

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE



VLIV IONTŮ A OXIDACE NA HYDRATACI A POHYBLIVOST
MODELOVÝCH LIPIDOVÝCH MEMBRÁN

THE EFFECTS OF IONS AND OXIDATION ON HYDRATION AND
MOBILITY OF MODEL LIPID MEMBRANES

Alžběta Vojtíšková

Školitel: Mgr. Piotr Jurkiewicz, Ph.D.

Praha 2011

Klíčová slova:

specifické efekty iontů, fluorescence, lipidová dvojvrstva, negativně nabitě membrány, oxidované lipidy

Key words:

specific ion effects, fluorescence, lipid bilayer, negatively charged membranes, oxidized lipids

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Bc. Alžběta Vojtíšková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Piotru Jurkiewiczovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc, za cenné rady a připomínky a také za čas, který věnoval konzultacím této práce. Děkuji Mgr. Lukasz Cwiklikovi, Ph.D. za provedení molekulárně dynamických simulací. Dík patří také Prof. Dr. Martinu Hofovi, DSc. za možnost pracovat v této skupině.

Abstrakt

Předkládaná práce navazuje na předchozí bakalářskou práci, která se zabývala vlivem monovalentních iontů na neutrální modelové membrány. V této diplomové práci byly studovány fyziologicky významnější systémy – negativně nabitě modelové membrány, které představují nejlepší model vnitřních vrstev plazmatických membrán. K výzkumu hydratace a pohyblivosti v oblasti glycerolu byla použita metoda fluorescenční relaxace rozpouštědla.

První studie se zabývala interakcí kationtů (Na^+ , K^+ , Cs^+) a negativně nabitých lipidů – směsi POPC a POPS. Bylo zjištěno, že přítomnost kationtů v membráně vyvolá její dehydrataci a také snížení pohyblivosti hydratovaných lipidů v oblasti glycerolu. Byly pozorovány specifické efekty jednotlivých iontů, které byly v souladu s Hofmeisterovou řadou.

Oxidované lipidy hrají klíčovou roli v patofyziologii mnoha nemocí. Proto byl v druhé studii zkoumán vliv oxidovaných lipidů (PazePC, PoxnoPC, PGPC, POVPC) na studovaný systém (POPC/POPS) a to v přítomnosti draselného kationtu (K^+). Výzkum vedl k odhalení složitých interakcí mezi oxidovanými lipidy, negativně nabitými lipidy a draselnými kationty. Ve většině případů pozorujeme v přítomnosti oxidovaných lipidů vzrůst hydratace membrány a zvýšení pohyblivosti lipidů v oblasti glycerolu.

Abstract

The presented thesis is a continuation of the bachelor work, in which the effects of monovalent ions on neutral model lipid membranes were characterized. Herein physical properties of physiologically relevant anionic membranes in the presence of monovalent cations and oxidized lipids were studied. Hydration and mobility of the lipid bilayer at glycerol level were investigated using fluorescent solvent relaxation technique.

In the first part of this work the interactions of cations (Na^+ , K^+ , Cs^+) with negatively charged POPC/POPS lipid mixture, which is a good model of inner leaflet of cellular membrane, were studied. The presence of cations resulted in dehydration and substantial hinderence of mobility of hydrated lipids at the glycerol level probed by Laurdan. Clear specificity of those effects, which correlated with Hofmeister series have been observed.

In the second part of the work truncated oxidized phospholipids, oxPLs (PazePC, PoxnoPC, PGPC, POVPC), which are known to be important in pathophysiology of numerous diseases, were investigated. 10 mol% of each oxPL was incorporated into neutral and anionic lipid bilayers, the hydration and mobility of which were measured in water or in KCl solution. The results reveal complex interactions between oxPLs, negatively charged lipids, and K^+ . In the majority of cases the presence of oxPLs resulted in enhanced hydration of the mixed POPC/POPS bilayer and the increased mobility at the glycerol level.

OBSAH

Abstrakt	1
Abstract	1
Seznam zkratek	5
1 Cíl práce.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Lipidy a membrány	8
2.1.1 Mastné kyseliny.....	8
2.1.2 Definice a klasifikace lipidů	8
2.1.3 Glycerofosfolipidy	9
2.1.4 Oxidované lipidy	10
2.1.5 Agregace amfifilních molekul ve vodných roztocích	11
2.1.5.1 Liposomy a dvojné vrstvy	12
2.1.6 Biologické membrány	13
2.1.6.1 Dynamika.....	14
2.2 Fluorescence	15
2.2.1 Jablonského diagram	15
2.2.2 Frankův- Condonův princip	16
2.2.3 Stokesův posuv	17
2.2.4 Doba života excitovaného stavu	17
2.2.5 Kvantový výtěžek	18
2.2.6 Ustálená fluorescence- intenzita	18
2.3 Relaxace rozpouštědla	19
2.3.1 Princip relaxace rozpouštědla	19
2.3.2 Časově rozlišená emisní spektra - TRES	20
2.3.2.1 Rekonstrukce TRES.....	20
2.3.2.2 Parametry získané z TRES.....	22
2.3.2.3 Spektra v čase $t = 0$ ns.....	23
2.3.2.4 Šířka spektra v polovině maxima – FWHM	24
2.3.3 Fluorescenční sondy lipidových membrán	25
2.3.3.1 Časové rozmezí relaxace rozpouštědla	25

3	Experimentální část	27
3.1	Studie č. 1 - VLIV IONTŮ NA NEGATIVNĚ NABITÉ MODELOVÉ MEMBRÁNY	27
3.1.1	Úvod	27
3.1.2	Materiály a metody	29
3.1.2.1	Použité chemikálie	29
3.1.2.2	Příprava liposomů	29
3.1.2.3	Spektroskopická měření	30
3.1.3	Výsledky	31
3.1.3.1	DOPC/DOPS vs DOPC	31
3.1.3.2	POPC/POPS vs POPC	33
3.1.4	Diskuze	37
3.1.5	Závěr	40
3.2	Studie č. 2 - VLIV OXIDOVANÝCH LIPIDŮ NA NEGATIVNĚ NABITÉ MODELOVÉ MEMBRÁNY	41
3.2.1	Úvod	41
3.2.2	Materiály a metody	46
3.2.2.1	Použité chemikálie	46
3.2.2.2	Příprava liposomů	46
3.2.2.3	Spektroskopická měření	46
3.2.3	Výsledky	47
3.2.3.1	Modelové oxidované membrány bez přítomnosti soli	47
3.2.3.2	Modelové oxidované membrány v přítomnosti KCl	52
3.2.4	Diskuze	56
3.2.4.1	Délka oxidovaných řetězců / funkční skupiny:	56
3.2.4.2	Hydratace:	57
3.2.4.3	Mobilita:	57
3.2.5	Závěr	59
3.3	Závěr obou studií	60
4	Literatura	61

Seznam zkratek

2-AS	kyselina 2-(9-anthroyloxy)stearová
9-AS	kyselina 9-(9-anthroyloxy)stearová
AMPs	antimikrobiální peptidy
APL	prostor jednoho lipidu (area per lipid)
C17DiFU	6,8-difluoro-4-heptadecyl-7-hydroxykumarin
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micelar concentration)
CPP	kritický pakovací parametr (critical packing parameter)
Dauda	kyselina 11-((5-dimethylaminonafalen-1-sulfonyl)amino)undekanová
DOPC	1,2-dioleoyl-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
DOPS	1,2-dioleoyl-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoserin
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FWHM	šířka v polovině maxima (full width at half maximum)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová
IRF	instrument response function
Laurdan	6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen
LUV	monolamelární vesikly (large unilamelar vesicles)
MD	molekulární dynamika
MLV	multilamelární vesikly (multilamelar large vesicles)
PAF-R	platelet activating factor - receptor
PAPC	1-palmitoyl-2-arachidonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
Patman	6-hexadecanoyl-2-(((2-(trimethylammonium)ethyl)methyl)-amino)naftalen chlorid
PazePC	1-palmitoyl-2-azelaoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
PC	fosfatidylcholin
PCL-PEO	poly(ϵ -kaprolakton)- <i>blok</i> -poly(ethylen oxid)
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaroyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
PLPC	1-palmitoyl-2-linoloyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
POPC	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
POPS	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoserin
POVPC	1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin

PoxnoPC	1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
Prodan	6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen
PS	fosfatidylserin
S ₀	singlet (základní elektronový stav)
S ₁	singlet (první elektronově excitovaný stav)
T ₁	triplet
THF	tetrahydrofuran
TRES	časově rozlišená emisní spektra (time resolved emission spectra)

1 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo studium fyzikálních vlastností negativně nabitých lipidových membrán a to jejich hydratace a pohyblivosti v oblasti fosfolipidových hlaviček. Negativně nabité lipidy se nachází ve vnitřních vrstvách plazmatických membrán.

Je známo, že roztoky solí mají silný vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti fosfolipidových membrán. Specifický efekt iontů může být velmi významný pro funkci biologických membrán. Proto byla první studie této práce věnována výzkumu interakcí solí s negativně nabitými membránami.

Mezi další systémy, které mají silný vliv na vlastnosti fosfolipidových membrán, patří oxidované lipidy. Oxidované lipidy se značně liší od původních, neoxidovaných, lipidů. Právě proto mohou snadno pozměnit jak fyzikální vlastnosti biologických membrán, tak jejich funkci. Předmětem druhé studie byl proto vliv oxidovaných lipidů na negativně nabitě fosfolipidové membrány.

Použita byla metoda fluorescenční relaxace rozpouštědla. Jedinečnost této metody spočívá v tom, že umožňuje měřit hydrataci a mobilitu plně hydratovaných lipidových dvojvrstev ve stavu tekutého krystalu.

2 Teoretická část

2.1 Lipidy a membrány

Biologické membrány oddělují buňku nebo její části od okolního prostředí. Skládají se především z lipidů. Mnoho základních buněčných procesů se odehrává právě v membránách. V této kapitole jsou uvedeny základní informace o struktuře a vlastnostech biologických membrán.

2.1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Mastné kyseliny mají v přírodě vždy sudý počet uhlíků, protože jejich řetězce vznikají z dvouuhlíkatých jednotek. Převážně jsou v přírodě zastoupeny kyseliny se šestnácti a osmnácti uhlíky. Vyskytují se jak nasycené, tak nenasycené mastné kyseliny. Nenasycené mastné kyseliny mají konfiguraci cis. U kyselin s více dvojnými vazbami jde většinou o systém izolovaných vazeb, nedochází tedy ke konjugaci π elektronů [1].

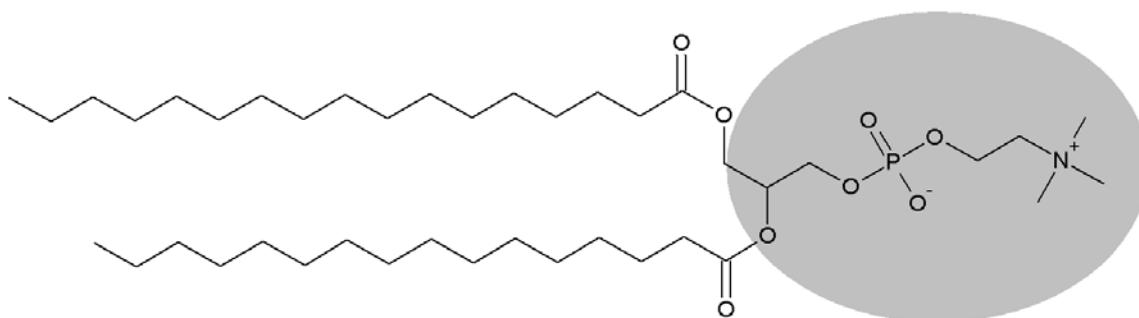
2.1.2 Definice a klasifikace lipidů

Lipidy jsou nepolární látky biologického původu zcela nebo téměř nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech. Mezi lipidy patří tuky, oleje, některé vitamíny, některé hormony a většina nebílkovinných částí biologických membrán. Ze strukturního hlediska dělíme lipidy do tří skupin: na jednoduché, složené a odvozené lipidy. Mezi jednoduché lipidy řadíme estery mastných kyselin a alkoholů. Složené lipidy obsahují navíc další složky, podle kterých se dělí do několika podskupin. Mezi odvozené lipidy řadíme všechny ostatní nepolární sloučeniny zcela nebo téměř nerozpustné ve vodě, které nemohou být zařazeny do předcházejících skupin. Zaměříme se nyní na složené lipidy. Glycerofosfolipidy se skládají z glycerol-3-fosfátu, který je na uhlovodíkových atomech $C_{(1)}$ a $C_{(2)}$ esterifikován mastnými kyselinami a na své fosforylové skupině skupinou X.

Plasmalogeny jsou glycerofosfolipidy, ve kterých je substituent na $C_{(1)}$ vázán na glycerolovou kostru etherovou vazbou (namísto esterové). Hlavní lipidovou složku rostlinných membrán tvoří glykoacylglyceroly. Skládají se z cukerné složky, glycerolu a derivátů mastných kyseliny. Sfgolipidy se skládají se ze sfingosinu, jedné mastné kyseliny, cholinu a kyseliny fosforečné. Mastná kyselina je na molekulu sfingosinu vázána amidovou vazbou. Více o jednotlivých složených lipidech pojednávají knihy: [2, 3].

2.1.3 Glycerofosfolipidy

Nejčastější zástupci složených lipidů jsou právě glycerofosfolipidy, někdy nazývané zkráceně jen fosfolipidy. Jsou hlavními složkami lipidových membrán. Jak již bylo řečeno, skládají se z glycerol-3-fosfátu, který je na uhlovodíkových atomech $C_{(1)}$ a $C_{(2)}$ esterifikován mastnými kyselinami a na své fosforylové skupině funkční skupinou X. Molekulu fosfolipidu lze rozdělit na dvě oblasti. První oblast vykazuje hydrofilní vlastnosti, zatímco druhá vykazuje hydrofobní vlastnosti. Hydrofilní neboli polární hlavička je reprezentována glycerolem, kyselinou fosforečnou a příslušnou funkční skupinou X. Hydrofobní neboli nepolární ocas představuje mastná kyselina. Molekulu mající takovýto duální charakter označujeme jako amfifilní. Nejjednodušším glycerofosfolipidem je kyselina fosfatidová. Skupinou X je v tomto případě vodík. V membránách se však vyskytuje jen v nepatrném množství. Jednotlivé fosfolipidy se navzájem liší funkční skupinou X vázanou fosfoesterovou vazbou na kyselinu fosfatidovou. Mezi obvyklé funkční skupiny X patří ethanolamin ($-O-CH_2-CH_2-N^+H_3$), cholin ($-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$), serin ($-O-CH_2-CH(^+NH_3)COO^-$) a další. Uvedené funkční skupiny X obsahují bazický dusík, který má za fyziologického pH pozitivní náboj. Zatímco kyselina fosforečná nese negativní náboj. Fosfolipidy s dusíkatými skupinami jsou proto obojetnými ionty - dipóly. Serin má ve své molekule navíc ještě karboxylovou skupinu, ta má za fyziologického pH negativní náboj. Fosfolipidy se serinem nesou tedy jeden pozitivní a dva negativní náboje, celkově jsou proto negativně nabitě.

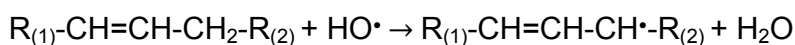


Obrázek č. 1 – Fosfatidylcholin, molekula fosfolipidu je rozdělena na hydrofilní část – fosfolipidovou hlavičku (šedě) a na hydrofobní část – fosfolipidové ocasy (bílé).

2.1.4 Oxidované lipidy

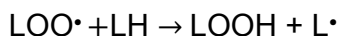
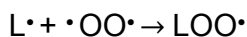
Tato diplomová práce se bude zabývat oxidovanými lipidy. Oxidované lipidy jsou oxidačními produkty polynenasycených lipidů. Řetězce oxidovaných mastných kyselin jsou nejčastěji vázány na *sn-2* pozici glycerofosfolipidů. Na *sn-1* pozici se většinou váže nasycená mastná kyselina. Oxidací mastných kyselin vzniká mnoho strukturně odlišných oxidačních produktů. Oxidace mastných kyselin v lipidech patří mezi radikálové řetězové reakce [4].

Následující popis vzniku oxidovaných lipidů je volně převzat z [5, 6]. Na dvojné vazbě v molekule lipidu dochází k přenosu vodíku z α -uhlíku na reagující radikál.

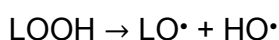
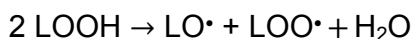


LH + HO \cdot \rightarrow L \cdot + H $_2$ O - schematické vyjádření předchozí rovnice

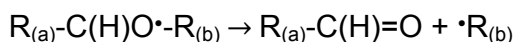
Ve všech uvedených příkladech označuje písmeno L lipid. Reaktivní formy kyslíku napadají radikálová centra molekul lipidů a produkují lipidové peroxidy (LOO \cdot), které jsou vysoce reaktivní. Po přenosu vodíku (např. z další mastné kyseliny) na peroxidový radikál vzniká hydroperoxid (LOOH) a další lipidový radikál (L \cdot).



Hydroperoxidy se poté začnou rozkládat za vzniku kyslíkatých funkčních skupin.



