

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY

Lipozomy modifikované kalixarénmi
ako receptory pre cytochróm C

2012

Michaela Chovancová

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Fakulta Matematiky, Fyziky a Informatiky

**Lipozómy modifikované kalixarénmi
ako receptory pre cytochróm C**

Diplomová práca

Študijný program : Biomedicínska fyzika

Študijný odbor: 1160 a 5141 fyzika a všeobecné lekárstvo

Školiace pracovisko: Katedra jadrovej fyziky a biofyziky

Školiteľ: RNDr. Peter Rybár, PhD.

Bratislava 2012

Michaela Chovancová

Univerzita Komenského v Bratislave
Fakulta Matematiky, Fyziky a Informatiky

ZADANIE

Meno a priezvisko študenta: Michaela Chovancová

Študijný program: Biomedicínska fyzika (Medziodborové štúdium, II. st., denná forma)

Študijný odbor: 1160 a 5141 fyzika a všeobecné lekárstvo

Typ záverečnej práce: Diplomová práca

Jazyk záverečnej práce: slovenčina

Názov: Lipozómy modifikované kalixarénmi ako receptory pre cytochróm C

Cieľ práce:

Spracovanie rešerše o štruktúre a funkciách cytochrómu C, jeho interakcii s lipidovou dvojvrstvou a o úlohe cytochrómu C v apoptóze. Štúdium mechanizmov interakcie cytochrómu C s lipozómami modifikovanými kalixarénmi. Vytvorenie lipozómov obsahujúcich rôzne molárne pomery kalixarénov, štúdium vplyvu obsahu kalixarénov na špecifický objem lipozómov a ich objemovú stlačiteľnosť. Zistenie vplyvu cytochrómu C na fyzikálne vlastnosti lipozómov. Štúdium bude vykonané najmä pomocou ultrazvukovej velocimetrie a denzitometrie.

Školiteľ: RNDr. Peter Rybár, PhD.

Katedra: FMFI.KJFB - Katedra jadrovej fyziky a biofyziky

Garant: prof. RNDr. Libuša Šikurová, CSc.

Dátum schválenia: 4.10.2010

.....
podpis školiteľa

.....
podpis študenta

Prehlásenie

Čestne prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne a výhradne s použitím citovaných prameňov, literatúry a ďalších odborných zdrojov. Experimentálne výsledky som získala v laboratóriách KJFB FMFI Univerzity Komenského.

V Bratislave, 4.5.2012

.....

Michaela Chovancová

Pod'akovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi RNDr. Petrovi Rybárovi, PhD. z katedry jadrovej fyziky a biofyziky FMFI UK za pomoc, cenné rady a postrehy, ktoré mi po celý čas práce v laboratóriu poskytoval. Ďakujem prof. RNDr. Tiborovi Hianikovi, DrSc. za jeho odborné vedenie a ochotu. Ďakujem Mgr. Zuzane Garaiovej za predanie svojich skúseností a poskytnutie odbornej literatúry. Ďakujem všetkým študentom z laboratórií Katedry jadrovej fyziky a biofyziky FMFI UK za vytvorenie príjemnej pracovnej atmosféry. Na záver by som sa chcela poďakovať svojim blízkym, ktorí mi boli veľkou oporou pri písaní tejto práce. Zvlášť ďakujem svojmu bratovi Róbertovi.

ABSTRAKT

Michaela Chovancová:

Lipozómy modifikované kalixarénmi ako receptory pre cytochróm C

Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta Matematiky, Fyziky a Informatiky, Katedra jadrovej fyziky a biofyziky

Diplomová práca, 64 strán, 2012

Vplyv rastúcej koncentrácie molekúl kalix[6]arénov (CX) zabudovaných do unilamelárnych lipozómov (ULL) tvorenými molekulami dimyristoylfosfatidylcholínu (DMPC) sme študovali v teplotnom rozmedzí 18 - 30 °C. So zvyšujúcou sa koncentráciou CX dochádzalo k postupnému zániku kooperativity fázového prechodu. Pre ULL s obsahom CX 10 mol % fázový prechod nebol pozorovateľný. Súčasne sa zmenšovala adiabatická stlačiteľnosť a špecifický objem ULL, čo možno vysvetliť zabudovaním kalixarénu nepolárnou kavitou do hydrofóbnej časti lipozómu. Cytochróm C spôsobil výrazný nárast adiabetickej stlačiteľnosti a špecifického objemu ULL z DMPC modifikovaných 10 mol % CX už pri koncentrácii 10 nmol/l, pričom tieto zmeny boli výraznejšie pre lamelárnu fázu gélu (18 °C). Pre nemodifikované ULL neboli pozorované výrazné zmeny termodynamických veličín. Táto práca potvrdzuje použiteľnosť CX ako umelého receptora pre cytochróm C a poukazuje na zmeny v ich interakcii pri rozdielnej teplote a usporiadaní ULL z DMPC resp. ULL z DMPC modifikované 10 mol % CX.

Kľúčové slová: cytochróm C, kalix[6]arén, umelý receptor, adiabatická stlačiteľnosť

ABSTRACT

Michaela Chovancová:

Liposomes modified by calixarenes as receptors for cytochrome C

Comenius University in Bratislava, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics,
Department of Nuclear Physics and Biophysics.

Diploma thesis, 64 pages, 2012

The effects of the increasing concentration of calix[6]arene (CX) embedded in large unilamellar vesicles (LUVs) composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) have been studied in the temperature range 18-30 °C. With the increasing concentration of CX the cooperativity of phase transition decreased. The phase transition has not been observed for DMPC LUVs contained 10 mol % of CX. Concomitantly, adiabatic compressibility and partial volume of LUVs have decreased. Therefore we can consider the extended interaction of CX with LUVs via hydrophobic cavity which implies deeper penetration of CX into LUVs. Cytochrome C has induced sharp increase of adiabatic compressibility and specific volume of LUVs modified by CX of 10 mol % whereby the changes have been more significant for lamellar gel phase (18 °C). For unmodified LUVs we did not observe the significant changes in thermodynamic characteristics. This work has proved the possible application of CX as an artificial receptor for cytochrome C and distinguishes the effect of different temperature for the DMPC LUVs both unmodified and modified by 10 mol % CX.

Key words: cytochrome C, calix[6]arene, artificial receptor, adiabatic compressibility

Predhovor

Diplomová práca sa v teoretickej časti zaoberá štruktúrou a funkciou biomembrán a lipozómov, z termodynamického hľadiska vysvetľuje ich charakteristické fázové zmeny. Obsahuje tiež spracovanú rešerš o štruktúre a funkciách cytochrómu C a jeho roli v apoptóze. Kapitola 2.6 je venovaná makrocyclickej zlúčenine kalix[6]arénu. Teoretická časť bola spracovaná s ohľadom na študovanú problematiku - interakciu cytochrómu C s kalix[6]arénmi zabudovanými v lipozómoch.

Ukázalo sa, že zabudovanie kalix[6]arénu do lipozómov zložených z dimyristoylfosfatidylcholínu (DMPC) rozširuje ich fázový prechod, zväčšuje inkrement rýchlosti ultrazvuku, znižuje špecifický zdanlivý molárny objem a špecifickú zdanlivú molárnu adiabatickú stlačiteľnosť DMPC v lipozómoch. Počas titrácie lipozómov s obsahom desať molárnych percent kalix[6]arénu cytochrómom C sa tieto charakteristiky menia, hodnoty špecifickej zdanlivej adiabetickej stlačiteľnosti a zdanlivého špecifického objemu DMPC sa zvýšia. Môžeme preto zhrnúť, že namerané makroskopické termodynamické charakteristiky odrážajú interakciu cytochrómu C s kalix[6]arénom. Metódy ultrazvukovej velocimetrie a denzitometrie sú vhodné na detekciu už nanomolárnych koncentrácií roztoku cytochrómu C nami navrhovaným receptorom.

Experimentálne výsledky boli namerané na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky Fakulty Matematiky, Fyziky a Informatiky v Bratislave.

OBSAH

1 Úvod	10
Zoznam skratiek a symbolov	11
2 Teoretická časť	13
2. 1 Biologická membrána	13
2. 1. 1 Štruktúra biologických membrán	13
2. 1. 2 Štruktúrne podjednotky biomembrán	14
2. 3 Lipidová dvojvrstva	15
2. 3. 1 Lipozómy	19
2. 3. 2 Hlavný fázový prechod lipidov. Kooperativita.	22
2. 4 Membránové proteíny	25
2. 4. 1 Cytochróm C	25
2. 5 Kalixarény	28
2. 6 Metódy molekulárnej akustiky	30
2. 6. 1 Ultrazvuk. Princíp ultrazvukovej velocimetrie	30
2.6.3 Princíp denzitometrie	35
3 Experimentálna časť	37
3. 1 Materiály	37
3.1.1 Tlmivý roztok	37
3.1.2 DMPC	37
3.1.3 Kalix[6]arén	38
3.1.4 Cytochróm C	39
3. 2 Metódy	39
3. 2. 1 LUVET	39
3. 2. 2 Metódy molekulárnej akustiky	40
4 Výsledky a diskusia	44
4.1 Vplyv kalix[6]arénu na fázový prechod ULL z DMPC	44
4.2 Vplyv cytochrómu C na termodynamické parametre ULL z DMPC so zabudovaným kalix[6]arénom	48
6 Záver práce	57
7 Zoznam použitej literatúry	58

1 Úvod

Lipozómy sú častými modelmi biomembrán pre *in vitro* experimenty simulujúce biologické procesy v bunke. Tvoria poddajný a citlivý materiál na vonkajšie podnety. V tejto práci sú použité modifikované lipozómy na skúmanie interakcie receptora - v našom prípade karboxylový derivát kalix[6]arénu (CX), s hosťujúcou molekulou - v našom prípade cytochróm C (cyt C).

Citlivosť samorganizujúcich sa amfifilných nadmolekulárnych štruktúr meniť svoju fázu a subfázu v závislosti na subtilných zmenách termodynamických veličín ich robí vhodným materiálom na vytvorenie vysokocitlivého biosenzora pre okolité prostredie.

Funkčnosť umelého receptora molekuly kalix[6]arénu pre cyt C bola uvedená v nedávnej minulosti v mnohých prácach skúmajúcich ich vzájomnú interakciu: Selektívna extrakcia cyt C kalix[6]arénom (T. Oshima a kol., 2005) bola zistená pomocou merania zeta potenciálu, priemernej veľkosti častíc metódou rozptylu svetla, zmeny frekvencie piezokryštálu ako aj pomocou zobrazenia povrchu cyt C s CX metódou atómovej silovej mikroskopie (T. Hianik a kol., 2011). Bola taktiež použitá elektrochemická impedančná spektroskopia pomocou ktorej sa ukázala špecifickosť cyt C - CX interakcií (A. M. Moshin a kol., 2011), ako aj metóda Langmuira s využitím monovrstiev lipidov na rozhraní voda-vzduch. Prítomnosť cyt C vo vodnej subfáze zväčšovala strednú plochu CX v monovrstvách tvorených molekulami CX (T. Hianik, Z. Garaiová a kol., 2011). Pre dvojvrstvy obsahujúce CX sa zistil nárast fluorescenčnej anizotropie (Z. Garaiová a spol., 2012). Vyššie uvedené práce svedčia o interakcii CX s cyt C. Okrem toho bol vyvinutý aj reálny biosenzor na povrchu zlatej elektródy so zabudovaným CX, ktorý pomocou zmien impedancie a kapacitancie reagoval na naviazanie cyt C a umožňoval určenie prítomnosti tohto proteínu už pri koncentrácii 10 nmol/l (A. M. Moshin a kol., 2011).

Táto práca si kladie za cieľ preskúmať vplyv uvedeného umelého receptora na fyzikálne vlastnosti unilamelárnych lipozómov metódou ultrazvukovej velocimetrie a denzitometrie v rozsahu teplôt zahrňujúcich fázový prechod z gélu do tekuto-kryštalickej fázy. Našou snahou bolo porovnanie efektu interakcie CX s cyt C pri odlišnom usporiadaní lipidov v lipozómoch indukovaných termotrópnou zmenou fázy.

Zoznam skratiek a symbolov

AFM - atómová silová mikroskopia
angl. - anglicky
ATP - adenosíntrifosfát
APAF - faktor aktivujúci apoptózu
a pod. - a podobne
atď. - a tak ďalej
 β - koeficient adiabatckej stlačiteľnosti
CLC - kritická lipozomálna koncentrácia
CMC - kritická micelárna koncentrácia
CX - kalix[6]arén alebo jeho karboxylový derivát (podľa kontextu)
cyt C - cytochróm C
dATP - deoxyadenosíntrifosfát
DMPC - 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholín
DPH - 1,6-difenylhexatri-1,3,5-én
EPR - elektrónová paramagnetická rezonancia
 ϕ_K - adiabatcká stlačiteľnosť
 ϕ_K/θ_0 - špecifická zdanlivá molárna adiabatcká stlačiteľnosť
 ϕ_V - špecifický objem
FMFI UK - Fakulta Matematiky, Fyziky a Informatiky Univerzity Komenského
FTIR - Fourier - transformačná Infračervená spektroskopia
GUVs - giant unilamellar vesicles (ang. skratka pre OUL)
 K - adiabatcká stlačiteľnosť
kaspáza - cysteinylaspartátová špecifická proteáza
KJFB - Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
kol. - kolektív
 L_α - fluidná lamelárna fáza
 L_β - hydratovaná lamelárna gélová fáza,
 L_c - kryštalická gélová fáza
LUVET - extrúzna technika na výrobu lipozómov

LUVs - large unilamellar vesicles (angl. skratka pre ULL)
 MLL - multilamelárne lipozomy
 MLVs - multilamellar vesicles (angl. skratka pre MLL)
 M, M - molárna hmotnosť
 MUL, SUVs - malé unilamelárne lipozomy
 MVL - mnohovezikulové lipozomy
 OUL - obrovské unilamelárne lipozomy
 P_{β} - - prechodná zvlínená fáza
 PC - fosfatidylcholín
 PE - fosfatidyletanolamín
 PG - fosfatidylglycerol
 PI - fosfatidylinozitol
 PS - fosfatidylserín
 QCM - piezokryštálické mikrováhy
 ρ - hustota roztoku
 ρ_0 - hustota rozpúšťadla
 $[\rho_0]$ - koncentračný inkrement hustoty
 RTG lúče - röntgenové lúče (0,01 - 10 nm)
 SAXS - rozptyl röntgenových lúčov pri malom uhle
 spol. - spolok
 SUVs - small unilamellar vesicles (angl. skratka pre MUL)
 TMA-DPH - 1-(4-(trimetylamino)fenyl)-6-fenylhexa-1,3,5-trién
 T_m, T_t - hlavný fázový prechod
 T_s - teplota subprechodu
 T_p - teplota predprechodu
 $[u]$ koncentračný inkrement rýchlosti ultrazvuku
 ULL - unilamelárne lipozomy

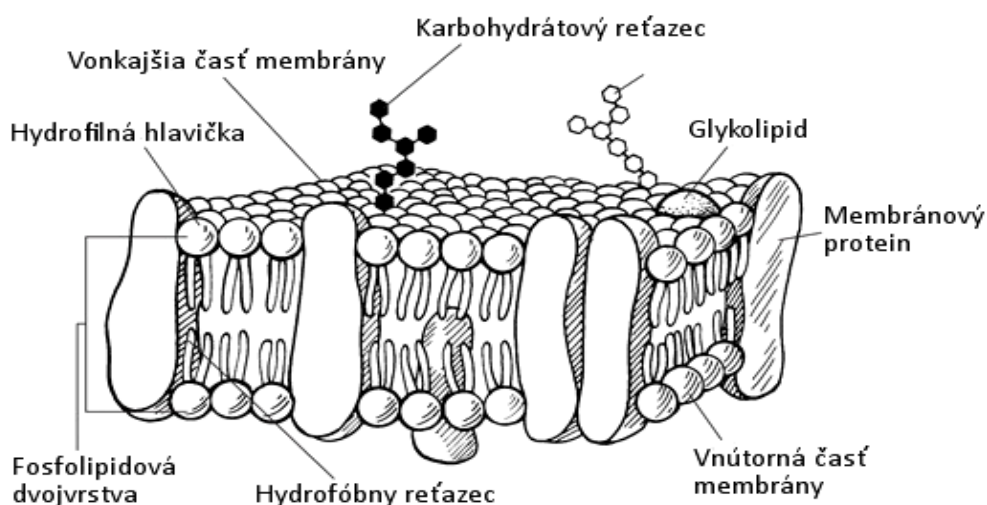
2 Teoretická časť

2.1 Biologická membrána

Biologická membrána je významný stavebný a funkčný prvok všetkých buniek. Oddeľuje bunky od okolia, ale aj jednotlivé bunkové organely od cytozolu. Podmieňuje riadený obojstranný prenos častíc, energie a informácie.

2.1.1 Štruktúra biologických membrán

Základná štruktúra membrány každej bunky je veľmi podobná: tvorí ju dvojvrstva fosfolipidov a do nej zabudované proteíny. Pomer jednotlivých komponentov membrány je podmienený jej funkciou. Významným znakom biomembrán je asymetrické rozloženie oboch vrstiev, ktoré je aktívne udržiavané mechanizmami závislými na ATP (G. van Meer a kol., 2008). Napríklad sacharidové zložky sú spravidla umiestnené na vonkajšej vrstve membrány, vid' obr. 2.1, glykokalix. Za fyziologických podmienok výhradne vnútorná vrstva obsahuje aniónový fosfatidylserín. Elektricky neutrálne lipidy ako fosfatidylcholín a sfingomyelín sú umiestnené najmä vo vonkajšej vrstve membrány, teda membrána je elektricky polarizovaná.



Obr 2.1: Mozaikový model biologickej membrány eukaryotickej bunky.

(Upravené podľa <http://media.wiley.com/Lux/49/161449.image0.jpg>).

Významnou zložkou biomembrán je cholesterol. Cholesterol je štvorcyklický sterol obsahujúci polárnu -OH skupinu. Plazmatická membrána eukaryotickej bunky obsahuje väčšie množstvo cholesterolu a sfingomyelínu v porovnaní s bunkovými organelami (Zambrano a kol., 1975), v mitochondriách sa cholesterol nachádza viac vo vonkajšej membráne (J. Comte a spol., 1976). Viacero experimentov poukazuje na nesymetrické rozloženie cholesterolu v membránach (J. E. Hale, F. Schroeder, 1982; M. Mondal a kol., 2009; W. G. Wood a spol. 2011).

