**, 100–106.
- FRAGNETO, G., CHARITAT, T., BELLET-AMALRIC, E., CUBITT, R., GRANER, F., 2003: Swelling of phospholipid floating bilayers: the effect of chain length. *Langmuir* **19**, 7695–7702.
- FRAGNETO, G., CHARITAT, T., DAILLANT, J., 2012: Floating lipid bilayers: models for physics and biology. *Eur. Biophys. J.* **41**, 863–874.
- GARAMUS, V., KAMEYAMA, K., KAKEHASHI, R., MAEDA, H., 1999: Neutron scattering and electrophoresis of dodecyldimethylamine oxide micelles. *Colloid Polym. Sci.* **277**, 868–874.
- GERELLI, Y., PORCAR, L., FRAGNETO, G., 2012: Lipid rearrangement in DSPC/DMPC bilayers: A neutron reflectometry study. *Langmuir* **28**, 15922–15928.
- GERELLI, Y., PORCAR, L., LOMBARDI, L., FRAGNETO, G., 2013: Lipid exchange and Flip-Flop in solid supported bilayers. *Langmuir* **29**, 12762–12769.
- GORSKI, N., GRADZIELSKI, M., HOFFMANN, H., 1994: Mixtures of nonionic and ionic surfactants. The effect of counterion binding in mixtures of tetradecyldimethylamine oxide and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Langmuir* **10**, 2594–2603.
- GREENWOOD, A.I., TRISTRAM-NAGLE, S., NAGLE, J.F., 2006: Partial molecular volumes of lipids and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **143**, 1–10.
- GRIEPERNAU, B., LEIS, S., SCHNEIDER, M.F., SIKOR, M., STEPPICH, D., BÖCKMANN, R.A., 2007: 1-Alkanols and membranes: a story of attraction. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2899–2913.

GUTBERLET, T., STEITZ, R., FRAGNETO, G., KLÖSGEN, B., 2004: Phospholipid bilayer formation at a bare Si surface: a time-resolved neutron reflectivity study. *J. Phys. Condens. Matter* **16**, S2469.

HEBERLE, F.A., PAN, J., STANDAERT, R.F., DRAZBA, P., KUČERKA, N., KATSARAS, J., 2012: Model-based approaches for the determination of lipid bilayer structure from small-angle neutron and X-ray scattering data. *Eur. Biophys. J.* **41**, 875–890.

HUNTER, D.G., FRISKEN, B.J., 1998: Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys. J.* **74**, 2996–3002.

JAMES, F., ROOS, M., 1975: Minuit - a system for function minimization and analysis of the parameter errors and correlations. *Comput. Phys. Commun.* **10**, 343–367.

KARLOVSKÁ, J., LOHNER, K., DEGOVICS, G., LACKO, I., DEVÍNSKY, F., BALGAVÝ, P., 2004: Effects of non-ionic surfactants *N*-alkyl-*N,N*-dimethylamine-*N*-oxides on the structure of a phospholipid bilayer: small-angle X-ray diffraction study. *Chem. Phys. Lipids* **129**, 31–41.

KISELEV, M.A., LOMBARDO, D., KISSELEV, A.M., LESIEUR, P., AKSENOV, V.L., 2003: Structure factor of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles: small-angle X-ray scattering study. *Poverhnost* **11**, 20–24.

KISELEV, M.A., ZEMLYANAYA, E.V., ASWAL, V.K., NEUBERT, R.H.H., 2006: What can we learn about the lipid vesicle structure from the small-angle neutron scattering experiment? *Eur. Biophys. J.* **35**, 477–493.

KLACSOVÁ, M., WESTH, P., BALGAVÝ, P., 2010: Molecular and component volumes of saturated *n*-alkanols in DOPC+DOPS bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 498–505.

KLACSOVÁ, M., BULACU, M., KUČERKA, N., UHRÍKOVÁ, D., TEIXEIRA, J., MARRINK, S.J., BALGAVÝ, P., 2011: The effect of aliphatic alcohols on fluid bilayers in unilamellar DOPC vesicles — a small-angle neutron scattering and molecular dynamics study. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 2136–2146.