Vzniklé radikály vstupují do reakcí, jimiž se štěpí vazby v řetězcích mastných kyselin a vznikají kyslíkaté funkční skupiny. Například aldehydy:



V membránách savců se nejčastěji vyskytují lipidy s fosfocholinovými skupinami (PC). Největší množství detekovaných oxidovaných lipidů u savců bylo proto fosfocholinových [6]. Některé zdroje též uvádějí častý výskyt oxidovaných fosfoserinů (PS) [7].

Vlastnosti, jako jsou polarita a tvar oxidovaných lipidů, se značně liší od původních – neoxidovaných - lipidů. Proto mají velký vliv na změnu vlastností membrán a funkci proteinů v membráně. Mohou značně pozměnit interakce mezi lipidy navzájem nebo mezi lipidy a proteiny.

Větší množství oxidovaných lipidů bylo pozorováno v membránách jedinců trpících aterosklerózou [8 - 10] (více viz úvod k oxidovaným lipidům), rakovinu [4], Alzheimerovu chorobu [11] a další.

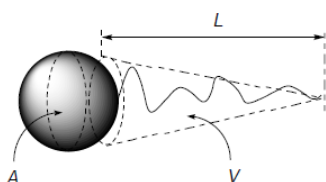
2.1.5 Agregace amfifilních molekul ve vodných roztocích

Molekuly amfifilních látek, jako jsou fosfolipidy, obsahují vždy alespoň jednu polární hydrofilní skupinu a zároveň nepolární hydrofobní část tvořenou buď jedním, nebo více alkylovými řetězci. Na agregaci lipidů se zjednodušeně můžeme dívat takto: hydrofilní hlavičky vykazují vysokou afinitu k vodě. Naopak u hydrofobních ocasů převládají odpudivé interakce vůči vodě [12]. Amfifilní molekuly vytvářejí ve vodných roztocích agregáty. Agregací molekuly předchází nežádoucímu kontaktu mezi vodou a hydrofobními konci molekul. Uspořádání pouze několika amfifilních molekul nepostačí k ochraně hydrofobních konců před kontaktem s vodou. Proto netvoří amfifilní molekuly ve vodných roztocích micely, dokud jejich koncentrace nepřekročí určitou kritickou hodnotu. Nad touto „kritickou koncentrací“ se téměř všechny amfifily agregují.

Typ vznikajícího agregátu závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly, který se vyjařuje pomocí bezrozměrné veličiny nazvané kritický sbalovací parametr [12] (*critical packing parametr*) *CPP*:

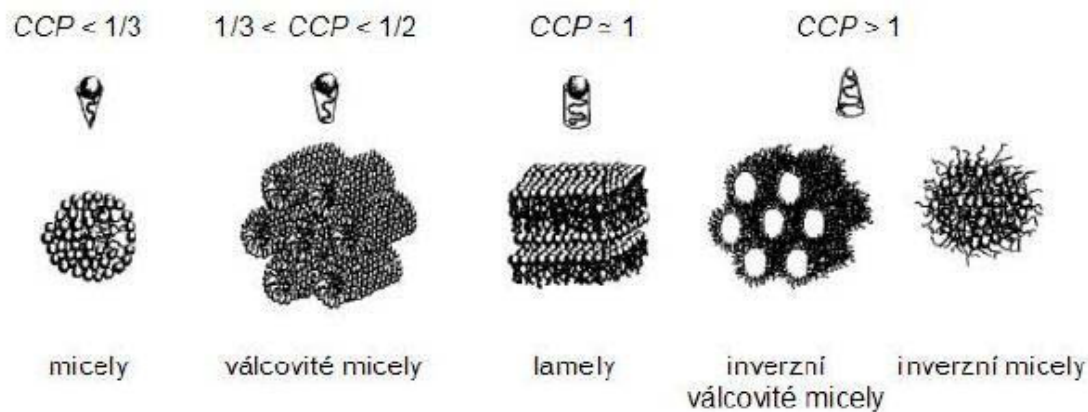
$$CPP = \frac{V}{A \times L} \quad (1)$$

kde *V* značí objem, který v agregátu zaujímá hydrofobní alkylový řetězec, *A* je plocha řezu hlavičkou a *L* je efektivní délka alkylového řetězce (znázorněno na obrázku č. 2).



Obrázek č. 2 - Popis v textu. Převzato z [12].

Jaký typ agregátu vznikne, závisí na hodnotě *CPP*. Různé typy agregátů jsou znázorněny na obrázku č. 3. Mezi nejběžnější agregáty patří - micely, válcovité micely, lamely - vesikly a dvojvrstvy, inverzní válcovité micely a inverzní micely.



Obrázek č. 3 – Různé možnosti vzniku agregátů podle hodnoty *CPP* [12].

2.1.5.1 Liposomy a dvojné vrstvy

Odpařením roztoku fosfolipidu v organickém rozpouštědle vznikne na stěně baňky tenký film amfifilu. Po převrstvení filmu vodou dochází k bobtnání vysušeného filmu fosfolipidů ve vodě, a tak vznikají částice představující monolamelární (LUV) a multilamelární (MLV) struktury tvořené dvojvrstvami lipidů. Multilamelární váčky mají dvojvrstvy lipidů uspořádané jako slupky cibule. Tyto částice, ať už mono-

nebo multilamelární, uzavírají ve svých vnitřních kompartmentech vodnou fázi. Takové útvary byly pojmenovány liposomy. Ultrafiltrací neboli extruzí takto získaných směsí liposomů, např. přes polykarbonátové porézní membrány, lze snížit jejich polydisperzitu [18]. Multilamelární váčky jsou tedy převedeny na váčky monolamelární (LUV), které mají pouze jednu lipidovou dvojvrstvu. Jejich rozměr se může pohybovat mezi 100-1000 nm [13].

Lipidová dvojvrstva je dvojitá vrstva lipidů tvořená jednoduchými nebo složenými lipidy. Lipidy jsou uspořádány tak, že hydrofobní ocasy jednotlivých molekul jsou vzájemně v úzkém kontaktu, stejně jako hydrofilní hlavičky. Dvě monovrstvy jsou orientovány hydrofilními hlavičkami směrem do vodné fáze a hydrofobními ocasy směrem do středu. Takovou dvojvrstvu můžeme pomyslně rozdělit na čtyři části: Voda v blízkosti dvojvrstvy, polární oblast, nepolární tuhá oblast, nepolární pohyblivá oblast [14]. Oblastí zvanou voda v blízkosti dvojvrstvy jsou myšleny molekuly vody, které se po interakci s lipidovou membránou vyznačují odlišnými vlastnostmi, než mají molekuly v roztoku. Do polární oblasti spadají hydrofilní lipidové hlavičky. Oblast začínající karbonylovými skupinami a končící tam, kde hustota řetězců je srovnatelná s hustotou kapalného hexadekanu, se nazývá nepolární tuhá oblast. Nepolární pohyblivá oblast se vyskytuje ve středu lipidové dvojvrstvy a je zcela hydrofobní.

2.1.6 Biologické membrány

Buňky všech organismů jsou obklopeny membránou a také existuje značné množství membrán uvnitř buňky. Membrány oddělují vnitřní prostor živých buněk od vnějšího prostředí. Představují bariéru schopnou udržet v oddělených prostorech rozdílné chemické potenciály iontů a molekul. Také skrze membrány dochází k selektivnímu transportu látek do a z nitra buněk.

Biologická membrána je dvojvrstva fosfolipidů, ve které je vázána řada různých proteinů s rozličnými funkcemi. Fosfolipidy tvoří základní matrix, do kterého jsou „vložené“ proteiny. Protože se liposomy skládají z dvojných vrstev, mohou být používány jako modely biologických membrán.

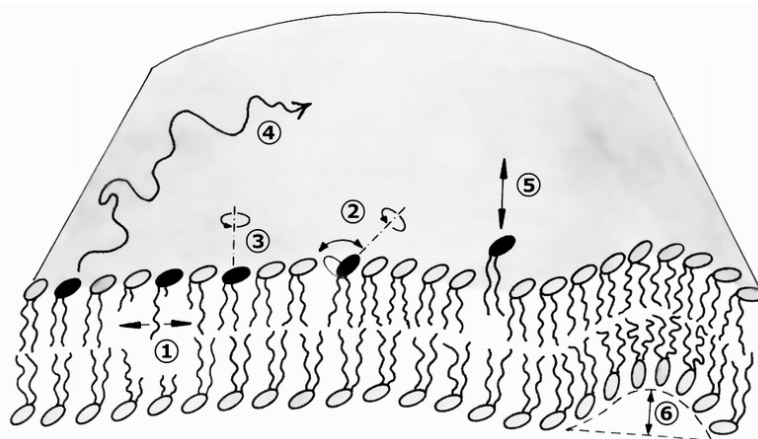
Biologické membrány jsou tvořeny převážně lipidy a proteiny. Jak již bylo řečeno, oxidované lipidy mají velký vliv na změnu vlastností membrán a funkci proteinů v membráně. Mohou značně pozměnit interakce mezi lipidy navzájem nebo mezi lipidy a proteiny. Membránových proteinů existuje celá řada. Rozlišujeme hlavní dva typy - periferní a integrální proteiny. Periferní proteiny jsou umístěny na povrchu dvojných vrstev a interagují jen s polárními hlavičkami. Zatímco integrální proteiny

prostupují skrze membránu. Lipidový film není tuhý, má charakter vazké tekutiny. Uvnitř filmu se za určitých podmínek mohou proteiny přemísťovat. O membránových proteinech pojednává více [3]. Mezi další součásti membrán patří také sacharidy, které jsou přítomny ve formě glykoproteinů nebo glykolipidů. Složení membrán je typické pro druh membrán i pro příslušný orgán. Na druhé straně lze ovlivnit složení membrán potravou, neexistuje tedy konstantní složení ve smyslu stechiometrických poměrů. [1]

2.1.6.1 Dynamika

Dynamiku biologických membrán vystihuje model tzv. fluidní mozaiky. Ten říká, že membránové molekuly jsou v neustálém pohybu. Fluidita je reciprokou hodnotou viskozity. Fluidita je velmi podstatnou vlastností buněčných membrán. I pouze velmi malá změna ve fluiditě může podstatně změnit vlastnosti membrány.

V biologických membránách rozlišujeme mnoho různých druhů pohybů. Pohybovat se mohou části lipidových molekul - mezi tyto pohyby řadíme pohyb dlouhých uhlovodíkových řetězců a rotaci či převrácení polárních hlaviček lipidů. Dochází-li k pohybu jedné molekuly lipidu, potom rozlišujeme mezi rotační difuzí, translační difuzí, vysunutím molekuly lipidu a překlápěním z jedné monovrstvy do druhé (tzv. flip-flop). Poslední možností je pohyb několika molekul lipidu. V takovém případě může docházet například k vlnění. Zmíněné pohyby jsou znázorněny na obrázku č. 4. Podrobněji se o jednotlivých pohybech lipidů pojednává v [13].



Obrázek č. 4 – Pohyby molekul v lipidové dvojvrstvě- 1) pohyb dlouhých uhlovodíkových řetězců, 2)rotace či převrácení polárních hlaviček lipidů, 3)rotační difuze, 4)translační difuze, 5)vysunutím molekuly lipidu, 6) vlnění několika molekul lipidu. Převzato z [13].

Také proteiny mohou v lipidové matrici konat laterální či rotační pohyby.

Za běžných podmínek je membrána ve formě kapalného krystalu - to znamená, že řetězce mastných kyselin jsou neuspořádané a v neustálém pohybu. Dojde-li k ochlazení lipidové dvojvrstvy, dojde také ke snížení pohyblivosti molekul membrány. Je-li dvojvrstva ochlazená pod tzv. teplotu fázového přechodu, pak přechází dvojvrstva z fluidního do zatuhlého stavu. V krystalickém stavu jsou řetězce mastných kyselin plně nataženy a dvojvrstva je velmi uspořádaná.

Přítomnost nenasycených mastných kyselin v lipidech má vliv na fluiditu membrán. V místě cis dvojných vazby je ohyb, který zamezuje napnutí a tím i snadné krystalizaci. Přítomnost dvojných vazeb proto snižuje teplotu fázového přechodu.

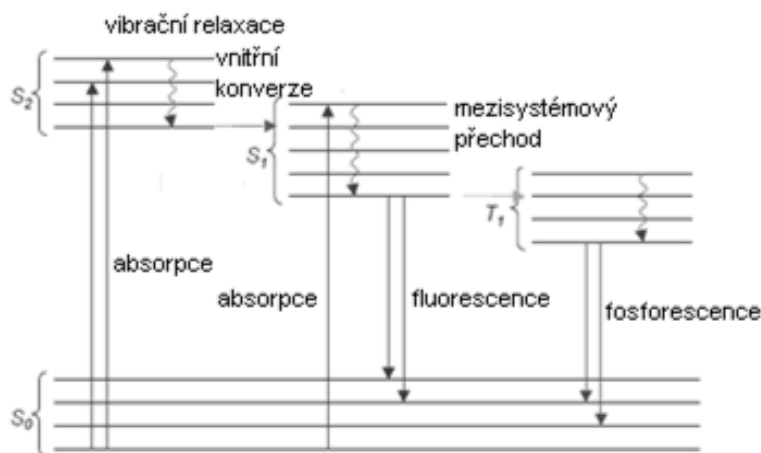
2.2 Fluorescence

Fotoluminiscence je většinou založena na absorpci fotonu. Molekula či atom absorbující foton se dostává ze základního stavu do excitovaného stavu. Při de-excitaci dochází k emisi záření. Mezi fotoluminiscenční jevy řadíme fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci.

2.2.1 Jablonského diagram

Absorpcí záření se molekula dostane do excitovaného stavu. Zpět do základního stavu se může vrátit hned několika způsoby. Nejdůležitější možnosti přechodů jsou uvedeny v Jablonského diagramu, který je znázorněn na obrázku č. 5. Při přechodu ze základního do prvního elektronového stavu přechází molekula podle Franckova-Condonova principu obvykle také do vyššího vibračního stavu. Z tohoto stavu však poměrně rychle klesá na nejnižší vibrační hladinu elektronového stavu - tento proces se nazývá vibrační relaxace a je velmi rychlý (10^{-15} s). Vibrační relaxace patří mezi tzv. nezářivé procesy. Zpět do základního elektronového stavu může molekula přejít zářivými procesy - fluorescencí (střední doba života je v kapalinách v řádu ns). V tom případě je emitováno záření o nižší energii, tedy o větší vlnové délce. Nezářivé přechody mezi stavy s různou spinovou multiplicitou se nazývají mezisystémové konverze. Stav T_1 (triplet) má relativně dlouhou střední dobu života (v řádu μ s až s). Emise záření se v tomto případě nazývá fosforescence. Při zpožděné fluorescenci absorbuje molekula ve stavu T_1 tepelnou energii, přejde do stavu S_1

(singlet) a následuje fluorescenční přechod do S_0 . Přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je spinově zakázaný, probíhá proto s mnohem menší pravděpodobností než přechod $S_1 \rightarrow S_0$, který je dovolený. Ze základního elektronového stavu dochází zřídka i k přechodu do vyšších elektronových hladin. Nezářivým přechodem, který se nazývá vnitřní konverze, se potom může uskutečnit přechod do nižšího elektronového stavu o stejné multiplicitě. Uvedené střední doby života byly čerpány z [13].



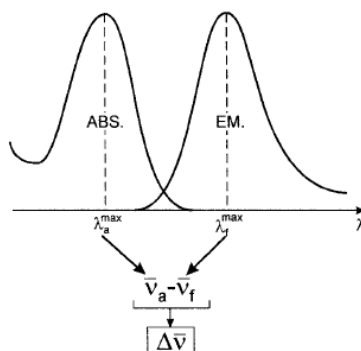
Obrázek č. 5 – Jablonského diagram, popis v textu.

2.2.2 Frankův- Condonův princip

Born–Oppenheimerova aproximace poukazuje na obrovský rozdíl mezi hmotností jader a elektronů. V důsledku toho je pohyb elektronů mnohem rychlejší než pohyb jader. Tato skutečnost je základem Franckova–Condonova principu [15]. Elektronové pohyby jsou ve srovnání s pohyby jader tak rychlé, že se při nich nemění geometrie molekuly. O vibračně-elektronových přechodech můžeme tedy říci, že jsou vertikální (tzn. $R=0$). Dalším důležitou částí Franck-Condonova principu je překryv vibračních vlnových funkcí, který je maximální.

2.2.3 Stokesův posuv

Záření absorbované molekulou má obvykle vyšší energii než emitované fluorescenční záření. Molekula tak emituje záření o vyšších vlnových délkách. Stokesův posuv je rozdíl mezi polohou absorpčního a emisního maxima, jak je znázorněno na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6 - Stokesův posuv. Převzato z [16].

2.2.4 Doba života excitovaného stavu

Vezměme jako zdroj záření pulzní laser. V čase $t=0$ je excitováno do stavu S_1 vždy stejné množství molekul A. Tyto molekuly mají poté několik možností jak se vrátit zpět do základního stavu. Tyto možnosti lze rozdělit do dvou skupin: 1. Zářivé přechody (zářivý přechod $S_1 \rightarrow S_0$); 2. Nezářivé přechody (nezářivý přechod $S_1 \rightarrow S_0$ a mezisystémová konverze). Kinetiku přechodu molekuly A ze stavu S_1 do stavu S_0 lze vyjádřit vztahem [16]:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_Z + k_N)[A^*] \quad (2)$$

Kde $[A^*]$ je koncentrace molekuly A v excitovaném stavu, k_Z je rychlostní konstanta zářivého přechodu a k_N rychlostní konstanta nezářivého přechodu, t je čas.