2. 1. 2 Štruktúrne podjednotky biomembrán

V roku 1972 Singer a Nicolson navrhli model membrány ako tekutej mozaiky. Podľa tohto modelu sú fosfolipidy voľne distribuované v celom objeme lipidovej dvojvrstvy, do ktorej sú zabudované proteíny s menšou laterálnou pohyblivosťou (S. J. Singer a G. L. Nicolson, 1972). Tento model vysvetľoval niektoré vlastnosti membrán ako napr. ich tekutosť, elasticnosť, nepriepustnosť pre nabité molekuly. Predpokladal rýchly laterálny pohyb, voľnú rotáciu a zmeny konformácie lipidov. Pre niektoré makroskopické membránové deje je tento model stále použiteľný. Ako príklad možno uviesť zmeny membrány bunky ako celku počas malígnej transformácie, zmeny v kooperativite membrány počas jej interakcie so špecifickým ligandom.

Laterálny pohyb lipidov a proteínov však nie je voľný, membrána je heterogénna, tvoria sa v nej usporiadané mikrodomény - rafty. Nepravidelný a obmedzený pohyb lipidov v membráne dokázali Stier a Sackmann EPR štúdiami kinetiky spinom značených enzýmov (A. Stier, E. Sackmann, 1973). Experimenty pomocou difrakcie RTG lúčov, elektrónového mikroskopu, fluorescenčnej anizotropie dokazujú heterogenitu rôznych typov biomembrán. Simons a Ikonen charakterizovali rafty ako chemicky rozoznateľné samoagregujúce funkčné domény obohatené o sfingolipidy a steroly. Tieto rafty sú pohyblivé v rámci fluidnej membrány (K. Simons a E. Ikonen, 1997). V roku 2006 sa na Keystonskom sympóziu definovali lipidové rafty ako laterálne pohyblivé heterogénne útvary s veľkosťou 10 - 200 nm, obohatené o steroly a sfingolipidy, ktoré segmentujú miesta bunkových procesov.

Rafty môžu byť v membráne poprepávané pomocou proteín-proteínových a proteín-lipidových interakcií a vytvoriť tak dynamickú organizovanú sieť. Pohyb jednotlivých

lipidov v rámci raftu a celého raftu ako celku bol pozorovaný metódou fluorescenčnou mikroskopiou vyvolanou stimulovanou emisiou fotónov (Ch. Eggeling a spol., 2009). Lipidové rafty sa zúčastňujú dynamických bunkových procesov ako napr. prenos látok bunkovou membránou, bunková signalizácia, endocytóza či v riadenom vstupe patogénov do bunky.

Lipidové rafty sú nerozpustné v detergentoch, preto je ich možné z membrány ľahko odizolovať (Skwarek, M. 2004).

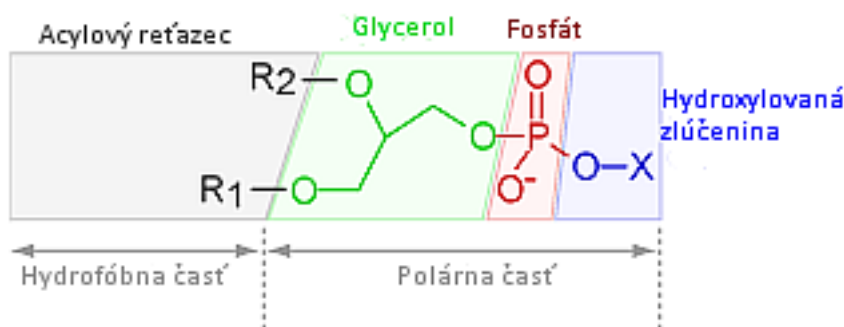
Niektoré štúdie rozdeľujú lipidové nehomogenity na viacero typov. Okrem spomínaných lipidových raftov rozlišujú tzv. kalveoly, čo je invaginácia membrány tvarom pripomínajúca hrušku, veľkosti 50-100 nm. Tento nehomogénny útvar obsahujú glykosfingolipidy, cholesterol a proteín kalveolín. Kalveola sa zúčastňuje homeostázy cholesterolu, vezikulárneho transportu membránou, prenosu signálov. (T. V. Kurzchalia, R.G. Parton, 1999).

V poslednom období sa preukazuje významnosť jednotlivých lipidov ako sekundárnych poslov spúšťajúcich dôležité bunkové procesy ako zápal, proliferáciu, či apoptózu (Spiegel a kol., 1996; Lord a kol. 2012).

2. 3 Lipidová dvojvrstva

Glycerofosfolipidy sú hlavnou zložkou všetkých biologických membrán. Obsahujú sn-glycerol-3-fosfát, ktorý je na prvom sn1- a druhom sn2- uhlíku esterifikovaný masnými kyselinami. Na uhlíku sn-1 sa najčastejšie vyskytujú masné nasýtené kyseliny (C16 a C18), uhlík v polohe sn-2 sa esterifikuje nenásýtenými masnými kyselinami (C16 a C20). (Voet D., Voet J. G., 1995).

Polárna časť je naviazaná na uhlík sn-3. Je tvorená polárnou fosfátovou skupinou, ktorá je esterifikovaná funkčnou skupinou - X, ktorej charakter rozhoduje o druhu fosfolipidu (Obr. 2.2). Pokiaľ je substituent - X vodík jedná sa o fosfatidovú kyselinu. Fosfatidová kyselina sa primárne nachádza v membránach ako dôležitý intermediát pri tvorbe ostatných glycerofosfolipidov. V bunkách cicavcov sa najviac vyskytujú estery cholínu, etanolamínu, inozitolu, glycerolu a serínu (Tab. 2.1).



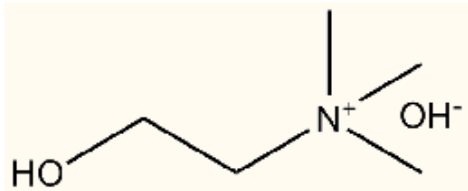
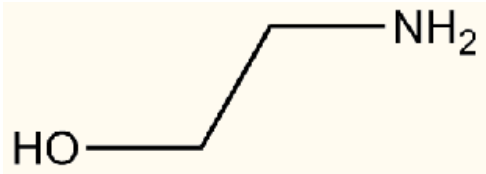
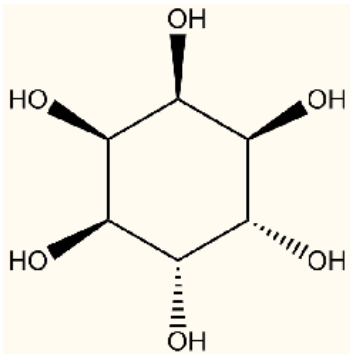
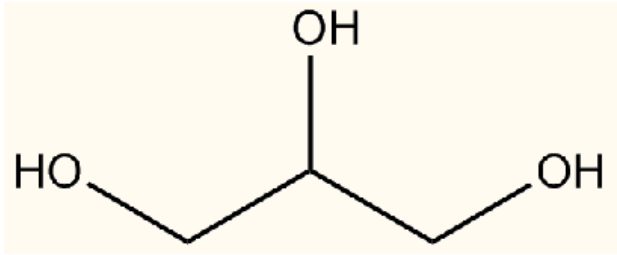
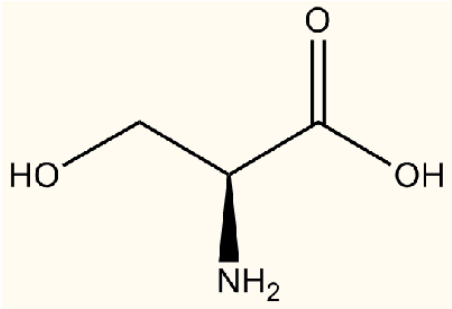
Obr. 2.2: Štruktúra fosfolipidu s vyznačenou funkčnou skupinou -X.

Charakteristickým znakom je kooperativita membránových lipidov. Štruktúra reaguje na vonkajšie podnety ako celok. Kooperativitu 1 by mala štruktúra lipidov, v ktorej by sa po zmene jedinej časti zmenila celá štruktúra. Pozitívna kooperativa v chemicko fyzikálnom procese vykazuje synergický efekt zapojenej kooperatívnej jednotky.

Samoorganizovanie molekúl lipidov vo vodnej fáze do nadmolekulárnych štruktúr je pre systém termodynamicky výhodné. Vďaka chemickej povahe molekuly vody, v kvapalnej fáze voda vytvára hustú a kooperatívnu sieť pospájanú vodíkovými väzbami. Táto sieť vodíkových väzieb tvorí dynamický systém s veľkou mierou entropie. Ak sa k takejto štruktúre pridá hydrofóbny lipid niektoré z vodíkových väzieb zaniknú a dôjde k poklesu entropie rozpúšťadla okolo povrchu hydrofóbnej molekuly. Interakcie molekúl vody a hydrofóbnej molekuly van der Waalsovými väzbami sú energeticky menej výhodné ako vodíkové mostíky medzi voľnými molekulami polárnej vody. Hydrofóbna molekula sa preto snaží minimalizovať svoj kontakt s polárnou fázou, čo je podstatou hydrofóbnej interakcie.

Membránové lipidy majú amfifilný charakter: ich molekuly obsahujú hydrofilnú časť, nazývanú polárna hlavička, a hydrofóbnu, tvorenú dlhými alifatickými nevetvenými reťazcami (Obr. 2.2).

Táto štruktúra sa samovoľne organizuje do tvaru, kde polárna hlavička interaguje pomocou vodíkových väzieb a elektrostatických síl s vodným prostredím, kým hydrofóbne reťazce tvoria nepolárne kontinuum súdržné vďaka hydrofóbnym interakciám.

Typ fosfolipidu	Substituent kyseliny fosforečnej	Štruktúrny vzorec
Fosfatidylcholín (PC)	cholín	
Fosfatidyletanolamín (PE)	etanolamín	
Fosfatidylinozitol (PI)	inozitol	
Fosfatidylglycerol (PG)	glycerol	
Fosfatidylserín (PS)	serín	

Tab.2.1: Najčastejšie druhy fosfolipodov v biomembránach cicavcov.

Agregáciou amfifilných lipidov vo vodnom prostredí vznikajú nadmolekulárne štruktúry - micely, dvojvrstvy, ktoré sa uzatvárajú do sférických vezikúl lipozómov, či hexagonálne fázy. O tom aký typ agregátu bude molekula uprednostňovať, rozhoduje rada faktorov: celkový tvar molekuly (t.j. veľkosť polárnej a nepolárnej časti), stupeň hydratácie, náboj polárnej skupiny a v neposlednej rade tiež podmienky za ktorých k agregácii dochádza, napr. pH, iónová sila, teplota. (B. de Kruijff a kol., 1985; D. E. Vance, J. E. Vance., 1996.).

Pomocou kritického agregáčného parametra p , môžu byť získané približné informácie o konečnom tvare agregátov (J. Israelachvili a kol., 1980):

$$p = \frac{v}{\alpha_0 l_c} \quad (2.1)$$

kde: v je objem uhľovodíkového reťazca,

α_0 je optimálna plocha hydrofilnej časti,

l_c je kritická dĺžka uhľovodíkového reťazca.

Objem uhľovodíkového reťazca v zodpovedá jeho van der Waalsovmu polomeru, kritická dĺžka l_c zodpovedá dĺžke natiahnutého reťazca v smere jeho hlavnej osi. Veľkosť optimálnej plochy α_0 zodpovedá dvom protichodným silám. Pokiaľ sú polárne hlavičky ďaleko od seba, voda sa dostáva do blízkosti hydrofóbných reťazcov, čím sa zvýši povrchová energia membrány. Naopak, ak sú polárne hlavičky tesne vedľa seba, budú sa elektrostaticky a stéricky odpudzovať.

Tvar agregátu	Hodnota parametru
sférické micely	$p < \frac{1}{3}$
valcové micely	$\frac{1}{3} < p < \frac{1}{2}$
pružné dvojvrstvy, lipozómy	$\frac{1}{2} < p < 1$
rovinné dvojvrstvy	$p = 1$
obrátené micely, hexagonálna fáza	$p > 1$

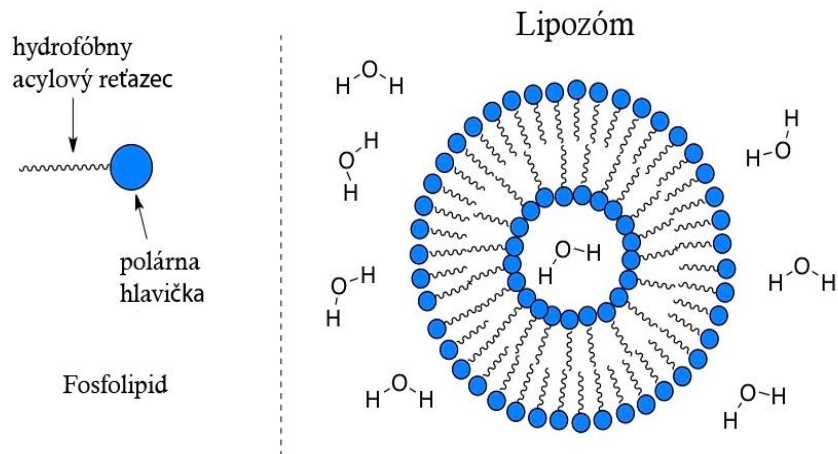
Tab. 2.2: Hodnoty parametra p pre jednotlivé tvary agregátov (G. Tresset, 2009).

Kónické molekuly lipidov s hlavičkami veľkými v porovnaní s plochou, ktorú uzavierajú acylové reťazce ($p < 0,5$) majú tendenciu vytvárať guľaté a valcovité micely. Hodnota p blízka k 1 predstavuje cylindrický tvar molekúl a predpokladá ich lamelárnu štruktúru, ako je to napr. v prípade dvojvrstiev či lipozómov. Invertovaná a hexagonálna fáza sa vytvára pri $p > 1$. Faktor je ovplyvnený použitým druhom rozpúšťadla, napr. elektrolyt s väčšou iónovou silou zväčšuje mieru hydratácie polárnych hlavičiek oproti elektrolytu s menšou iónovou silou. Vytváranie týchto agregátov závisí aj od koncentrácie rozpúšťaného lipidu, pretože hydrofóbne interakcie musia prekonať interakcie medzi vodou a hydrofilnou časťou molekuly fosfolipidu. Pre vytvorenie micel je potrebné presiahnuť ich kritickú micelárnu koncentráciu (CMC). Pri vyšších koncentraciách fosfolipidov, pri tzv. kritickej lipozomálnej koncentrácii (CLC) sa začnú micely vo vodnom roztoku pretransformovávať na dvojvrstvy.

2. 3. 1 Lipozómy

Lipozómy sú umelo vytvorené lamelárne lipidové vezikuly, uzatvárajúce vo svojom vnútri vodu (A. D. Bangham, 1965). Pri ich príprave sa najskôr lipidy vysušia na tenký biofilm, do ktorého sa pridá voda. Takto sa vytvoria tzv. multilamelárne lipozómy (MLL) obsahujúce viac ako jednu lipidovú dvojvrstvu. Lipidové dvojvrstvy sú oddelené od seba

vrstvičkou vodnej fázy. Z MLL vznikajú jednovrstvové vezikuly s menšou veľkostnou distribúciou metódami extrúzie polykarbonátovými filtrami alebo ultrasonikáciou.



Obr. 2.3: Schematický náčrt lipozómu (ULL). (Uprevené podľa <http://icanhasscience.com/wpcontent/uploads/2011/02/Liposome.jpg>).

Podľa počtu dvojvrstiev a veľkosti rozdeľujeme lipozómy do niekoľkých skupín, ktorých schematické zobrazenie je nasledovné:

- malé unilamelárne lipozómy (SUVs, MUL): 25 – 50 nm, sú relatívne nestabilné kvôli veľkému povrchovému napätiu
- veľké unilamelárne lipozómy (LUVs, ULL): 50 nm - 200 nm, stabilnejšie, vhodné na enkapsuláciu hydrofilných látok
- obrovské unilamelárne lipozómy (GUVs, OUL): 5-200 μm , majú priemer bunky
- multilamelárne lipozómy (MLVs, MLL): 0,1 - 15 μm , obsahujú viac dvojvrstiev
- mnohovezikulové lipozómy (MVL): 1,6 - 10,5 μm , v jednej vezikule je uzatvorené veľké množstvo malých vezikúl

Niektoré vlastnosti lipozómov

Interakcia medzi lipozómami je riadená dvoma silami: príťažlivou van der Waalsovou a odpudzujúcou elektrostatickou silou. Rovnováha medzi týmito dvoma silami určuje stabilitu lipozómov.

Chemické zloženie fosfolipidovej dvojvrstvy, teplota, pH a iónová sila rozpúšťadla ovplyvňujú dôležité vlastnosti lipozómov, ako sú ich priepustnosť, tekutosť (fluiditu), stlačiteľnosť a charakter ich fázového prechodu. Tekutosť je chápaná ako schopnosť lipidov pohybovať sa v rovine dvojvrstvy. Čím ľahšie sa lipidy pohybujú, tým je tekutosť dvojvrstvy väčšia. Uvažujúc chemické zloženie lipidov v lipozómoch, každá dvojité väzba vnáša do dvojvrstvy určitú nesúmernosť, kvôli ktorej sa reťazce nemôžu dokonale priblížiť, pri niektorých konformáciách dochádza k ich vzájomnému odpudzovaniu či priťahovaniu. Čím viac dvojných väzieb obsahujú lipidy tvoriace dvojvrstvu, tým je tekutejšia a priepustnejšia, náchylnejšia k deformáciám a k porušeniu usporiadanej štruktúry. Všeobecne sú nenasýtené reťazce ohybnejšie a reaktívnejšie, stlačiteľnejšie, elastickejšie, dvojvrstva je permeabilnejšia pre vodu a teplota fázového prechodu z gélovo kryštalickej lamelárnej fázy na tekutú kryštalickú fázu nastáva pri nižšej teplote ako pre nasýtené uhľovodíky (D. Mostofsky a kol., 2001). Ohybnosť uhľovodíkov klesá s nárastom dĺžky reťazca, tj. zvyšuje sa usporiadanosť membrány (D. P. Kharakoz, 2002). Hlavný fázový prechod je širší pre unilamelárne ako pre multilamelárne lipozómy, čo zodpovedá menšej kooperativite ich fázového prechodu. (D. Marsch a kol., 1977).