KLAUDA, J.B., KUČERKA, N., BROOKS, B.R., PASTOR, R.W., NAGLE, J.F., 2006: Simulation-based methods for interpreting X-ray data from lipid bilayers. *Biophys. J.* **90**, 2796–2807.

KOMURA, S., TOYOSHIMA, Y., TAKEDA, T., 1982: Neutron small-angle scattering from single-walled liposomes of egg phosphatidylcholine. *Jpn. J. Appl. Phys.* **21**, 1370–1372.

KÖNIG, B.W., KRUEGER, S., ORTS, W.J., MAJKRZAK, C.F., BERK, N.F., SILVERTON, J.V., GAWRISCH, K., 1996: Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal. *Langmuir* **12**, 1343–1350.

KUČERKA, N., NAGLE, J.F., FELLER, S.E., BALGAVÝ, P., 2004: Models to analyze small-angle neutron scattering from unilamellar lipid vesicles. *Phys. Rev. E* **69**, 051903.

KUČERKA, N., PENCER, J., SACHS, J.N., NAGLE, J.F., KATSARAS, J., 2007: Curvature effect on the structure of phospholipid bilayers. *Langmuir* **23**, 1292–1299.

- KUČERKA, N., NAGLE, J.F., SACHS, J.N., FELLER, S.E., PENCER, J., JACKSON, A., KATSARAS, J., 2008: Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data. *Biophys. J.* **95**, 2356–2367.
- KUČERKA, N., GALLOVÁ, J., UHRÍKOVÁ, D., BALGAVÝ, P., BULACU, M., MARRINK, S.-J., KATSARAS, J., 2009: Areas of monounsaturated diacylphosphatidylcholines. *Biophys. J.* **97**, 1926–1932.
- KUČERKA, N., NIEH, M.-P., KATSARAS, J., 2011a: Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 2761–2771.
- KUČERKA, N., HOLLAND, B.W., GRAY, C.G., TOMBERLI, B., KATSARAS, J., 2011b: Scattering density profile model of POPG bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and X-ray scattering experiments. *J. Phys. Chem. B* **116**, 232–239.
- KUKLIN, A.I., ISLAMOV, A.K., GORDELIY, V.I., 2005: Two-detector system for small-angle neutron scattering instrument. *Neutron News* **16**, 16–18.
- KUKLIN, A.I., ISLAMOV, A.K., KOVALEV, Y.S., UTROBIN, P.K., GORDELIY, V.I., 2006: Optimization two-detector system small-angle neutron spectrometer YuMO for nanoobject investigation. *J. Surf. Invest.: X-Ray, Synchrotron Neutron Tech.* **6**, 74–83.
- KUKLIN, A.I., KOVALEV, Y.C., IVANKOV, A.I., SOLOVIEV, D.V., ROGACHEV, A.V., SOLOVIEV, A.G., UTROBIN, P.K., GORDELIY, V.I., 2013: Some specific features of experiment realization at SANS spectrometer at IBR-2. *JINR Report P14-46*.
- LIDE, D.R., 2009: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90. vyd., CRC Press, Boca Raton.
- LORENZ, C.D., HSIEH, C.-M., DREISS, C.A., LAWRENCE, M.J., 2011: Molecular dynamics simulations of the interfacial and structural properties of dimethyldodecylamine *N*-oxide micelles. *Langmuir* **27**, 546–553.
- MACDONALD, R.C., MACDONALD, R.I., MENCO, B.P.M., TAKESHITA, K., SUBBARAO, N.K., HU, L., 1991: Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297–303.
- MAEDA, H., TANAKA, S., ONO, Y., MIYAHARA, M., KAWASAKI, H., NEMOTO, N., ALMGREN, M., 2006: Reversible micelle–vesicle conversion of oleyldimethylamine oxide by pH changes. *J. Phys. Chem. B* **110**, 12451–12458.
- MARSH, D., 2013: Handbook of Lipid Bilayers, 2. vyd., CRC Press, Boca Raton.
- MASON, P.C., GAULIN, B.D., EPAND, R.M., WIGNALL, G.D., LIN, J.S., 1999: Small angle neutron scattering and calorimetric studies of large unilamellar vesicles of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine. *Phys. Rev. E* **59**, 3361–3367.
- MOURITSEN, O.G., 2005: Life - As a Matter of Fat, Springer, Berlin.