Integrací dostáváme vztah:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3)$$

Kde τ je doba života excitovaného stavu vyjádřená:

$$\tau = \frac{1}{k_Z + k_N} \quad (4)$$

Doba života excitovaného stavu je tedy čas potřebný k tomu, aby koncentrace molekuly v excitovaném stavu klesla na $1/e$ své původní hodnoty.

2.2.5 Kvantový výtěžek

Jako kvantový výtěžek označujeme počet emitovaných fotonů dělený počtem absorbovaných fotonů. Další možností, jak vyjádřit kvantový výtěžek, je pomocí rychlostních konstant jednotlivých de-excitačních dějů [16]:

$$\phi = \frac{k_Z}{k_Z + k_N} = k_Z \tau \quad (5)$$

kde ϕ je kvantový výtěžek.

2.2.6 Ustálená fluorescence- intenzita

Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce, energii, vlnočtu nebo frekvenci emitovaného záření při konstantní vlnové délce budícího záření. V případě excitačního spektra pozorujeme intenzitu fluorescence na vlnové délce, energii, vlnočtu nebo frekvenci excitovaného záření při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Emisní a excitační spektra se obvykle měří spektrofluorometrem vybaveným konstantně zářící lampou. Za daný čas lampa emituje přesné množství fotonů - N_0 . Vzorek o jednotkovém objemu a koncentraci fluoroforu $[A]$ absorbuje při excitaci αN_0 fotonů, kde α vyjadřuje poměr množství fotonů absorbovaných molekulou ku množství fotonů emitovaných lampou. De-excitační procesy mohou být opět rozděleny do dvou skupin - na zářivé přechody a nezářivé přechody. Jelikož je molekula fluoroforu konstantně ozařována, zůstává i koncentrace $[A^*]$ konstantní - A^* je tedy v ustáleném stavu. To lze vyjádřit vztahem [16]:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_Z + k_N)[A^*] \quad (6)$$

kde k_a je rychlostní konstanta absorpce, N_0 je přesné množství fotonů emitovaných lampou za čas t , αN_0 je přesné množství fotonů absorbovaných vzorkem v jednotce objemu, a proto $k_a \alpha N_0$ je množství absorbovaných fotonů v jednotce objemu vzorku za jednotku času. Konstantní koncentrace A^* je vyjádřena vztahem:

$$[A^*] = \frac{k_a \alpha N_0}{(k_Z + k_N)} \quad (7)$$

Intenzitou ustáleného stavu označujeme množství fotonů emitovaných za jednotku času jednotkou objemu. Vyjadřujeme ji vztahem:

$$I = k_Z [A^*] = k_Z \frac{k_a \alpha N_0}{(k_Z + k_N)} = k_a \alpha N_0 \phi \quad (8)$$

kde I je intenzita emisního spektra ustáleného stavu.

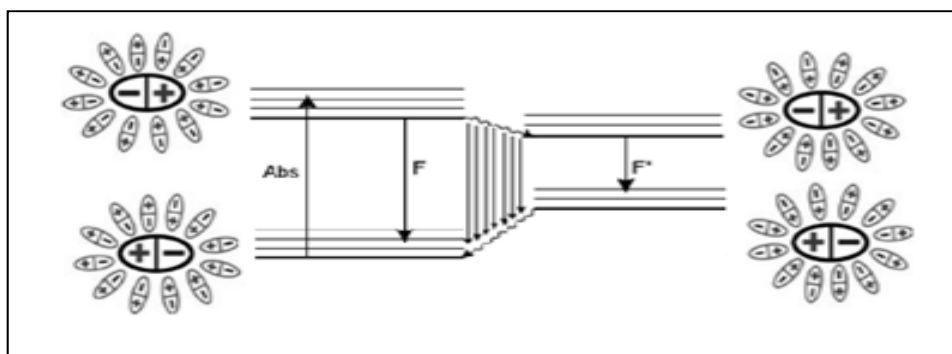
2.3 Relaxace rozpouštědla

Jedinečnost metody relaxace rozpouštědla spočívá v tom, že umožňuje měřit hydrataci a mobilitu plně hydratovaných lipidových dvojvrstev ve stavu tekutého krystalu. Měřením časově rozlišených emisních spekter lze zjistit právě tyto vlastnosti. Proces relaxace rozpouštědla je založen na interakci dipólu molekuly fluoroforu s polárním okolím.

2.3.1 Princip relaxace rozpouštědla

Již bylo řečeno, že absorpcí záření se molekula fluoroforu dostane ze základního rovnovážného stavu do excitovaného stavu (Franckova-Condonova stavu). Během excitace dochází k redistribuci náboje molekuly fluoroforu, a v důsledku toho také k okamžité změně dipólového momentu. Protože je pohyb elektronů mnohem rychlejší než pohyb jader, nedochází při excitaci k reorientaci nebo ke změně pozice molekul okolního rozpouštědla. Molekuly rozpouštědla se tak po excitaci dostávají do energeticky nerovnovážného stavu a musí změnit svoji polohu, aby se rovnováha obnovila. Poté je dosažen rovnovážný excitovaný stav o nižší energii. Relaxace rozpouštědla je tedy dynamický proces začínající nerovnovážným Franckovým-Condonovým stavem a končící plně zrelaxovaným rovnovážným excitovaným stavem, jak je znázorněno na obrázku č. 7.

Byla provedena studie na Coumarinu 153 [17]. Dipólový moment Coumarinu 153 je v základním elektronovém stavu 6,55 D. Při přechodu do excitovaného stavu dochází k redistribuci náboje molekuly a hodnota dipólového momentu se pohybuje mezi 14.2 – 16 D.



Obrázek č. 7 - Diagram procesu relaxace rozpouštědla. V molekule fluoroforu dochází při excitaci k velké změně polarity. Molekuly rozpouštědla se po excitaci dostávají do energeticky nerovnovážného stavu a mění svoji polohu k opětovnému dosažení rovnováhy. To vede k snižování energie systému a k s tím spojenému posuvu emisního spektra do červené oblasti.

2.3.2 Časově rozlišená emisní spektra - TRES

Celkový spektrální posuv a kinetika tohoto posuvu jsou dva hlavní faktory, které lze získat z časově rozlišených emisních spekter (TRES). Nyní se zaměříme na to, jak se TRES spektra získávají a poté na to, jak z TRES spekter získáme potřebné parametry.

2.3.2.1 Rekonstrukce TRES

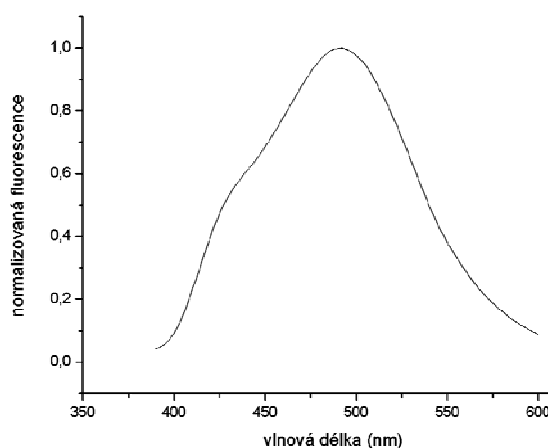
Nejprve je třeba naměřit emisní spektra ustálené fluorescence $S_o(\lambda)$ fluorescenční sondy umístěné ve zkoumaném systému a sérii křivek fluorescenčního vyhasínání $D_m(t, \lambda)$ při vlnových délkách odpovídajících emisnímu spektru ustálené fluorescence. Kde t vyjadřuje čas po excitaci. Příklady spekter $S_o(\lambda)$ a křivek vyhasínání $D_m(t, \lambda)$ jsou znázorněny na obrázcích č. 8 a 9. Protože rozlišení všech přístrojů měřících časově rozlišená spektra je konečné, naměřené křivky vyhasínání $D_m(t)$ představují konvoluci pravých křivek vyhasínání $D(t)$ a tzv. funkcí odezvy přístroje $IRF(t)$ (z anglického instrument response function) (viz vztah 13). $IRF(t)$ charakterizuje nepřesnosti měření přístroje, získáme ji měřením elastického rozptylu, při kterém je kyveta naplněna rozptylovačem a emisní monochromátor fixován na stejnou vlnovou délku jako excitační monochromátor [17]. Protože je dekonvoluce z matematického hlediska tzv. „ill posed“ problém, nemůže být funkce $D(t)$ vypočítána přímo z $D_m(t, \lambda)$ a $IRF(t)$. Proto dochází k opakovanému fitování fluorescenčních křivek vyhasínání $D_m(t, \lambda)$ (pro každou vlnovou délku zvlášť) multi-exponenciálními

funkcemi (vztah 14) při současné konvoluci s $IRF(t)$. Popsaným způsobem je pro každou vlnovou délku spočítána funkce $D_c(t)$, která se nejvíce blíží právě $D(t)$.

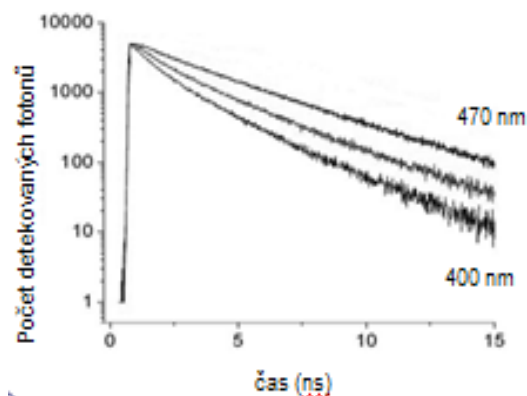
$$D_c(t) \otimes IRF(t) = D_m(t) \quad (13)$$

$$D_c(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (14)$$

kde \otimes je symbol značící konvoluci, je pre-exponenciální faktor, t čas a doba vyhasínání.



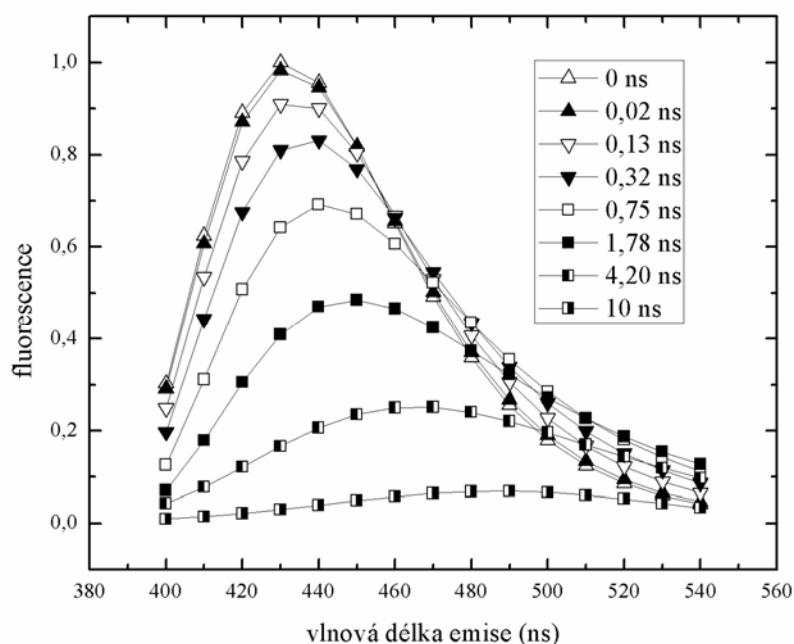
Obrázek č. 8 –
Emisní spektrum ustálené fluorescence $S_0(\lambda)$.



Obrázek č. 9 -
Křivky fluorescenčního vyhasínání $D_m(t, \lambda)$.

Z emisního spektra ustálené fluorescence $S_0(\lambda)$ a z exponenciálních fitů křivek fluorescenčního vyhasínání $D_c(t, \lambda)$ zrekonstruujeme poté podle vztahu (9) časově rozlišená emisní spektra (TRES) [17, 18]. Příklad časově rozlišeného emisního spektra $S(\lambda, t)$ je znázorněn na obrázku č. 10.

$$S(\lambda, t) = \frac{D(t, \lambda) \times S_0(\lambda)}{\int_0^{\infty} D(t, \lambda) dt} \quad (9)$$



Obrázek č. 10 – Příklad časově rozlišeného emisního spektra v časovém rozmezí do 10 ns po excitaci pro Laurdan v membráně POPC ve formě LUV v přítomnosti 1 M KCl. Měřeno při 283 K.

2.3.2.2 Parametry získané z TRES

Analýzou TRES spekter můžeme získat cenné informace o viskozitě nebo polaritě v mikrookolí fluorescenční značky. K analýze používáme parametry, jako jsou pozice maxim emisních spekter $\nu(t)$ nebo šířka emisních spekter.

2.3.2.2.1 Celkový spektrální posuv; hydratace

Jako spektrální posuv označujeme rozdíl mezi energiemi Franckova-Condonova stavu a plně relaxovaného excitovaného stavu [18]:

$$\Delta\nu = \nu(0) - \nu(\infty) \quad (10)$$

kde $\nu(0)$ a $\nu(\infty)$ jsou vlnočty v časech $t=0$ a $t=\infty$ v reciprokových centimetrech.

Bylo zjištěno, že $\Delta\nu$ je přímo úměrné funkci polaritě [17, 19]. V biologických membránách je polarita v nejbližším okolí fluorescenční sondy určena převážně přítomností dipólů vody hydratujících membránu. Pomocí spektrálního posuvu můžeme proto sledovat míru hydratace v oblasti fosfolipidových hlaviček.

2.3.2.2.2 Kinetika spektrálního posuvu; mobilita

Kinetika spektrálního posuvu je závislá především na mobilitě systému, jinak řečeno na přeskupování molekul k znovudosažení rovnovážného stavu po excitaci. K vyhodnocení se používá normalizovaná spektrální funkce odezvy $C(t)$, nazývaná rovněž korelační funkce. Integrací korelační funkce získáme vztah pro dobu relaxace rozpouštědla [18]:

$$C(t) = \frac{v(t) - v(\infty)}{v(0) - v(\infty)} = \frac{v(t) - v(\infty)}{\Delta v} \quad (11)$$

$$\tau_r \equiv \int_0^{\infty} C(t) dt \quad (12)$$

Kde τ_r je integrační relaxační čas rozpouštědla, který vyjadřuje míru viskozity v okolí fluoroforu. Jinak řečeno, čas relaxace popisuje mobilitu lokálního molekulového okolí fluoroforu.

Zaměříme se nyní na fosfolipidové membrány hydratované vodou. Mezi molekulami vody a lipidovými molekulami se tvoří vodíkové můstky. Relaxaci rozpouštědla ve fosfolipidových membránách neoznačujeme proto relaxaci samotného rozpouštědla (vody), ale relaxaci hydratovaných lipidů v okolí fluoroforu. Hovoříme-li o mobilitě, nejde tedy o mobilitu izolovaných molekul vody, ale o pohyb hydratovaných polárních hlaviček fosfolipidové dvojvrstvy.

2.3.2.3 Spektra v čase $t = 0$ ns

Abychom mohli vypočítat celkový spektrální posuv Δv a korelační funkci $C(t)$ podle vztahů 9 a 10, musíme znát vlnočet $\nu(t=0 \text{ ns})$ odpovídající maximu spektra v nulovém čase. Pojmeme spektrum v nulovém čase označujeme hypotetické emisní spektrum pozorované po vibrační relaxaci fluorescenční sondy ale před relaxací rozpouštědla. Tato hodnota nemůže být naměřena z důvodu nedostatečného rozlišení přístroje. Za hodnotu vlnočtu v nulovém čase $\nu(0)$ je použita hodnota vypočítaná metodou odhadu [20].

Metoda odhadu je založena na úvaze, že spektra v nepolárním prostředí mají podobné spektrální vlastnosti jako ty ve Frank-Condonově stavu. V této metodě se tedy používají absorpční a emisní spektra fluorescenční značky v nepolárním prostředí a absorpční spektra v polárním prostředí. Z tvaru těchto spekter, jejich posuvu a z distribuční funkce tohoto posuvu je následně spočítáno emisní spektrum v nulovém čase. Detailně je tato metoda odhadu popsána v [17, 18, 20].

Porovnáním hodnoty $v(0)_{estimated}$ vypočítané pomocí metody odhadu a naměřené hodnoty $v(0)_{observed}$ určíme, kolik procent z procesu relaxace rozpouštědla bylo pozorováno.

2.3.2.4 Šířka spektra v polovině maxima – FWHM(t)

Dojde-li k relaxaci rozpouštědla během doby života excitovaného stavu a je-li rozlišení přístroje odpovídající pro zachycení relaxace rozpouštědla, potom pozorujeme na FWHM(t) (z anglického full width at half maximum) křivce maximum [21]. Jednotlivé fluorofory v membráně se liší svým mikrookolím. V důsledku heterogenity mikrookolí fluoroforů reagují molekuly rozpouštědla „různě rychle“ na změnu lokálního elektrického pole po excitaci. Během relaxace se různé molekuly nacházejí v různých fázích relaxačního procesu. Heterogenita mikrookolí fluoroforů tak roste a proto dochází k rozšiřování fluorescenčních relaxačních spekter - rostoucímu charakteru FWHM(t). Jakmile se molekuly rozpouštědla dostanou do rovnovážného stavu, potom heterogenita mikrookolí fluoroforu klesá a FWHM(t) má proto klesající charakter. Pozorované maximum obvykle odpovídá průměrné době relaxace rozpouštědla. Pokud na křivce vzrůst alespoň částečně chybí, znamená to, že relaxace rozpouštědla proběhla rychleji, než jaké je rozlišení přístroje. Je-li SR naopak pomalejší než fluorescenční vyhasínání, pozorujeme pouze vzrůst FWHM. FWHM nám tedy slouží jako kontrola, zda relaxace rozpouštědla proběhla v časovém rozlišení měření.