Ako bolo spomenuté v kapitole 2.3, pri vyššej iónovej sile rozpúšťadla dochádza k jeho interakcii s lipozómami, preto na porušenie tejto interakcie je potrebné vynaložiť vyššiu energiu, čo môže ovplyvniť aj teplotu fázového prechodu. K uskutočneniu fázového prechodu je nutné dodať energiu do systému napr. vo forme tepelnej energie alebo zvýšením tlaku. Teplota a tlak môžu porušiť vnútornú integritu lipozómov.

Lipozómy sa využívajú ako model biomembrán pre *in vitro* štúdie, napr. mechanizmu interakcie proteínu či ligandu s lipidmi, vplyv modifikácie dvojvrstvy na bunkové procesy, lipozómy slúžia ako nosič pri štúdiu dynamických vlastností transmembránových proteínov, či biosenzorov. V súčasnosti prebieha intenzívny výskum cieleného prenosu liečiv a génov enkapsulovaných vo vnútri lipozómov. Ich schopnosť prejsť membránou cielennej bunky závisí od ich zloženia. Pre využitie elektromagnetickej energie na riadenie

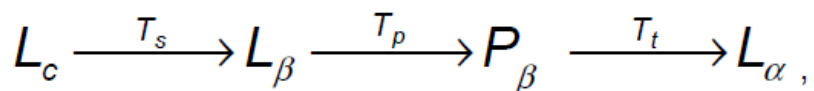
pohybu lipozómov sa ich zloženie obohatí o feromagnetické nanočastice (M. Babincová a P. Babinec, 2009), alebo sa vytvorí na povrchu alebo vo vnútri lipozómu vzduchová bublina stabilizovaná surfaktantom - kavita, pri prenose liečiva ultrazvukom (S. L. Huang, 2008).

Je nutné poznamenať, že zjednodušený prístup chápania biologickej membrány tvorenej lipidovou dvojvrstvou môže byť aj prekážkou v presnom porozumení niektorých membránových funkcií. Súhrn hlavných nedostatkov, ktoré sa spájajú s použitím membránových modelov, uvádza práca Vestergaarda a spol. (M. Vestergaard a spol., 2008).

2. 3. 2 Hlavný fázový prechod lipidov. Kooperativita.

Fázové vlastnosti lipidových membrán a lipozómov sa menia v závislosti od teploty. Takéto fázové premeny sa nazývajú termotrópne fázové prechody. Pre Termotrópne fázové prechody sú príznačné tým, že pri určitej teplote môžu vedľa seba koexistovať dve odlišné fázy.

Pri zvyšujúcej sa teplote možno pozorovať nasledovné prechody (P. Rybár.,2004):



kde: L_c - kryštalická gélová fáza,

T_s - teplota subprechodu,

L_β - hydratovaná lamelárna gélová fáza,

T_p - teplota predprechodu,

P_β - - prechodná zvlínená fáza,

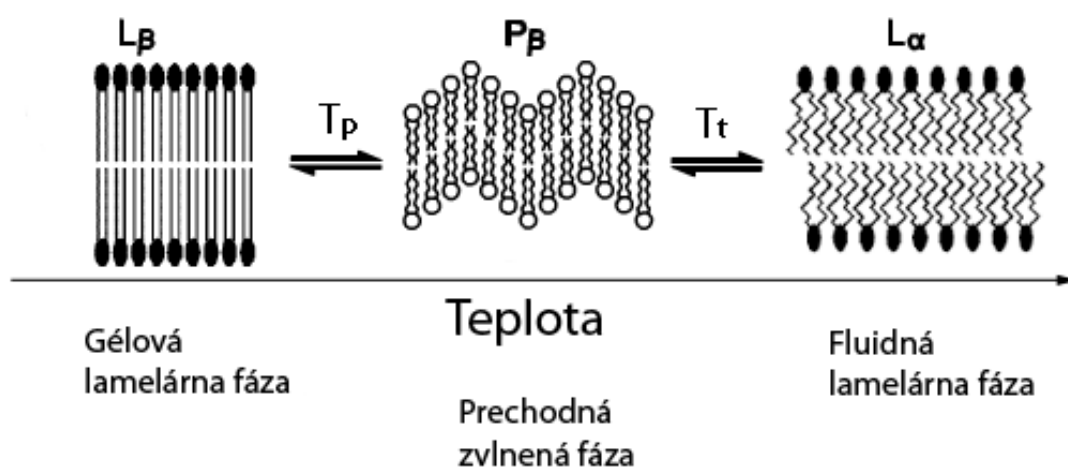
T_t^1 - teplota hlavného fázového prechodu,

L_α - fluidná lamelárna fáza.

¹ T_t je teplota topenia, v texte je použitý aj anglický ekvivalent T_m (melting temperature)

Niektoré dvojvrstvy lipidov môžu na svojom povrchu viazať vrstvu vodného roztoku, ktorá tak jednotlivé dvojvrstvy v kryštáli rozdeľuje. Takáto štruktúra sa označuje ako lamelárna štruktúra a lipidy tvoriace lamelárnu fázu sú napr. PC, PS a mnohé ďalšie. Lamelárna štruktúra môže vytvoriť tekutý kryštál L_α alebo tuhú gélovú fázu L_β , čo sa označuje ako hlavný fázový prechod (R. Koynova a M. Caffrey, 1998).

Medzi prechodom $L_\beta \rightleftharpoons L_\alpha$ rozoznávame aj prechodnú zvlnenú fázu P_β , ktorá zodpovedá zastúpeniu oboch fáz L_β , L_α v dvojvrstve a je charakteristická zvýšenou elasticitou a kurvatúrou membrány. Stabilná zvlnená fáza P_β je charakteristická pre nasýtené diacylfosfatidyly (M. Rappolt, 2000).



Obr. 2.4: Usporiadanie fosfolipidovej dvojvrstvy pri rôznych teplotách. Hlavný fázový prechod. L_β stav podobný gélu, P_β prechodná zvlnená fáza, L_α stav podobný tekutému kryštálu, T_p - teplota predprechodu, T_t teplota hlavného prechodu (Upravené podľa obr. 1.3, P. Rybár, 2004).

Lamelárna lipidová dvojvrstva vykazuje nasledujúce správanie. Pri nízkych teplotách existuje vo fáze usporiadaného gélového kryštálu L_β . Fázový prechod do neusporiadaného tekutého kryštálu L_α nastáva pri teplote T_m , charakterizovanej ziskom entropie zo zmeny konformačnej izomérie lipidových reťazcov z *trans* \rightarrow *gauche* a maximom tepelnej kapacity prechodu. V gélovom stave sú nasýtené reťazce v konformácii *trans* a ich pohyblivosť je obmedzená. Energia dodaná systému zvýšením teploty umožní uhlíkovým rotovať, meniť torzný uhol z konformácie *trans* na *gauche* (+)/(-) a opačne. Energetická bariéra zmeny týchto dvoch konformácií je 12-17 kJ mol⁻¹ (P. N. Bartlett, 2008).

Izomerizáciou *trans* → *gauche* sa zvýši priemerná plocha na molekulu lipidu približne o 20-25 % a tiež dochádza k vzájomnému prekrytiu vrstiev membrány, čo je doprevádzané zmenšením hrúbky dvojvrstvy ≈ 20-25 %. Ďalším pozorovaným javom pri prechode do fázy L_α je zvýšená priepustnosť molekúl vody do vnútra membrány, čím sa oslabia van der Waalsove interakcie medzi acylovými reťazcami. Voda v membráne môže spôsobiť zvýšenie parciálneho objemu molekúl lipidov o 3-5 % (T. Heimburg, 1998).

Môžeme zhrnúť, že hlavný fázový prechod v lipidovej dvojvrstve je charakterizovaný maximom zmeny entalpie zistenej napr. metódou diferenciálnej kalorimetrie. Teplo dodané na hlavný fázový prechod sa spotrebúva najmä na prekonanie van der Waalsových väzieb usporiadaných acylových reťazcov L_β fázy, čím sa zvýši vnútorná energia dvojvrstvy. Ďalším príspevkom entalpie je práca, vykonaná objemovou expanziou dvojvrstvy (S. Tristram-Nagle a J. F. Nagle, 2004). Z termodynamického hľadiska má tento fázový prechod znaky fázového prechodu prvého aj druhého druhu, kedy síce dochádza pri prechode k rovnovážnemu zloženiu oboch fáz, ale pre tento prechod nie je potrebné dodať latentné teplo. Pri teplote T_m pozorujeme ostré minimum v závislosti inkrementu rýchlosti ultrazvuku [u], čo predpokladá fázový prechod druhého druhu, prudké stúpanie alebo vzostup [u] je charakteristický pre fázové prechody prvého druhu (P. Rybár, 2004).

Hlavný fázový prechod možno charakterizovať Van't Hoffovou rovnicou:

$$\frac{1}{\delta} \approx N\Delta H \quad (2.2),$$

kde: δ - šírka fázového prechodu,

N - stupeň kooperativity, tiež počet molekúl tvoriacich kooperatívnu jednotku,

ΔH - zmena molárnej entalpie počas fázového prechodu.

Z rovnice vyplýva, že kooperativita fázového prechodu je nepriamo úmerná šírke fázového prechodu. Číslo N je vzťahnuté k pravdepodobnosti výskytu defektu v usporiadaní membrány. Čím viac má membrána defektov, tým vykazuje menší stupeň kooperatívneho správania. Čím väčší stupeň voľnosti v pohybe majú molekuly lipidov

tvoriacich membránu, tým je väčšia tendencia pre vznik defektu v membráne (D. Nelson a kol., 1998).

Väčšia kooperativita fázového prechodu je dosiahnutá v homogénnom systéme s jednou zložkou. Kooperatívne jednotky v membráne tak ľahšie vytvárajú väčšie klustery jednotnej fázy, prímes neruší ich vzájomnú interakciu. Nečistoty či prímеси inej komponenty narúšajú kooperativitu fázového prechodu (Lee, A. G., 1977). Na zobrazenie lipidových kooperatívnych jednotiek jednotlivých fáz počas fázového prechodu sa často využíva metóda atómovej silovej mikroskopie (AFM). Zistilo sa, že pri fázovej zmene dochádza k postupnému úbytku klasterov jednej fázy, zatiaľčo počet klasterov konečnej fázy narastá. Teplota fázového prechodu (T_m) je charakterizovaná rovnakým množstvom molekúl v oboch fázach (F. Tokumasu a kol., 2002; L. J. Johnston, 2007).

Termotrópne správanie lipozómov možno stanoviť množstvom metód, napr. denzitometriou, tlakovou perturbačnou kalorimetriou (H. Matsuki a kol., 2012), diferenčnou kalorimetriou (S. Mabrey a kol. 2012), ultrazvukovou velocimetriou (T. Hianik a kol., 1997; 1998), NMR, FTIR (B. de Kruijff a kol., 1975; R. L. Silvestri, 1994), rozptylom röntgenových lúčov pri malých uhloch (SAXS) (I. Denisov, 2005) atď.

2. 4 Membránové proteíny

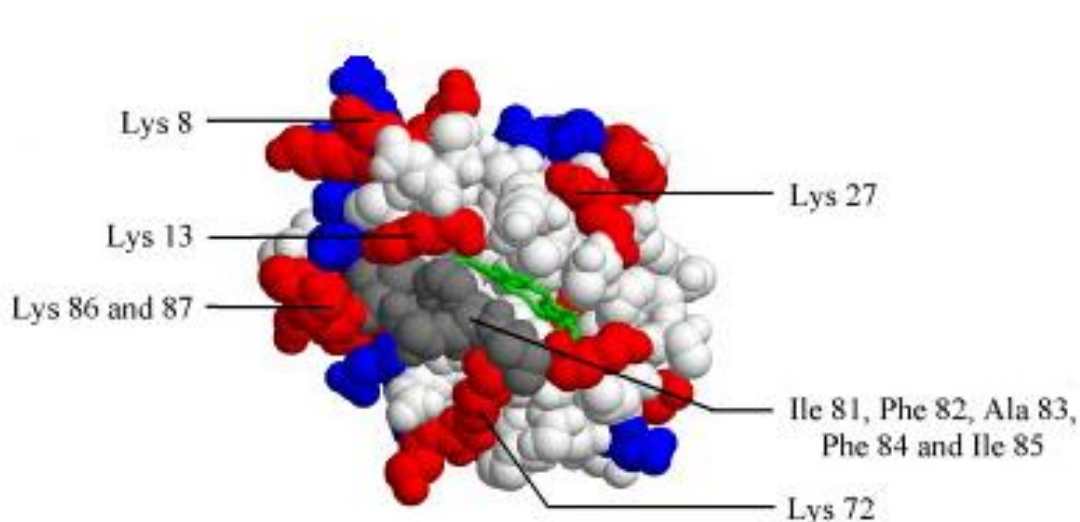
Dôležitou súčasťou membrán sú membránové proteíny, ktoré sú zodpovedné za receptorovú, transportnú a kontaktnú funkciu membrány. Z hľadiska ich umiestnenia v dvojvrstve ich môžeme rozdeliť na integrálne a periférne bielkoviny. Integrálne bielkoviny prechádzajú obidvoma vrstvami membrány a periférne prechádzajú len jednou vrstvou.

2. 4. 1 Cytochróm C

Cytochróm C (cyt C) (Obr.2.5 a 2.6) je periférna bielkovina lokalizovaná na vonkajšej strane vnútornej membrány mitochondrie, kde sa špecificky viaže na kardiopolipín. Má molekulovú hmotnosť približne 12,4 kDa a hydrodynamický priemer približne 3,6 nm (L. Banci a spol., 1997). Cyt C pozostáva z jedného polypeptidového reťazca s vysokým

podielom sekundárnej štruktúry α -helixu. Obsahuje 104 aminokyselín kovalentne viazaných k hemovej skupine obsahujúcej železo pomocou dvoch aminokyselín cysteínu. Hemová skupina je lokalizovaná v centrálnej hydrofóbnej kavite cyt C (L. Wang a kol., 1998).

Na povrchu cyt C sa nachádza 19 kladne nabitých zvyškov lyzínu a 2 tiež kladne nabité arginíny, jeho výsledný kladný náboj je +8. V natívnom stave je rozpustný vo vode.



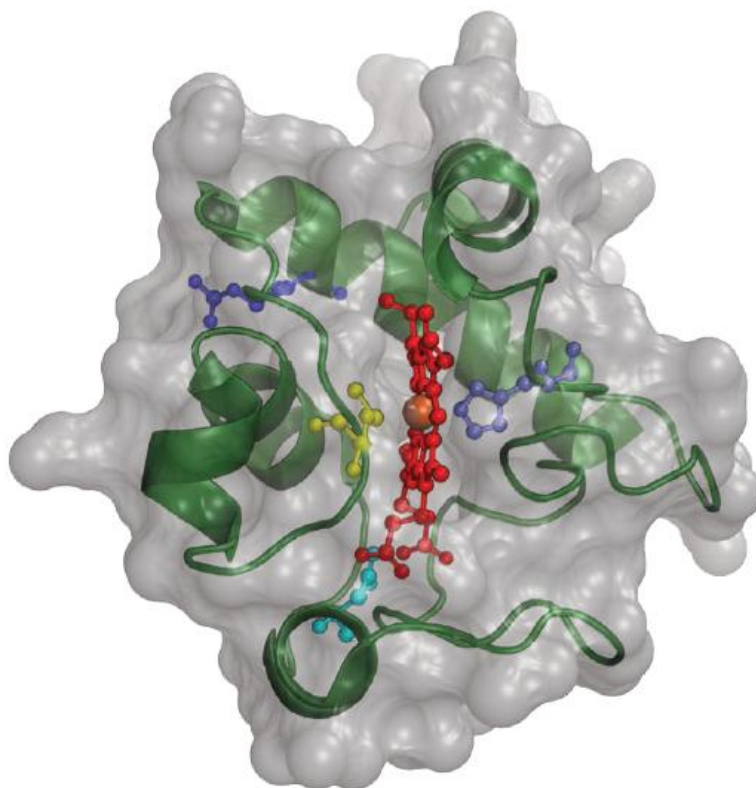
Obr. 2.5: Štruktúra Cyt C s vyznačenými aminokyselinami. Značenie aminokyselín: Lys a Arg (červeno), Asp a Glu (modro), hydrofóbne aminokyseliny (sivo) a hemová skupina je vyznačená zelene (Zdroj: E.K. Kirat a S. Morandat, 2009).

Cyt C zohráva kľúčovú úlohu v dýchacom reťazci mitochondrie, prostetická hemová skupina cyt C účinkuje ako prenášač elektrónov medzi enzýmami cytochrómu C reduktázou a cytochrómu C oxidázou, pričom dochádza k zmene redoxného stavu železa (S. Bernad, 2004).

Interakcia medzi cyt C a negatívne nabitými membránami má elektrostatickú povahu. Cyt C je však schopný interagovať s fosfolipidmi aj prostredníctvom hydrofóbnych interakcií (E. K. Kirat a S. Morandat, 2011).

Cyt C vytvára nerozpustné agregáty v prítomnosti aniónových lipidov či ligandov. Štruktúru týchto agregátov možno zobrazíť napr. metódou AFM a FTIR mikroskopie (J. M. Alakoskela a kol., 2006). Jedná sa o rigidnú fibrilárnu štruktúru polypeptidového reťazca so sekundárnou konformáciou β -skladaného listu a nadmolekulárnou štruktúrou pravotočivej závitnice. Metóda AFM umožnila štúdium vzniknutých agregátov cyt C (dĺžka

7 nm) po interakcii so špecifickým ligandom kalix[6]arénom, pri koncentrácii cyt C 30 nmol/l a inkubačnej dobe 40 minút (20°C) (T. Hianik a kol. 2011).