NAGLE, J.F., TRISTRAM-NAGLE, S., 2000: Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159–195.

NAWROTH, T., CONRAD, H., DOSE, K., 1989: Neutron small angle scattering of liposomes in the presence of detergents. *Physica B* **156–157**, 477–480.

OSTANEVICH, Y.M., 1988: Time-of-flight small-angle scattering spectrometers on pulsed neutron sources. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **15**, 91–103.

PABST, G., RAPPOLT, M., AMENITSCH, H., LAGGNER, P., 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.

PAN, J., TRISTRAM-NAGLE, S., KUČERKA, N., NAGLE, J.F., 2008: Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **94**, 117–124.

PAN, J., CHENG, X., MONTICELLI, L., HEBERLE, F.A., KUČERKA, N., TIELEMAN, D.P., KATSARAS, J., 2014: The molecular structure of a phosphatidylserine bilayer determined by scattering and molecular dynamics simulations. *Soft Matter* **10**, 3716–3725.

PARRATT, L.G., 1954: Surface studies of solids by total reflection of X-rays. *Physical Review* **95**, 359–369.

RAPPOLT, M., HODZIC, A., SARTORI, B., OLLIVON, M., LAGGNER, P., 2008: Conformational and hydrational properties during the-to-and-to H_{II}-phase transition in phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* **154**, 46–55.

RICHARD, D., FERRAND, M., KEARLEY, G.J., 1996: Analysis and visualisation of neutron-scattering data. *J. Neutron Res.* **4**, 33–39.

RONDELLI, V., FRAGNETO, G., MOTTA, S., DEL FAVERO, E., CANTÙ, L., 2012: Reflectivity from floating bilayers: can we keep the structural asymmetry? *J. Phys. Conf. Ser.* **340**, 012083.

STIDDER, B., FRAGNETO, G., ROSER, S.J., 2005: Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. *Langmuir* **21**, 9187–9193.

STIDDER, B., FRAGNETO, G., ROSER, S.J., 2007: Structure and stability of DPPE planar bilayers. *Soft Matter* **3**, 214–222.

TALBOT, J.P., BARLOW, D.J., LAWRENCE, M.J., TIMMINS, P.A., FRAGNETO, G., 2009: Interaction of cationic lipoplexes with floating bilayers at the solid–liquid interface. *Langmuir* **25**, 4168–4180.

TRISTRAM-NAGLE, S., PETRACHE, H.I., NAGLE, J.F., 1998: Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **75**, 917–925.

TRISTRAM-NAGLE, S., KIM, D.J., AKHUNZADA, N., KUČERKA, N., MATHAI, J.C., KATSARAS, J., ZEIDEL, M., NAGLE, J.F., 2010: Structure and water permeability of fully hydrated diphytanoylPC. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 630–637.

TUCKER, I.M., PETKOV, J.T., JONES, C., PENFOLD, J., THOMAS, R.K., ROGERS, S.E., TERRY, A.E., HEENAN, R.K., GRILLO, I., 2012: Adsorption of polymer–surfactant mixtures at the oil–water interface. *Langmuir* **28**, 14974–14982.

UHRÍKOVÁ, D., KUČERKA, N., ISLAMOV, A., GORDELIY, V., BALGAVÝ, P., 2001: Small-angle neutron scattering study of *N*-dodecyl-*N,N*-dimethylamine *N*-oxide induced solubilization of dioleoylphosphatidylcholine bilayers in liposomes. *Gen. Physiol. Biophys.* **20**, 183–189.

UHRÍKOVÁ, D., RYBÁR, P., HIANIK, T., BALGAVÝ, P., 2007: Component volumes of unsaturated phosphatidylcholines in fluid bilayers: a densitometric study. *Chem. Phys. Lipids* **145**, 97–105.

