



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

Mgr. Mária Klacsová, rod. Kotalová

Autoreferát dizertačnej práce

**ŠTÚDIUM AGREGÁTOV FOSFOLIPIDOV S PRIMÁRNymi
ALIFATICKÝMI N-ALKOHOLMI FYZIKÁLNymi
METÓDAMI**

na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor

v študijnom programe 4.1.12 Biofyzika

Bratislava, 2010

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

Predkladateľ: Mgr. Mária Klacsová, rod. Kotalová
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK
Mlynská dolina F2, 842 48 Bratislava

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

Oponenti: Prof. RNDr. Pavol Miškovský, DrSc.
Katedra biofyziky, Ústav fyzikálnych vied, PriF UPJŠ
Jesenná 5, 041 54 Košice

Prof. Ing. Július Cirák, PhD.
Katedra fyziky, FEI STU
Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava

RNDr. Ľubica Lacinová, DrSc.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
Vlárska 5, 833 34 Bratislava

**Obhajoba dizertačnej práce sa konáoh pred komisiou pre
obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou
predsedom odborovej komisie dňa 4.1.12 Biofyzika
na.....**

Prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.
predseda spoločnej odborovej komisie
v študijnom programe 4.1.12 Biofyzika

1. Súčasný stav riešenej problematiky

1.1. *Mechanizmus účinku celkových anestetík*

Biologická membrána sa zúčastňuje mnohých biologických procesov, ako sú napr. transport, rast, neurálne funkcie, imunologické odpovede, signalizácia a enzýmová aktivita. Väčšina liečiv sú hydrofóbne alebo amfifilné zlúčeniny, ktorých cieľom v ľudskom organizme sú hydrofóbne oblasti proteínov a membrán, resp. ich hydrofóbno-hydrofilné rozhrania. V mojej dizertačnej práci som sa venovala štúdiu vplyvu primárnych alifatických *n*-alkoholov na štruktúrne parametre a fyzikálno-chemické vlastnosti modelových membrán tvorených syntetickými fosfolipidmi. Primárne alkoholy (skratka C_nOH, *n* je počet atómov uhlíka v alifatickom reťazci) sú všeobecné anestetiká, u ktorých sa pozorovali odchýlky od Meyerovho-Overtonovho pravidla (Meyer, 1899; Overton, 1901). Celkový anestetický účinok v homologickom rade rastie až po C₁₁OH, C₁₂OH vykazuje už o niečo slabšiu účinnosť a C₁₄OH je úplne neúčinný (Meyer a Hemmi, 1935; Pringle a kol., 1981). Jav, keď účinnosť s rastúcou dĺžkou reťazca vzrastá, dosahuje maximum a potom klesá sa nazýva „cut-off“ efekt.

Na vysvetlenie „cut-off“ efektu boli navrhnuté rôzne modely, ktoré z hľadiska predpokladaného miesta účinku spadajú pod tzv. proteínovú resp. tzv. lipidovú hypotézu. Na základe proteínovej hypotézy anestetiká interagujú priamo s nepolárnymi časťami excitabilného proteínu, čím dochádza ku konformačným zmenám a následnej inhibícii jeho funkcie. Proteínová hypotéza však dostatočne nezohľadňuje nízku afinitu a širokú diverzitu rôznych štrukturálnych skupín anestetík, pre ktoré by vychádzajúc z uvedenej teórie mali existovať zvláštne väzbové miesta na proteínoch. Keďže všetky iónové kanály sú transmembránové proteíny, lipidová hypotéza predpokladá, že môže dochádzať k ovplyvneniu ich vlastností nepriamo, účinkom anestetík na lipidovú dvojvrstvu. Lee (1976a) navrhol model účinku lokálnych anestetík, ktorého základom je predstava, že fyziologickú funkciu proteínového kanála v dvojvrstve ovplyvňujú lipidy, ktoré ho priamo obkolesujú, tzv. anulárne lipidy. Za normálnych podmienok, keď je kanál otvorený pre ióny, sú anulárne lipidy v tuhom (gélom) stave. Pridaním anestetika dochádza k fázovému prechodu anulárnych lipidov z gélového do tekutokryštalického

stavu, čím sa iniciuje uzatvorenie kanála a dochádza k anestézii. Podľa Haydona a kol. (1977) je zmena vlastností kanála za prítomnosti anestetík podmienená zmenou hrúbky fosfolipidovej dvojvrstvy, ktorá nastáva, keď sa do nej anestetiká inkorporujú. Tento model teoreticky aj experimentálne rozšírili Balgavý a Devínsky (1996), Uhríková a kol. (1993) a Cibula a kol. (1994) v modeli voľného objemu. Ak je dĺžka uhl'ovodíkového reťazca alkoholu kratšia ako dĺžka uhl'ovodíkových reťazcov fosfolipidov, pod terminálnou metylovou skupinou každej molekuly alkoholu vzniká vo fosfolipidovej dvojvrstve defekt – tzv. voľný objem. Čím je tento rozdiel dĺžok väčší, tým väčší je voľný objem. Keďže pri konštantnej koncentrácii alkoholu jeho koncentrácia v dvojvrstve rastie exponenciálne s dĺžkou reťazca, je veľkosť voľného objemu funkciou nielen rozdielu dĺžok uhl'ovodíkového reťazca alkoholu a lipidu, ale aj koncentrácie alkoholu. Voľná energia tvorby voľného objemu je veľmi vysoká, preto súbežne s interkaláciou liečiva dochádza k eliminácii voľného objemu, a to buď *trans-gauche* izomerizáciou alebo interdigitáciou reťazcov z protiľahlých monovrstiev. Pri oboch mechanizmoch dochádza k zmene hrúbky hydrofóbnej oblasti fosfolipidovej dvojvrstvy, ktorej priebeh v závislosti na dĺžke alkylového reťazca alkoholu je kváziparabolický podobne ako biologické účinky. Cantor (1998) vypracoval mechanickú a termodynamickú interpretáciu sprostredkovaného účinku anestetík založenú na redistribúcii laterálneho tlaku v dvojvrstve, ktorá nastáva pri oveľa nižších koncentráciách alkoholu ako zmena hrúbky dvojvrstvy. Pri interkalácii anestetika laterálny tlak vzrastá selektívne v oblasti rozhrania s vodou a kompenzačne klesá smerom ku stredu dvojvrstvy. Pri takomto profile laterálneho tlaku integrované proteíny musia vynaložiť veľkú prácu na prekonanie zvýšeného tlaku, a preto je uprednostnený uzavretý stav. Hu a Wu (2001) vypracovali novú hypotézu, na základe ktorej anestetiká narúšajú kyslíkové dráhy vo fosfolipidovej dvojvrstve ako aj v proteínoch využívajúcich kyslík. Pri interakciách anestetík s proteínmi teda nie sú uvažované špecifické väzby, ale iba perturbácia ligandových miest. V dôsledku týchto zmien sa znižuje dostupnosť kyslíka na miestach spotreby, čím sa spúšťa kaskáda bunkových odpovedí vedúca k celkovej anestézii. Podľa solitónového modelu (Heimburg a Jackson, 2007) dochádza pri prechode akčného potenciálu k lokálnej kompresii lipidových molekúl v dvojvrstve. Dostatočná laterálna resp. objemová kompresia môže vyvolať fázový prechod do gélového stavu.

Predpokladá sa teda, že vytvorenie lokálnych gélových domén v rámci fluidnej membrány indukuje vznik akčného potenciálu. Účinky anestetík na termodynamické vlastnosti, o.i. na teplotu hlavného fázového prechodu, lipidových dvojvrstiev môžu preto inhibovať vznik akčného potenciálu a šírenie nervového vzruchu.