2.3.3 Fluorescenční sondy lipidových membrán

Lipidové membrány nemají vlastní fluorescenci, jsou proto značeny fluorescenčními sondami. Tyto sondy mohou podávat informace o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita, hydratace a uspořádání lipidů. Sondy používané při metodě relaxace rozpouštědla by měli po excitaci vykazovat co největší změnu dipólového momentu [18], protože takové jsou nejcitlivější na polaritu okolí.

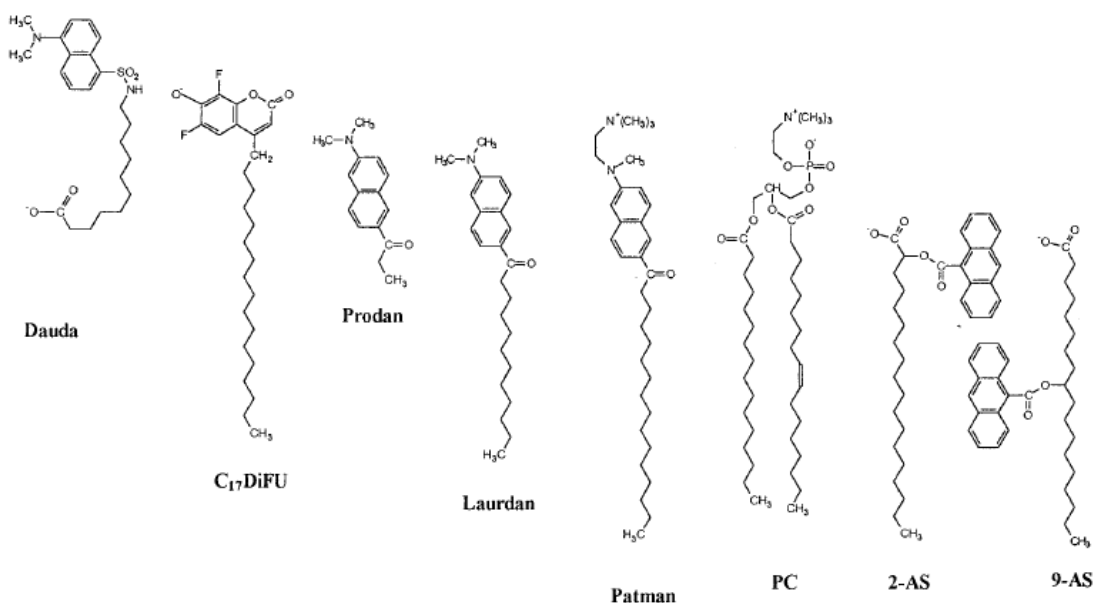
Konkrétní sonda je v lipidové dvojvrstvě fixována na určitém místě v přesné hloubce. Fluorescenční sondy se mohou zanořovat do oblasti nepolárních uhlovodíkových řetězců, do oblasti lipidových hlaviček nebo se mohou vyskytovat na rozhraní membrány a vody [21]. Je důležité znát přesnou polohu sondy v membráně, protože v různé hloubce membrány pozorujeme také různou polaritu. Čím hlouběji je sonda zanořena, tím pomalejší je proces relaxace rozpouštědla – v čisté vodě nastává řádově během stovek femtosekund, v biomembránách se časová škála tohoto procesu posunuje až k jednotkám nanosekund [22].

Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen) a jeho deriváty nesou na svém naftalenovém kruhu donorové a akceptorové skupiny (orientované proti sobě). Po excitaci tak dochází k velké změně dipólového momentu. Jsou tedy vhodnými fluorescenčními sondami pro relaxaci rozpouštědla. Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen), derivát Prodanu, obsahuje ve své molekule dvanácti uhlíkatý řetězec, který mu umožňuje ukotvení v membráně. Je proto hojně užívaný při studování lipidových dvojvrstev [23].

Vlastnosti fluorescenčních sond jsou čteně studovány na lipidových dvojvrstvách ale i na mnoha dalších systémech. Například byly studovány vlastnosti Prodanu a Laurdanu na vesiklech PCL-PEO (poly(ϵ -kaprolakton)-*blok*-poly(ethylen oxid)) ve vodném roztoku tetrahydrofuranu (THF) [24]. S přidávajícím množstvím THF se Prodan částečně uvolňoval z vesikul do roztoku. Naproti tomu se do roztoku uvolnila pouze velmi malá frakce molekul Laurdanu.

2.3.3.1 Časové rozmezí relaxace rozpouštědla

Vraťme se nyní k lipidovým dvojvrstvám. K výzkumu modelových lipidových membrán fosfatidylcholinu (PC) bylo použito sedm fluorescenčních barviv s různou hloubkou zanoření do fosfolipidové dvojvrstvy. Struktury těchto barviv jsou znázorněny na obrázku č. 11 [21].



Obrázek č. 11 - znázorňuje molekulární struktury barviv použitých v práci [21].

O oblasti nepolárních uhlovodíkových řetězců vypovídají sondy 2-AS a 9-AS, které obsahují stejné fluorofory. Hodnota $\Delta\nu$ pro 2-AS byla mnohem větší než hodnota pro 9-AS. Vypovídá to o tom, že fluorofor 9-AS se nachází hlouběji v membráně než 2-AS [21].

O oblasti glycerolu vypovídají sondy Laurdan, Prodan a Patman, které opět obsahují stejný fluorofor. Hodnoty $\Delta\nu$ se pro jednotlivá barviva liší. Z toho lze usuzovat, že tyto hodnoty vypovídají o různé polaritě svého mikrookolí. Nižší hodnoty $\Delta\nu$ Patmanu a Laurdanu vypovídají o tom, že fluorofory těchto barviv jsou situovány hlouběji v PC membráně. Molekuly Patmanu a Laurdanu totiž obsahují hydrofobní uhlovodíkový řetězec, který se zanořuje mezi řetězce lipidových molekul. To vysvětluje, proč jsou fluorofory těchto molekul situovány hlouběji než v případě molekuly Prodanu. FWHM všech tří barviv nejprve prudce vzroste a dosáhne svého maxima při 0.7 ns (Prodan) a 1.5 ns (Patman, Laurdan), potom následuje pokles. Relaxace rozpouštědla probíhá tedy během života excitovaného stavu a lze ji měřit přístroji s nanosekundovým rozlišením [21].

Sondami vypovídající o rozhraní fosfolipidových hlaviček a vody jsou Dauda a C₁₇DiFU. Vyhodnocením FWHM křivek bylo zjištěno, že větší část sledované relaxace rozpouštědla proběhla rychleji, než bylo možné s tímto rozlišením přístroje naměřit. Relaxaci rozpouštědla značenou fluoroforem Daudy bylo možné na nanosekundové škále sledovat pouze 26%, fluoroforem C₁₇DiFU 52% [21].

3 Experimentální část

3.1 Studie č. 1 - VLIV IONTŮ NA NEGATIVNĚ NABITÉ MODELOVÉ MEMBRÁNY

3.1.1 Úvod

Chceme-li plně porozumět funkci a chování biologických membrán, musíme také chápat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Znalost toho, jak jednotlivé soli ovlivňují vlastnosti lipidových membrán, je proto zcela klíčová. Sodné a draselné ionty jsou v lidském těle ze všech kationtů nejrozšířenější. Sodík se vyskytuje v hojném množství v extracelulární kapalině, zatímco draslík se nachází převážně uvnitř buněk. Tyto ionty se vyskytují vždy s nějakými protionty. U sodných kationtů jsou to hlavně chloridy. Uvnitř buněk, kde se nachází draselné kationty, se však volné anionty nevyskytují. Elektroneutralita je v tomto případě zajištěna přítomností negativně nabitých proteinů a lipidů v membránách [25].

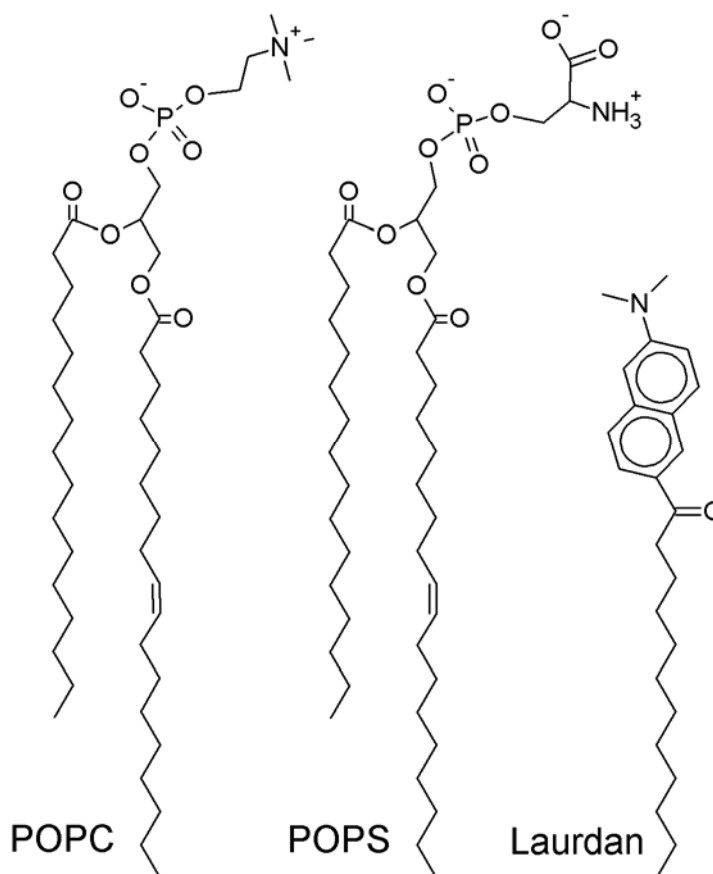
Před 120 lety seřadil Franz Hofmeister soli do tzv. Hofmeisterovy řady podle jejich schopnosti vysolovat bílkoviny. Častým předmětem současného výzkumu je právě specifický vliv iontů na neutrální membrány [25 - 31]. Je známo, že silnější efekt vykazují anionty než kationty [26, 31].

Zaměříme se nyní na některé konkrétní studie. Bylo zjištěno, že molární enthalpie naměřené při adsorbci alkalických iontů do membrány byly kladné (endotermický děj), zanořování iontů do membrány je tedy entropicky řízený děj [25]. Dále bylo zkoumáno, jak hluboko se jednotlivé ionty do membrány zanořují [26, 28]. Nejhlouběji se zanořují sodné kationty, zatímco chloridové protiionty zůstávají ve vodné fázi – tvoří se tak elektrická dvojvrstva [26]. Interakce draselných a cesných kationtů je podstatně slabší než sodných a také tyto ionty netvoří elektrické dvojvrstvy. Dále bylo zjištěno, že přítomnost 150 mM NaCl vyvolá dehydrataci DOPC membrány [26] a způsobí snížení APL (prostor jednoho lipidu – area per lipid) [28].

Studovány jsou také fyzikální vlastnosti nabitých membrán. Vyskytují se práce zabývající se jak kladně nabitými membránami [32-34], tak fyziologicky významnějšími negativně nabitými membránami [35, 36].

Tato práce navazuje svým tématem na předchozí bakalářskou práci [30], která popisuje specifický vliv iontů (z Hofmeisterovy řady) na membrány DOPC. Z hlediska fyziologie je však významnější studium smíšených negativně nabitých membrán s neutrálními. Základním předpokladem pro první studii této diplomové práce bylo, že negativně nabitá membrána budou přitahovat pozitivně nabitá kationty. Otázkou však bylo, jaký je (a zda-li je) specifický efekt kationtů na negativně nabitou membránu.

V této práci byl proto zkoumán vliv sodných, draselných a cesných solí na smíšené membrány fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylserinu (PS) (v molárním poměru 4:1). Takovéto složení lipidů velmi dobře vystihuje složení vnitřní vrstvy plasmatické membrány. K označení lipidů v oblasti glycerolu byla použita fluorescenční značka Laurdan. Struktury jednotlivých lipidů a Laurdanu a také hloubka zanoření této značky jsou vyznačeny na obrázku č. 12. Použitou metodou byla fluorescenční relaxace rozpouštědla. Experimentální výsledky byly srovnávány s výsledky molekulárně dynamických simulací (viz diskuze).



Obrázek č. 12 - Struktury jednotlivých lipidů použitých v této práci a fluorescenční značky Laurdan. Je znázorněna hloubka zanoření Laurdanu do membrány.

3.1.2 Materiály a metody

3.1.2.1 Použité chemikálie

Lipidy - 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (POPC), 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserin (POPS), 1,2-dioleoyl-palmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DOPC) a 1,2-dioleoyl-palmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserin (DOPS), Lipidy firmy Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) byly uskladněny při -20°C v rozpouštědlech chloroformu a metanolu v poměru 2:1 (v:v).

Fluorescenční sonda - 6-dodekanoyl-2-dimethylaminonafalen (Laurdan), pořízená od firmy Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Laurdan byl uložen v methanolu při teplotě -20°C .

Soli – chlorid sodný NaCl a chlorid cesný CsCl -byly produktem firmy Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). Chlorid draselný KCl byl pořízen do firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Ostatní - Voda pro spektroskopické účely - Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA), kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA a hydroxid sodný NaOH firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Organická rozpouštědla pro spektroskopické účely byly produktem firmy Merck (Darmstadt, Německo).

3.1.2.2 Příprava liposomů

Byly připraveny roztoky solí NaCl, KCl, CsCl o koncentraci 1M. Roztok příslušného lipidu byl smíchán s fluorescenční sondou Laurdan. Celkové množství fluorescenční sondy v liposomu bylo 1% (molární). Organická rozpouštědla byla za stálého ohřívání odpařena proudem dusíku. Vysušený lipid byl rozpuštěn v 0,5 ml roztoku soli nebo vody s 0,1 mM EDTA a 3 minuty míchán. LUV byly vytvořeny extruzí přes polykarbonátovou membránu (Avestin, Ottawa, Kanada) se 100 nm póry. Roztok liposomů byl 3x zředěn stejnou solí. Koncentrace lipidu ve vzorku byla 1mM. Vzorky byly převedeny do kyvety a ponechány 10 minut vytemperovat na požadovanou teplotu.

3.1.2.3 Spektroskopická měření

3.1.2.3.1 Ustálená fluorescence

Všechna excitační a emisní spektra byla měřena Fluorologem-3 spectrofluorimetrem (model FL3-11; Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA) vybaveným xenonovou lampou. Krok měření spekter činil 1 nm. Emisní spektra vzorků byla měřena při excitačním záření 373 nm, excitační spektra vzorků byla měřena při emisním záření 440 nm a 490 nm. Měření vzorků byla provedena při teplotě 283 K.

3.1.2.3.2 Časově rozlišená fluorescence

Časově rozlišená fluorescenční spektra byla naměřena na přístroji 5000U Single Photon Counting (IBH, Glasgow, UK), s použitím IBH laserové diody NanoLED 11 (o vlnové délce budícího záření 373nm, s dobou pulzu 80 ps a s frekvencí 1 MHz) a Hamamatsu R3809U - 50 chlazené mikrokanálové desky fotonásobiče. Při měření pomocí metody relaxace rozpouštědla byly měřeny série křivek fluorescenčního dohasínání při různých emisních vlnových délkách (400-540 nm). Krok měření v sérii byl 10 nm. Při měření fluorescenčního vyhasínání byl používán stínící filtr. Účelem filtru bylo eliminovat rozptýlené světlo o vlnových délkách $\lambda < 399$ nm. Při měření nebyly používány polarizátory. Hladina signálu nepřekročila 2% repetiční frekvence světelného zdroje (1MHz). Data byla sbírána do 8192 kanálů (jeden kanál odpovídá 0,014 ns) tak dlouho, dokud maximální hodnota nedosáhla 5000 counts (počtu detekovaných fotonů). Měření vzorků byla provedena při teplotě 283K. Fluorescenční křivky byly fitovány multi-exponenciálními funkcemi a to buď 2, nebo 3 exponenciálními. Křivky byly fitovány v IBH DAS6 softwaru.