Obr. 2.6: 3D Cyt C. Značenie: Hem (červená), axiálne ligandy hemu: His 18 (modrá), Met 80 (žltá); Arg 91 (vľavo, modrá), Asn 52 (azúrová). Polypeptidový reťazec je vyznačený zelene. (Zdroj: Protein Databank 1hrc.pdb, úprava v Pymol, autor: Esa Tuominen).

Cyt C a jeho rola v apoptóze

Apoptóza prebieha v niekoľkých fázach. Zahájená je tzv. iniciačnou (signálnou) dráhou. Počas tejto fázy môže byť proces apoptózy odvrátený. Apoptóza býva aktivovaná vnútornou signálnou dráhou alebo vonkajšou signálnou dráhou.

Cyt C sa zúčastňuje vnútornej signálnej dráhy apoptózy. Počas tejto fázy dochádza k oligomerizácii a následnej inzercii proapoptických proteínov do vonkajšej membrány mitochondrie, čo spôsobí jej permeabilizáciu a vyliatie cyt C do cytoplazmy. Následkom toho sa otvoria veľké iónové kanály vonkajšej aj vnútornej mitochondriálnej membrány, mitochondria stráca svoju funkciu, praská a uvoľňuje svoj matrix do cytoplazmy.

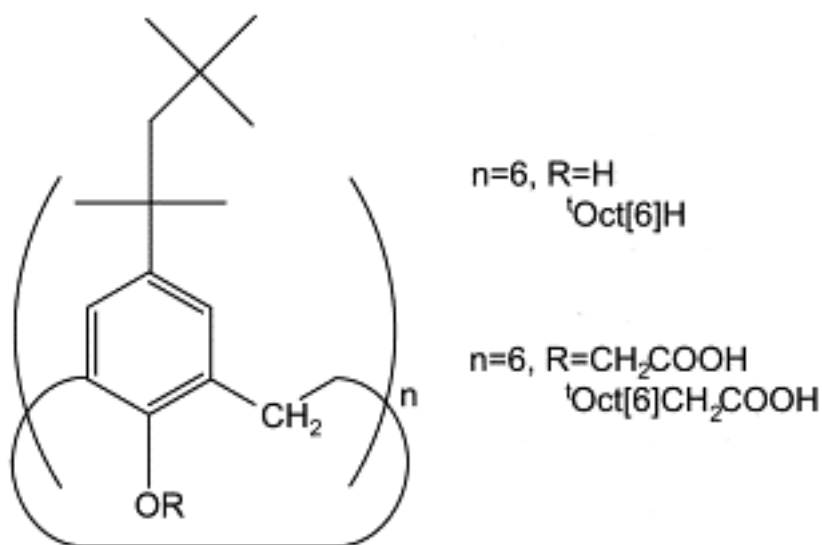
Cyt C uvoľnený do cytoplazmy sa viaže na proteín Apaf-1 a za prítomnosti ATP/dATP vzniká komplex nazývaný apoptozóm. Apaf-1 je adaptorová molekula viažuca sa na prokaspázu-9. Signálna fáza apoptózy je ukončená aktiváciou proteínov nazývaných kaspázy.

Tie sú zodpovedné za proteolytickú degradáciu intracelulárnych proteínov. Aktiváciou kaspáz sa zahajuje ireverzibilná alebo rozkladná fáza apoptózy (D.R. Green, 2005).

To, že cyt C je spúšťačom bunkovej apoptózy môže slúžiť na diagnostické účely. K tomu je potrebné nájsť vhodný spôsob detekcie cyt C v cytoplazme bunky. Významnú úlohu tu môžu zohrať biosenzory na báze umelých receptorov, napríklad kalixarénov.

2. 5 Kalixarény

Základnú kostru kalix[n]arénu tvorí aromatický fenol s počtom jednotiek n (4-16) premostených metylénovými skupinami ($-\text{CH}_2-$), viz obr. 2.7. Fenolové podjednotky sú usporiadané do tvaru kruhu s dutinou uprostred, čo vedie k charakteristickej kónickej štruktúre pripomínajúcej kalich, latinsky kalix. Veľkosť hydrofóbnej kavity závisí od počtu fenolových subjednotiek.



Obr. 2.7: Základná jednotka p-(1,1,3,3-tetrametylbutyl) derivátu kalixarénu, kalixarén študovaný v tejto práci platí $n=6$, a R je $-\text{CH}_2\text{COOH}$. Zdroj (Oshima T. a spol., 2007).

Kalixarén vzniká syntézou fenolov a aldehydov. U kalixarénov rozlišujeme tzv. horný okraj (upper rim) s väčším priemerom ako dolný okraj (lower rim) obsahujúci hydroxylovú skupinu fenolu resp. substituent fenolu. Vhodnou modifikáciou môže byť kalixarén viac či menej rozpustný v polárnom resp. v hydrofóbnom prostredí, či selektívny pre chirálne enantioméry (E. Garrier, 2005). Pre kalixarény je príznačné, že nešpecifickou interakciou vychytáva z okolitého prostredia malé ióny a neutrálne molekuly.

Oshima a kol. syntetizovali karboxylový derivát kalix[6]arénu (CX) (Obr. 2.7 a 3.2). Tento kalixarén má šesť karboxylových substituentov polárnych fenolových $-\text{OH}$ skupín a ideálnu veľkosť kavity pre uchytenie kladne nabitej aminoskupiny ($-\text{NH}^{3+}$). Karboxylová skupina kalixarénu interaguje s NH^{3+} skupinou lyzínu alebo arginínu cyt C (T. Oshima a kol., 2007). Tieto komplexy sú veľmi stabilné, bola stanovená ich disociačná konštanta ($K_D = 66,1 \pm 21,2 \text{ nmol/l}$). Moshin a spol. vytvorili biosenzor na báze šesťkarboxylového derivátu kalix[6]arénu a zistili, že tento receptor detekuje cyt už pri koncentrácii 10 nmol/l, pričom aminokyselinu lyzín bol schopný detekovať až pri koncentrácii 30 $\mu\text{mol/l}$ (M. A. Mohsin a kol., 2011). Preto sa možno domnievať že cyt C reaguje s týmto derivátom kalix[6]arénu aj hydrofóbnou interakciou.

Oshima a spol. preskúmali hlavné faktory ovplyvňujúce stabilitu komplexov karboxylových derivátov kalix[6]arénov s vybranými amóniovými zlúčeninami: dĺžka karboxylových a alkylových substituentov CX, ich polarita a schopnosť zmeniť konformáciu v prospech interakcie s hosťujúcou molekulou, veľkosť kavity makrocyclického ligandu - CX, ako aj pH rozpúšťadla sú rozhodujúce pre stupeň extrakcie amóniových zlúčenín z roztoku. Taktiež sa zistilo, že CX a jeho deriváty nerozlíšili stereoizoméry študovaných amóniových molekúl (Oshima a kol., 2004).

Analýzou povrchu CX zabudovaného v dvojvrstve DMPC na *mica* povrchu metódou AFM sa zistilo, že molekuly kalix[6]arénu navzájom interagujú a vytvárajú molekulové klastery približnej výšky 2 nm, čo implikuje formáciu klasteru o výške štyroch molekúl (T. Hianik, 2011).

2. 6 Metódy molekulárnej akustiky

Ultrazvuková velocimetria a denzitometria sú citlivé metódy pre štúdium mechanických a termodynamických vlastností biokoloidov a biopolymérov (A. Ochendusko a V. Buckin, 2010; R. Krivánek a kol., 2001). Umožňujú určiť teplotu fázového prechodu a stupeň kooperativity fázového prechodu. Určenie mechanických parametrov je podstatné pre veľkosť defektov v štruktúre membrány v mieste interakcie kalixarénu resp. proteínu.

2. 6. 1 Ultrazvuk. Princíp ultrazvukovej velocimetrie

Ultrazvuk je pozdĺžne mechanické vlnenie vyvolávajúce v prostredí tlakovú vlnu s frekvenciou oscilácií väčšou ako 20 kHz. Frekvencia ultrazvuku je úmerná rýchlosti šírenia ultrazvukovej vlny.

Hlavnou súčasťou ultrazvukového velocimetra sú dva rezonátory, piezoryštály. Medzi nimi sa nachádza meracia cela pre kvapalnú vzorku. Na rezonátor je privedené striedavé napätie s frekvenciou od 6,9 - 7,2 MHz (ultrazvuk), čo spôsobí, že veľkosť rezonátora začne oscilovať v presne určenom smere a s danou frekvenciou, vytvorí pozdĺžnu stojatú tlakovú vlnu v cele so vzorkou medzi dvoma paralelnými stenami rezonátora, v rovine určenej geometriou kryštálu. Miesta zhustenia molekúl kvapaliny vytvoria lokálne kmitne (amplitúda je maximálna) a miesta zriedenia sú nódy (amplitúda je nulová).

Vyhovujúce vlnové dĺžky stojatej vlny resp. rezonančné frekvencie v cele musia spĺňať podmienku:

$$\lambda_n = \frac{2l}{n} \quad (2.3)$$

kde: λ_n - vlnová dĺžka stojatej vlny

n - prirodzené číslo, ktoré určuje počet kmitaní stojatej vlny

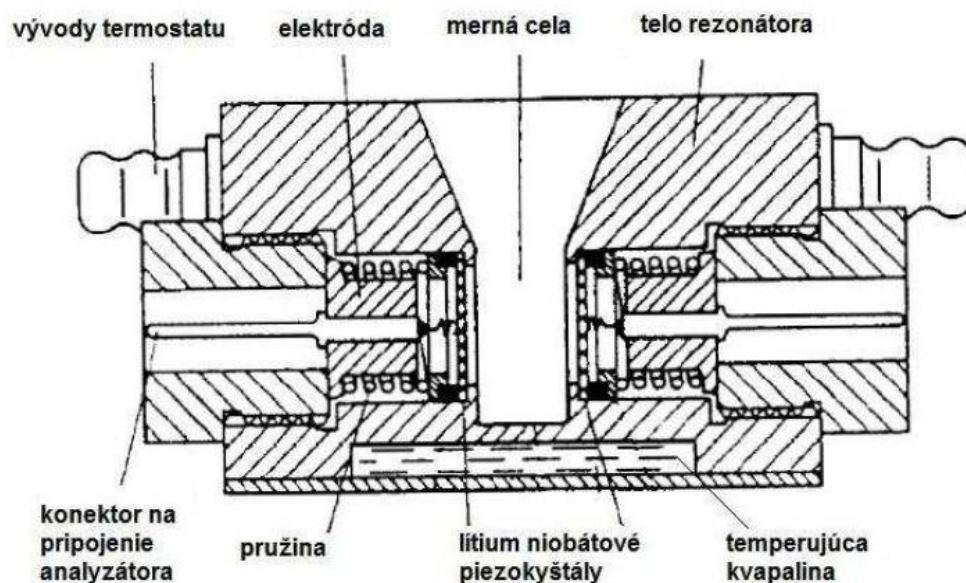
l - vzdialenosť plôch, medzi ktorými sa stojatá vlna vytvára, konštanta.

Druhý rezonátor, sa tlakom tejto vlny deformuje, čím sa získa výstupné napätie na elektróde, ktoré zaznamenáva a upravuje pripojený analyzátor a jednotlivé parametre vyhodnocuje počítač s príslušným softvérom. Vlnová dĺžka resp. frekvencia stojatej vlny je závislá na zložení vzorky, koncentrácii, elastických vlastnostiach a teplote vzorky.

Použitá rezonančná frekvencia napätia pre budiaci kryštál závisí na zložení a výbruse kryštálu. Použiteľné frekvenčné pásmo určuje tzv. faktor kvality:

$$Q = \frac{f_n}{\delta f_n} \quad (2.4),$$

kde f_n je frekvencia n -tého rezonančného píku δf_n je pološírka príslušného píku. Závislosť Q od f nadobúda maximum pri 6,9 - 7,2 MHz. Pokles faktoru kvality Q pri vyšších frekvenciách zodpovedá zvýšeniu absorpcie ultrazvuku. Naproti tomu pri nižších frekvenciách sa jedná o difrakčné straty.



Obr. 2.8: Pričný rez rezonátorom (Zdroj: P. Rybár, 2004).

Pri diferenciálnom meraní rezonančných frekvencií sa obvykle najprv určia stredné frekvencie rezonančných pík v meracej a referenčnej cele, rozdiel ktorých potom

spresňuje ich fázovo - frekvenčná charakteristika. Presnosť merania závisí od presnosti odčítania strednej frekvencie rezonančného píku.

Ďalej platí, že čím je strmšia amplitúdovo-frekvenčná charakteristika, tým je rezonátor citlivejší pri meraní rýchlosti ultrazvuku.

Rýchlosť ultrazvuku je spojená so stavovými termodynamickými veličinami vzťahom:

$$\beta_s = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_s = \frac{1}{\rho u^2} \quad (2.5)$$

kde: β_s - koeficient adiabetickej stlačiteľnosti roztoku

V - objem kvapalnej vzorky

p - tlak pôsobiaci na systém

ρ - hustota kvapalnej vzorky

S - entropia

u - rýchlosť šírenia ultrazvuku v kvapalnej vzorke.

Rýchlosť šírenia ultrazvuku v roztoku je tak rýchly proces, že periodicky stláčaná molekula si nestíha vymeniť teplo s okolím, t.j. jedná sa o adiabatický dej, entropia systému sa nemení.

Rovnica (2.5) poukazuje na možnosť využitia merania rýchlosti ultrazvuku na meranie elastických vlastností biokoloidov a biosuspenzií v roztoku. Zároveň ukazuje na vzájomné prepojenie hodnoty adiabetickej stlačiteľnosti, hustoty resp. merného špecifického objemu a rýchlosti ultrazvuku.

Adiabatická stlačiteľnosť (vzťah 2.7) a molárna adiabatická stlačiteľnosť (vzťah 2.8) sú definované ako:

$$K = - \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_s = \beta V \quad (2.7)$$

$$\phi_k = \frac{K}{n} \quad (2.8)$$

a molárny špecifický objem ϕ_V komponenty vo veľmi zriedenom ($n \approx 0$) roztoku ako:

$$\phi_V = \left(\frac{\partial V}{\partial n} \right)_{n=0} \approx \frac{V - V_0}{n} = \frac{M}{\rho_0} - \frac{\rho - \rho_0}{C \rho_0} \quad (2.9)$$

kde K je adiabatická stlačiteľnosť, β - koeficient adiabatickej stlačiteľnosti, n je látkové množstvo, M - molárna hmotnosť, ρ je hustota, V je objem, C je špecifická (hmotnostná) koncentrácia komponenty v roztoku a V_0 je objem, ρ_0 je hustota rozpúšťadla.

Za predpokladu, že platí nezávislosť objemov jednotlivých komponent, t. j. platí nasledujúca rovnica:

$$V = \sum_{i=1}^n V_i \quad (2.10),$$

aj molárna adiabatická stlačiteľnosť ϕ_K a molárny objem ϕ_V sú aditívne veličiny, tzn., že jednotlivé komponenty prispievajú k ich výslednej hodnote nezávisle jedna na druhej.

Aditívne sú aj zdánlivé molárne veličiny, tj. ϕ_K resp. ϕ_V vzťahnuté na adiabatický kompresibilitný koeficient rozpúšťadla (β_0). Táto aproximácia dobre platí pre veľmi zriedené roztoky ($< 10^{-3}$ mol/l).

$$\phi_K = \frac{1}{C} \sum_{i=1}^m [\phi_K]_i c_i \quad (2.11)$$

$$\phi_v = \frac{1}{C} \sum_{i=1}^m [\phi_v]_i c_i \quad (2.12)$$

kde:

- ϕ_k - celková molárna adiabatická stlačiteľnosť vzorky,
- M - molárna hmotnosť vzorky,
- β_0 - kompresibilitný koeficient rozpúšťadla,
- ρ_0 - hustota rozpúšťadla,
- $[\rho]$ - inkrement hustoty vzorky vzhľadom na rozpúšťadlo,
- $[u]$ - inkrement rýchlosti ultrazvuku,
- $[\phi_k]_i$ - molárna adiabatická stlačiteľnosť i -tej komponenty,
- φ_v - špecifický zdanlivý objem rozpustenej látky,
- $[\varphi_v]_i$ - špecifický zdanlivý objem i tej komponenty,
- C - celková molárna koncentrácia všetkých komponent,
- c_i - koncentrácia nezávislej zložky.

Aditívny je aj inkrement rýchlosti ultrazvuku $[u]$ (vzťah 2.13) z dôvodu prepojenia s adiabatickou stlačiteľnosťou a špecifickým objemom:

$$[u] = \frac{1}{C} \sum_{i=1}^m [u]_i c_i \quad (2.13)$$

Odklon veličiny $[u]$ od aditívnosti môže určovať mieru vzájomného pôsobenia medzi komponentmi roztoku.

Príspevky k týmto aditívnym veličinám tvoria jednotlivé rozpustené látky, ale aj ich subjednotky s rozdielnymi vlastnosťami ako napr. hydratačná vrstva či hydrofóbná kavita vnútri molekuly.

Neželaným príspevkom sú vzduchové bubliny vzniknuté nedostatočným odvzdušnením vzorky, pretože skresľujú meranie biofyzikálnych a chemických vlastností. Ich prasknutím môže dôjsť aj k poškodeniu biologickej vzorky.

2.6.3 Princíp denzitometrie

Podstatou presného merania hustoty je založené na určení prirodzenej periódy elektronicky budeného mechanického oscilátora s efektívnou hmotnosťou M_0 .

Mechanický oscilátor je sklenená trubica v tvare U s presne určeným objemom a rovinou kmitov. Po pridání látky do tohto oscilátora sa jeho hustota zvýši, čím sa jeho prirodzená frekvencia zníži. Vďaka elektronickému budiacemu systému denzitometra je možno zanedbať vplyv tlmených kmitov na frekvenciu oscilátora.

Pre hmotnosť oscilátora naplneného vzorkou potom platí :

$$m = M_0 + \rho V \quad (2.14)$$

kde: m - hmotnosť oscilátora naplneného vzorkou,

ρ - hustota vzorky v oscilátore,

V - objem vzorky v oscilátore,

M_0 - hmotnosť prázdneho oscilátora.

Pre frekvenciu oscilátora analogicky ako pre harmonický oscilátorom platí:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} = \sqrt{\frac{k}{M_0 + \rho V}} \quad (2.15)$$

kde: f - rezonančná frekvencia oscilátora,

k - tuhosť materiálu oscilátora,

m - hmotnosť oscilátora naplneného vzorkou,

V - objem vzorky v oscilátore,

ρ - hustota vzorky v oscilátore,

M_0 - hmotnosť prázdneho oscilátora.