1.2. Vplyv primárnych alkoholov na štruktúru a vlastnosti modelových fosfolipidových dvojvrstiev

Hnacou silou interkalácie malých organických molekúl, teda aj CnOH, do fosfolipidovej dvojvrstvy je hydrofóbny efekt. Pri interkalácii CnOH do dvojvrstvy dochádza k dehydratácii ich hydrofóbných reťazcov. Zároveň dochádza k zmenám v interakciách lipid-voda v oblasti rozhrania a k zmenám vnútromolekulových interakcií lipidov (Rowe a kol., 1998). Tieto efekty sú úmerné dĺžke reťazca CnOH, pričom v prípade krátkych CnOH majú za následok narušenie interakcií v dvojvrstve, kým dlhšie CnOH tieto interakcie posilňujú (Westh a kol., 2001). Pri zabudovaní krátkych CnOH do dvojvrstvy vzniká totiž v centrálnej oblasti vakancia, ktorá sa zaplní susednými reťazcami lipidu pri súčasnom poklese ich usporiadanosti. V prípade stredne dlhých CnOH je počet metylénových skupín dostatočne veľký na vznik silných van der Waalsových interakcií s uhlíkovými reťazcami lipidu, ktorých snahou je eliminovať veľkosť vakancie v centre dvojvrstvy. Dlhé CnOH majú na usporiadanie lipidových reťazcov iba malý vplyv. Príčinou je analogická interakcia reťazcov CnOH s reťazcami lipidu ako medzi lipidovými reťazcami navzájom (Westerman a kol., 1988; Zavoico a kol., 1985). Skupina Westha (Westh a Trandum, 2000; Aagaard a kol., 2006) pozorovala výrazné objemové zmeny vyvolané zabudovaním CnOH do fosfatidylcholinových dvojvrstiev. Tieto zmeny sú pri zabudovaní krátkych CnOH ($n \leq 6$) do dvojvrstvy kladné, zatiaľ čo pri zabudovaní dlhších CnOH sú záporné. Pozitívna objemová zmena vyplýva z perturbácie tesného usporiadania v oblasti rozhrania, t.j. v okolí esterových väzieb a prvých metylénových skupín fosfolipidov. Dôsledkom voľnejšieho packingu v oblasti hydrofóbných reťazcov je častejší výskyt *trans-gauche* izomerizácie, čo vedie k zníženiu hrúbky dvojvrstvy. Dlhšie CnOH sú viac hydrofóbne, preto penetrujú hlbšie do dvojvrstvy. Interkalácia reťazcov CnOH do tejto oblasti vedie k tesnejšiemu packingu – reťazce vypĺňajú voľný objem – čo sa prejaví negatívnou zmenou objemu CnOH a

zvážšením hrúbky dvojvrstvy. Tieto závery boli potvrdené simuláciami molekulovej dynamiky (Griepernau a kol., 2007; Patra a kol., 2006). Nárast objemu v systéme CnOH-lipid sa prejavuje predovšetkým v laterálnej expanzii dvojvrstvy. Pri zabudovaní krátkych CnOH ($n < 8$) plocha pripadajúca na jednu molekulu lipidu narastá, súčasne rastie aj fluidita reťazcov a klesá hrúbka dvojvrstvy (Griepernau a kol., 2007). V prítomnosti dlhých CnOH naopak klesá plocha pripadajúcej na jednu molekulu lipidu, zvyšuje sa usporiadanosť lipidov v dvojvrstve a zvyšuje sa jej hrúbka. Metódou mikropipetovej aspirácie sa zistilo, že s rastúcou koncentráciou CnOH klesá modulu ohybu dvojvrstvy (Ly a Longo, 2004). Závislosť plošnej stlačiteľnosti od dĺžky alifatického reťazca CnOH je v súlade s Traubeho pravidlom (Traube, 1891), tzn. že pri pridaní jednej CH_2 skupiny je potrebná približne trojnásobne nižšia koncentrácia CnOH na dosiahnutie rovnakého modulu stlačiteľnosti. Z uvedeného vyplýva, že na vyhladenie teplotných fluktuácií a/alebo zväčšenie plochy pripadajúcej na jednu molekulu fosfolipidu je v prítomnosti CnOH potrebná menšia práca ako v čistej zmesi lipid-voda.

Už v prvých experimentoch uskutočnených metódami rozptylu svetla (Hill, 1974), fluorescencie (Lee, 1976b), kalorimetrie (Hui a Barton, 1973; Elias a kol., 1976) a dilatometrie (MacDonald, 1978) sa zistilo, že krátke CnOH znižujú, zatiaľ čo dlhé CnOH zvyšujú teplotu hlavného fázového prechodu fosfolipidových dvojvrstiev do ktorých boli interkalované. Navyiac, s rastúcou koncentráciou dlhých CnOH sa pozorovalo vymiznutie predprechodu (Elias a kol., 1976) a rozširovanie hlavného fázového prechodu (Mountcastle a kol., 1978; Pringle a Miller, 1979). Účinok CnOH na teplotu fázového prechodu však nie je monotónny. Krátke (Rowe a kol., 1983) ako aj dlhé CnOH (Kamaya a kol., 1984) znižujú teplotu hlavného fázového prechodu fosfolipidov pri nízkych koncentráciách a zvyšujú ju pri vyšších koncentráciách. Možným vysvetlením tohto bifázického efektu je vznik novej gélovej fázy pri vyšších koncentráciách CnOH, ktorá je charakterizovaná úplnou interdigitáciou lipidových reťazcov medzi protiahle monovrstvy (Simon a McIntosh, 1984). Keďže v interdigitovanej fáze pripadá na jeden polárny fragment dvakrát viac uhlíkovodíkových reťazcov než v tradičnej gélovej fáze, rozdeľovací koeficient CnOH bude vyšší než v tekuto-kryštalickej fáze. Teplota fázového prechodu následne narastá, až kým sa nedosiahne úplná saturácia dvojvrstvy CnOH. Löbbecke a Cevc (1995) usudzujú, že jedinou príčinou interdigitácie lipidových reťazcov

v prítomnosti CnOH je narušenie tesného usporiadania v polárnej oblasti dvojvrstvy. Iné vysvetlenie (Suezaki a kol., 1991) sa zakladá na zmene voľnej energie CnOH v lipidoch v gélovej a tekuto-kryštalickej fáze Δg a zmene voľnej energie interakcie CnOH-lipid medzi týmito dvoma fázami Δu . Ak $\Delta g < \Delta u < 0$, t_m s rastúcou koncentráciou CnOH monotónne klesá; ak $\Delta g > \Delta u > 0$, teplota fázového prechodu monotónne rastie. Bifázický efekt s minimom t_m sa objaví, keď $\Delta u > \Delta g > 0$; bifázický efekt s maximom t_m sa objaví, keď $\Delta u < \Delta g < 0$. Ak je dĺžka reťazca CnOH blízka dĺžke uhl'ovodíkového reťazca fosfolipidu, vytvorí sa rovnováha medzi Δu a Δg a minimum t_m sa posúva k extrémne nízkym koncentráciám CnOH.

U niektorých fosfolipidov pozorujeme so zvyšovaním teploty aj fázové prechody spojené so zmenami symetrie a/alebo topológie. Najčastejšie ide o prechod medzi lamelárnou L_α a invertovanou hexagonálnou fázou H_{II} . Hornby a Cullis (1981) metódou ^{31}P NMR spektroskopie zistili, že krátke CnOH zvyšujú teplotu fázového prechodu vaječného fosfatidylcholínu z L_α do H_{II} fázy, dlhšie CnOH ju naopak znižujú. To znamená, že krátke CnOH stabilizujú lamelárnu fázu, kým dlhšie CnOH ju destabilizujú a vyvolávajú prechod z lamelárnej do hexagonálnej fázy. Možným vysvetlením rôznych vplyvov študovaných CnOH na prechod z lamelárnej do hexagonálnej fázy je rozdielny tvar týchto molekúl, ktorý určuje makromolekulovú štruktúru vznikajúcich agregátov. Kubická fáza sa prvýkrát pozorovala pri nadbytku CnOH v plne hydratovaných diacylfosfatidylcholínových agregátoch pomocou rtg difrakcie (Huang a kol., 1996). Mriežkové parametre kubickej fázy výrazne narastajú s dĺžkou uhl'ovodíkového reťazca, čo naznačuje rast hydratácie kubickej fázy v agregátoch s väčšou dĺžkou reťazca. Rovnako rastie aj teplota fázového prechodu z gélovej do kubickej fázy. Vznik kubickej fázy v systéme fosfolipid-CnOH môže byť teda podmienený schopnosťou molekúl CnOH interagovať vodíkovými väzbami s polárnymi fragmentmi fosfolipidov. V dôsledku týchto interakcií vzrastá negatívne zakrivenie lipidovej monovrstvy a klesá hydratácia polárnej oblasti, čím sa fázová rovnováha presúva smerom k invertovaným štruktúram.

2. Ciele práce

Ako vyplýva z uvedeného prehľadu literatúry, štúdium vplyvu dlhých CnOH na fyzikálne a fyzikálno-chemické vlastnosti lipidových dvojvrstiev je neúplné, no zároveň sa zdá byť potrebné z hľadiska popisu mechanizmu cut-off pozorovaného v biologických účinkoch rôznych amfifilných prímiesí. V projekte dizertačnej práce sme si preto stanovili nasledovné ciele:

1. Študovať zabudovávanie dlhých CnOH do fluidných fosfolipidových dvojvrstiev a stanoviť parciálne a zdanlivé molekulové objemy jednotlivých zložiek v študovanom systéme metódou denzitometrie.
2. Údaje z denzitometrie využiť na analýzu zmien štruktúrnych parametrov fosfolipidovej dvojvrstvy (hrúbky dvojvrstvy, plochy pripadajúcej na jednu molekulu fosfolipidu, laterálnej a transverzálnej teplotnej rozťažnosti) v prítomnosti dlhých CnOH zaznamenaných metódou malouhlového rozptylu neutrónov.
3. Študovať fázové prechody (predprechod a hlavný fázový prechod) v agregátoch fosfolipid-CnOH metódou diferenčnej skenovacej kalorimetrie a charakterizovať tieto fázové prechody z termodynamického hľadiska.
4. Študovať štruktúrny polymorfizmus fosfolipidov v prítomnosti dlhých CnOH metódou rtg difrakcie, stanoviť teplotu fázového prechodu lamelárna-nelamelárna fáza a určiť mriežkové parametre jednotlivých fáz, a to v závislosti od koncentrácie CnOH a teploty.