VACKLIN, H.P., TIBERG, F., FRAGNETO, G., THOMAS, R.K., 2005: Composition of supported model membranes determined by neutron reflection. *Langmuir* **21**, 2827–2837.

WACKLIN, H.P., 2010: Neutron reflection from supported lipid membranes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 445–454.

WACKLIN, H.P., TIBERG, F., FRAGNETO, G., THOMAS, R.K., 2007: Distribution of reaction products in phospholipase A₂ hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1036–1049.

WIENER, M.C., WHITE, S.H., 1992a: Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of X-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups. *Biophys. J.* **61**, 428–433.

WIENER, M.C., WHITE, S.H., 1992b: Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys. J.* **61**, 434–447.

ZACCAI, G., BÜLDT, G., SEELIG, A., SEELIG, J., 1979: Neutron diffraction studies on phosphatidylcholine model membranes: II. Chain conformation and segmental disorder. *J. Mol. Biol.* **134**, 693–706.

ZHANG, X.L., PENFOLD, J., THOMAS, R.K., TUCKER, I.M., PETKOV, J.T., BENT, J., COX, A., CAMPBELL, R.A., 2011: Adsorption behavior of hydrophobin and hydrophobin/surfactant mixtures at the air–water interface. *Langmuir* **27**, 11316–11323.

7 Zoznam publikačnej činnosti

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

ADC01 Belička, Michal 24% - Dubnička, Stanislav 23% - Dubničková, Anna Z. 30% - Liptaj, A. 23%: Rigorous pion electromagnetic form factor behavior in the spacelike region

Lit. 13 záz. n.

In: Physical Review C - Nuclear Physics. - Vol. 83, No. 2 (2011), Art. No. 028201, s. 1-4

ADC02 Belička, Michal 17% - Klacsová, Mária 17% - Karlovská, Janka 17% - Westh, Peter 15% - Devínsky, Ferdinand 17% - Balgavý, Pavol 17%: Molecular and component volumes of N,N-dimethyl-N-alkylamine N-oxides in DOPC bilayers

Lit. 36 záz. n., 4 obr., 3 tab.

In: Chemistry and Physics of Lipids. - Vol. 180 (2014), s. 1-6

ADC03 Belička, Michal 16% - Kučerka, Norbert 14% - Uhríková, Daniela 14% - Islamov, Akhmed K. 14% - Kuklin, Alexander I. 14% - Devínsky, Ferdinand 14% - Balgavý, Pavol 14%: Effects of N,N-dimethyl-N-alkylamine-N-oxides on DOPC bilayers in unilamellar vesicles: small-angle neutron scattering study

Lit. 60 záz. n., 6 obr., 2 tab.

In: European Biophysics Journal with Biophysics Letters. - Vol. 43, No. 4-5 (2014), s. 179-189

AFC Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách

AFC01 Belička, Michal 25% - Dubničková, Anna Z. 25% - Dubnička, Stanislav 25% - Liptaj, A. 25% : Compatibility check of new space-like region pion form factor data with sigma tot(e+e- --> pí+pí-) obtained by radiation return

Lit. 5 záz. n.

In: International Workshop Hardron Structure and QCD (HSQCD 2008) from Low to High Energies. - St. Petersburg : Petersburg Nuclear Physics Institute, 2008. - S. 294-301. - ISBN 978-5-86763255-7

[HSQCD 2008 : Hardron Structure and QCD from Low to High Energies : International Workshop. St. Petersburg, 30.6.-4.7.2008]

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

AFD01 Belička, Michal 25% - Dubnička, Stanislav 25% - Dubničková, Anna Z. 25% - Liptaj, A. 25% : Model independent pion electromagnetic form factor behavior in the space-like region

Lit. 18 záz. n.