Medzi frekvenciou f a periódou T oscilácií platí známy vzťah:

$$T = \frac{1}{f} \quad (2.16)$$

Na základe periódy kmitajúceho oscilátora môžeme vypočítať špecifický objem skúmanej vzorky v kvapalnej fáze.

3 Experimentálna časť

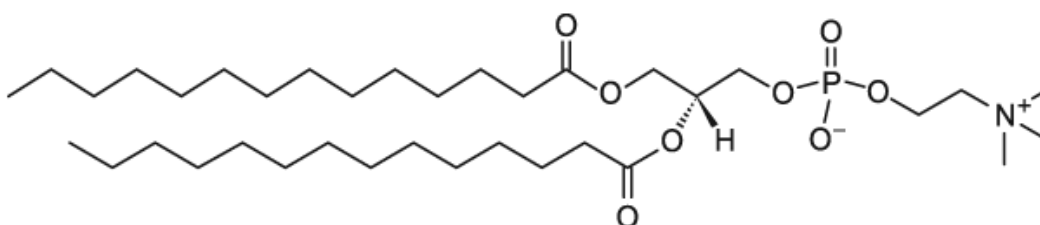
3.1 Materiály

3.1.1 Tlmivý roztok

Ako rozpúšťadlo všetkých zložiek v prevedených experimentoch bol výhradne použitý fosfátový tlmivý roztok PBS (phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) s prímiesou solí NaCl a KCl. Tlmivý roztok s koncentráciou 10 mmol/l a s pH 7,4 bol vytvorený rozpustením tabletky v 200 ml deionizovanej vody (ELIX 5, Millipore, USA) a následným prefiltrovaním cez filtračný papier. Výrobcom udávané hodnoty molárnych koncentrácií solí v takto pripravenom roztoku sú 0,0027 mol/l KCl a 0,137 mol/l NaCl. Tlmivý roztok sa skladoval v chladničke pri 4 °C.

3.1.2 DMPC

Štruktúra DMPC je zobrazená na nasledujúcom obrázku:



Obr.3.1: 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholín (Avanti Polar Lipids Inc., USA).

Tento amfifilný lipid bol použitý na prípravu unilamelárnych lipozómov (ULL). Použitá koncentrácia DMPC bola vo všetkých experimentoch 4 mg/ml. Molárna hmotnosť DMPC je 677,94 g/mol. DMPC bol skladovaný v mrazničke pri -20 °C. Na obale bol uvedený dátum výroby: 11. 6. 2010.

3.1.4 Cytochróm C

Na experimenty sa použil cytochróm C (cyt C) zo srdca býka (Bovine heart cytochrome C, Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) s molárnou hmotnosťou 12327 g/mol.

Pri príprave zásobných roztokov pre titráciu sa koncentrácia cyt C overila UV-VIS spektrofotometriou ($\epsilon_{410\text{nm}}$ 106100 dm⁻³ mol⁻¹cm⁻¹). Použitý cyt C bol v oxidovanom stave.

Koncentrácie cyt C (nmol/l) počas titrácie ULL z DMPC resp. ULL z DMPC s 10 mol % CX stúpali v tomto poradí: 1, 3, 10, 30, 100 nmol/l. Objemy pridávaného zásobného roztoku cyt C počas titrácie sa pohybovali v rozpätí 5 - 20 µl. Teploty počas titrácie boli zvolené tak, aby zachycovali správanie DMPC pred hlavným fázovým prechodom pri 18 °C, v oblasti fázového prechodu pri 25,5 °C a v oblasti fázy tekutého kryštálu L_α pri 30 °C.

3. 2 Metódy

3. 2. 1 LUVET

Unilamelárne lipozómy (ULL) boli pripravené extrukčnou metódou LUVET s použitím polykarbonátových membrán s rozmerom pórov 100 nm (R. C. MacDonald a kol., 1991).

Navážený DMPC v sklenenej okrúhlej banke sa rozpustil v chloroforme a vzniknutý roztok sa zamiešal. Na vytvorenie suchého biofilmu na stenách banky sa použil jemný prúd dusíka, ktorým sa odparoval chloroform po dobu približne 20 minút. Na úplné odparenie chloroformu sa nechala banka uzatvorená parafilmom s malými dierkami asi hodinu stáť. Vysušený biofilm sa hydratoval v tlmivom roztoku PBS ohriatom na asi 40°C a intenzívne sa premiešaval. Po ustálení teploty sa banka premiestnila do mrazničky (-20°C). Po zmrazení sa vzorka rozmrazila, zahrievala a intenzívne premiešala. Tento postup sa opakoval 4-5 krát. Výsledný roztok bol nepriehľadný, bielej farby (MLL). Vzorka sa potom pretláčala 21 krát cez polykarbonátové filtre s rozmerom pórov 100 nm (Millipore, USA) s použitím mini extrúdera (Avanti Polar Lipids, USA). Výsledný roztok ULL bol priehľadný.

Tento postup sa použil aj pri príprave lipozómov s kalix[6]arénom. Vypočítané množstvo kalix[6]arénu vo forme chloroformového roztoku sa pridalo pipetou k predtým

naváženému DMPC. Chloroformový roztok s kalix[6]arénom sa skladoval v mrazničke maximálne 2 dni.

3. 2. 2 Metódy molekulárnej akustiky

Ultrazvuková velocimetria

Velocimetrické merania prebiehali na monofrekvenčnom interferometri vyvinutom na KJFB, FMFI UK. Zariadenie pracovalo na princípe počítačom riadenej fázovo-frekvenčnej spätnej väzby. Akustické rezonátory s konštantným priemerom, ktoré sú najdôležitejšou súčasťou monofrekvenčného interferometra, boli skonštruované v Ústave teoretickej a experimentálnej biofyziky Ruskej akadémie vied (Pušino, Moskva, Rusko), dáta boli analyzované počítačom riadeným analyzátorom typu USAT 70162. Samotné merania prebiehali v dvoch rezonančných celách s konštantným priemerom. Rezonátor zabudovaný v stene cieľ je tvorený líthiumniobátovým piezokryštálom s hrúbkou 10 mm pokrytý zlatou elektródou. Jedna cela bola referenčná, v tomto prípade naplnená tlmivým roztokom, resp. tlmivým roztokom s cyt C a merná naplnená skúmanou vzorkou.

Objem vzoriek v celách bol 0,7 ml, vzorky boli pred meraním zbavené vzduchu metódou vytvorenia podtlaku v injekčnej striekačke. Meranie prebiehalo pri frekvenciách ultrazvuku 6,9 – 7,2 MHz. Keďže merania boli zamerané na zmeny závislé od teploty, merné cely boli pred meraním temperované na požadovanú teplotu 1 hodinu pred meraním, počas merania boli cely temperované 10 minút na každý 1°C termostatom Lauda RK 8 CS (Lauda Königshöfen, Nemecko) s presnosťou $\pm 0,1$ °C. Z nameraných dát sa vypočítal koncentračný inkrement rýchlosti ultrazvuku podľa vzťahu:

$$[u] = \frac{f_M - f_R - \Delta f_0}{(f_R + \Delta f_0)c} \quad (3.1),$$

kde: f - rezonančná frekvencia, indexy „M“ a „R“ určujú merný a referenčný rezonátor,
 c - špecifická koncentrácia rozpustenej látky, v našom prípade DMPC,

Δf_0 - korekčný faktor pre rezonančnú frekvenciu, zodpovedajúci rozdielu frekvencií rozpúšťadla v mernej a referenčnej cele.

Presnosť merania závisí od tepelnej stability celého systému, metóda diferenciálnych meraní túto chybu zmierňuje.

Denzitometria

Na presné denzitometrické merania bol použitý komerčne vyrábaný denzitometer, ktorý sa skladá z analyzátora periodických kmitov oscilátora DMA 60 a dvoch merných ciel DMA 602 (Anton Paar, Graz, Rakúsko) s meracím rozsahom hustoty $0,5 - 2 \text{ g/cm}^3$ ($\pm 5 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^3$, presnosť udávaná výrobcom pri teplotnej stabilite $\pm 0,01 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pri tomto meraní sa sledovala zmena hustoty látky v závislosti od meniacej sa teploty, preto celé zariadenie bolo potrebné temperovať aspoň 1,5 hodiny pred meraním pomocou pripojeného ultratermostatu Lauda RML6 (Lauda Königshöfen, Nemecko) s presnosťou $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Počas merania sa teplota zvyšovala o $1 \text{ }^\circ\text{C}$ alebo $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Celková presnosť merania závisí od citlivosti prístroja, tepelnej stability, presnej koncentrácii vzorky, či prípadných zvyškov vzorky usadených na stene oscilátora. Pri zahrnutí všetkých týchto efektov a minimalizácii systematických chýb možno tvrdiť, že presnosť merania hustoty bola približne 10^{-2} ml/g .

Pred meraním bola vzorka odvzdušnená pomocou podtlaku vytvoreného v injekčnej striekačke, objem oscilátora bol $0,7 \text{ ml}$. Vzorka sa do oscilátora vniesla pomocou striekačky jemným pohybom jej piestu tak, aby v oscilátore nevznikli vzduchové bubliny, ktoré by skreslili meranie. V prítomnosti vzduchových bublín v oscilátore hodnota meranej periódy kmitov oscilátora nekonverguje k stálej hodnote. Vývody oscilátora boli uzatvorené zátkami, aby sa obmedzil vplyv vonkajšieho prostredia na experiment.

Na kalibráciu denzitometra pre rozpúšťadlo umiestnené v referenčnej cele bolo potrebné určiť koeficienty A a B. Počas kalibračných meraní boli v mernej cele umiestnené voda a vzduch o známej hustote, kým v referenčnej cele bolo rozpúšťadlo. Na výpočet hustoty, resp. špecifického objemu DMPC v ULL bolo potrebné určiť aj hustotu rozpúšťadla.

Pre konštanty A a B platí:

$$A = \frac{k}{4\pi^2 V} \quad (3. 2)$$

$$B = \frac{4\pi^2 M_0}{k} \quad (3. 3)$$

kde k - tuhosť materiálu oscilátora,

M_0 - efektívna hmotnosť prázdneho oscilátora,

V – objem vzorky podieľajúci sa na kmitaní.

Pomocou konštanty k môžeme vypočítať hustotu vzorky v mernej cele - vzťah (3.5).

Experimentálne sa konštanta k stanoví zo vzťahu (3.4):

$$\rho_{vzduch} - \rho_{voda} = k(T_{vzduch}^2 - T_{voda}^2) \quad (3. 4)$$

$$\rho_0 = \rho_{voda} + k(T_0^2 - T_{voda}^2) \quad (3. 5) ,$$

kde: ρ_{voda} - tabuľková hustota vody,

ρ_{vzduch} - tabuľková hustota vzduchu rozpúšťadla,

T_{voda} - nameraná perióda kmitov oscilátora pre vodu,

T_{vzduch} - nameraná perióda pre vzduch,

ρ_0 - hustota rozpúšťadla, v našom prípade PBS,

T_0 - nameraná perióda pre rozpúšťadlo, v našom prípade PBS,

k - tuhosť materiálu oscilátora.

Špecifický zdanlivý objem vzorky, v našom prípade molekúl DMPC, možno vypočítať z koncentračného inkrementu hustoty podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\varphi_v = \frac{1}{\varphi_0} \left(1 - \left(\frac{\rho - \rho_0}{c} \right) \right) = \frac{1}{\rho_0 - [\rho]} \quad (3.6),$$

kde: φ_v je špecifický zdanlivý objem rozpustenej látky, v našom prípade DMPC,
 c je hmotnostná (špecifická) koncentrácia rozpustenej látky, v našom prípade DMPC,
 ρ_0 je hustota rozpúšťadla, v našom prípade PBS,
 ρ je hustota rozpustenej látky v mernej cele, v našom prípade DMPC,
 $[\rho]$ je koncentračný inkrement hustoty pre rozpustenej látky, v našom prípade DMPC.

Každá séria meraní bola vykonaná najmenej trikrát.

Výpočet adiabetickej stlačiteľnosti

Na základe nameraných hodnôt koncentračného inkrementu rýchlosti ultrazvuku $[u]$ a špecifického objemu φ_v sa vypočítala zdanlivá molárna adiabatická stlačiteľnosť:

$$\frac{\varphi_k}{\beta_0} = -2[u] - \frac{1}{\rho_0} + 2\varphi_v \quad (3.7),$$

kde: $[u]$ je inkrement rýchlosti ultrazvuku vztiahnutý na DMPC v ULL,
 ρ_0 je hustota rozpúšťadla, v našom prípade PBS,
 φ_v je zdanlivý špecifický objem vzorky, v našom prípade DMPC,
 φ_k/β_0 je zdanlivá adiabatická stlačiteľnosť vzorky, v našom prípade DMPC.

Namerané hodnoty boli vyhodnotené programom OriginPro 8 SR0. Obrázky sa spracovali v programe Gimp 2.6 (freeware) a ACD/ChemSketch 11.01 (freeware).

4 Výsledky a diskusia

V tejto časti sú predložené výsledky merania ultrazvukovou velocimetriou a denzitometriou, na základe ktorých bola vypočítaná hodnota adiabetickej stlačiteľnosti.

Získané hodnoty sú zobrazené na Obr. 4.1 až 4.3 a 4.6 až 4.14.

4.1 Vplyv kalix[6]arénu na fázový prechod ULL z DMPC

Pomocou ultrazvukovej velocimetrie a denzitometrie sa preskúmal vplyv predpokladanej interakcie kalix[6]arénu s ULL z DMPC (4 mg/ml) na koncentračný inkrement rýchlosti ultrazvuku a zdanlivého špecifického objemu v teplotnom rozmedzí 18 -30 °C. Tento teplotný interval zahrňuje fázový prechod DMPC z lamelárnej gélovej kryštalickej do lamelárnej tekutej kryštalickej fázy. Kalix[6]arén sa pridával k ULL z DMPC v týchto molárnych pomeroch: 1:100, 1:30 a 1:10.

Zo závislosti koncentračného inkrementu rýchlosti ultrazvuku (Obr. 4.1) je zrejmé, že kalix[6]arén (CX) ovplyvnil kooperativitu fázového prechodu lipidov v ULL. So zvyšujúcou sa koncentráciou CX dochádza k postupnému rozširovaniu fázového prechodu, znižovaniu jeho kooperativity (rovnica 2.2) a k poklesu adiabetickej stlačiteľnosti lipidovej dvojvrstvy (Obr. 4.3) t. j. dochádza k zvýšeniu rigidity dvojvrstvy. Pri najvyššej koncentrácii CX (10 mol %) fázový prechod DMPC takmer úplne vymizol. Zníženie zdanlivej adiabetickej kompresibility DMPC si môžeme vysvetliť pomocou rovnice (4.1):

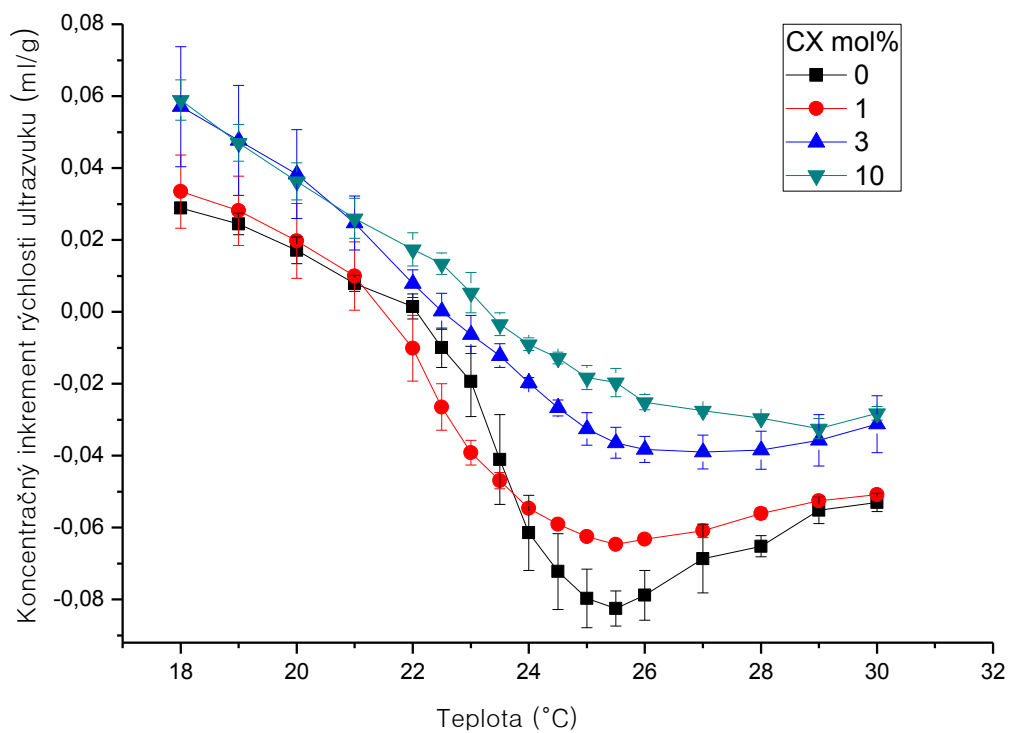
$$\beta_{TOT} = S_L \beta_L + (1 - S_L) \beta_{CX} \quad (4.1),$$

kde β_{TOT} je celkový koeficient adiabetickej stlačiteľnosti dvojvrstvy,

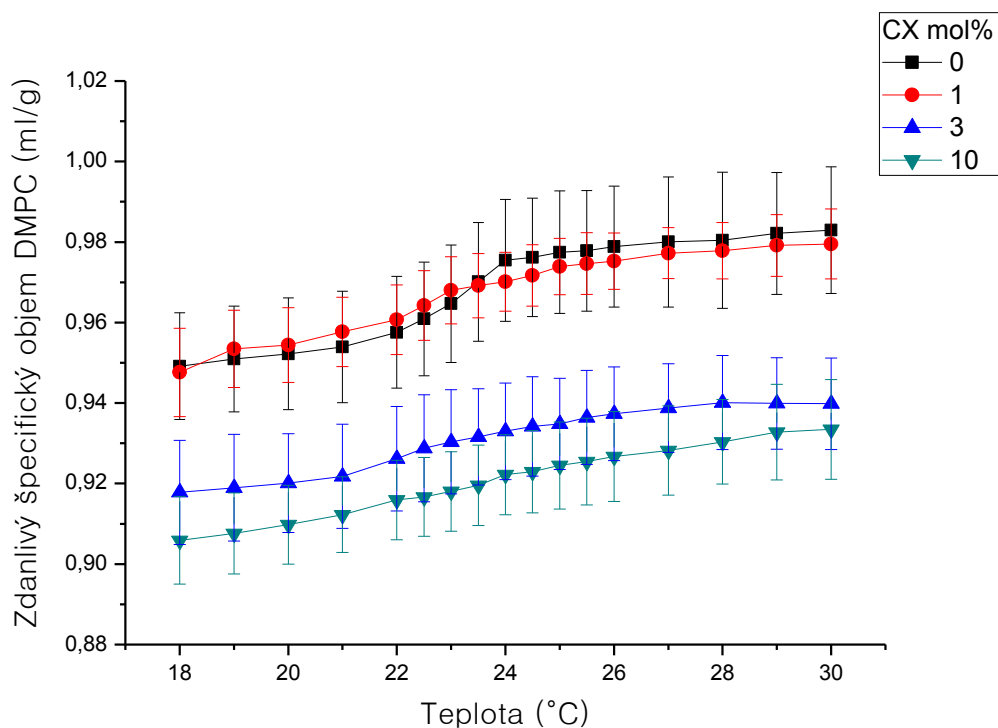
β_L je koeficient adiabetickej stlačiteľnosti nemodifikovanej dvojvrstvy z DMPC,