3. Metodika práce

3.1. *Denzitometria*

Metódou denzitometrie sme študovali zabudovanie dlhých CnOH ($n = 10-18$) do dvojvrstiev v lipozómoch zložených z 96 hm% DOPC + 4 hm% DOPS pri rôznych mólových pomeroch CnOH/lipid ($r = 0-1$) a teplotách ($t = 20, 34, 43$ a 51 °C). Tieto experimenty boli motivované teóriou Seemana (1972), podľa ktorej anestetický účinok CnOH je sprevádzaný anizotropnou expanziou lipidovej dvojvrstvy, tzn. zmenšením hrúbky dvojvrstvy pri súčasnom zväčšení jej objemu. Syntetické lipidy (dioleoylfosfatidylcholín DOPC a dioleoylfosfatidylserín DOPS) boli zakúpené od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA), CnOH s čistotou 99% od firmy Sigma (St. Luis, USA) a organické rozpúšťadlá spektrálnej čistoty od firmy Slavus (Bratislava, Slovensko). Zásobné roztoky DOPC, DOPS a CnOH ($n = 8-18$) boli pripravené jednotlivo v zmesi chloroformu a metanolu. Potrebné množstvá DOPC a DOPS (96 hm% DOPC + 4 hm% DOPS) boli odpipetované do sklenených skúmaviek, zmes rozpúšťadiel bola odparená pod prúdom dusíka a následne boli vzorky vákuované pri tlaku ~ 2 Pa po dobu 8 hod. Potom boli k jednotlivým vzorkám pridané príslušné množstvá CnOH a rozpúšťadlá boli odstránené rovnakým spôsobom ako je popísané vyššie. Aby sa zabránilo odpareniu kratších CnOH počas vákuovania, vzorky boli schladené na -15 °C. Presné množstvá lipidu a CnOH boli stanovené vážením po jednotlivých vákuovaniach. Vzorky boli hydratované MilliQ vodou (18,2 M Ω , Millipore, Molsheim, Francúzsko) na hmotnostný pomer $H_2O:(DOPC+DOPS) = 60$. Vzorky sme homogenizovali vortexovaním a ultrasonikáciou a uskladnili ich na 24 hod v chladničke. Krátko pred meraním boli vzorky temperované pri laboratórnej teplote a odplynené premiešavaním pod vákuom.

Denzitometrické merania boli uskutočnené na vibračnom trubicovom denzitometri DMA 602 (Anton Paar, Graz, Rakúsko). Frekvencia oscilácií bola odčítavaná v 30 s intervaloch po dobu ~ 5 min, t.j. pokým nedošlo k ustáleniu jej hodnoty. Medzi dvomi meraniami bola trubica preplachovaná metanolom a sušená prúdom vzduchu, až do úplného odparenia metanolu. Teplota vzorky bola regulovaná termostatom RC 20 (Lauda, Lauda-Königshofen, Germany) s presnosťou ± 0.01 °C. Teplotné zmeny boli

zaznamenávané NRT termistorom umiestneným vedľa trubice denzitometra. Prístrojové konštanty boli stanovené z oscilačných frekvencií zaznamenaných pre vodu a vzduch. Zo špecifických objemov vzoriek boli vypočítané zdanlivé a parciálne molekulové objemy jednotlivých zložiek v binárnej zmesi lipid-voda resp. terciárnej zmesi lipid-CnOH-voda podľa práce Greenwooda a kol. (2006).

3.2. Rozptyl neutrónov

Jednou z experimentálnych techník vhodných na štúdium fyzikálnych parametrov lipidových dvojvrstiev je rozptyl neutrónov pod malými uhlami (SANS). Z hľadiska štruktúrnej analýzy týchto objektov je najpoužívanejší rozptyl na vodíku (^1H), resp. deutériu (^2H). Metóda SANS bola použitá na štúdium dvojvrstiev vo fluidných unilamelárnych lipozómoch z 96 hm% DOPC + 4 hm% DOPS v prítomnosti CnOH ($n=8-8$) pri rôznych kontrastoch (tzn. množstve $^2\text{H}_2\text{O}$ vo vzorke zodpovedajúcom 50-100 %) a pri rôznych mólových pomeroch CnOH/lipid ($r = 0-1$) a teplotách ($t = 20, 34, 43$ a 51 °C). Unilamelárne lipozómy sa často používajú ako štruktúrne modely biologických membrán. Malé množstvo DOPS prítomné v dvojvrstvách nabíja povrch DOPC dvojvrstvy negatívne a tým bráni vzniku oligolamelárnych lipozómov počas prípravy unilamelárnych lipozómov resp. ich agregácii po príprave (Kučerka a kol., 2007).

Deuterovaná voda $^2\text{H}_2\text{O}$ bola zakúpená od firmy Merck (Darmstadt, Germany), ostatné chemikálie sú uvedené v kapitole 3.1. Pripravené boli dve série vzoriek – vzorky s variáciou kontrastu a vzorky v 100 % $^2\text{H}_2\text{O}$ (viď postup v kapitole 3.1; variácia kontrastu bola dosiahnutá riedením koncentrovanej disperzie lipidu pripravenej v 100 % $^2\text{H}_2\text{O}$ príslušným množstvom H_2O). Konečná koncentrácia lipidu v jednotlivých vzorkách bola 10 mg/ml. Unilamelárne lipozómy boli pripravené krátko pred meraním 51-násobným pretláčaním disperzie lipidov cez polykarbonátový filter s veľkosťou pórov 50 nm (Nuclepore, USA) v extrúderi LiposoFast Basic extruder (Avestin, Canada). Merania boli uskutočnené na difraktometri PAXE v laboratóriu L. Brillouina v Saclay, Francúzsko. Rozptylové dáta boli zaznamenané pri dvoch pozíciách detektora zodpovedajúcich vzdialenostiam vzorka-detektor 1,3 a 5,05 m. Vlnová dĺžka neutrónov bola 0,6 nm. Teplota vzoriek bola regulovaná elektronicky s presnosťou ± 1 °C. Doba

merania vzoriek pripravených v 100 % $^2\text{H}_2\text{O}$ bola 30 min, pri vzorkách s množstvom $^2\text{H}_2\text{O}$ 90, 80, 70, 60 a 50 % bola doba merania 45, 60, 90, 105 resp. 120 min. Normalizovaná intenzita žiarenia ako funkcia rozptylového vektora bola získaná podľa postupu opísaného v práci Kučerku a kol. (2003). Normalizované dáta boli vyhodnotené dvoma spôsobmi. Najprv bola použitá Guinierova aproximácia rozptylovej krivky, čím sa získal parameter hrúbky dvojvrstvy d_g (Kotalová a kol., 2008). Tento postup sa však viaže na použitie jednoduchého modelu dvojvrstvy, ktorý zanedbáva informáciu o jej vnútornej štruktúre. Druhý postup sa zakladá na použití exaktného vzťahu pre funkciu intenzity rozptylu, ktorou sa fituje rozptylová krivka na celom intervale hodnôt rozptylového vektora (postup je podrobne popísaný v prácach Gallovej a kol. (2008) a Uhríkovej a kol. (2008)). Pri dátach s variáciou kontrastu boli všetky experimentálne krivky fitované simultánne. Použitý model vychádza z aproximácie lipozómov polydisperznou dutou guľou, ktorej stenu tvorí lipidová dvojvrstva oddeľujúca vnútorný a vonkajší vodný kompartment, pričom samotná dvojvrstva je rozdelená na tri vrstvy zodpovedajúce dvom polárnym oblastiam na okrajoch a hydrofóbnej oblasti v strede dvojvrstvy, pričom z hľadiska polomeru sú lipozómy polydisperzné. Pri vyhodnotení boli použité molekulové objemy DOPC+DOPS a CnOH stanovené denzitometricky. Najprv boli popísaným postupom vyhodnotené krivky s variáciou kontrastu, s cieľom stanoviť hrúbku polárnej oblasti fosfolipidovej dvojvrstvy. Táto hodnota bola potom pri fitovaní rozptylových kriviek zaznamenaných v 100 % $^2\text{H}_2\text{O}$ fixovaná, a stanovovala sa hrúbka lipidovej dvojvrstvy (hrúbka hydrofóbnej oblasti bola dopočítaná zo známej hrúbky polárnej oblasti), laterálna plocha jednotkovej bunky tvorenej jednou molekulou fosfolipidu a príslušnou frakciou CnOH na rozhraní lipid/voda a počet molekúl vody pripadajúcich na jednu molekulu fosfolipidu v rámci polárnej oblasti.