3.1.3 Výsledky

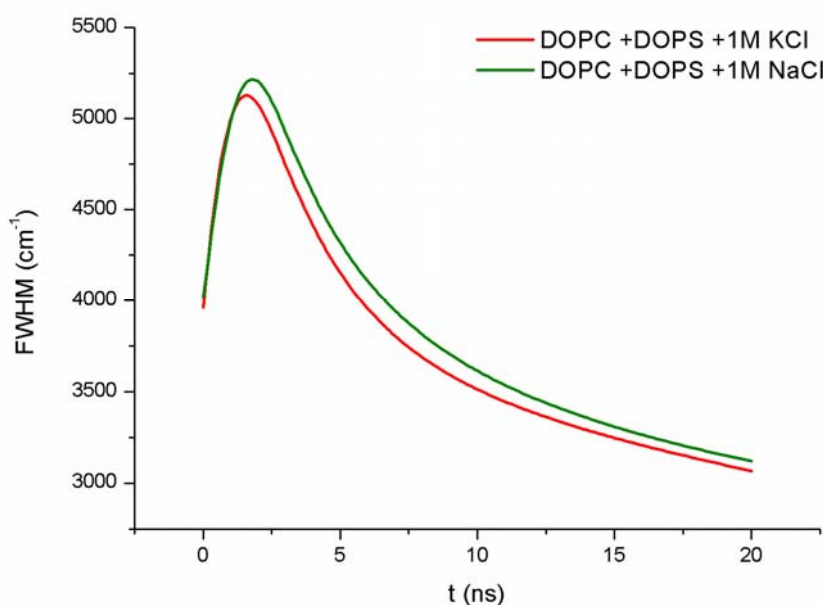
Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci [30], ve které jsem se zabývala vlivem iontů na modelové membrány DOPC. Proto byly v této práci nejprve studovány směsné negativně nabitě modelové membrány DOPC/DOPS (směs lipidů o molárním poměru 4:1) a porovnávány s čistým DOPC (DOPC naměřeno dříve). Později byly zkoumány analogické negativně nabitě membrány POPC/POPS (opět směs lipidů o molárním poměru 4:1) a pro srovnání neutrální membrány POPC.

Lipidové dvojvrstvy byly označeny fluorescenční značkou Laurdan, která se zanořuje do oblasti *sn*-1 karbonylu. Stacionární emisní spektra a křivky fluorescenčního vyhasínání byly měřeny při 283 K.

3.1.3.1 DOPC/DOPS vs DOPC

Nejprve byl studován vliv přítomnosti NaCl a KCl na hydrataci a mobilitu modelových směsných membrán DOPC/DOPS (molární poměr 4:1). Membrány byly ve formě LUV. Pro srovnání uvádím také výsledky pro DOPC naměřené dříve.

K analýze dat byly používány šířky v polovině maxima (FWHM) časově rozlišených emisních spekter (TRES) [17, 21]. Grafy závislosti FWHM na čase jsou uvedeny na obrázku č. 13. Křivky vykazují v obou případech jasné maximum, proces relaxace rozpouštědla proběhl tedy během časového rozlišení měření [21].



Obrázek č. 13 – FWHM pro Laurdan v dvojvrstvách DOPC/DOPS (v molárním poměru 4:1) ve formě LUV. Dvojvrstvy byly v přítomnosti 1 M solí NaCl a KCl. Měřeno při 283 K.

Další analýzou TRES spekter byly získány parametry jako jsou-celkový spektrální posuv (Δv), integrační relaxační čas (τ_r) a procenta z pozorovaného relaxačního procesu (hodnoty uvedeny v tabulce č. 1)[18].

Tabulka č. 1 - Parametry relaxace rozpouštědla získané pro DOPC/DOPS a DOPC LUV v přítomnosti 1M solí (chloridů) značených Laurdanem při 283K.

	DOPC/DOPS 4/1			DOPC (naměřené dříve)		
	Δv (cm^{-1})	τ_r (ns)	pozorováno (%)	Δv (cm^{-1})	τ_r (ns)	pozorováno (%)
NaCl	4200	2,20	78	4200	1,65	76
KCl	4150	2,00	75	4200	1,60	70

Z procesu relaxace rozpouštědla bylo ve všech případech pozorováno přibližně 75%.

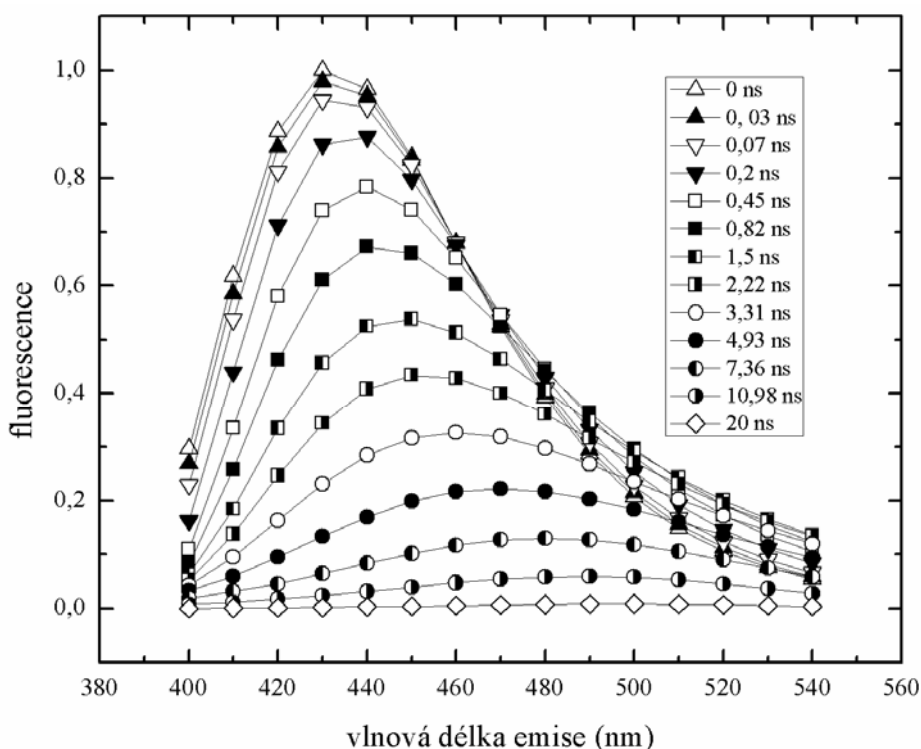
Polarita (hydratace) membrány je přímo úměrná spektrálnímu posuvu Δv [17, 19]. Hodnoty spektrálního posuvu jsou naměřené a vypočítané s přesností na 50 cm^{-1} . V membránách DOPC/DOPS i DOPC rozdíl Δv pro uvedené ionty nepřesahuje tuto hodnotu. Můžeme tedy říct, že hydratace je v přítomnosti obou iontů přibližně stejná. Negativně nabitá membrána DOPC/DOPS se však zdá být mírně hydratovanější v přítomnosti NaCl ($\Delta v = 4200\text{ cm}^{-1}$) než v přítomnosti KCl ($\Delta v = 4150\text{ cm}^{-1}$).

Relaxační čas τ_r je nepřímo úměrný mobilitě systému. V přítomnosti NaCl je relaxační proces pomalejší ($\tau_r = 2,20\text{ ns}$) než v přítomnosti KCl ($\tau_r = 2,00\text{ ns}$). Membrána je tedy v přítomnosti sodných iontů sbalenější a méně pohyblivá. Stejnému trendu odpovídají hodnoty pro neutrální membránu DOPC, avšak rozdíl mezi relaxačními časy je mnohem menší: v přítomnosti NaCl $\tau_r = 1,65\text{ ns}$ a v přítomnosti KCl $\tau_r = 1,60\text{ ns}$.

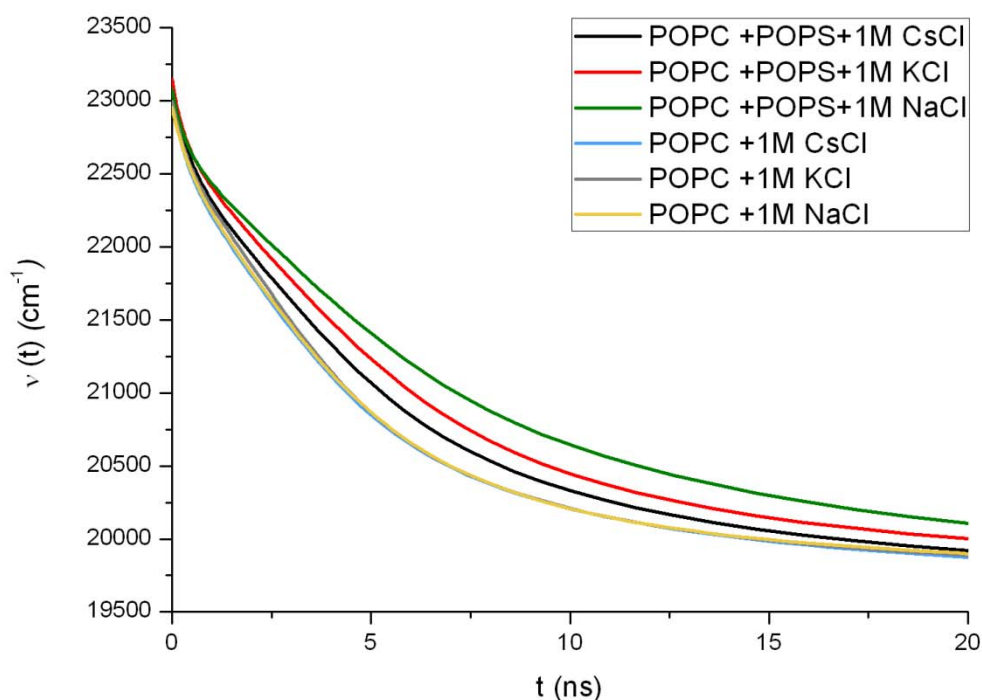
3.1.3.2 POPC/POPS vs POPC

DOPC obsahuje dvě nenasycené mastné kyseliny, naproti tomu POPC má pouze jednu nenasycenou mastnou kyselinu a druhou – palmitovou - nasycenou. Membrány POPC jsou při teplotě 283K méně pohyblivé (viz teoretický úvod), v důsledku toho trvá relaxační proces déle. Proto můžeme lépe sledovat rozdíly ve vlastnostech membrán POPC než DOPC.

Předmětem zkoumání byly směsné negativně nabitě membrány POPC/POPS (opět směs lipidů o molárním poměru 4:1) a pro kontrolu neutrální membrány POPC. Membrány byly ve formě 100 nm LUV. Vliv solí na hydrataci a mobilitu modelových membrán byl studován v přítomnosti 1 M NaCl, KCl a CsCl a pro kontrolu také bez soli. Z naměřených stacionárních emisních spekter a křivek fluorescenčního vyhasínání byly zrekonstruovány časově rozlišená emisní spektra (TRES). Příklad TRES spektra je znázorněn na obrázku č. 14. Všechny FWHM profily získané analýzou TRES vykazovaly jasné maximum, z toho vyplývá, že relaxace rozpouštědla proběhla během časového rozlišení měření [21].

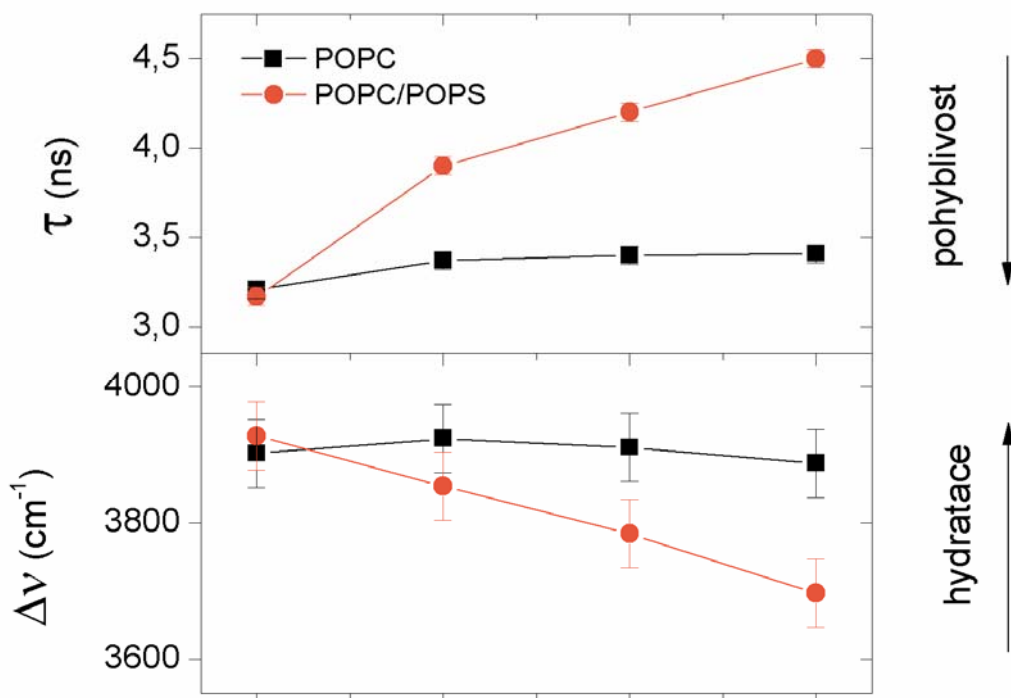


Obrázek č. 14 - Časově rozlišené emisní spektrum v časovém rozmezí do 20 ns po excitaci pro Laurdan v membráně POPC ve formě LUV v přítomnosti 1 M NaCl. Měřeno při 283 K.



Obrázek č. 15 – Pozice maxim TRES spekter $v(t)$ v závislosti na čase pro Laurdan v membránách POPC/POPS a POPC ve formě LUV v přítomnosti 1 M solí. Měřeno při 283 K.

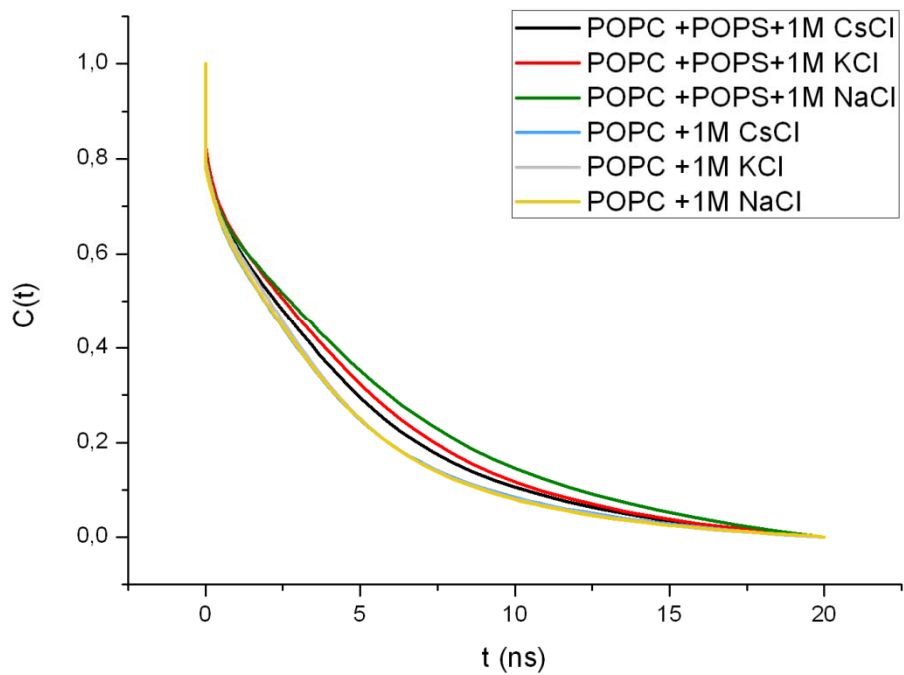
Obrázek č. 15 znázorňuje pozice maxim TRES spekter $v(t)$. Křivky $v(t)$ pro všechny vzorky neutrálních membrán POPC (všechny soli i bez soli) a také pro negativně nabitě membrány POPC/POPS v nepřítomnosti soli jsou si velmi podobné. Ovšem jasné rozdíly pozorujeme mezi křivkami $v(t)$ pro POPC/POPS v přítomnosti jednotlivých kationtů. Tomu odpovídají hodnoty celkového spektrálního posuvu $\Delta\nu$, které pro negativně nabitě membrány POPC/POPS mají klesající charakter ve směru: voda (3950 cm^{-1}) > Cs^+ (3850 cm^{-1}) > K^+ (3800 cm^{-1}) > Na^+ (3700 cm^{-1}). Výsledky znázorňuje obrázek č. 16. Spektrální posuv je přímo úměrný míře hydratace membrány. Pozorujeme, že přidání soli k negativně nabitě membráně způsobí její dehydrataci, přičemž nejvíce je membrána dehydratována v přítomnosti sodných kationtů. Hydratace neutrálních membrán POPC se po přidavku soli nezmění, hodnota $\Delta\nu$ je 3900 cm^{-1} a to pro membránu bez soli i s jakoukoliv solí. K výpočtu $\Delta\nu$ byla použita hodnota $v(0)_{estimated}$ určená metodou odhadu [20] na 23800 cm^{-1} a jako $v(\infty)$ bylo zvoleno $v(t=20\text{ns})$. Ve všech případech bylo pozorováno okolo 80% z relaxačního procesu.



Obrázek č. 16 – Srovnání parametrů relaxace rozpouštědla: Δv a τ_r pro Laurdan ve smíšených dvojvrstvách POPC/POPS a neutrálních dvojvrstvách POPC (ve formě LUV). Dvojvrstvy byly v přítomnosti 1 M solí nebo bez solí. Měření byla provedena při 283 K.

Závislost korelačních funkcí $C(t)$ (viz vztah 11) na čase pro jednotlivé vzorky jsou vykresleny v obrázku č. 17. Jasně rozdíly pozorujeme opět pouze u negativně nabitých membrán POPC/POPS po přidavku jednotlivých solí. Křivky pro neutrální membrány a pro membrány bez přidavku soli jsou si velmi podobné.