β_{CX} je koeficient adiabetickej stlačiteľnosti CX,

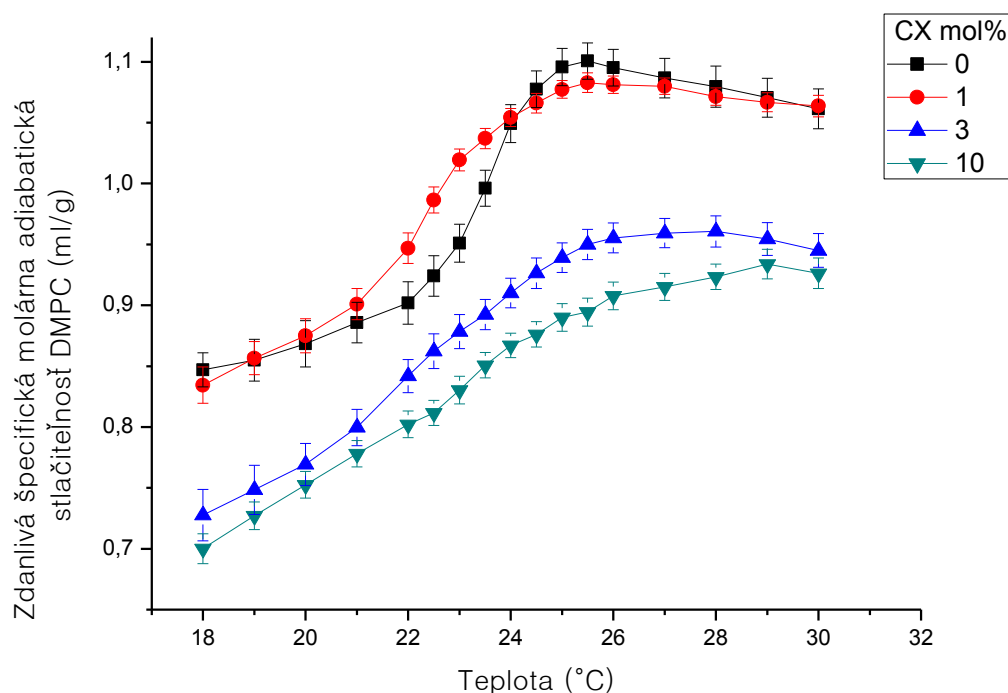
S_L je relatívna plocha nemodifikovanej lipidovej dvojvrstvy z DMPC.



Obr.4.1: Teplotná závislosť inkrementu rýchlosti ultrazvuku ULL z DMPC (4 mg/ml) s rôznym molárnym obsahom CX.



Obr. 4.2: Teplotná závislosť zdánlivého špecifického objemu ULL z DMPC (4 mg/ml) s rôznym molárnym obsahom CX.



Obr. 4.3: Teplotná závislosť zdanlivej špecifickej molárnej adiabetickej stlačiteľnosti ULL z DMPC (4 mg/ml) s rôznym molárnym obsahom CX.

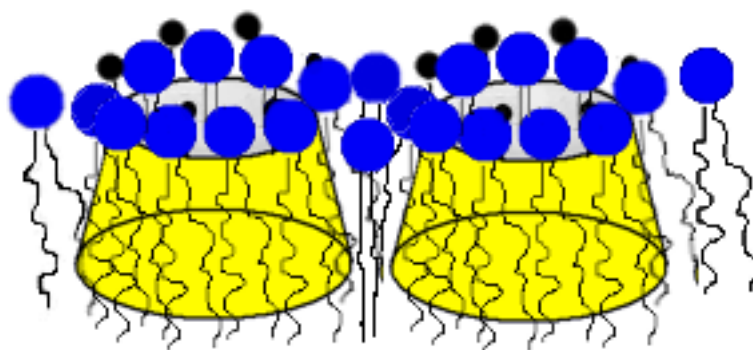
Pomocou merania povrchového tlaku monomolekulárnych filmov tvorených CX s použitím Wilhelmyho metódy bola určená stredná plocha na molekulu CX: $3,02 \text{ nm}^2$ (T.Hianik, Z. Garaiová a kol., 2011), ako aj stredná plocha na molekulu DMPC, $0,6 \text{ nm}^2$ (P. Vitovič a kol., 2007). Z toho vyplýva, že stredná plocha CX je až 5 krát väčšia ako stredná plocha na molekulu DMPC. Vzhľadom na rigidnú kostru CX predpokladáme, že $\beta_{CX} \ll \beta_L$. Preto rast koncentrácie CX v lipidovej dvojvrstve bude viesť k zníženiu β_{TOT} .

Zníženie fluidity ULL z DMPC s rastúcim obsahom CX v hydrofóbnej aj hydrofilnej časti boli zistené aj meraním fluorescenčnej anizotropie dvojvrstvy, pričom významná zmena nastala pri zabudovaní 3 mol % CX (Garaiová a kol., 2012).

Na Obr. 4.2 môžeme zo závislosti zdanlivého špecifického objemu taktiež pozorovať rozšírenie fázového prechodu. Z tejto závislosti sa grafickou metódou podľa Obr 4.5 určil rozsah fázového prechodu a teplota fázového prechodu (T_m). So zväčšovaním obsahu CX v ULL dochádza k posunu T_m k vyšším teplotám (viď. Tab. 4.1). Pre ULL s 10 mol % CX nebolo možné z Obr. 4.2 určiť šírku fázového prechodu, fázový prechod v danom rozsahu teplôt nebol rozoznateľný.

obsah CX [mol %]	rozsah fázového prechodu [°C]	teplota fázového prechodu [°C]
0	21-24	23
1	21-24	23
3	22-27	24,5

Tab. 4.1: Zmeny v rozsahu termotropného fázového prechodu a v teplote fázového prechodu T_m určeného grafickou metódou (viď. Obr. 4.5) z priemerných hodnôt zdanlivého špecifického molárneho objemu lipozómov s rôznym molárnym pomerom CX. Hodnota T_m bola určená ako medián z hodnôt teplôt v rozsahu fázového prechodu.

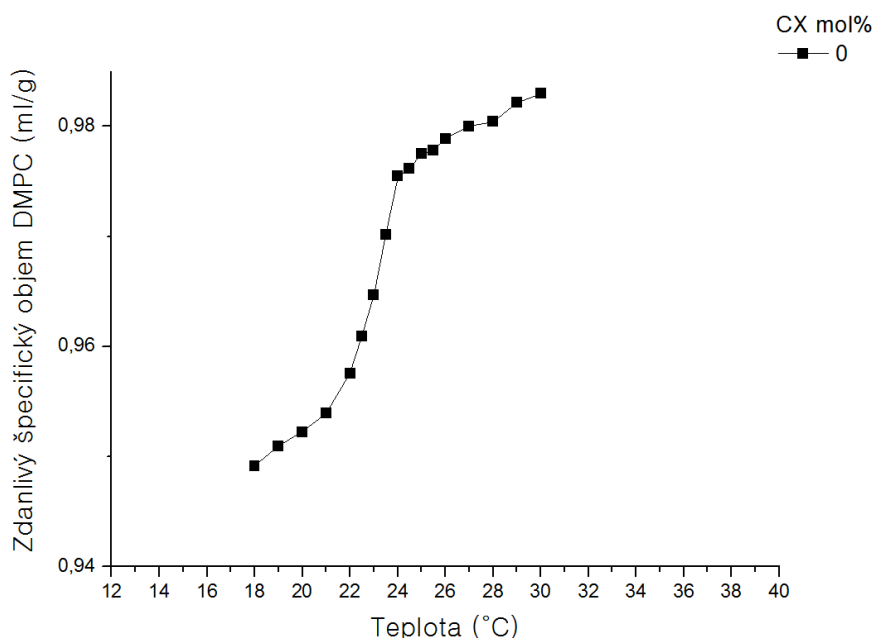


Obr. 4.4: Schematické znázornenie usporiadania lipidov DMPC okolo molekuly CX v dvovrstve ULL.

Na základe štruktúry CX a zistených termodynamických veličín pre DMPC v ULL sa domnievame, že došlo k interakcii aromatickej časti CX s ULL a k pevnému uchyteniu CX do štruktúry membrány, čo predpokladá zásah do štruktúry usporiadania DMPC v ULL a preusporiadanie ich molekúl v blízkosti zabudovaného CX. Predpokladáme, že molekuly DMPC sú usporiadané v tesnej blízkosti okolo CX (Obr.4.4) a natočené tak, aby interagovali svojou hydrofilnou časťou s hydrofilnou časťou CX a hydrofóbny reťazec bol v kontakte s hydrofóbnym aromatickým benzénom fenolu. Na základe zisteného pomeru 1:5 stredných plôch na molekulu pre ULL s CX a ULL bez CX (T. Hianik, Z. Garaiová a kol., 2011) predpokladáme, že okolo jednej molekuly CX sa môže usporiadať až 10 molekúl DMPC. Tento model vysvetľuje zníženie zdanlivého špecifického objemu DMPC (Obr. 4.2) a markantné zníženie adiatickej stlačiteľnosti dvojvrstvy (Obr.4.3) s rastúcou koncentráciou zabudovaného CX. Je potrebné podotknúť, že najvyšší molárny pomer

resp. pomer počtu častíc CX:DMPC pripravených ULL je 10:1, čo predpokladá tesné usporiadanie rigidných molekúl CX v dvojvrstve. Tento mechanizmus interakcie rozširuje základný model interakcie CX s ULL, v ktorom sa uvažuje interakcia hydrofóbných reťazcov lipidu s nepolárnymi 1,1,3,3-tetrametylbutylovými reťazcami CX.

Rozšírený model možno použiť na vysvetlenie výrazných zmien špecifického objemu a adiabatckej stlačiteľnosti dvojvrstvy zabudovaním CX s obsahom 3 a 10 mol %. Tento model, ktorý predpokladá hlboké sa vnorenie do dvojvrstvy, podporuje aj zvyšujúca sa hodnota fluorescenčnej anizotropie dvojvrstvy so zvyšujúcim sa obsahom CX, ktorá poukazuje na výrazné zníženie fluidity v hydrofóbnej aj v hydrofilnej časti dvojvrstvy pre ULL z DMPC s obsahom CX 3 a 10 mol %. (Z. Garaiová a kol., 2012).



Obr. 4.5: Schematické znázornenie určenia šírky fázového prechodu zo závislosti zdanlivého špecifického objemu DMPC na teplote.

4.2 Vplyv cytochrómu C na termodynamické parametre ULL z DMPC so zabudovaným kalix[6]arénom

Podľa výsledkov v predchádzajúcej kapitole (Obr. 4.1 až 4.3, Tab. 4.1) možno usúdiť, že najväčší vplyv na usporiadanie DMPC v ULL mal 10 mol % CX. CX v tejto molárnej

koncentracii spôsobil zvýšenie adiabatickej stlačiteľnosti, zníženie stupňa usporiadanosti ULL a nezreteľný hlavný fázový prechod. Merania hydrodynamického priemeru dynamickým rozptylom svetla, zeta potenciálu (Z. Garaiová a kol., 2011) a fluorescenčnej anizotropie ULL z DMPC (Z. Garaiová a kol., 2012) vykazovali najväčšiu zmenu hodnoty s 10 mol % CX. Preto na štúdium interakcie cyt C s CX boli použitý práve ULL s 10 mol % CX³.

Teploty počas titrácie boli zvolené tak, aby zachytili správanie ULL z DMPC vo fáze gélu L_β (18 °C), v oblasti fázového prechodu (25,5 °C) a v oblasti fázy tekutého kryštálu L_α (30 °C).

Predchádzajúce práce (T.Hianik T., Z. Garaiová a kol., 2011; M.A. Moshin a spol., 2011) ukázali, že skokové zmeny v študovaných parametroch nastávajú už pre nanomolárne koncentrácie cyt C, avšak zistila sa tendencia cyt C vytvárať agregáty už pri 30 nmol/l, taktiež metóda QCM poukázala nepriamo na vznik agregátov molekúl cyt C (T. Hianik a spol. 2011).

Na Obr. 4.6 je zobrazená závislosť inkrementu rýchlosti pre DMPC ULL s 10 mol % CX pri titracii cyt C. Cyt C spôsobil exponenciálny pokles inkrementu rýchlosti ultrazvuku vo fáze gélového kryštálu aj vo fáze hydratovaného tekutého kryštálu. Cyt C ovplyvnil viac fáz gélového kryštálu (18 °C). V oblasti teploty fázového prechodu (25,5 °C) sa inkrement rýchlosti ultrazvuku dvojvrstvy mierne zväčšil, čo svedčí o tom, že CX narušil kooperativitu fázového prechodu ULL z DMPC. Smerodajné odchýlky inkrementu rýchlosti ultrazvuku sú najväčšie pri tejto teplote, čo svedčí o celkovej nestabilite meraných hodnôt. Inkrement rýchlosti ultrazvuku pre ULL z DMPC (Obr. 4. 7) sa prakticky nezmenil.

So zvyšujúcou sa koncentráciou cyt C rastie takmer lineárne zdanlivý špecifický objem aj zdanlivá molárna adiabatická stlačiteľnosť dvojvrstvy s 10 mol % CX pri teplote 25,5 °C a 30 °C (Obr. 4.8, 4.10). Pri teplote 18 °C vo fáze hydratovaného gélu L_β je však nárast týchto veličín v rozmedzí koncentracii cyt C 0 - 10 nmol/l väčší ako pri iných teplotách (Obr. 4.8. a Obr. 4.10), čo je v súlade s výsledkami ultrazvukovej velocimetrie.

³ Stabilné ULL z DMPC s väčšou koncentráciou CX s vzhľadom na priemernú plochu na molekulu oboch komponent už nie je možné pripraviť (kap. 3.3).

Cyt C ovplyvnil dvojvrstvu s obsahom CX 10 mol % výrazne práve vo fáze gélu, keď dochádza k najväčšej zmene meraných termodynamických veličín.

Grafickou metódou (Obr.4.5) sme určili detekčný limit ULL z DMPC s CX pre cyt C s pomerom signál:šum 3:1. Tento detekčný limit s teplotou klesá (Tab.4.2).

Teplota [°C]	Detekčný limit cyt C [nmol/l]	Smerodajná odchýlka ⁴
18	5,7	0,01
25,5	22,5	0,08
30	30	0,08

Tab. 4.2: Detekčné limity navrhovaného bioreceptora pre cyt C pri teplotách 18 °C, 25 °C a 30 °C s pomerom signál:šum 3:1 . Určené grafickou metódou podľa obr. 4.15.

Vyššie uvedené zmeny v termodynamických veličinách možno vysvetliť zväčšením solvatačného obalu dvojvrstvy, kde voda vytvára vysoko usporiadanú málo stlačiteľnú štruktúru. Táto hydratačná vrstva je stabilnejšia pri nižšej teplote, t. j. pri 18 °C, pri 30 °C ruší jej usporiadanie tepelný pohyb častíc okolitých molekúl rozpúšťadla.

Zistilo sa, že, prítomnosť cyt C vo vodnej subfáze spôsobovala rast strednej plochy na molekulu CX v monovrstvách tvorených CX (T.Hianik, Z. Garaiová a kol., 2011). Možno preto predpokladať, že CX v prítomnosti cyt C stláčal dvojvrstvu, čo spôsobilo zväčšenie plochy na molekulu lipidu DMPC. Podľa tohto modelu predpokladáme nárast laterálneho rozmeru dvojvrstvy a súčasné zmenšenie hrúbky dvojvrstvy.

Pre nemodifikované ULL z DMPC nedošlo k výrazným zmenám meraných termodynamických veličín (Obr. 4.7, 4.9. a 4.11). Preto sa domnievame, že v tomto

⁴ Smerodajná odchýlka pre detekčný limit cyt C je určená zo smerodajných odchýlok zdanlivého špecifického objemu. Variačný koeficient súboru nameraných hodnôt zdanlivého špecifického objemu je menší ako 12 %. Presnosť určenia špecifického objemu je 10^{-2} ml/g vid'. kap. 3. 2. 2 Metódy molekulárnej akustiky).