3.3. Diferenčná skenovacia kalorimetria

Diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC) je široko využívaná na analýzu termodynamických parametrov v makromolekulových systémoch. V membranológii sa DSC používa predovšetkým na kontinuálnu analýzu fázových prechodov. Celkový kvantitatívny popis makromolekúl v roztoku sa získava meraním ich špecifickej tepelnej kapacity pri konštantnom tlaku v závislosti od teploty. Metódu DSC sme využili na

štúdium fázových prechodov (predprechodu a hlavného fázového prechodu) DMPC v prítomnosti CnOH (n = 8-18) pri mólových pomeroch CnOH/DMPC = 0-1 v rozsahu teplôt 5-50 °C. Disperzia lipidov o koncentrácii 0,5 hm% bola pripravená analogicky ako je popísané v kapitole 3.1. Merania boli uskutočnené na diferenčnom skenovacom kalorimetri nano-DSC III CSC 6300 (TA Instruments, New Castle, USA). Rýchlosť ohrevu/chladienia bola 1 °C/min, vzorky boli temperované 1000 s. Meracie cely naplnené vzorkou resp. redestilovanou vodou (referencia) boli počas merania udržiavané pri tlaku 3 atm, s cieľom predísť tvorbe bublín vo vzorke počas zahrievania. Získané termogramy boli po odčítaní sigmoidálneho prístrojového pozadia (t.j. referenčného termogramu) v programe NanoAnalyze (TA Instruments, New Castle, USA) fitované Pearsonovou funkciou v programe Peakfit. Pozadie vzorky bolo eliminované extrapoláciou lineárneho pozadia pred a za endo/exotermickým píkcom. Teplota fázového prechodu bola stanovená ako poloha maxima, entalpia fázového prechodu ako celková plocha pod endo/exotermickým píkcom. Z týchto údajov bola vypočítaná entropia fázového prechodu, popisujúca usporiadanie molekúl v študovanom systéme. Pre symetrické píky bola stanovená hodnota van't Hoffovej entalpie a popísaná kooperativita fázového prechodu podľa práce Gallovej a kol. (1995).

3.4. Rtg difrakcia

Rozptyl röntgenového žiarenia je jednou z najspoľahlivejších metód na identifikáciu fáz lipidových štruktúr. Na tento účel sa využívajú dve oblasti difrakčnej snímky – malouhlová oblasť (SAXD) poskytuje informáciu o usporiadaní na dlhú vzdialenosť, ktoré charakterizuje lamelárne a nelamelárne fázy z hľadiska typu kryštalickej mriežky a symetrie, kým z veľkouglovej oblasti (WAXD) môžeme určiť usporiadanie na krátku vzdialenosť popisujúce usporiadanie uhl'ovodíkových reťazcov v jednotlivých agregátoch. Vznik translačne usporiadanej mezofázy sa prejaví prítomnosťou jedného alebo viacerých difrakčných píkov v malouhlovej oblasti. Intenzita jednotlivých píkov je daná distribúciou elektrónovej hustoty v elementárnej bunke. Na základe charakteristických pomerov reciprokových vzdialeností reflexií môžeme identifikovať fázu lamelárnu (pomery 1, 2, 3,...), hexagonálnu (1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, ...), resp. kubickú (1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2,...). Difrakcia synchrotrónového žiarenia bola použitá na štúdium štruktúrneho

polymorfizmu v agregátoch $C_nOH:(DOPE:DOPC) = r:(3:1)$, pre $r = 0-1$ a $n = 10-18$. Mólový pomer $DOPE:DOPC = 3:1$ bol vybraný na základe výsledkov predbežných experimentov (Klacsová a kol., 2009), podľa ktorých je uvedený mólový pomer z technických dôvodov vhodný na štúdium fázového prechodu z lamelárnej do hexagonálnej fázy v teplotnom rozsahu $5-95\text{ }^\circ\text{C}$.

Vzorky boli pripravené pri mólovom pomere $H_2O : (DOPE+DOPC) = 50 : 1$ podľa postupu uvedeného v kapitole 3.1. Homogenizácia spočívala v spätnej centrifugácii a vortexovaní vzoriek v zatavených skúmavkách pri $5\text{ }^\circ\text{C}$. Difrakčné experimenty boli uskutočnené na meracej stanici A2 v laboratóriu HASYLAB strediska DESY v Hamburgu, Nemecko. Synchrotrónové žiarenie s energiou $4,45\text{ GeV}$ sa získava brzdením rýchlo letiacich pozitronov v magnetickom poli elektromagnetov cyklického urýchľovača DORIS III. Vlnová dĺžka emitovaného žiarenia bola $0,154\text{ nm}$. Intenzita žiarenia difrakčného obrazu bola zaznamenávaná dvomi mnohokanálovými lineárnymi detektormi (Rapp a kol., 1995); SAXD detektor bol kalibrovaný na kolagén z potkanieho chvosta (Bigi a Roveri, 1991) a WAXD detektor na tripalmitín (Chapman, 1962). Teplota termostaticky kontrolovaného držiaka vzoriek bola nastavovaná s presnosťou $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ a vzorky sa pri nej temperovali 5 min. Rýchlosť ohrevu v prípade teplotných záznamov bola $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, z čoho sa vzorka 50 s temperovala a 10 s bol snímaný difrakčný obraz. Olovená clona umiestnená pred vzorkou sa otvárala iba v čase merania, a tým chránila vzorku pred dlhodobým ožiarovaním. Nežiaduci rozptyl monochromatického lúča bol redukovaný skupinou wolfrámových štrbín. Experimentálne dáta boli transformované do kódu ASCII a normalizované na intenzitu primárneho lúča. Difraktogramy boli vyhodnocované v programe Peakfit fitovaním Lorentzovou funkciou pri súčasnej korekcii na lineárne preložené pozadie. Metódou najmenších štvorcov bola stanovená poloha a polšírka maxima a intenzity a integrálne intenzity všetkých pozorovaných reflexií. Z reciprokových vzdialeností boli vypočítané mriežkové parametre jednotlivých fáz, z teplotných závislostí intenzít pozorovaných reflexií bola stanovená teplota fázového prechodu z lamelárnej do hexagonálnej fázy.

4. Zhrnutie výsledkov

4.1. Objemové zmeny pri zabudovaní CnOH do DOPC+DOPS dvojvrstiev

Z denzitometrických údajov zaznamenaných pre vzorku DOPC+DOPS pri rôznych teplotách sme vypočítali zdanlivý molekulový objem DOPS. Pri výpočte sme vychádzali zo známych hmotnostných zlomkov jednotlivých lipidov vo vzorke a z predpokladu, že molekulový objem DOPC v tejto zmesi je rovnaký ako v čistých DOPC dvojvrstvách. Takto získaný molekulový objem DOPS sa dobre zhoduje s hodnotami získanými v čistých DOPS dvojvrstvách, čo svedčí o ideálnom zmiešavaní lipidov v DOPC+DOPS dvojvrstvách pri použitých hmotnostných pomeroch (4 hm% DOPS). Zdanlivé molekulové objemy DOPC a DOPS rástli s teplotou, pre DOPS bol rast strmší, čo sa prejavilo aj na vyšších hodnotách koeficientu izobarickej teplotnej rozťažnosti určenej pre DOPS v porovnaní s DOPC. Keďže hydrofóbne reťazce sú u oboch lipidov identické, predpokladáme, že pozorovaný rozdiel môže byť spôsobený elektrostatickou repulziou medzi nabitými polárnymi fragmentmi DOPS. Z molekulových objemov boli ďalej vypočítané objemy fragmentov lipidových molekúl vychádzajúc z objemu polárneho fragmentu DOPC $V_H^{PC}=325 \text{ \AA}^3$, ktorý bol nedávno overený ako najspoľahlivejší v práci Uhríkovej a kol. (2007). Výsledky tejto analýzy potvrdili, že kým objem V_H^{PC} DOPC je nezávislý na teplote, objem polárneho fragmentu DOPS signifikantne rastie v celej oblasti študovaných teplôt. Parciálne molekulové objemy CnOH boli určené fitovaním závislosti objemu „zmesnej molekuly“ DOPC+DOPS+CnOH od hmotnostného zlomku x_{AL} CnOH v lipide. Zdanlivé a parciálne molekulové objemy boli zhodné a konštantné pre C12OH po hodnotu $x_{AL} = 0,5$ (tzn. v celom študovanom koncentračnom rozsahu C12OH), kým pre C16OH iba po $x_{AL} = 0,33$. Pri vyššom množstve C16OH v dvojvrstve bol zaznamenaný výrazný pokles hodnôt V_{C16OH} . Rovnaký zlom bol pozorovaný v závislosti koeficientu objemovej teplotnej rozťažnosti „zmesnej molekuly“ DOPC+DOPS+C16OH od x_{AL} . Na základe predbežných výsledkov z experimentov SAXD a WAXD (nepublikované) usudzujeme, že nad hodnotou $x_{AL} = 0,33$ dochádza v agregáte DOPC+DOPS+C16OH k objemovej kryštalizácii, ktorá sa zrejme prejavuje aj v objemových zmenách jednotlivých zložiek študovaného systému. Ďalej sme zistili, že zdanlivý molekulový objem CnOH v DOPC+DOPS dvojvrstve rastie pri hmotnostnom