Mobilita systému je po přidavku soli k čistému POPC mírně snížena ($\tau_{r(\text{voda})} = 3,21\text{ns}$, $\tau_{r(\text{sól})} \approx 3,40\text{ns}$). Přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2 (v kapitole 3.1.4. - diskuze). U negativních membrán však pozorujeme markantní pokles mobility systému v přítomnosti jednotlivých solí: voda (3,17 ns) > Cs^+ (3,9 ns) > K^+ (4,2 ns) > Na^+ (4,5 ns). Znaménko nerovnosti vyjadřuje snižování pohyblivosti systému. Relaxační proces je tedy u negativních membrán v přítomnosti soli mnohem pomalejší než bez soli, nejsilnější efekt pozorujeme v přítomnosti sodných kationtů.



Obrázek č. 17 - Korelační funkce $C(t)$ v závislosti na čase pro Laurdan v membránách POPC/POPS a POPC ve formě LUV v přítomnosti 1 M solí. Měřeno při 283 K.

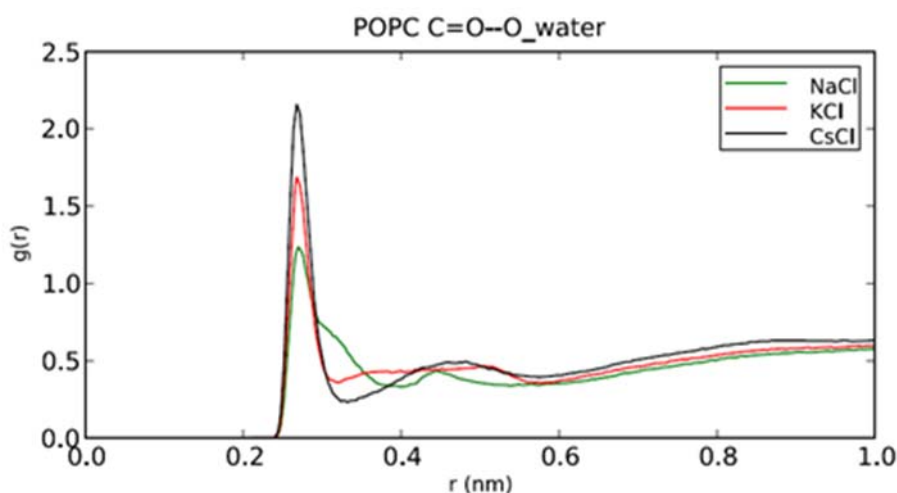
3.1.4 Diskuze

Tato studie srovnává experimentální výsledky s molekulárně dynamickými (MD) simulacemi neutrálních (PC) a negativně nabitých (PS) membrán v přítomnosti solí.

Prvním důležitým výsledkem této studie je, že vlastnosti membrán POPC, do kterých je přidán POPS, jsou velmi silně ovlivněny přítomností kationtů (jak bylo předpokládáno). Naproti tomu vlastnosti membrán složených pouze z POPC jsou přítomností kationtů ovlivněny jen velmi slabě.

V nepřítomnosti soli bychom mohli předpokládat, že přidavek negativně nabitých lipidů do neutrální membrány vyvolá repulzi mezi negativně nabitými hlavičkami. Díky tomu dojde k expanzi membrány a to povede k zvýšení hydratace. Avšak v případě, kdy není přítomna žádná sůl (membrána pouze ve vodě), přidavek POPS do neutrální membrány POPC nezpůsobí významnou změnu v hydrataci membrány. Musíme si však uvědomit, že hlavičky PS jsou mnohem menší než hlavičky PC, a také, že negativně nabitá membrána obsahuje vždy určité množství protiontů k negativně nabitým hlavičkám. V tomto případě to bylo 0,2 mM Na⁺. Je možné, že už tak malé množství může mít vliv na dehydrataci membrány.

Dalším dílčím výsledkem této studie je, že přidavek fyziologického množství POPS do neutrální membrány POPC v přítomnosti kteréhokoli ze studovaných iontů způsobí dehydrataci membrány. Nejméně membránu dehydratují cesné kationty, o něco více draselné a nejvíce sodné ($\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$). Stejně pořadí kationtů (jako u Δv a τ_r) nalezneme v Hofmeisterově řadě, experimentální výsledky se tedy shodují s touto řadou. V naší skupině byly také provedeny molekulárně dynamické simulace membrán POPC/PS, které také potvrdily, že přítomnost jednotlivých kationtů ovlivňuje hydrataci membrány. Radiální distribuční funkce (obrázek č. 18) byly spočítány pro atomové páry mezi atomy kyslíku v molekule karbonylu a atomy kyslíku molekul vody. Hydratace klesá v řadě: $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, to se shoduje s výsledky fluorescenční relaxace rozpouštědla.



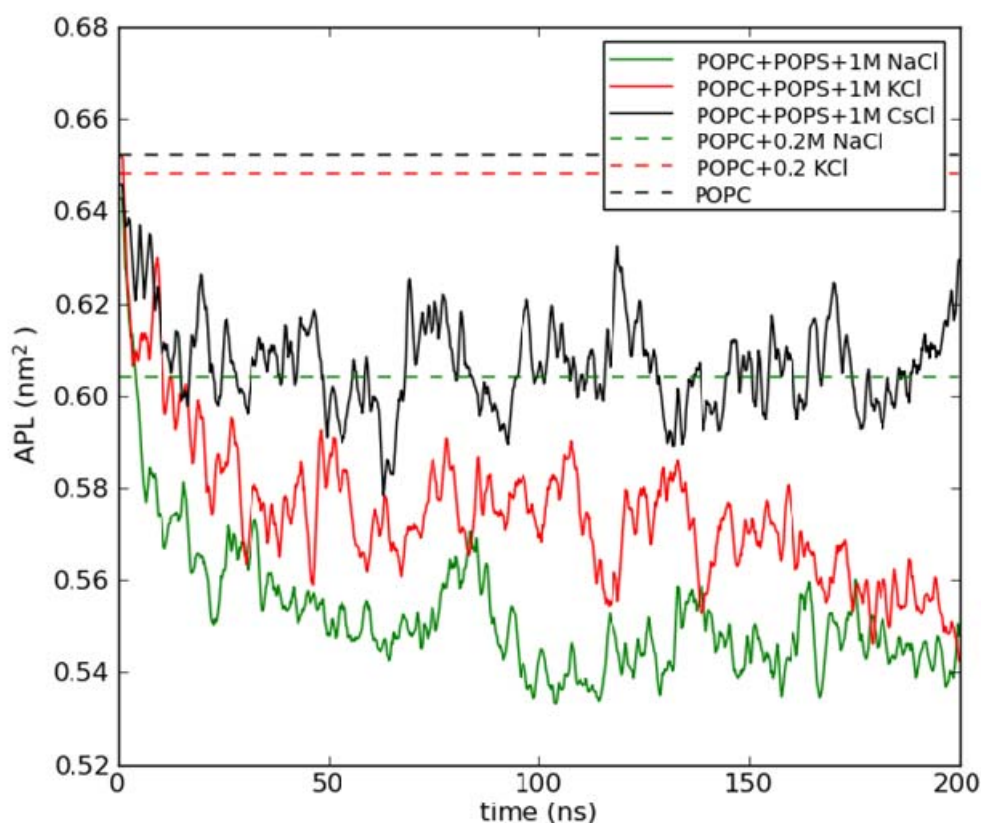
Obrázek č. 18 – Radiální distribuční funkce spočítaná pro kyslíkové atomové páry: za první kyslíky v karbonylových skupinách molekul POPC a to řetězců v pozici sn-1 i sn-2; a za druhé kyslíky v molekulách vody.

Jak již bylo řečeno (ve výsledcích), u negativních membrán pozorujeme v přítomnosti jednotlivých solí markantní pokles mobility systému. A to v pořadí: voda > Cs⁺ > K⁺ > Na⁺. Hodnoty relaxačních časů, které jsou nepřímo úměrné mobilitě systému, jsou uvedeny v tabulce č. 2. Znamená to, že v přítomnosti solí je tato membrána sbalenější a to znesnadňuje lipidům pohyb. Je-li membrána sbalenější, pak je také dehydratovanější. Největší dehydrataci membrány vyvolá přítomnost sodných kationtů. Výsledky hydratace a pohyblivosti negativních membrán se tedy shodují. Neutrální membrány vykazují v hydrataci i mobilitě stejný trend jako negativní membrány - tzn. po přidavku soli jsou membrány sbalenější (méně pohyblivé) a také dehydratovanější. Nepozorujeme však tak významné rozdíly mezi jednotlivými kationty.

Tabulka č. 2 - Parametry molekulárně dynamických simulací a relaxace rozpouštědla získané pro POPC/POPS a POPC membrány ve formě LUV v přítomnosti 1M solí (chloridů) a ve vodě značených Laurdanem při 283K.

	POPC/POPS 4/1			POPC		
	Δv (cm ⁻¹)	T_r (ns)	APL (nm ²)	Δv (cm ⁻¹)	T_r (ns)	APL (nm ²)
NaCl	3700	4,50	0,546	3900	3,41	0,604 ^a
KCl	3800	4,20	0,561	3900	3,40	0,648 ^a
CsCl	3850	3,90	0,607	3900	3,37	-
voda	3950	3,17	-	3900	3,21	0,654

a: hodnoty jsou převzaty z článku [28]



Obrázek č. 19 – Znázorňuje APL smíšených negativně nabitých dvojvrstev POPC/POPS (plná čára) a neutrálních dvojvrstev POPC (přerušovaná čára). Hodnoty APL pro neutrální dvojvrstvy POPC byly převzaty z [27].

Pomocí MD byly vypočítány hodnoty APL (area per lipid - prostor jednoho lipidu) pro membrány POPC/POPS v přítomnosti 1M solí. APL jako funkce času znázorňuje obrázek č. 19. Pro srovnání jsou uvedeny také průměrné hodnoty APL v neutrálních membránách POPC v přítomnosti: vody, 0,2 M NaCl a 0,2 M KCl - tyto hodnoty jsou převzaty z článku [28]. Hodnoty APL pro jednotlivé systémy jsou uvedeny v tabulce č. 2. Opět pozorujeme, že APL klesá v pořadí: $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. Nejnižší hodnotu APL má membrána v přítomnosti sodných iontů. Znamená to tedy, že v přítomnosti sodných iontů je membrána nejvíce sbalená, lipidy mají tak nejméně prostoru. Tyto výsledky se tedy opět shodují s experimentálně naměřenými relaxačními časy, které jsou nepřímo úměrné mobilitě systému.

3.1.5 Závěr

První studie této práce měla za cíl objasnit, jak sodné, draselné a cesné kationty ovlivňují vlastnosti smíšených neutrálních a negativních membrán. Vliv iontů byl studován metodou relaxace rozpouštědla a srovnáván s výsledky molekulárně dynamických simulací.

V přítomnosti vybraných kationtů je lipidová membrána obsahující negativně nabitě lipidy sbalenější než v případě neutrální lipidové membrány. Pohyblivost v oblasti fosfolipidových hlaviček je v přítomnosti těchto kationtů snížena. Přítomnost kationtů v membráně vyvolá také její dehydrataci. Stejný, ale slabší trend pozorujeme i v neutrálních membránách.

Po přidavku negativně nabitého lipidu PS do membrány PC pozorujeme specifické efekty jednotlivých iontů. Největší efekt vykazoval Na^+ , naopak nejmenší efekt vykazoval Cs^+ . Toto pořadí je v souladu s Hofmeisterovou řadou.

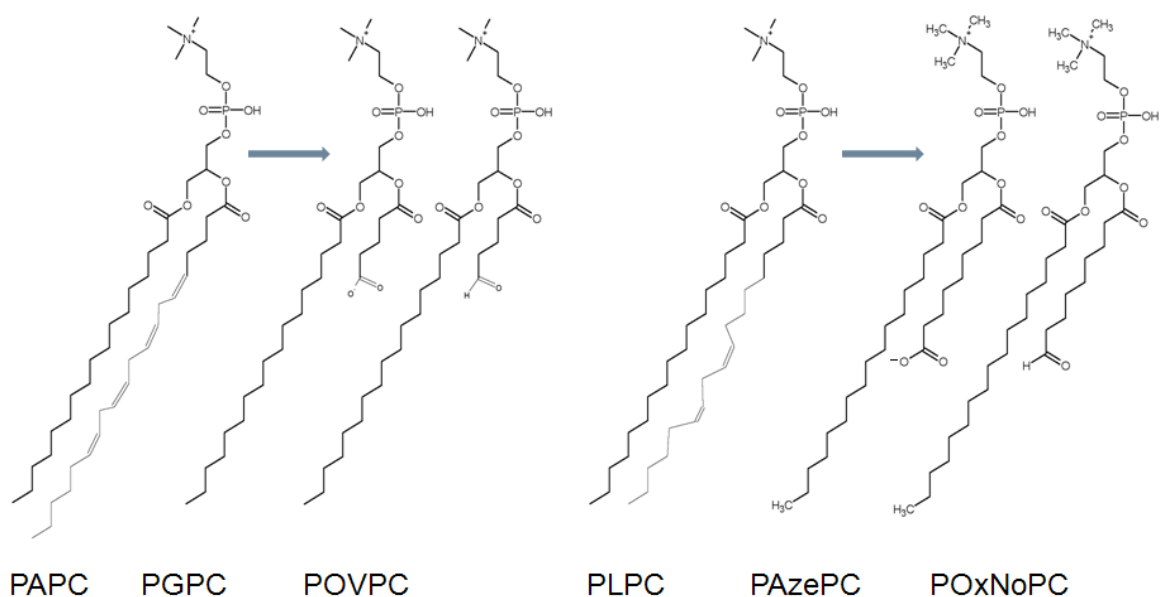
Experimentální výsledky fluorescenční relaxace rozpouštědla se shodují s molekulárně dynamickými simulacemi.

3.2 Studie č. 2 - VLIV OXIDOVANÝCH LIPIDŮ NA NEGATIVNĚ NABITÉ MODELOVÉ MEMBRÁNY

3.2.1 Úvod

Jelikož se oxidované lipidy významně podílí na mnoha patofyziologických procesech, jsou v posledních několika letech předmětem četného zkoumání. Oxidované lipidy se od neoxidovaných velmi liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Cílem této studie bylo prozkoumat, jak různé oxidované lipidy ovlivňují hydrataci a mobilitu lipidových dvojvrstev. Oxidované lipidy použité v této práci byly oxidačními produkty buďto lipidu PLPC (1-palmitoyl-2-linoloyl-sn-glycero-3-fosfocholin) v případě PazePC (1-palmitoyl-2-azelaoyl)-sn-glycero-3-fosfocholin) a PoxnoPC (1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-fosfocholin), nebo lipidu PAPC (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-fosfocholin) v případě PGPC (1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-fosfocholin) a POVPC (1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-fosfocholin) [8, 9] Struktury jednotlivých oxidovaných lipidů jsou znázorněny na obrázku č. 20. Tyto oxidované lipidy mají velice podobnou chemickou stavbu. Liší se pouze řetězcem v *sn*-2 poloze glycerolu. PazePC a PoxnoPC mají devíti uhlíkatý řetězec, naproti tomu PGPC a POVPC mají pěti uhlíkatý řetězec. PazePC a PGPC mají na konci tohoto řetězce karboxylovou funkční skupinu, PoxnoPC a POVPC aldehydovou.

V následujících několika odstavcích bude uveden přehled literatury, pojednávající o oxidovaných lipidech. Bylo zjištěno, že podle hodnot kritických micelárních koncentrací (CMC) lze oxidované lipidy seřadit takto: POVPC > PGPC > PoxnoPC > PazePC [37]. Vidíme, že CMC oxidovaných lipidů s pěti uhlíkatým *sn*-2 řetězcem je vyšší než těch s devíti uhlíkatým. Také si můžeme povšimnout toho, že oxidované lipidy s aldehydovými funkčními skupinami mají vyšší hodnotu CMC než ty s karboxyly.



Obrázek č. 20 – Struktury jednotlivých oxidovaných lipidů studovaných v této práci a struktury lipidů s nenasycenými řetězci, z nichž uvedené oxidované lipidy vznikají.

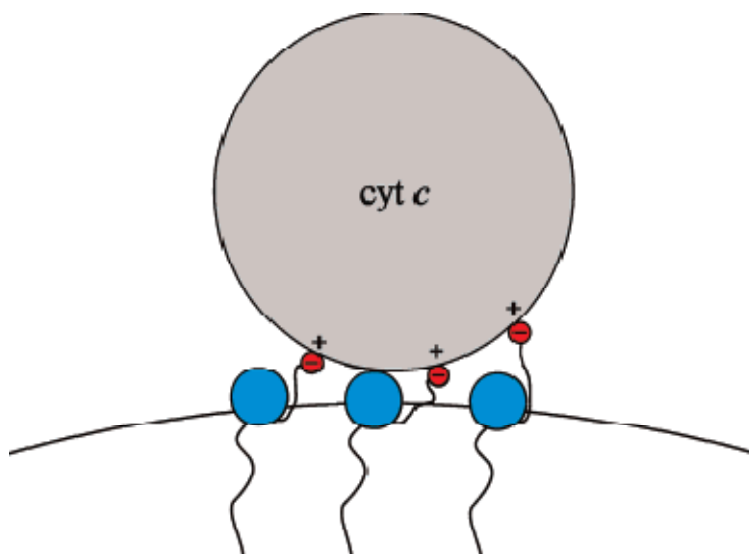
Dalším předmětem výzkumu byl tvar agregátů oxidovaných lipidů. Přesáhnou-li oxidované lipidy určitou kritickou micelární koncentrací, potom dochází k jejich agregaci. Bylo zjištěno, že oxidované lipidy tvoří micely o velikosti 4 – 9 nm [37, 38].