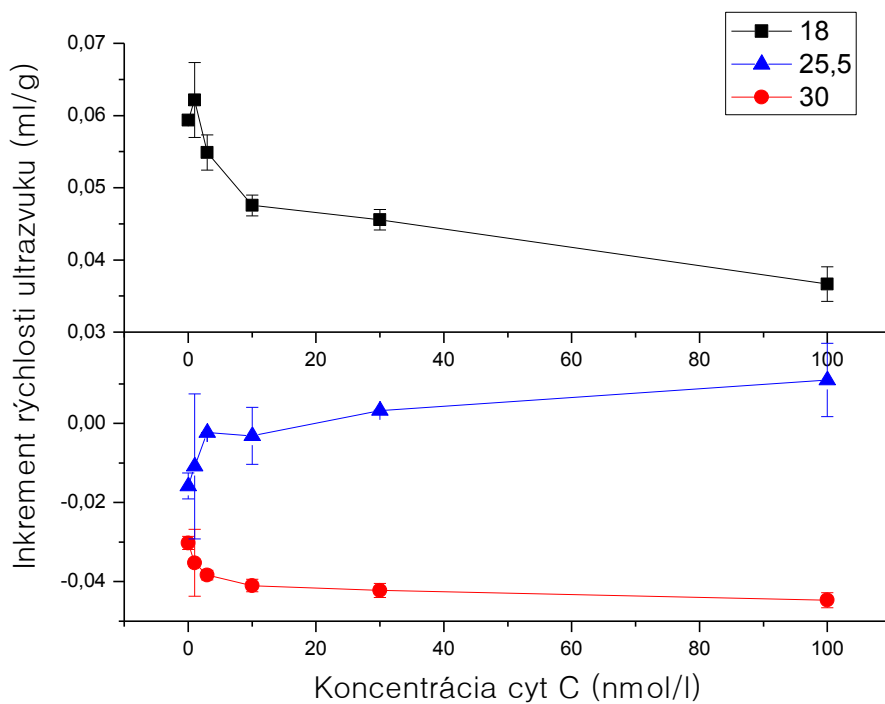
prípade došlo iba k obmedzenému ovplyvneniu usporiadania dvojvrstvy molekulami cyt C v rozpúšťadle.

Obr. 4.12 až 4.14 zachytávajú celkový efekt cyt C na inkrement rýchlosti ultrazvuku, zdanlivý objem a zdanlivú adiabatickú stlačiteľnosť dvojvrstvy pre ULL z DMPC a pre ULL z DMPC modifikované CX s obsahom 10 mol %.

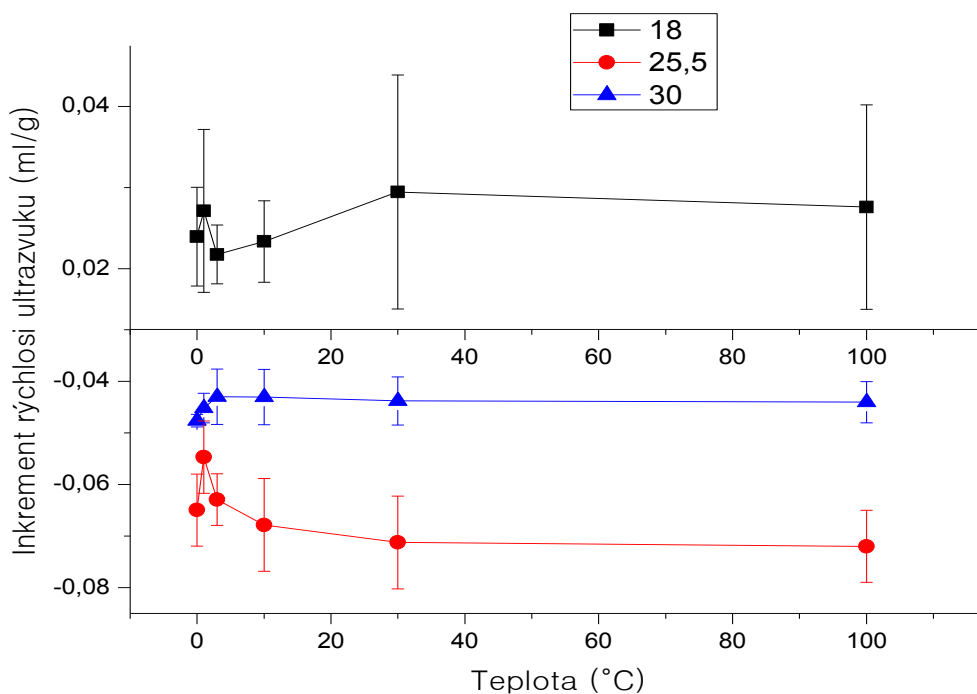
Pre modifikované ULL z DMPC v prítomnosti molekúl cyt C s koncentráciou 100 nmol/l úplne vymizol charakteristický fázový prechod molekúl DMPC, zdanlivý objem dvojvrstvy sa zväčšil a zdanlivá molárna adiabatická stlačiteľnosť vzrástla. Relatívna zmena zdanlivého objemu pre modifikované ULL z DMPC v prítomnosti cyt C s koncentráciou 100 nmol/l voči modifikovaným ULL z DMPC bez prítomnosti cyt C je približne 20 % a relatívna zmena zdanlivej adiabetickej stlačiteľnosti pre tieto ULL je až 40 %.

Pre nemodifikované ULL z DMPC neboli pozorované výrazné zmeny meraných termodynamických veličín v prítomnosti cyt C. V prípade merania teplotnej závislosti inkrementu rýchlosti došlo k posunu minima o $+0,5^{\circ}\text{C}$, čo môže byť spôsobené nešpecifickou interakciou cyt C aj s nepolárnym zwitteriónovým DMPC. Predpokladáme, že mohlo dôjsť k ovplyvneniu hydratačnej sféry aj dvojvrstvy ako aj molekuly cyt C počas fázového prechodu ULL. Pri nižších a vyšších teplotách sa neobjavila výrazná zmena v priebehu koncentračného inkrementu rýchlosti ultrazvuku. AFM štúdie na dvojvrstvách DMPC upevnených na pevnom povrchu (sBLM) potvrdzujú interakciu cyt C s zwitteriónovými membránami a interkaláciu cyt C do dvojvrstvy v gélovej (L_{β}) aj fluidnej (L_{α}) lamelárnej fáze (S. Morandat, E.K. Kirat, 2007; E. K. Kirat, S.Morandat, 2011). Pre preskúmanie vplyvu cyt C na ULL z DMPC by bolo vhodné zistiť jeho konformačné zmeny počas interakcie.

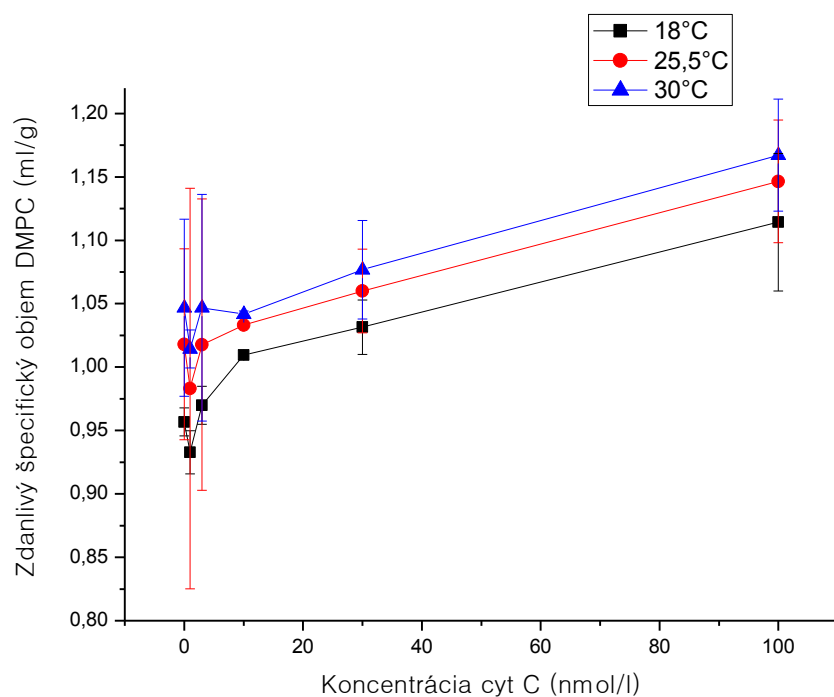
Zistené hodnoty termodynamických veličín potvrdili použiteľnosť ULL z DMPC modifikovaného CX ako umelého receptora pre cyt C už v nanomolárnych koncentráciách. Metódy molekulárnej akustiky ultrazvuková velocimetria a denzitometria sú vhodné na zachytenie zmien v dvojvrstve ULL z DMPC spôsobené ich modifikáciou CX a následne pridávaným cyt C.



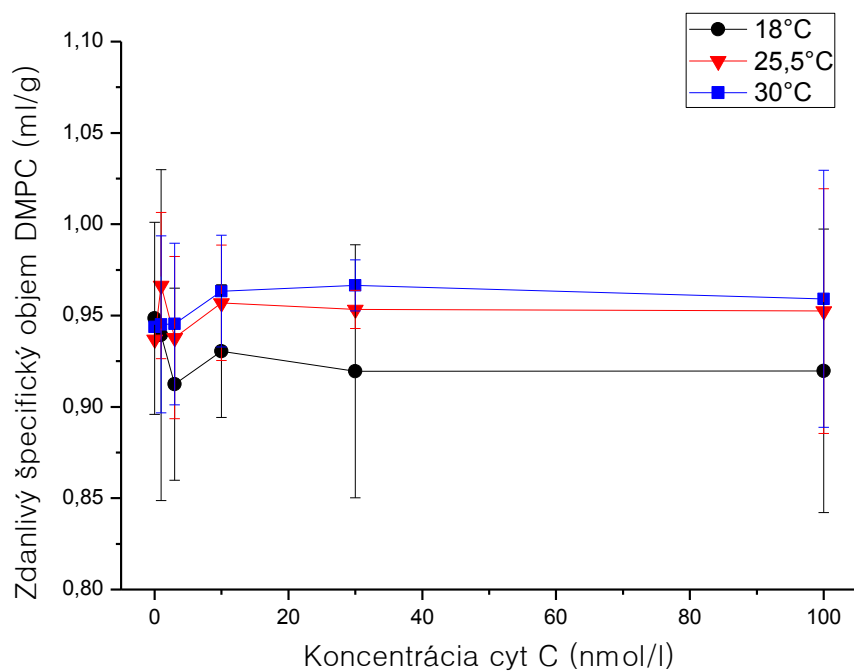
Obr. 4.6: Inkrement rýchlosti ultrazvuku pre DMPC (4 mg/ml) v lipozómoch DMPC/CX s molárnym pomerom 10/1 počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



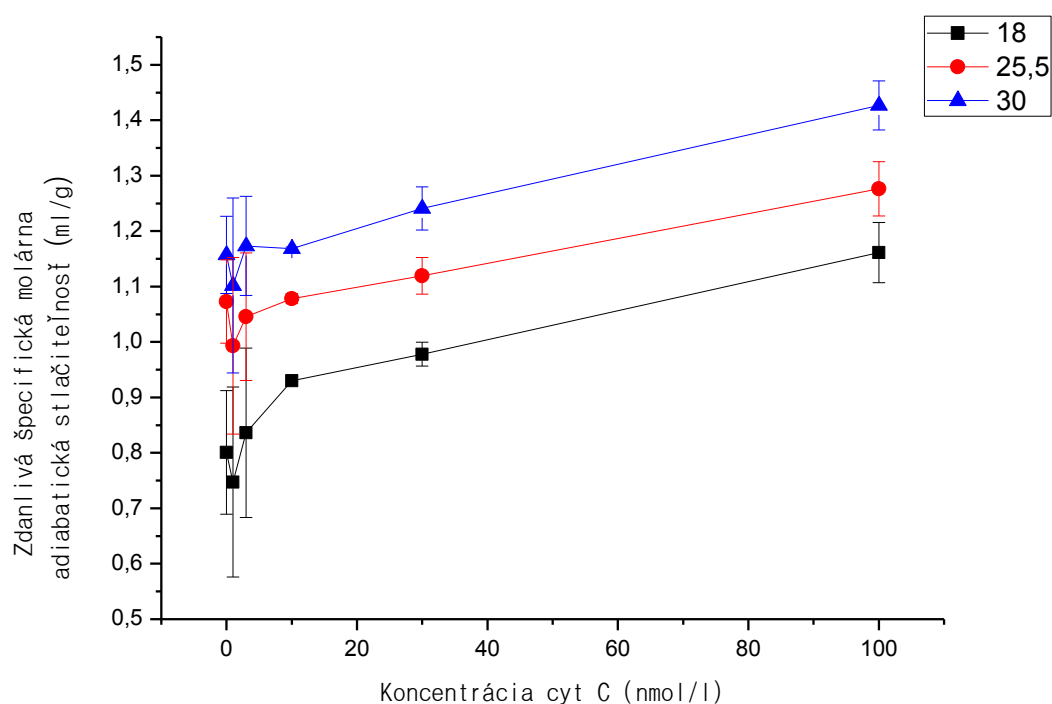
Obr. 4.7: Inkrement rýchlosti ultrazvuku pre DMPC (4 mg/ml) v lipozómoch DMPC počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



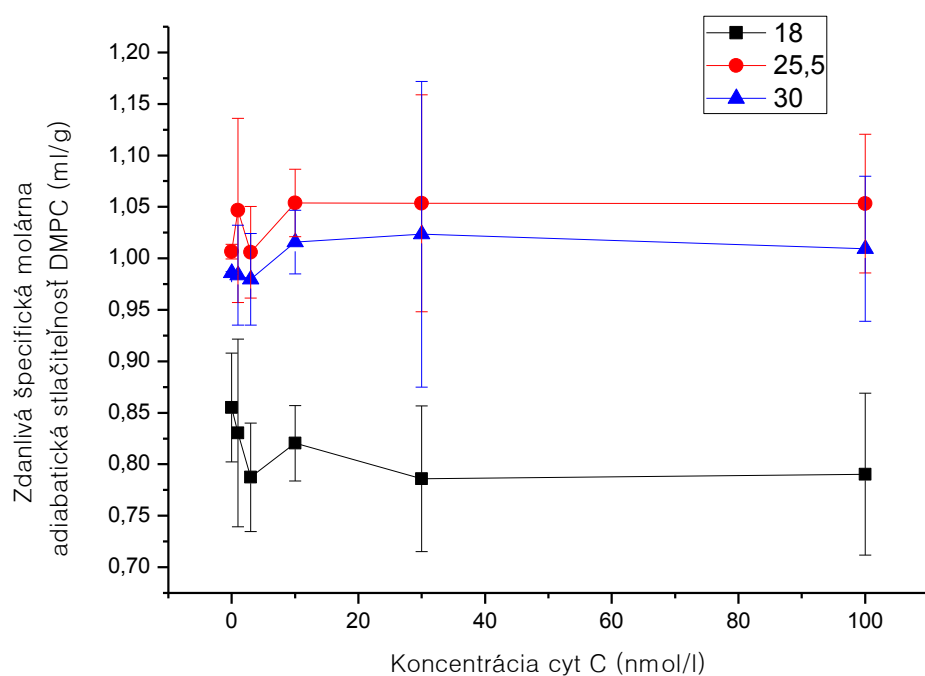
Obr.4.8: Zdanlivý objem ULL z DMPC (4 mg/ml) s obsahom CX 10 mol % počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



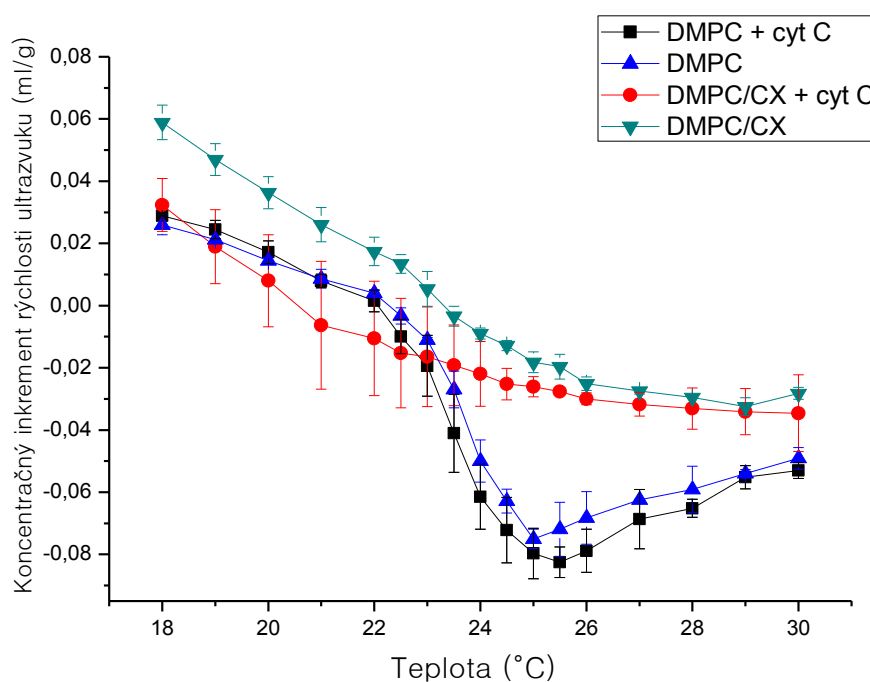
Obr.4.9: Zdanlivý objem ULL z DMPC (4 mg/ml) počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



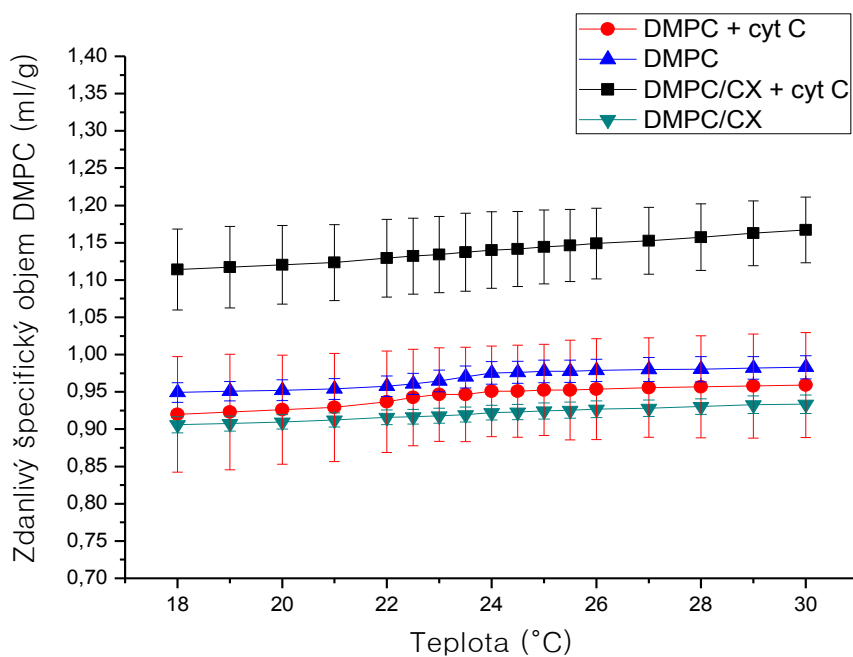
Obr. 4.10: Zdanlivá adiabatická stlačiteľnosť ULL z DMPC (4 mg/ml) modifikovaných 10 mol. % CX počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