zlomku $x_{AL} = 0,29$ s dĺžkou reťazca $n = 10-16$ lineárne. Na výpočet objemov fragmentov molekuly C_nOH v čistom stave, vo vode a v DOPC+DOPS dvojvrstve sme vychádzali z údajov v prácach (Aagaard a kol., 2006; Friedman a Scheraga, 1965; Liew a kol., 1992), resp. z uvedenej lineárnej závislosti. Zistili sme, že v čistom stave objem hydroxylovej OH skupiny s teplotou rastie, vo vodnom prostredí je objem OH skupiny výrazne nižší ako v čistom stave a s teplotou sa výrazne nemení, v DOPC+DOPS dvojvrstve objem OH skupiny klesá, ostáva však v celom študovanom teplotnom rozsahu vyšší ako vo vode resp. čistom stave. Objem metylénovej CH_2 skupiny rastie v čistom stave (menej výrazne ako objem OH skupiny) aj v dvojvrstve, kým vo vode sa výrazne nemení. Zmena molekulového objemu ΔV pri zabudovaní študovaných C_nOH do DOPC+DOPS dvojvrstvy z čistého stavu resp. z vodnej fázy bola vypočítaná pomocou údajov o objeme C_nOH v týchto fázach. Hodnota ΔV prenosu C_nOH z čistého stavu do dvojvrstvy bola záporná pre všetky študované C_nOH , pričom v závislosti $\Delta V = f(n)$ sa pozoroval bifázický efekt s minimom pri $n = 12$. Tieto výsledky sú v súlade s teóriou voľného objemu v strede dvojvrstvy (Marrink a kol., 1996; Balgavý a Devínsky, 1996), ktorý sa s rastúcou dĺžkou reťazca C_nOH postupne vyplňa. Bifázický efekt môže súvisieť s prítomnosťou dvojitej väzby v acylovom reťazci lipidov.

4.2. Vplyv C_nOH na štruktúrne parametre DOPC+DOPS lipozómov

Prvá sada experimentov (s variáciou kontrastu 100, 90, 80, 70, 60 a 50 % 2H_2O) bola zameraná na stanovenie hrúbky polárnej oblasti D_H lipidovej dvojvrstvy DOPC+DOPS bez a v prítomnosti $C_{10}OH$ a $C_{16}OH$ pri mólovom pomere $C_nOH/PCPS = 0,4$. Simultánnym fitovaním rozptylových kriviek zaznamenaných pri jednotlivých kontrastoch sme zistili, že D_H klesá s rastúcou dĺžkou reťazca interkalovaného C_nOH . Na základe týchto výsledkov a predpokladu, že D_H klesá lineárne s rastúcou koncentráciou $C_{10}OH$ a $C_{16}OH$ resp. dĺžkou reťazca n , dopočítali sme hrúbku polárnej oblasti DOPC+DOPS dvojvrstvy v prítomnosti ostatných C_nOH pre rôzne mólové pomery $C_nOH/PCPS$. V ďalšom vyhodnotení sme takto získané hodnoty D_H zadávali ako fixovaný parameter.

Pre referenčnú vzorku DOPC+DOPS bola stanovená hodnota hrúbky dvojvrstvy $D = 50 \pm 0.5 \text{ \AA}$ pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a objeme polárneho fragmentu 321 \AA^3 . Pri porovnaní

s hodnotami hrúbky čistej DOPC dvojvrstvy publikovanými v nedávnych prácach (Gallová a kol., 2008; Kučerka a kol., 2009) sme zistili, že malé množstvo DOPS použité v študovaných dvojvrstvách nemá (v rámci experimentálnej chyby) vplyv na hrúbku dvojvrstvy. S rastúcim mólovým pomerom CnOH/PCPS hrúbka dvojvrstvy rástla v prítomnosti všetkých študovaných CnOH. Pri konštantnom mólovom pomere $r = 0,4$ hrúbka dvojvrstvy rástla s dĺžkou reťazca interkalovaného CnOH. Pri uvedenom mólovom pomere bola v prítomnosti C16OH a C18OH zistená hodnota D zhodná (v rámci experimentálnej chyby) s hrúbkou lipidovej dvojvrstvy čistého DOPC+DOPS. Pozorovaný účinok CnOH na hrúbku dvojvrstvy je možné vysvetliť rozdielom dĺžok medzi reťazcami lipidu a CnOH – pri interkalácii kratších CnOH do dvojvrstvy vzniká pod koncovou metylovou skupinou alkylového reťazca voľný objem, ktorý sa zapĺňa susednými acylovými reťazcami lipidu pri súčasnom poklese hrúbky dvojvrstvy. Alkylové reťazce dlhších CnOH penetrujú hlbšie do hydrofóbnej časti dvojvrstvy, spôsobujú preto menší pokles jej hrúbky. Plocha A_{UC} pripadajúca na jednotkovú bunku v dvojvrstve DOPC+DOPS na rozhraní lipid-voda predstavovala pri 20 °C $A_{PCPS} = 64.6 \pm 0.7 \text{ \AA}^2$. Táto hodnota narastá v prítomnosti všetkých CnOH s mólovým pomerom CnOH/PCPS lineárne. Miera nárastu sa však medzi jednotlivými CnOH líši a rastie v smere C16OH>C12OH>C8OH. Plocha A_{UC} zároveň výrazne rastie pri mólovom pomere $r = 0,4$ s dĺžkou reťazca CnOH. Týmito výsledkami sme potvrdili predpoklady o laterálnej expanzii polárnej oblasti dvojvrstiev (Jørgensen a kol., 1991; Löbbecke a Cevc, 1995) v dôsledku zabudovania OH skupiny na rozhraní lipid/voda a rozšírili ich o kvantitatívne vyjadrenie zmeny parciálnej plochy pripadajúcej na jednu „zmiešanú“ molekulu PCPS resp. molekulu CnOH podľa prístupu Edholma a Naglea (2005). Obdobné závislosti D a A_{UC} od mólového pomeru CnOH/PCPS resp. dĺžky reťazca CnOH boli pozorované aj pri vyšších teplotách (28, 34, 43 a 51 °C). Plocha pripadajúca na jednotkovú bunku a počet molekúl vody v polárnej oblasti s teplotou rastú, kým hrúbka dvojvrstvy klesá. Tieto zmeny pripisujem kontinuálnemu vzniku *trans-gauche* rotamérov acylových reťazcov pri zvyšovaní teploty. Z teplotných závislostí zaznamenaných pre vzorky v 100 % $^2\text{H}_2\text{O}$ boli vypočítané koeficienty laterálnej a transverzálnej teplotnej rozťažnosti. S rastúcou dĺžkou reťazca CnOH laterálna rozťažnosť DOPC+DOPS dvojvrstiev klesá, zatiaľ čo transverzálna rozťažnosť

rastie. Dĺžka reťazca CnOH má teda výrazný vplyv na teplotné správanie lipidových dvojvrstiev do ktorých boli interkalované.