Metodou agarózové elektroforézy bylo zjištěno, že agregáty oxidovaných lipidů s karboxylovou funkční skupinou mají vyšší hodnotu povrchového napětí a elektroforetické mobility než oxidované lipidy s aldehydovou funkční skupinou [37].

Jak již bylo řečeno, lipidové membrány nejsou symetrické. Ve vnějších vrstvách buněčných membrán převažují neutrální lipidy (fosfatidylcholin - PC), naopak ve vnitřních vrstvách nalezneme velké množství negativně nabitých lipidů (fosfatidylserinů - PS). Při oxidaci lipidů v membráně dochází však k translokaci lipidů, membrána se stává symetrickou, a to vyvolává apoptózu [7, 9].

Lipidové dvojvrstvy jsou tvořeny tak, že hydrofilní hlavičky směřují do vodné fáze a hydrofobní ocsy do středu dvojvrstvy. To ovšem nelze prohlásit i o oxidovaných lipidech. K micelám PazePC a PoxnoPC byl přidán cytochrom c (kladně nabitý protein) a byla sledována jejich vzájemná interakce [39]. Cytochrom c zůstává ve vodné fázi, nezanořuje se mezi lipidy. Mezi micelami z PazePC a proteinem byla pozorována silná interakce. Aby mohlo k této interakci dojít, musí řetězce nesoucí karboxylové skupiny pronikat do oblasti lipidových hlaviček nebo přímo až do vodné fáze.

Interakce mezi micelami PoxnoPC a proteinem byla také pozorována, ale byla mnohem slabší. Znázornění vazby mezi PazePC a cytochromem c je vykresleno na obrázku č. 21.



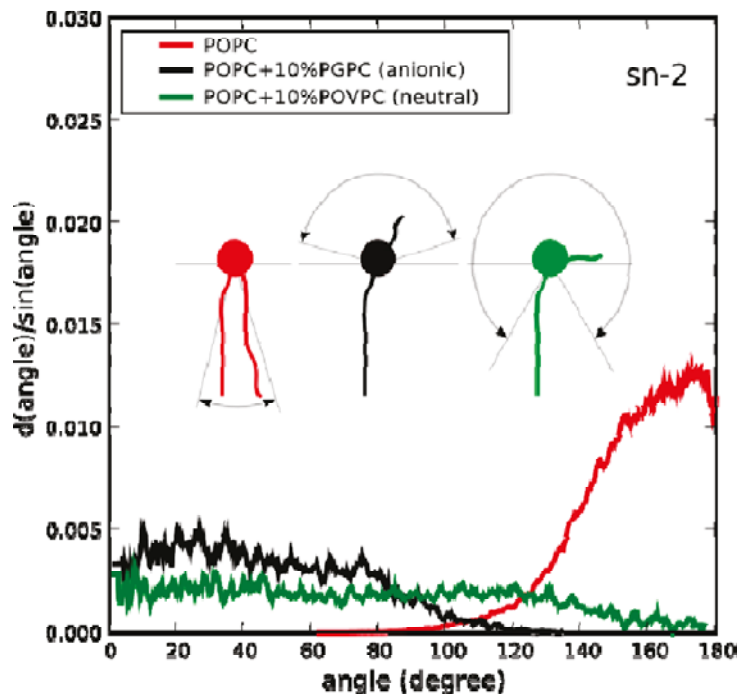
Obrázek č. 21 – Interakce cytochromu c a oxidovaného lipidu PazePC [39].

Ve stejné vědecké skupině byla provedena další podobná studie. Byla zkoumána vzájemná interakce mezi směsnými modelovými membránami a kladně nabitými antimikrobiálními peptidy (AMPs). Složení lipidových dvojvrstev bylo následující: PazePC+DMPC (1-palmitoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin) a PoxnoPC+DMPC, lipidy byly ve formě LUV. AMPs se zanořují do membrány. AMPs se podstatně slaběji váže k PazePC než k PoxnoPC [40]. To lze vysvětlit tím, že oxidované řetězce v PoxnoPC (s aldehydovou funkční skupinou) pronikají spíše do oblasti hydrofilních hlaviček, kde se proteiny vyskytují. Oxidované řetězce PazePC se naproti tomu vyskytují spíše ve vodné fázi.

Orientací *sn-2* řetězců v oxidovaných lipidech se kromě dalších experimentátorů [37, 41] zabývali také teoretičtí chemici [38, 42]. Byly provedeny molekulárně dynamické simulace systémů POPC+POVPC a POPC+PGPC [42]. Výsledek je znázorněn na obrázku č. 22. Řetězce POVPC (s aldehydovou funkční skupinou) se mohou vyskytovat jak uvnitř dvojvrstvy, tak v oblasti fosfolipidových hlaviček, tak ve vodné fázi. Řetězce PGPC (s karboxylovou funkční skupinou) se vyskytují pouze ve vodné fázi. Tyto výpočty jsou ve shodě s předchozími experimentálními výsledky [37, 40 - 42].

Také byl spočítán APL [42]. Hodnoty APL jsou ovlivněny orientací oxidovaného řetězce v *sn-2* poloze glycerolu. V případě PGPC dochází k vyčnívání řetězců ven, v membráně je zasunut pouze jeden řetězec, membrána je proto sbalenější, APL činí

0,61 nm². Řetězce POVPC vyčnívají buď ven (což by vedlo k většímu sbalení membrány), nebo jsou zanořeny v membráně - mohou však být také paralelně (to by naopak vedlo k uvolnění membrány). Tyto dva efekty působí proti sobě, sbalenost membrány se proto nemění a proto se nemění ani APL. Hodnota APL pro čistý POPC a pro POPC s 10% POVPC je stejná: 0,66 nm².

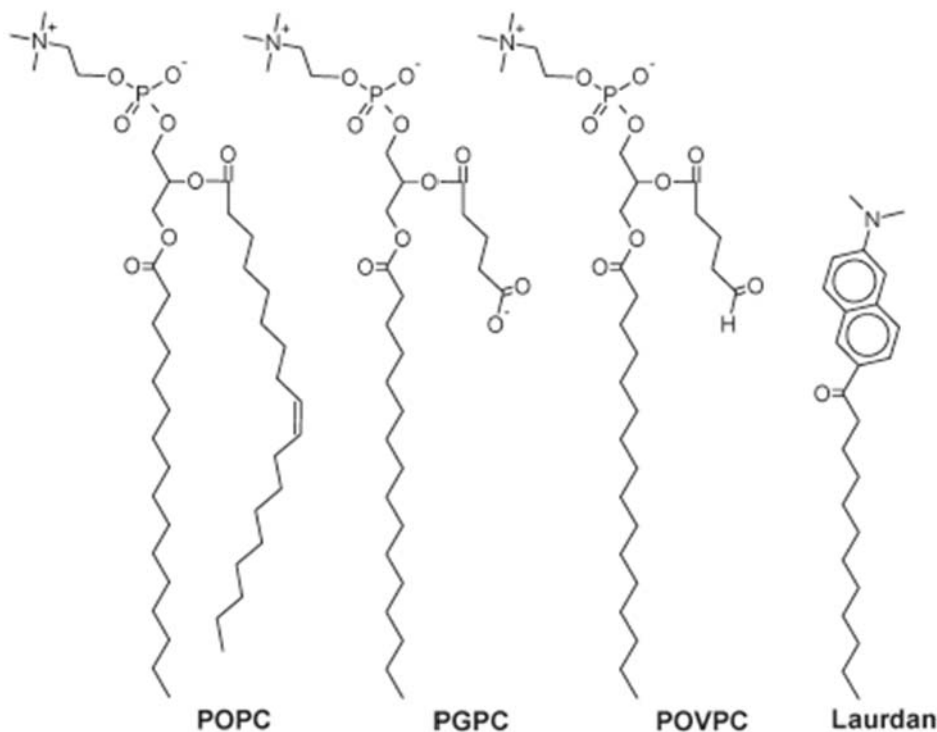


Obrázek č. 22 – znázorňuje distribuci úhlu sklonu řetězce v sn-2 poloze oxidovaných lipidů. Úhel 180° odpovídá řetězcům orientovaným rovnoběžně k normále membrány. [42]

Jak již bylo řečeno, větší množství oxidovaných lipidů bylo pozorováno v membránách jedinců trpících aterosklerózou. Ateroskleróza je onemocnění tepen, při němž se v jejich stěnách ukládají tukové látky. Takto poškozená tepna ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování až uzavření. Ateroskleróza je často spojována s apoptózou (buněčnou smrtí) [43]. Apoptóza je proces během něhož jsou eliminovány pro organismus již neprospěšné látky. Je to tedy pro organismus důležitý a prospěšný proces, probíhá-li ve správné míře. Více o ateroskleróze a apoptóze pojednávají například články [8 - 10]. K apoptóze dochází, jsou-li aktivovány receptory, které rozpoznávají apoptické buňky. Tyto buňky jsou následně odstraněny - dojde k apoptóze. „Apoptické“ receptory mají své specifické ligandy, naváže-li se příslušný ligand na receptor, dojde k aktivaci receptoru. Kromě specifických ligandů

mohou však být tyto receptory aktivovány oxidovanými lipidy [8, 10]. K apoptóze pak buďto dochází ve zvýšené míře nebo je funkce receptorů modifikována. Experimentálně byl tento proces ověřen na oxidovaných lipidech PGPC a POVPC a receptorech PAF-R (platelet activating factor - receptor) [8, 9] a CD36 [8, 10].

V této diplomové práci byl zkoumán vliv oxidovaných lipidů (PGPC, POVPC, PazePC a PoxnoPC) na hydrataci a pohyblivost modelových lipidových membrán (neutrálních nebo negativních) v přítomnosti KCl nebo v nepřítomnosti soli a to za fyziologického pH. KCl bylo zvoleno na základě výsledků předchozí studie, kde vykazoval „střední“ efekt na hydrataci i mobilitu negativních membrán. Neutrální modelové membrány byly složeny z POPC a příslušného oxidovaného lipidu (v molárním poměru 9:1). Negativní membrány se skládaly z POPC, POPS a příslušného oxidovaného lipidu (tentokrát v molárním poměru 7:2:1). K označení lipidů v oblasti glycerolu byla použita fluorescenční značka Laurdan. Struktury jednotlivých lipidů a Laurdanu a také hloubka zanoření této značky jsou vyznačeny na obrázku č. 23. Z oxidovaných lipidů jsou pro větší přehlednost znázorněny pouze ty, které mají pěti uhlíkatý oxidovaný řetězec. Použitou metodou byla relaxační relaxace rozpouštědla.



Obrázek č. 23 - Struktury lipidů a fluorescenční značky použitých v této diplomové práci. Fluorofor v Laurdanu je zanořen do oblasti karbonylů lipidů.

3.2.2 Materiály a metody

3.2.2.1 Použité chemikálie

Lipidy - 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (POPC), 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserin (POPS), 1-palmitoyl-2-glutaryl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (PGPC), 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-*sn*-glycero-3-fosfocholin (POVPC), 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-*sn*-glycero-3-fosfocholin (PoxnoPC) a 1-palmitoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (PazePC). Lipidy firmy Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) byly uskladněny při -20°C v rozpouštědlech chloroformu a metanolu v poměru 2:1 (v:v).

Fluorescenční sonda - 6-dodekanoyl-2-dimethylaminonafalen (Laurdan), pořízená od firmy Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Laurdan byl uložen v methanolu při teplotě -20°C.

Ostatní - Chlorid draselný KCl a pufr HEPES byly pořízeny do firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Voda pro spektroskopické účely - Milli-Q od firmy (Millipore, Billerica, MA, USA). Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA, hydroxid sodný NaOH a hydroxid draselný KOH firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Organická rozpouštědla pro spektroskopické účely byly produktem firmy Merck (Darmstadt, Německo).

3.2.2.2 Příprava liposomů

Roztoky příslušných lipidů byly smíchány s fluorescenční sondou Laurdan v molárním poměru buďto POPC/POPS/Oxidovaný lipid/Laurdan 69/20/10/1, nebo POPC/Oxidovaný lipid/Laurdan 89/10/1. Organická rozpouštědla byla za stálého ohřívání odpařena proudem dusíku. Vysušený lipid byl rozpuštěn v 0,5 ml 10 mM HEPES (pH 7,4) nebo 10 mM HEPES s 150 mM KCl a 3 minuty míchán. LUV byly vytvořeny extruzí přes polykarbonátovou membránu (Avestin, Ottawa, Kanada) se 100 nm póry. Roztok liposomů byl 3x zředěn příslušným roztokem. Celková koncentrace lipidu ve vzorku byla 1 mM. Vzorky byly převedeny do kyvety a ponechány 10 minut vytemperovat na požadovanou teplotu.

3.2.2.3 Spektroskopická měření

Spektroskopická měření byla shodná se spektroskopickými měřeními v předchozí studii.

3.2.3 Výsledky

V předchozí studii této práce byly zkoumány smíšené negativně nabitě membrány POPC/POPS (o molárním poměru 4:1) a pro srovnání neutrální membrány POPC. Jelikož v živých organismech může docházet k oxidaci lipidů v membránách, je z fyziologického hlediska významné studium oxidovaných lipidových membrán.

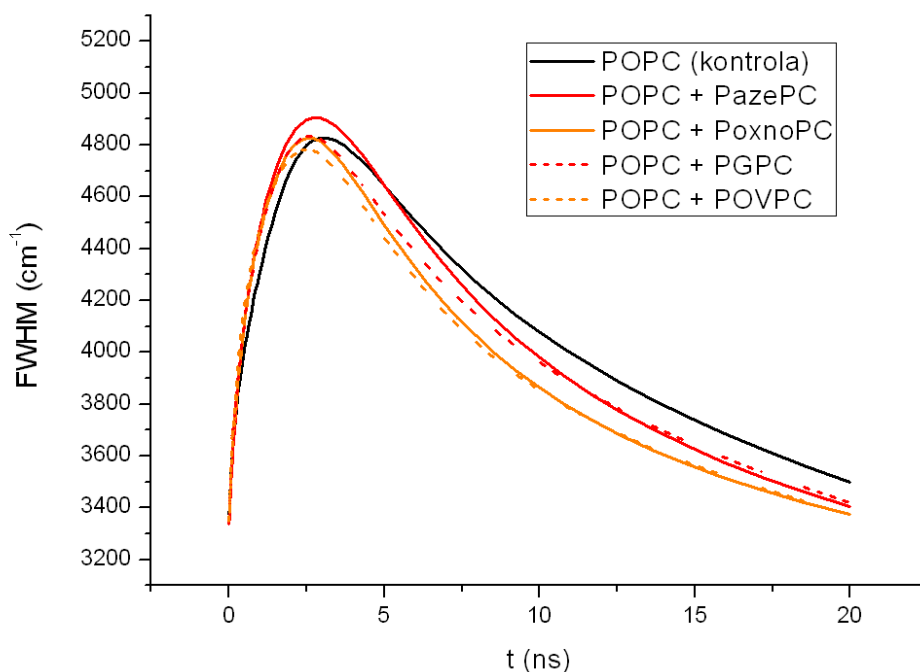
V této druhé studii byl tedy použit stejný systém lipidů jako v předchozí studii (POPC/PS a POPC) s tím rozdílem, že do membrán bylo přidáno 10% (molárních) čtyř různých oxidovaných lipidů. Modelové oxidované membrány byly nejprve zkoumány bez přítomnosti soli a poté v přítomnosti 150 mM KCl.

Lipidové dvojvstvy ve formě LUV byly opět označeny fluorescenční značkou Laurdan, která se zanořuje do oblasti *sn-1* karbonylu. Můžeme s její pomocí proto studovat vlastnosti v oblasti fosfolipidových hlaviček. Stacionární emisní spektra a křivky fluorescenčního vyhasínání byly měřeny při 283 K.