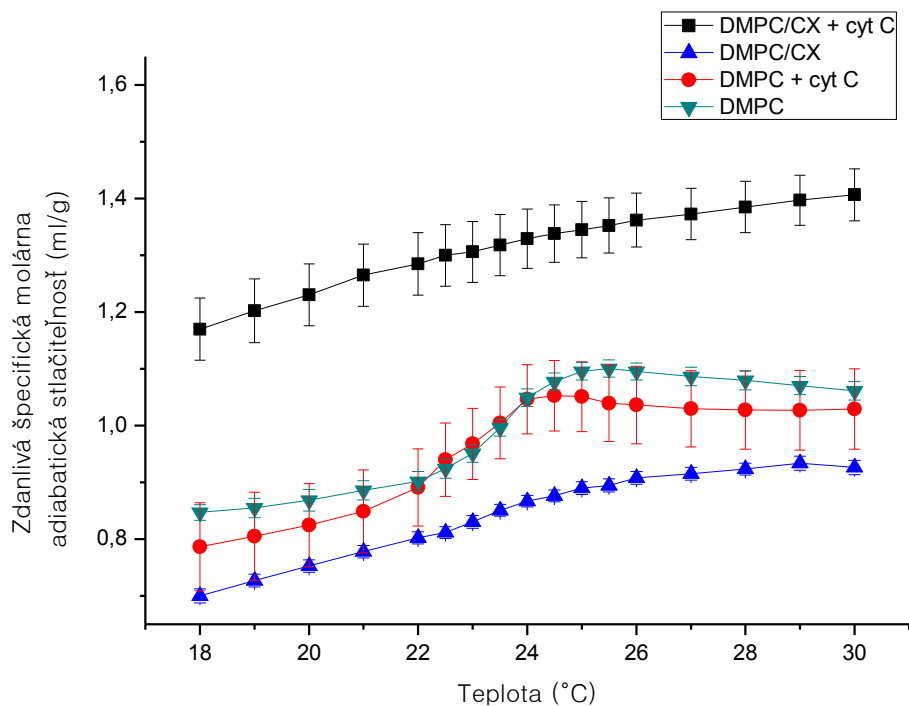
Obr 4.11: Zdanlivá adiabatická stlačiteľnosť ULL z DMPC (4 mg/ml) počas titrácie cyt C pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C.



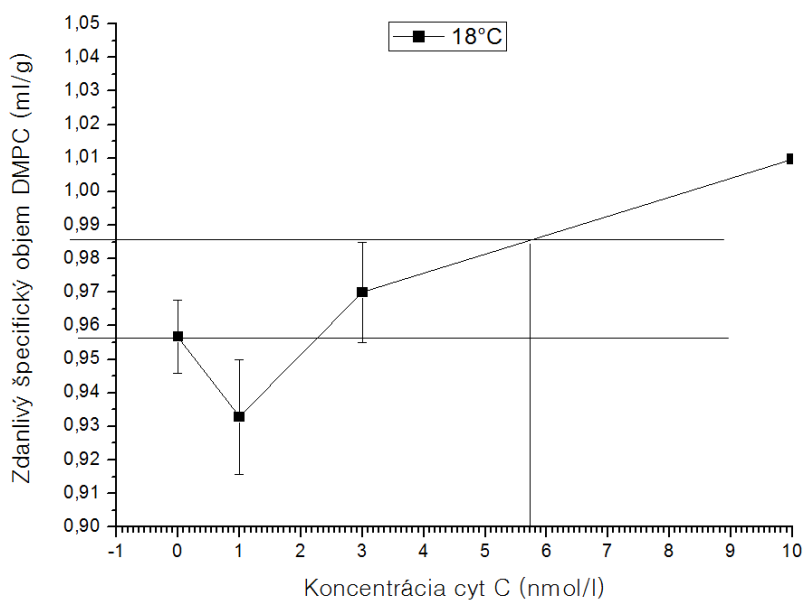
Obr.4.12: Teplotná závislosť inkrementu rýchlosti ultrazvuku nemodifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) a modifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) s obsahom CX 10 mol. % pred titráciou a po titrácii 100 nmol/l cyt C.



Obr. 4.13: Teplotná závislosť zdanlivého objemu stlačiteľnosti nemodifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) a modifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) s obsahom CX 10 mol % pred titráciou a po titrácii 100 nmol/l cyt C.



Obr. 4.14: Teplotná závislosť adiabetickej stlačiteľnosti nemodifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) a modifikovaných ULL z DMPC (4 mg/ml) s obsahom 10 mol. % CX pred titráciou a po titrácii 100 nmol/l cyt C.



Obr. 4.15: Schematické znázornenie určenia detekčného limitu cyt C s pomerom signál šum 3:1.

6 Záver práce

Predmetom tejto diplomovej práce bolo experimentálne štúdium vplyvu CX na fyzikálne vlastnosti ULL tvorených molekulami DMPC v rozsahu teplôt zahrňujúcich hlavný fázový prechod DMPC (18 až 30 °C). Vplyv cyt C na štruktúrne a termodynamické veličiny ULL s CX a bez CX boli skúmané v rozsahu koncentrácií cyt C 1-100 nmol/l pri teplotách 18 °C, 25,5 °C a 30 °C. Použité boli metódy molekulárnej akustiky: ultrazvuková velocimetria a denzitometria. Z výsledkov vyplýva, že:

1. zabudovaním CX do ULL z DMPC dochádza k vzniku defektov, ktoré porušujú kooperativitu hlavného fázového prechodu DMPC, dochádza k zníženiu stupňa usporiadanosti DMPC v ULL.
2. zvyšujúca sa koncentrácia CX v ULL z DMPC vedie k zmenšeniu špecifického objemu a adiabatckej stlačiteľnosti dvojvrstvy, rozšíreniu fázového prechodu a zvýšeniu teploty fázového prechodu, T_m .
3. pre ULL z DMPC s obsahom CX 10 mol % došlo k vymiznutiu fázového prechodu charakteristického pre DMPC.
4. cyt C výrazne zvýšil adiabatckú stlačiteľnosť lipidovej dvojvrstvy (približne o 40 %) a špecifický objem (približne o 20 %) modifikovaných ULL z DMPC s obsahom CX 10 mol %. už pri koncentrácii cyt C 10 nmol/l.
5. cyt C nespôsobil výrazné zmeny meraných termodynamických veličín v nemodifikovanej dvojvrstve, bez CX.
6. ULL z DMPC s obsahom CX 10 mol % sa ukázal byť vhodným receptorom na detekciu nanomolárnych koncentrácií cyt C: v gélovej fáze (18 °C) bol stanovený detekčný limit pre cyt C $5,7 \pm 0,01$ nmol/l, vo fáze tekutého kryštálu (30 °C) klesla citlivosť detekcie pre cyt C na $30 \pm 0,08$ nmol/l.
7. metódy molekulárnej akustiky boli vhodné na detekciu subtlých zmien v usporiadaní dvojvrstvy.

7 Zoznam použitej literatúry

1. Alakoskela, J. M., Jutila, A, Simonsen, A. C., Pirneskoski, J, Pyhäjoki, S., Turunen, R., Marttila, S, Mouritsen, O. G., Goormaghtigh, E., Kinnunen, P. K. (2006) Characteristics of Fibers Formed by Cytochrome c and Induced by Anionic Phospholipids. *Biochemistry* **45**, 13447-13453.
2. Babincova ,M., Babinec , P. (2009) Magnetic drug delivery and targeting: principles and applications., *Biomedical papers of the Medical Faculty of the Univerzita Palackého, Olomouc* **153**, 243-50.
3. Banci, L. et al. (1997). Solution structure of oxidized horse heart cytochrome C, NMR,minimized average structure. *Biochemistry* **36**, 9867–9877.
4. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
5. Bartlett, P. N. (2008) Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications, 1st. ed. New York: *Wiley*, 2008. 494 p. ISBN-13: 978-0470843642.
6. Bernad, S., Ollerich, S., Soulomane, T., Noinville, S., Baron, M., Paternostre, M., Lecomte, S. (2004) Interaction of horse heart and thermus thermophilus type c cytochromes with phospholipid vesicles and hydrophobic surfaces. *Biophys. J.* **86**, 3863 – 3872.
7. Comte, J., Maisterrena, B., Gautheron, D. C. (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **419**, 271-284.
8. de Kruijff, B., Verkleij, A. J., Tilcock C. P. S. (1985). Phospholipid and Cellular Regulation 1 (J. F. Kuo, ed.), Boca Raton: *CRC Press*, 1985. pp. 1-60.
9. de Kruijff, B. , Cullis P. R., Radda G.K. (1975) Differential scanning calorimetry and ³¹P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes, *Biochim Biophys Acta* **406**, 6-20.

10. Denisov, I., McLean, M., Shaw, A., Grinkova, Y. (2005) Thermotropic Phase Transition in Soluble Nanoscale Lipid Bilayer, *J. Phys Chem B.* **109**, 15580–15588.
11. Eggeling, Ch., Ringemann, Ch., Hell, S. W. et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159-116.
12. Garaiová, Z. a spol. (2012). Fluorescence anisotropy measurements of lipid vesicles incorporated calixarenes. Bratislava: *Zborník Vth. Slovak Biophys. Symposium*, FMFI UK, 2012. s. 71-72.
13. Garaiová, Z., Moshin, A. M., Vargová V., Banica, F. G., Hianik, T. (2011). Complexation of cytochrome c with calixarenes incorporated into the lipid vesicles and supported membranes. *Bioelectrochemistry*. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2011.12.004.
14. Garrier, E., Gac, S. L., Jabin, I. (2005) First enantiopure calix[6]aza-cryptand: synthesis and chiral recognition properties towards neutral molecules. *Tetrahedron Asymmetry* **16**, 3767-3771.
15. Green, D. R. (2005) Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674.
16. Hale, J. E., Schroeder, F. (1982) Asymmetric transbilayer distribution of sterol across plasma membranes determined by fluorescence quenching of dehydroergosterol. *Eur. J. Biochem.* **122**, 649-661.
17. Hianik, T., Rybár, P., Kostner, G.M., Hermetter, A. (1997). Molecular acoustic as a new tool for the study of biophysical properties of lipoproteins, *Biophys. Chem.* **67**,. 221-228.
18. Hianik, T. Haburčák, M., Lohner, K., Prenner, E., Paltauf F., Hermetter A. (1998) Compressibility and density of lipid bilayers composed of polyunsaturated phospholipids and cholesterol, *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects* **139**, 189-197.
19. Hianik, T., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Garaiová, Z., Vargová, V., Karpišová, I. (2011) The Study of the interaction of Cyt c with calixarenes incorporated into the vesicles or supporting lipid films. *Acta Physica Universitatis Comenianae* **LII**, 19-32.

20. Hianik, T., Garaiová Z., Vargová, V., Vitovič, P. (2011) Štúdium interakcie cyt C s kalixarénmi zabudovanými do lipidových membrán, *Čs. čas. fyz.* **61**, 194-198.
21. Heimburg, T. (1998) Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim.Biophys. Acta* **1415**,147–162.
22. Huang, S. L. (2008) Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Advance drug delivery reviews.* **60**, 1167-1176.
23. Israelachvili, J. N., Marcelja, S., Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* **13**, 121-200.
24. Johnston, L. J. (2007) Nanoscale imaging of domains in supported lipid membranes. *Langmuir* **23**, 5886-95.
25. Kharakoz, D.P. (2002) Phase-Transition-Driven Synaptic Exocytosis: A Hypothesis and Its Physiological and Evolutionary Implications. *Bioscience Reports* **11**, 802-829
26. Kirat, E.K., Morandat, S. (2009) Cytochrome c interaction with neutral lipid membranes: influence of lipid packing and protein charges. *Chemistry and Physics of Lipids* **162**, 17–24.
27. Kirat, K., Morandat, S. (2011) Cytochrome c provokes the weakening of zwitterionic membranes as measured by force spectroscopy. *Colloids and Surfaces B* **82**, 111-117
28. Krivánek, R., Rybár, P., Prenner, J.E. (2001) Interaction of the antimicrobial peptide gramicidine S with dymiritoyl-phosphatidylcholine bilayer membranes: a densitometry and sound velocimetry study, *Biochim. and Biophys. Acta* **1510**, 452-463.
29. Koynova, R., Caffrey, (1998) M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim Biophys Act* **1376**, 91-145.
30. Kurzchalia,T.V., Parton, R.G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 424–431.

31. Lee, A. G. (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **472**, 285–344.
32. Lord, C.C. et al. (2012) CGI-58/ABHD5-derived signaling lipids regulate systemic inflammation and insulin action. *Diabetes* **61**, 355-63.
33. MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco B. P., Takeshita K., Subbarao N. K., Hu L. R. (1991). Small volume extrusion apparatus for preparation large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297.
34. Marsch, D. et al. (1997) Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **465**, 500–514.
35. Mabrey, S., Sturtevant, S. (1976) Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 3862-3866.
36. Matsuki H. et al. (2012) Volumetric characterization of ester- and ether-linked lipid bilayers by pressure perturbation calorimetry and densitometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **92**, 232–239
37. Mondal, M., Mesmin, B., Mukherjee, S., Maxfield, F. R. (2009) Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 581-588.
38. Mohsin, A. M., Banica, F.G., Oshima, T., Hianik, T. (2011) Electrochemical impedance spectroscopy for assessing the recognition of cytochrome c by immobilized calixarenes. *Electroanalysis* **23**, 1229 – 1235.
39. Morandat, S., Kirat, K. E. (2007) Real-time atomic force microscopy reveals cytochrome c-induced alterations in Neutral Lipid Bilayers. *Langmuir* **23**, 10929-10932.
40. Mostofsky, D., Yehuda, S., Salem, N. (2001). Fatty Acids: Physiological and Behavioral Functions. 1st ed. New York: *Humana Press*, 2001. 464 p. ISBN-13: 978-0896039421.

41. Nagle, S. T., Nagle, J. F. (2004) Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions. *Chemistry and Physics of Lipids* **127**, 3–14.
42. Nelson, D., Piran, T., Weinberg, S. (2004) Statistical Mechanics of Membranes and Surfaces. 2nd ed. Singapore: *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, 2004. 442 p. ISBN-13: 978-9812387608.
43. Ohto, K., Yano, M., Inoue, K., Yamamoto, T., Goto, M., Nakashio, F., Shinkai, S., Nagasaki, T. (1995) Solvent extraction of trivalent rare earth metal ions with carboxylate derivatives of calixarenes. *Anal. Sci.* **11**, 893-902.
44. Ochendusko, A., Buckin, V. (2010) Real-time monitoring of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin in aqueous solution using high-resolution ultrasonic spectroscopy. *J. Thermophys* **31**, 113-130
45. Oshima, T., Katsutoshi, I., Uezu, K. a Goto, M. (2004) et al. Dominant factors affecting extraction behavior of amino compounds by a calix[6]arene carboxylic acid derivative. *Analytica Chimica Acta* **509**, 137–144.
46. Oshima, T., Higuchi, H., Ohto, K., Inoue, K., Goto, M. (2005) Selective extraction and recovery of cytochrome c by liquid–liquid extraction using a calix[6]arene carboxylic acid derivative. *Langmuir* **21**, 7280-7284.
47. Oshima, T. et al. (2007) Liquid membrane transport of cytochrome c using a calix[6]arene carboxylic acid derivative as a carrier. *Journal of Membrane Science* **37**, 284-291.
48. Rappolt, M. (2000) New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *Biophys. J.* **29**, 125-133.
49. Rybár, P. (2004) Štúdium vplyvu oxidačných procesov na fyzikálne vlastnosti biokoloidov : dizertačná práca, Bratislava: KJFB FMFI UK, 2004. 137 s.
50. Silvestri, R. L., Koenig, J. L. (1994) Spectroscopic characterization of trans-gauche isomerization in liquid crystal polymers with two nematic states, *Polymer* **35**, 2528–2537.

51. Simons, K., Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 568–572.
52. Singer, S. J., Nicholson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
53. Skwarek, M. (2004) Recent controversy surrounding lipid rafts, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **52** , 427–431.
54. Spiegel, S., Foster, D., Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 159-167.
55. Stier, A., Sackmann, E. 1973. Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous Lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 400-408.
56. Tokumasu, F., Jin, J., Dvorak, A. (2002). Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. *Journal of Electron microscopy* **51**,1-9.
57. Tresset, G. (2009) PMC Biophys. chap. 2.3. <http://www.physmathcentral.com/1757-5036/2/3>.
58. van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112-124.
59. Vance D. E., Vance J. E. (1991) Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam: *Elsevier*, 1991. 648 p. ISBN: 978-0-444-89321-5.
60. Vitovič, P., Weis, M., Tomčík, P., Cirák, J., Hianik, T. 2007. Maxwell displacement current allows to study structural changes of gramicidin A in monolayers at the air–water interface. *Bioelectrochemistry* **70**, 469-480.
61. Vestergaard M., Hamada T., Takagi M. (2008) Using Model Membranes for the Study of Amyloid beta:Lipid Interactions and Neurotoxicity. *Biotechnology and Bioengineering* **99**, 753-763.
62. Voet D., Voet J. G., (1995), Biochemie, Praha:Victoria Publishing, 1995. 673 s. ISBN 80-85605-44-9.

63. Wood, W. G., Igbavboa, U., Müller, W.E., Eckert, G.P. (2011), Cholesterol Asymmetry in Synaptic Plasma Membranes. *J. Neurochem.* **116**, 684–689.
64. Zambrano, R., Fleischer, S., and Fleischer, B. (1975) Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. *Biochim. Biophys. Acta* **380**, 357-369.