4.3. *Fázové prechody agregátov DMPC+CnOH*

Na termogramoch zaznamenaných pri zahrievaní/chladení agregátov DMPC+CnOH sme v teplotnom rozsahu 5-50 °C zaznamenali dva endo/exotermické píky zodpovedajúce predprechodu a hlavnému fázovému prechodu. U vzoriek obsahujúcich CnOH sa pozorovala asymetria u endotermického píku predprechodu a exotermického píku hlavného fázového prechodu už pri najnižšom študovanom mólovom pomere CnOH/DMPC. Asymetria píkov výrazne rástla s množstvom CnOH vo vzorke pri súčasnom poklese ich amplitúdy. Vymiznutie predprechodu sa pozorovalo v prítomnosti C10OH pri mólovom pomere $r = 0,5$, v prítomnosti C12OH pri $r = 0,2$. Od uvedených mólových pomerov sme zároveň pozorovali rozširovanie a štiepenie píku hlavného fázového prechodu. Predpokladáme preto, že efekty pozorované u predprechodu resp. hlavného fázového prechodu sú vzájomne prepojené a môžu súvisieť so vznikom tuhých roztokov CnOH-lipid v gélovej fáze (Kaminoh a kol., 1988; Jørgensen a kol., 1991). Štiepenie píku hlavného fázového prechodu pri vyšších koncentráciách CnOH následne svedčí o rozdelení (demixing) tohto tuhého roztoku.

U čistého DMPC sa pri oboch fázových prechodoch pozoroval ich hysterézny charakter, hystéza sa stávala výraznejšou s rastúcou koncentráciou CnOH v dvojvrstve. Prítomnosť C10OH mala na teplotu t_m hlavného fázového prechodu DMPC v závislosti od mólového pomeru C10OH/DMPC bifázický efekt. Minimálna hodnota t_m bola zaznamenaná pri $r = 0,15$. V prítomnosti C12OH v DMPC dvojvrstvách sa pozoroval výhradne nárast t_m . Šírka fázového prechodu bola však výrazne vyššia ako v prípade C10OH. Na základe výsledkov SAXD a WAXD (Kotalová a kol., 2007) usudzujeme, že príčinou je laterálna separácia, v dôsledku ktorej vznikajú v DMPC dvojvrstve nestabilné domény s odlišným množstvom C12OH a teda odlišnou teplotou fázového prechodu. Pri anesteticky relevantných koncentráciách C8OH a C10OH bol pozorovaný pokles t_m DMPC, tzn. destabilizácia gélovej fázy v prospech tekuto-kryštalickej fázy, čo je v zhode s výsledkami Kamayu a kol. (1984). Dlhšie, anesteticky neúčinné CnOH gélovú fázu naopak stabilizujú, čím podľa teórie Heimburga a Jacksona (2007) bránia prenosu

akčného potenciálu pozdĺž neurónov. Entalpia ΔH_m a entropia ΔS_m hlavného fázového prechodu vykazujú v prítomnosti C10OH nemonotónny nárast v závislosti od mólového pomeru C10OH/DMPC. Zlom v uvedených závislostiach bol zaznamenaný pri $r = 0,4$. Tieto zmeny svedčia o narúšaní interakcií medzi reťazcami lipidov pri interkalácii C10OH a súčasnom poklese ich usporiadanosti. Pozorovaný zlom môže svedčiť o prítomnosti fázovej separácie alebo vzniku interdigitovanej fázy v študovanom agregáte, charakterizovanej nárastom usporiadania lipidových reťazcov, následkom čoho ΔH_m a ΔS_m mierne klesá. V prítomnosti C12OH entalpia a entropia hlavného fázového prechodu rastie monotónne. Pozorovaný nárast je však menej výrazný ako v prípade C10OH, zrejme v dôsledku pevnejších interakcií alkylových reťazcov C12OH s reťazcami lipidov (Westerman a kol., 1988) a vyššom počte kontaktov medzi nimi (Westh a kol., 2001). S rastúcou dĺžkou reťazca C_nOH pri $r = 0,2$ sa entalpia a entropia menia nelineárne, po $n = 14$ bol pozorovaný nárast, nad touto hodnotou pokles oboch veličín. Pre C18OH bola zmena ΔH_m a ΔS_m dokonca negatívna. Tento efekt môže súvisieť so zmenou medzimolekulových interakcií medzi reťazcami ako aj v polárnej oblasti dvojvrstvy. K tejto zmene zjavne dochádza, keď dĺžka reťazca C_nOH dosiahne polovičnú dĺžku acylového reťazca DMPC.

4.4. Štruktúrny polymorfizmus multilamelárnych DOPE+DOPC lipozómov v prítomnosti C_nOH

Pre všetky študované vzorky DOPE+DOPC+ C_nOH boli v SAXD oblasti zaznamenané pri nízkych teplotách dve reflexie zodpovedajúce lamelárnej L_α fáze, s rastom teploty bola pozorovaná superpozícia lamelárnej a invertovanej hexagonálnej H_{II} fázy, napokon pri ďalšom zahriatí bola pozorovaná čistá H_{II} fáza v celom objeme vzorky. Z recipročných vzdialeností s pozorovaných reflexií boli vypočítané mriežkové parametre príslušnej fázy –periodicita lamelárnej fázy $d = 1/s$ vyjadrujúca súčet hrúbky lipidovej dvojvrstvy a hrúbky vodnej vrstvy oddeľujúcej dvojvrstvy, a vzdialenosť stredov $a = 2d/\sqrt{3}$ lipidových tubúl v hexagonálnom usporiadaní. Teplota t_{LH} fázového prechodu z L_α do H_{II} fázy bola stanovená z teplotných závislostí intenzít SAXD reflexií resp. z teplotných závislostí mriežkových parametrov. Zistili sme, že C10OH má na teplotu fázového prechodu DOPE+DOPC v závislosti od mólového pomeru C10OH/PEPC

bifázický efekt, s maximom zaznamenaným pri $r = 0,2$. Od mólového pomeru $r = 0,4$ bol zaznamenaný pokles t_{LH} v porovnaní s čistým DOPE+DOPC. Tento efekt má teda opačný charakter ako účinok C10OH na teplotu hlavného fázového prechodu DMPC (viď kapitola 4.3). V prítomnosti C16OH bola teplota fázového prechodu nižšia v porovnaní s čistým DOPE+DOPC v celom rozsahu študovaných mólových pomerov. Monotónny pokles t_{LH} v závislosti od mólového pomeru C16OH/PEPC bol však pozorovaný iba po $r = 0,4$, nad touto hodnotou došlo k ustáleniu hodnôt t_{LH} . Predpokladáme, že zlom v popísanej závislosti je spôsobený objemovou kryštalizáciou DOPE+DOPC+C16OH v študovanom agregáte pri vyšších mólových pomeroch. V oblasti WAXD sme totiž nad $r = 0,4$ pozorovali okrem difúzneho píku charakteristického pre neusporiadané reťazce vo fluidnom lipide aj dve ostré reflexie zodpovedajúce vysoko usporiadaným reťazcom kryštalickej fázy. Mriežkový parameter a hexagonálnej fázy nelineárne klesá s koncentráciou C10OH a C16OH vo vzorke. V agregátoch DOPE+DOPC+C16OH bol zaznamenaný pokles omnoho výraznejší, aj napriek zlomu pozorovanému pri $r = 0,4$, prítomnému pravdepodobne v dôsledku vyššie popísanej kryštalizácie.

V homologickom rade CnOH bol pri $r = 0,4$ pozorovaný nárast teploty fázového prechodu DOPE+DOPC v prítomnosti C10OH a pokles t_{LH} v prítomnosti dlhších CnOH. Destabilizácia dvojvrstvy v prospech H_{II} fázy je teda úmerná dĺžke reťazca CnOH. Mriežkový parameter a systematicky klesal s dĺžkou reťazca CnOH. Rozdiel v účinku študovaných CnOH môže byť vysvetlený zmenou plochy A_L pripadajúcej na jednu molekulu fosfolipidu na rozhraní lipid/voda (viď Griepernau a kol., 2007) resp. kapitolu 4.2). Pokles A_L pri zabudovaní CnOH je sprevádzaný nárastom zakrivenia monovrstvy a následným poklesom polomeru vodného cylindra resp. parametra a , a naopak.