In: Nuclear Physics B-Proceedings Supplements. - Vol. 198, No. 1 (2010), s. 143-148

[Hadron Structure 2009 : Joint International Conference. 3rd, Tatranská Štrba, 30.8.-3.9.2009]

AFD02 Belička, Michal 25% - Uhríková, Daniela 25% - Teixeira, José 25% - Balgavý, Pavol

25%: The investigation of the influence of alcohols on POPC/POPE liposomes by the neutron small-angle scattering

Recenzované

Lit. 16 záz.

In: 17th Conference of Czech and Slovak Physicists: Proceedings. - Košice : Slovak Physical Society, 2012. - S. 79-80. - ISBN 978-80-970625-4-5

[Conference of Czech and Slovak Physicists 2011. 17th, Žilina, 5.-8.9.2011]

AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných vedeckých konferencií

AFG01 Belička, Michal 20% - Uhríková, Daniela 16% - Gallová, Jana 16% - Islamov, Akhmed 16% - Kuklin, Alexander 16% - Balgavý, Pavol 16%: Effects of N,N-dimethyl-N-alkylamine-oxides on the basic structural parameters of DOPC bilayers in unilamellar vesicles

Lit. 5 záz.

In: SANS-YuMO User Meeting at the Start-up of Scientific Experiments on IBR-2M Devoted to the 75th Anniversary of Yu. M Ostanevich's Birth. - Dubna : Joint Institute for Nuclear Research, 2011. - S. 48. - ISBN 978-5-9530-0285-1

[SANS-YuMO User Meeting at the Start-up of Scientific Experiments on IBR-2M Devoted to the 75th Anniversary of Yu. M Ostanevich's Birth. Dubna, 27.-30.5.2011]

Štatistika kategórií (Záznamov spolu: 7):

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch (3)

AFC Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách (1)

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách (2)

AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných vedeckých konferencií (1)

8 Summary

The present work is focused on the investigation of the phospholipid bilayer structure changes caused by the intercalation of amphiphilic molecules. Simple amphiphiles were chosen – primary aliphatic alcohols (C_nOH , $n = 10, 16$) and a homologous series of N,N -dimethyl- N -alkylamine N -oxides (C_nNO , $n = 12, 14, 16, 18$); n is the number of carbons in the alkyl chain.

The small-angle neutron scattering (SANS) on unilamellar vesicles was used as the main experimental technique and the main bilayer structure parameters – *interface area per lipid molecule* A and *hydrocarbon region thickness* $2D_C$ – were obtained as functions of the amphiphile molar ratios in bilayers. It was found that in the case of C_nNO in dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) bilayers partial molecular areas of C_nNO \hat{A}_{C_nNO} for $n = 12, 14$ and 16 are the same within their experiment uncertainties in the interval $0,364 - 0,369 \text{ nm}^2$, whereas the value of $\hat{A}_{C_{18NO}} = 0,394 \pm 0,004 \text{ nm}^2$ is significantly higher. Similar change in tendency was found in the slopes of dependencies $2D_C(r_{C_nNO})$. Therefore the observed effect is most probably caused by the different position of C_{18NO} in the DOPC bilayer in comparison to the rest of the series. The SANS measurements on mixed bilayers consisting of palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC), palmitoyloleoylphosphatidylethanolamine (POPE) and palmitoyloleoylphosphatidylserine (POPS) with intercalated C_{10OH} and C_{16OH} , respectively, showed that even without intercalated alcohols the bilayer structure depends on the structure of its hydrophilic regions. The intercalation of alcohol with a shorter alkyl chain than the lipid chains is influenced only slightly by the bilayer composition, but with increasing amount of POPE in the bilayer a lateral phase separation was observed. The intercalation of alcohol with an alkyl chain length comparable to the lipid chains is much stronger influenced by presence of POPE in the bilayer and the lateral separation is observed at lower molar fractions of POPE in the bilayer.

The specular neutron reflectivity was used to investigate its possibilities to detect the internal structure of floating bilayers. A system of a floating deuterated d_{62} -dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer over a supported dibehenoylphosphatidylcholine bilayer was used for measurements. Using the contrast variation technique it was found that it is possible to describe the internal structure a floating bilayer on the level of functional groups only in its liquid-crystalline phase, but not in the gel phase.