5. Závery

Najdôležitejšie výsledky predkladanej dizertačnej práce je možné zhrnúť nasledovne:

1. C_nOH a lipidy sú v dvojvrstve objemovo ideálne miešateľné po mólový pomer C_nOH/lipid $r = 0,5-0,6$, pri vyšších mólových pomeroch dochádza k separácii fáz. Molekulový objem C_nOH v lipidovej dvojvrstve rastie (pri ideálnom zmiešavaní) lineárne s dĺžkou alkylového reťazca. Zmena molekulového objemu C_nOH pri jeho zabudovaní z čistého stavu, resp. z vodnej fázy vykazuje v závislosti od dĺžky alkylového reťazca bifázický efekt s minimom pri $n = 12$.
2. C_nOH znižujú hrúbku fluidnej lipidovej dvojvrstvy D a zvyšujú plochu pripadajúcu na lipid A na rozhraní lipid/voda ako aj hydratáciu N polárnej oblasti dvojvrstvy v porovnaní s referenčnými vzorkami bez prítomnosti C_nOH. D, A aj N s dĺžkou alkylového reťazca C_nOH rastú. Parciálna plocha C_nOH na rozhraní lipid/voda vo fosfolipidových dvojvrstvách je pre $n < 12$ podstatne menšia ako plocha kolmého prierezu uhl'ovodíkového reťazca v tuhých C_nOH a alkánoch.
3. Pri anesteticky relevantných koncentráciách homológy C_nOH s $n = 8-12$ znižujú teplotu hlavného fázového prechodu gél – tekutý kryštál, kým homológy s dlhšími reťazcami ju zvyšujú. Účinok kratších C_nOH na teplotu hlavného fázového prechodu v závislosti od mólového pomeru C_nOH/lipid vykazuje bifázický efekt. Entalpia a entropia hlavného fázového prechodu v prítomnosti C₁₀OH rastie po $r = 0,4$, pri vyšších sa pozoruje efekt separácie fáz. V prítomnosti C₁₂OH entalpia a entropia hlavného fázového prechodu rastie monotónne až po $r = 1$.
4. Teplota fázového prechodu lamelárna – hexagonálna fáza v prítomnosti C_nOH $n \leq 10$ rastie a pre dlhšie C_nOH ($n > 10$) klesá. Účinok kratších C_nOH na túto teplotu fázového prechodu v závislosti od mólového pomeru C_nOH/lipid vykazuje bifázický efekt. U dlhších C_nOH teplota fázového prechodu klesá s rastúcim mólovým pomerom. Mriežkový parameter hexagonálnej fázy klesá s dĺžkou alkylového reťazca ako aj s koncentráciou C_nOH.

5. Z hľadiska lipidovej teórie všeobecne anestetického účinku študovaných alkoholov možno konštatovať, že moje výsledky jednoznačne potvrdzujú, že medzimolekulové interakcie fosfolipidov a alkoholov v dvojvrstvách sú odlišné pre krátke a dlhé alkoholy, pričom dĺžka acylových reťazcov lipidov hrá tiež dôležitú úlohu. Pre hlbšie pochopenie týchto interakcií by v budúcnosti bolo treba nami študované sústavy preskúmať aj metódami molekulovej dynamiky. V experimentoch by bolo užitočné výskum rozšíriť na štúdium vplyvu polárneho fragmentu lipidov, vplyvu prítomnosti cholesterolu a transmembránových polypeptidov v dvojvrstvách. Výskum by mal smerovať k lipidovým sústavám čo najbližšie imitujúcim chemické zloženie membrán nervových buniek.

6. Zoznam literatúry použitej v autoreferáte

- Aagaard, T.H., M.N. Kristensen, P. Westh. 2006. *Biophys. Chem.* 119:61-68.
- Balgavý, P., F. Devínsky. 1996. *Adv. Coll. Int. Sci.* 66:23-63.
- Bigi, A., N. Roveri. 1991. *In Handbook on Synchrotron Radiation.* S. Ebashi, M. Koch, E. Rubenstein, editors. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 199-239.
- Cantor, R.S. 1998. *Toxicol. Lett.* 100:451-458.
- Chapman, D. 1962. *Chem. Rev.* 62:433-453.
- Cibula, J., J. Gallová, D. Uhríková, P. Balgavý. 1994. *Čes. Slov. Farm.* 43:87-91.
- Edholm, O., J.F. Nagle. 2005. *Biophys. J.* 89:1827-1832.
- Eliasz, A.W., D. Chapman, D.F. Ewing. 1976. *Biochim. Biophys. Acta* 448:220-230.
- Friedman, M.E., H.A. Scheraga. 1965. *J. Phys. Chem.* 69:3795-3800.
- Gallová, J., J. Bágeľová, J. Čižmárik, P. Balgavý. 1995. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60:763-780.
- Gallová, J., D. Uhríková, N. Kučerka, J. Teixeira, P. Balgavý. 2008. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:2627-2632.
- Greenwood, A.I., S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle. 2006. *Chem. Phys. Lipids* 143:1-10.
- Griepernau, B., S. Leis, M.F. Schneider, M. Sikor, D. Steppich, R.A. Böckmann. 2007. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:2899-2913.
- Haydon, D.A., B.M. Hendry, S.R. Levinson, J. Requena. 1977. *Nature* 268:356-358.
- Heimburg, T., A.D. Jackson. 2007. *Biophys. J.* 92:3159-3165.
- Hill, M.W. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 356:117-124.
- Hornby, A.P., P.R. Cullis. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 647:285-292.
- Hu, H.P., M.X. Wu. 2001. *Med. Hypotheses* 57:619-627.
- Huang, Z., J.M. Seddon, R.H. Templer. 1996. *Chem. Phys. Lipids* 82:53-61.
- Hui, F.K., P.G. Barton. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* 296:510-517.
- Jørgensen, K., J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, D. Bennett, M.J. Zuckermann. 1991. *Biochim. Biophys. Acta* 1067:241-253.
- Kamaya, H., N. Matubayasi, I. Ueda. 1984. *J. Phys. Chem.* 88:797-800.
- Kaminoh, Y., T. Chikara, H. Kamaya, I. Ueda. 1988. *Biochim. Biophys. Acta* 946:215-220.

- Klacsová, M., J. Karlovská, S.S. Funari, P. Balgavý. 2009. *AIP Conf. Proc.* 1204:231-233.
- Kotalová, M., J. Karlovská, S.S. Funari, P. Balgavý. 2007. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 54:95-103.
- Kotalová, M., D. Uhríková, J. Teixeira, P. Balgavý. 2008. *Proc. III. Slovak Biophys. Symposium* 47-48.
- Kučerka, N., J. Gallová, D. Uhríková, P. Balgavý, M. Bulacu, S.J. Marrink, J. Katsaras. 2009. *Biophys. J.* 97:1926-1932.
- Kučerka, N., J. Pencer, J.N. Sachs, J.F. Nagle, J. Katsaras. 2007. *Langmuir* 23:1292-1299.
- Kučerka, N., D. Uhríková, J. Teixeira, P. Balgavý. 2003. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 50:78-89.
- Lee, A.G. 1976a. *Nature* 262:545-548.
- Lee, A.G. 1976b. *Biochemistry* 15:2448-2454.
- Liew, K.Y., C.E. Seng, B.H. Ng. 1992. *J. Sol. Chem.* 21:1177-1183.
- Löbbecke, L. G. Cevc. 1995. *Biochim. Biophys. Acta* 1237:59-69.
- Ly, H.V., M.L. Longo. 2004. *Biophys. J.* 87:1013-1033.
- MacDonald, A.G. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* 507:26-37.
- Marrink, S.J., R.M. Sok, H.J.C. Berendsen. 1996. *J. Chem. Phys.* 104:9090-9099.
- Meyer, H.H. 1899. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 42:109-118.
- Meyer, K.H., H. Hemmi. 1935. *Biochem. Z.* 277:39-72.
- Mountcastle, D.B., R.L. Biltonen, M.J. Halsey. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:4900-4906.
- Overton, E. 1901. *Studien über Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie.* Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Patra, M., E. Salonen, E. Terama, I. Vattulainen, R. Faller, B.W. Lee, J. Holopainen, M. Karttunen. 2006. *Biophys. J.* 90:1121-1135.
- Pringle, M.J., K.B. Brown, K.W. Miller. 1981. *Mol. Pharmacol.* 19:49-55.
- Pringle, M.J. K.W. Miller. 1979. *Biochemistry* 18:3314-3320.
- Rapp, G., A. Gabriel, M. Dosiere, M.H.J. Koch. 1995. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* 357:178-182.

- Rowe, E.S. 1983. *Biochemistry* 22:3299-3305.
- Rowe, E.S., F.L. Zhang, T.W. Leung, J.S. Parr, P.T. Guy. 1998. *Biochemistry* 37:2430-2440.
- Seeman, P. 1972. *Pharmacol. Rev.* 24:583-655.
- Simon, S.A., T.J. McIntosh. 1984. *Biochim. Biophys. Acta* 773:169-172.
- Suezaki, Y., K. Tamura, M. Takasaki, H. Kamaya, I. Ueda. 1991. *Biochim. Biophys. Acta* 1066:225-228
- Traube, I. 1891. *Ann. Chem. Liebigs.* 265:27-55.
- Uhríková, D., N. Kučerka, J. Teixeira, V. Gordeliy, P. Balgavý. 2008. *Chem. Phys. Lipids* 155:80-89.
- Uhríková, D., P. Rybár, T. Hianik, P. Balgavý. 2007. *Chem. Phys. Lipids* 145:97-105.
- Westerman, P.W., J.M. Pope, N. Phonphok, J.W. Doane, D.W. Dubro. 1988. *Biochim. Biophys. Acta* 939:64-78.
- Westh, P., C. Trandum. 2000. *J. Phys. Chem. B* 104:11334-11341.
- Westh, P., C. Trandum, Y. Koga. 2001. *Biophys. Chem.* 89:53-63.
- Zavoico, G.B., L. Chandler, H. Kutchai. 1985. *Biochim. Biophys. Acta* 812:299-312.

7. Zoznam publikácií autora dizertácie súvisiacich s problematikou

- ABC 1 Balgavý P., Gallová J., Karlovská J., Kotalová M., Kučerka N., Murugova T., Teixeira J., Uhríková D.: Why and how to measure lipid bilayer thickness? *In: Advances in Medicine and Biology*. Vol. 4, Ed. L. V. Berhardt, Nova Science Publishers Inc., New York, v tlači.
- ADC 1 Klacsová M., Westh P., Balgavý P.: Molecular and component volumes of saturated n-alkanols in DOPC+DOPS bilayers, prijaté do *Chem. Phys. Lipids* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.04.004>).
- ADC 2 Klacsová M., Bulacu M., Kučerka N., Uhríková D., Teixeira J., Marrink S.-J., Balgavý P.: Effects of aliphatic alcohols on the fluid bilayer in unilamellar DOPC+DOPS vesicles: SANS and MD study, *Biochimica Biophysica Acta*, rukopis.
- ADC 3 Klacsová M., Westh P., Balgavý P.: Thermal behavior of the DMPC + n-alkanol systems studied by DSC, *Colloids Surf B*, rukopis.
- ADC4 Klacsová M., Karlovská J., Funari S.S., Balgavý P.: Lamellar to hexagonal phase transition in DOPE + DOPC + n-alkanol system: X-ray diffraction study, *Eur. Biophys. J.*, rukopis.
- ADD 1 Petrenko V.I., Klacsová M., Beskrovnyy A.I., Uhríková D., Balgavý P.: Interaction of long-chain n-alcohols with fluid DOPC bilayers: a neutron diffraction study, zaslané do *Gen. Physiol. Biophys.* (8.3.2010).
- ADF 1 Lukešová M., Uhríková D., Kotalová M., Balgavý P.: Vplyv primárnych alifatických alkoholov na štruktúru lipidových dvojvrstiev v hydratovanej gélovej lamelárnej fáze dipalmitoylfosfatidylcholínu, *Farm. Obzor* 76 (2007), 236-245.
- AEC 1 Kotalová M., Uhríková D., Funari S.S., Balgavý P.: Influence of long-chain alcohols on structural parameters of DOPC bilayers, In: *HASYLAB Annual Report 2007, Part I*, eds. W. Caliebe, W. Drube, J.R. Schneider, DESY, Hamburg, 2008, pp. 1485-1486.
- AED1 Kotalová M., Karlovská J., Funari S.S., Balgavý P.: SAX and WAX diffraction study of gel - fluid phase transition in hydrated lamellar

- dodekanol + DMPC system, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 54 (2007), 95-103.
- AED2 Kotalová M., Žiaková A., Balgavý P.: Phase transitions in unilamellar DPPC liposomes containing primary aliphatic alcohols, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 55 (2008), 129-134.
- AED3 Klacsová M., Surovcová E., Ondrušová E., Karlovská J., Balgavý P.: Lamellar to hexagonal phase transition in EYPE + alkan-1-ol vesicles studied by turbidimetry and ^{31}P -NMR, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 56 (2009), 85-92.
- AFB 1 Balgavý P., Gallová J., Karlovská J., Kotalová M., Kučerka N., Murugova T., Teixeira J., Uhríková D.: Why and how to measure lipid bilayer thickness?, *Proceedings of 16th Conference of Slovak Physicists*, Ed. Reiffers M., Slovenská fyzikálna spoločnosť, Košice, ISBN 978-80-969124-5-2, 2008, str. 25-30, prednáška.
- AFC2 Kotalová M., Funari S.S., Balgavý P.: X-ray diffraction study of polymorphic phase transition in multilamellar DOPC+DOPE liposomes in presence of aliphatic n-alcohols, *Proceedings of 16th Conference of Czech and Slovak Physicists*, MAFY, ISBN 80-86148-93-9, Hradec Králové, 2009, pp. 286-293.
- AFC3 Klacsová M., Karlovská J., Funari S.S., Balgavý P.: SAXD study on DOPC+DOPE liposomes containing long 1-alkanols, *Proc. 5th International Summer School „Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine“*, Eds. A.Z. Dubničková, S. Dubnička, American Institute of Physics, ISBN 978-0-7354-0741-1, New York, 2009, pp. 231-233, prednáška.
- AFG 1 Klacsová M., Uhríková D., Teixeira J., Balgavý P.: Effect of aliphatic 1-alcohols on thickness parameter of unilamellar DOPC+DOPS liposomes studied by SANS, *Hercules Specialised Courses on Scattering and Imaging Studies of Soft Matter Systems using Synchrotron Radiation and Neutrons (HSC9)*, Grenoble, 2008, cena za nejlepší poster.

- AFG 2 Klacsová M., Surovcová E., Ondrušová E., Balgavý P.: Influence of alkane-1-ols on lamellar-hexagonal phase transition of EYPE studied by turbidimetry and NMR, 38. *Syntéza a analýza liečiv*, ISBN 978-80-7305-078-8, Hradec Králové, 2009, str. 125, poster.
- AFG 3 Klacsová M., Uhríková D., Kučerka N., Teixeira J., Zajac P., Balgavý P.: Effects of long aliphatic alcohols on the fluid bilayer in unilamellar DOPC/DOPS vesicles as determined by small-angle neutron scattering, *Book of abstracts VII Simposio Internacional: "Investigación química en la frontera"*, Centro de Graduados e Investigación en Química, Tijuana, Mexico, 2009, pp. 99-100, poster.
- AFH 1 Kotalová M., Uhríková D., Funari S.S., Balgavý P.: SAX and WAX diffraction study of gel-fluid phase transition of dodecanol-DMPC system, 33. Technologické dni, Bratislava, *Farm. obzor* 76 (2007), 200, poster.
- AFH 2 Kotalová M., Uhríková D., Teixeira J., Balgavý P.: SANS study on extruded unilamellar DOPC+DOPS liposomes containing long-chain aliphatic 1-alcohols, *Proc III. Slovak Biophysical Symposium*, Library and Publishing Centre, FMFI UK, Bratislava, 2008, pp. 47-48, poster.
- AFH 3 Klacsová M., Westh P., Balgavý P.: General anesthesia and solitons?, *Zborník abstraktov 32. Dni Lekárskej biofyziky*, LF UPJŠ, ISBN 978-80-7097-750-7, Košice, 2009, str. 38, prednáška.
- AFH 4 Balgavý P., Klacsová M., Kučerka N., Uhríková D.: Nové pohľady na Meyerovo-Overtonovo pravidlo. *Zborník abstraktov 8. Zjazd Slovenskej farmaceutickej spoločnosti*, *Farm. obzor* 78, 174 (2009), prednáška.
- GAI 1 Kotalová M., Bóta A., Balgavý P.: Temperature study of DOPC – n-alcohol aggregates using SAX diffraction, *II. Zborník príspevkov štipendistov centra projektovej podpory FMFI UK*, Bratislava, 2007, str. 35-38.
- GHG 1 Klacsová M.: SANS study of unilamellar DOPC+DOPS liposomes containing aliphatic 1-alcohols, *Seminár „ILL-Slovensko – nové možnosti využitia rozptylu neutrónov“*, Košice, 2009, http://www.saske.sk/ill-sk/Program_pdf/PresentationKlacsova.pdf, prednáška.

8. Summary

Densitometry, small-angle neutron scattering, microcalorimetry and small- and wide-angle X-ray diffraction were used to study the properties of binary and ternary phospholipid-alcohol-water systems as a function of alcohol chain length (abbreviation CnOH, n = 8-18 is even number of carbons in the aliphatic chain), alcohol/lipid molar ratio and temperature. Bilayers were prepared from synthetic diacylphosphatidylcholines, diacylphosphatidylserines and diacylphosphatidylethanolamines, with saturated or monounsaturated acyl chains. It has been found, that volume mixing of CnOHs and lipids is ideal in the bilayer up to CnOH/lipid = 0,5-0,6 mol/mol, at higher mole ratios a phase separation is present. CnOHs decrease the thickness D of fluid lipid bilayers and increase the area per lipid molecule A at the lipid/water interface as well as the hydration N of the bilayer polar region in comparison with reference samples without CnOH; D, A and N increase with CnOH alkyl chain length. At anesthetically relevant concentrations CnOH homologs with n = 8-12 decrease the temperature of main transition between gel and liquid-crystalline phase, whereas longer chain homologs increase it. The effect of CnOHs on phase transition temperature between lamellar and hexagonal phase is opposite.