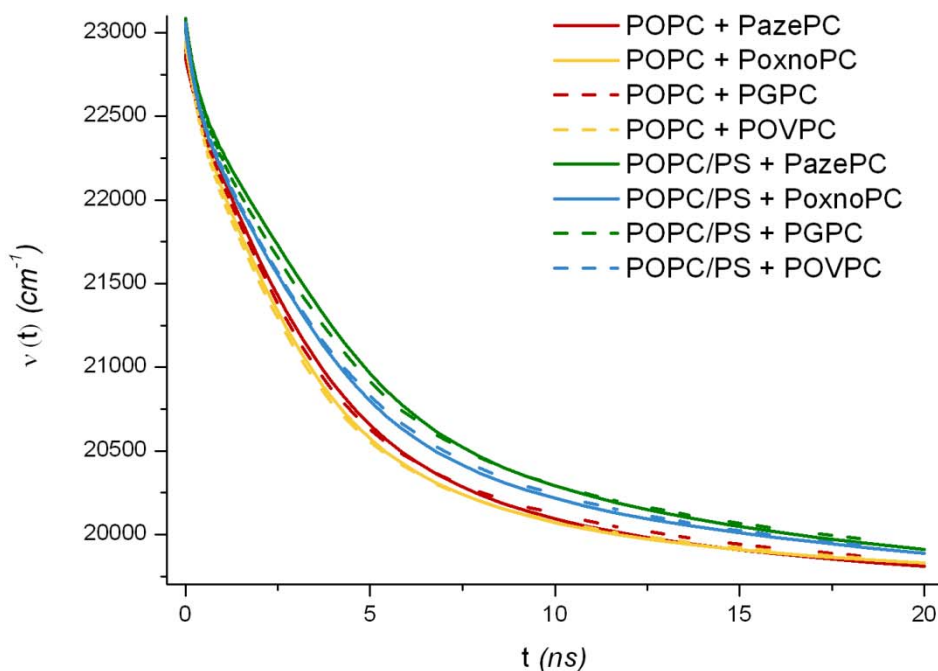
3.2.3.1 Modelové oxidované membrány bez přítomnosti soli

Nejprve byl studován vliv přítomnosti oxidovaných lipidů (POVPC, PazePC, PoxnoPC a PGPC) na hydrataci a mobilitu modelových směsných membrán POPC/POPS a neutrálních membrán POPC bez přítomnosti solí, tedy pouze v čistém pufru. Molární poměr jednotlivých lipidů v membráně byl následující: POPC/POPS/oxidovaný lipid: 70/20/10, POPC/oxidovaný lipid: 90/10.

Křivky šířky v polovině maxima (FWHM) vykazují ve všech případech jasné maximum, proces relaxace rozpouštědla proběhl tedy ve všech systémech během časového rozlišení měření [11bak]. Na obrázku č. 24 je znázorněna závislost FWHM na čase pro systémy POPC s 10% (molárními) oxidovaných lipidů a pro čisté POPC (kontrolní vzorek). Vidíme podobnost křivek pro systémy obsahující oxidované lipidy se stejnými funkčními skupinami. Jinak řečeno - blízké jsou si membrány s PazePC a s PGPC (červené křivky), které mají karboxylovou funkční skupinu a dále jsou si blízké membrány s PoxnoPC a s POVPC (oranžové křivky), které mají aldehydovou funkční skupinu.



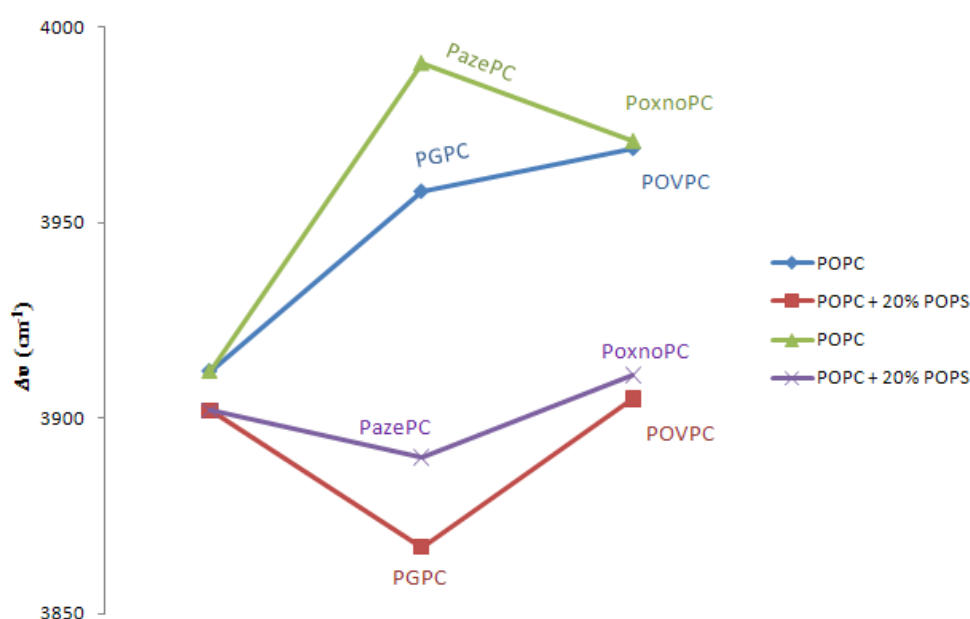
Obrázek č. 24 - FWHM pro Laurdan v dvojvrstvách POPC s příslušnými oxidovanými lipidy v molárním poměru 9:1. Dvojvrstvy byly ve formě LUV. Měřeno při 283 K v nepřítomnosti soli.



Obrázek č. 25 - Křivky závislosti $v(t)$ na čase pro Laurdan v dvojvrstvách POPC a POPC/POPS s příslušnými oxidovanými lipidy (molární poměry jednotlivých lipidů jsou uvedeny v textu). Dvojvrstvy byly ve formě LUV. Měřeno při 283 K v nepřítomnosti soli.

U křivek $v(t)$ (obrázek č. 25) pozorujeme stejný trend v blízkosti křivek jako u FWHM. Křivky $v(t)$ pro membrány obsahující oxidované lipidy se stejnými funkčními skupinami jsou si navzájem podobné. To platí jak v neutrálních membránách (žluté a červené křivky), tak v negativně nabitých membránách (modré a zelené křivky). Plnou čarou jsou znázorněny ty lipidy, jejichž oxidovaný řetězec je pěti uhlíkatý, přerušovaně jsou ty s devíti uhlíkatým řetězcem.

Hodnoty celkového spektrálního posuvu Δv se počítají z rozdílu $\Delta v = v(0 \text{ ns}) - v(20 \text{ ns})$. Hydratace membrány v oblasti karbonylu je přímo úměrná Δv (hodnoty Δv jsou zaneseny do tabulky č. 3 a znázorněny na obrázku č. 26).



Obrázek č. 26 - Hodnoty Δv pro Laurdan ve smíšených dvojrstvách POPC/POPS a neutrálních dvojrstvách POPC (ve formě LUV) v přítomnosti příslušných oxidovaných lipidů. Dvojrstvy byly bez solí. Měření byla provedena při 283 K.

Tabulka č. 3 - Parametry relaxace rozpouštědla získané pro POPC/POPS a POPC a příslušných oxidovaných lipidů. Dvojrstvy byly ve formě LUV a v nepřítomnosti soli. Použitá fluorescenční značka byla Laurdan. Měření byla provedena při 283K.

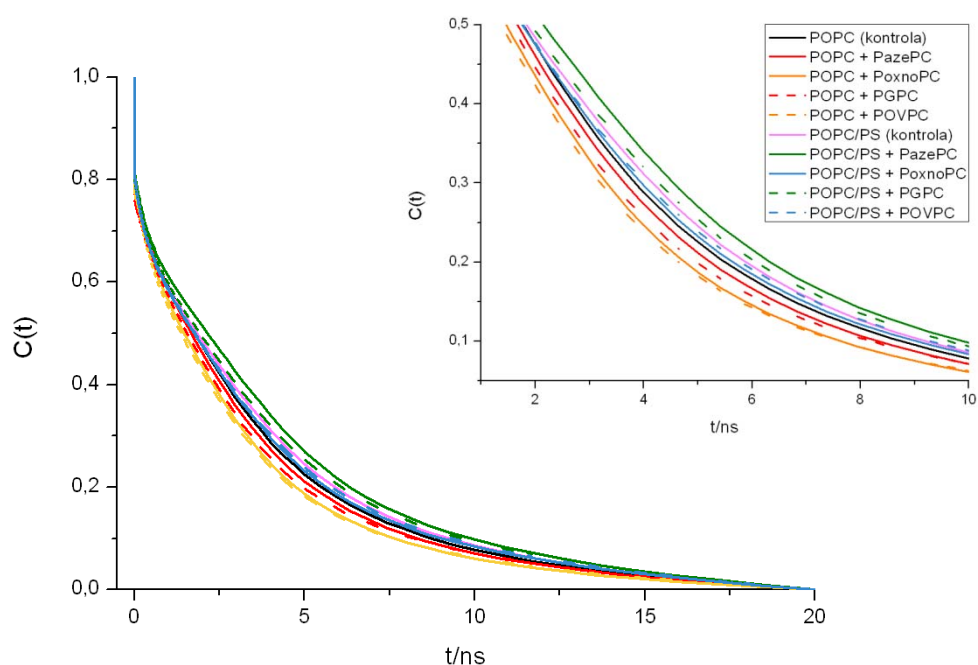
POPC/POPS				POPC		
ox. lipid	Δv (cm^{-1})	T_r (ns)	pozorováno (%)	Δv (cm^{-1})	T_r (ns)	pozorováno (%)
PazePC	3890	3,65	82	3990	3,05	78
PoxnoPC	3910	3,30	80	3970	2,80	78
PGPC	3870	3,50	80	3960	2,95	77
POVPC	3910	3,35	81	3970	2,80	79
kontrola	3900	3,15	79	3910	3,20	78

Přídavek oxidovaných lipidů do neutrální membrány POPC způsobí zvýšení hydratace membrány ($\Delta V_{(POPC)} = 3910 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta V_{(POPC + \text{oxidované lipidy})} = 3960\text{-}3990 \text{ cm}^{-1}$). Nepřesnost měření činí 50 cm^{-1} , rozdíly Δv mezi jednotlivými oxidovanými lipidy v neutrální membráně POPC jsou tedy v rámci experimentální chyby.

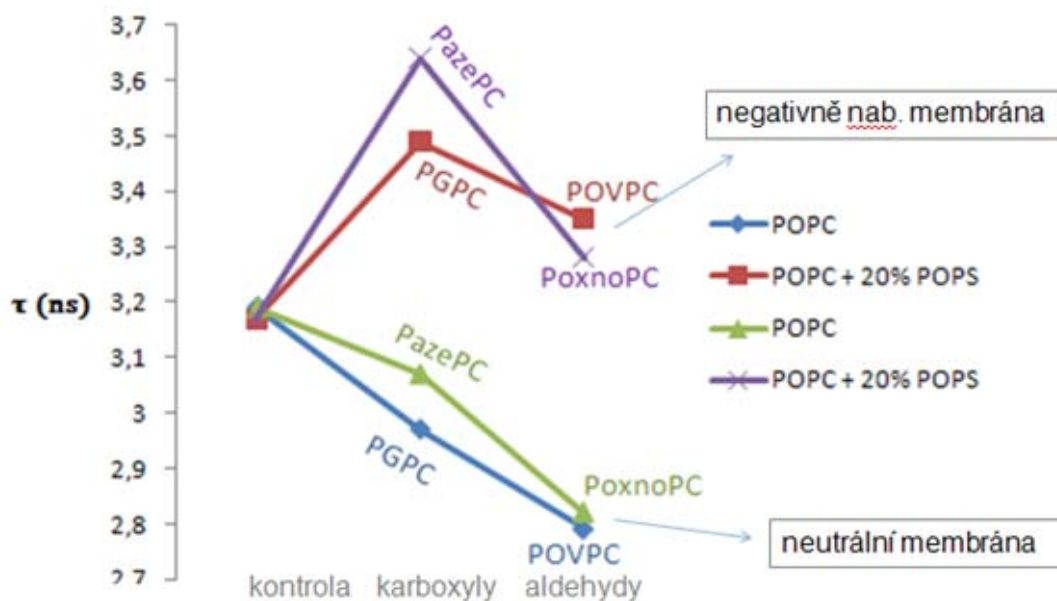
Přítomnost oxidovaných lipidů v negativně nabitě membráně POPC + 20% POPS (molární %) nezpůsobí výrazné změny v hydrataci membrány ($\Delta V_{(POPC/PS)} = 3900 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta V_{(POPC/PS + \text{oxidované lipidy})} = 3870\text{-}3910 \text{ cm}^{-1}$). Tyto hodnoty jsou v rámci experimentální chyby (50 cm^{-1}).

Ve všech případech bylo pozorováno okolo 80% z relaxačního procesu [20] (hodnoty pro jednotlivé systémy jsou uvedeny v tabulce č. 3).

Korelační křivka $C(t)$ je zobrazena na obrázku č. 27. Pozorujeme stejné pořadí křivek jako v případě křivek $v(t)$, jsou zde však navíc uvedeny kontroly-dvojrstvy bez oxidovaných lipidů. Pořadí je následující: POPC+aldehydy (oranžové) < POPC+karboxyly (červené) < POPC-kontrola (černá) < POPC/PS+aldehydy (modré) < POPC/PS-kontrola (růžová) < POPC/PS+karboxyly (zelené). Křivky $C(t)$ oxidovaných lipidů v neutrálních dvojrstvách leží pod neutrální kontrolou. Kontrola v negativních dvojrstvách leží však mezi vzorky s oxidovanými lipidy s aldehydy a oxidovanými lipidy s karboxyly.



Obrázek č. 27 - Křivky závislosti $C(t)$ na čase pro Laurdan v dvojrstvách POPC a POPC/POPS s příslušnými oxidovanými lipidy (molární poměry jednotlivých lipidů jsou uvedeny v textu). Dvojrstvy byly ve formě LUV. Měřeno při 283 K v nepřítomnosti soli.



Obrázek č. 28 - Hodnoty τ pro Laurdan ve smíšených dvojvrstvách POPC/POPS a neutrálních dvojvrstvách POPC (ve formě LUV) v přítomnosti příslušných oxidovaných lipidů. Dvojvrstvy byly bez soli. Měření byla provedena při 283 K.

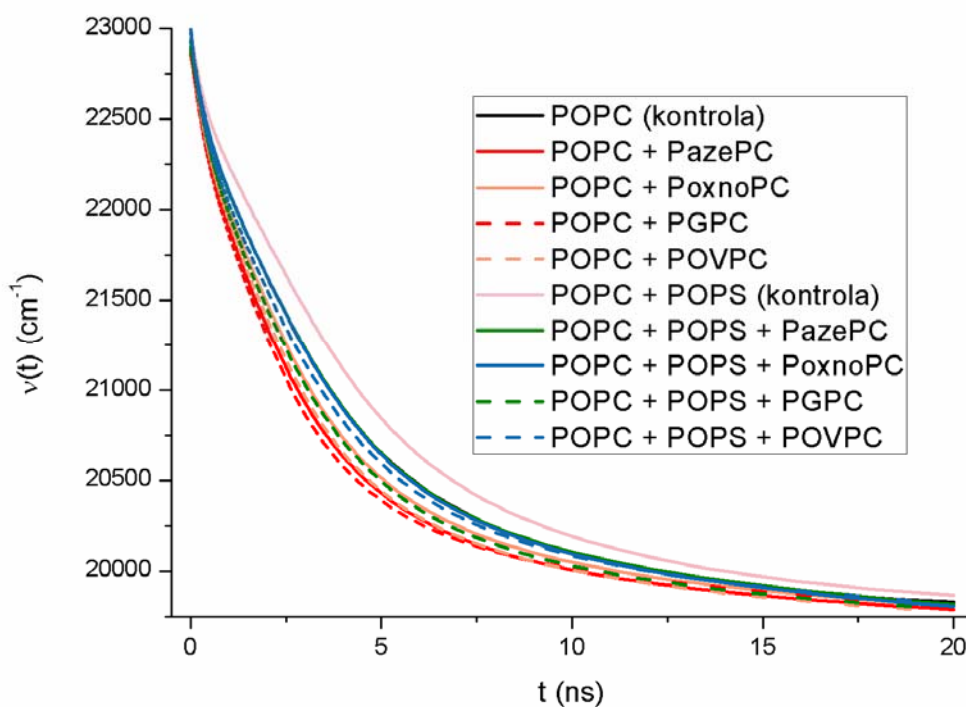
Z $C(t)$ funkce byl vypočítán relaxační čas τ_r , který je nepřímo úměrný mobilitě systému. V neutrální membráně dochází po přidavku oxidovaných lipidů k zvýšení pohyblivosti systému ($\tau_r(\text{POPC}) = 3,20 \text{ ns}$, $\tau_r(\text{POPC} + \text{oxidované lipidy}) = 2,80 - 3,05 \text{ ns}$). Přidavek negativně nabitého POPS do neutrální dvojvrstvy POPC s oxidovanými lipidy způsobí snížení mobility systému - pozorujeme nárůst τ_r přibližně o 0,5 ns oproti dvojvrstvám bez POPS ($\tau_r(\text{POPC/PS}) = 3,15 \text{ ns}$, $\tau_r(\text{POPC/PS} + \text{oxidované lipidy}) = 3,30 - 3,65 \text{ ns}$). Porovnáme-li vliv funkčních skupin v oxidovaných lipidech na mobilitu, potom zjistíme, že v přítomnosti karboxylů je mobilita v oblasti fosfolipidových hlaviček nižší než v přítomnosti aldehydů (viz obrázek č. 28 a tabulka č. 3) a to jak v neutrálních dvojvrstvách ($\tau_r(\text{POPC} + \text{karboxyly}) \approx 3,0 \text{ ns}$, $\tau_r(\text{POPC} + \text{aldehydy}) \approx 2,8 \text{ ns}$), tak v negativně nabitých dvojvrstvách ($\tau_r(\text{POPC/PS} + \text{karboxyly}) \approx 3,55 \text{ ns}$, $\tau_r(\text{POPC/PS} + \text{aldehydy}) \approx 3,3 \text{ ns}$).

3.2.3.2 Modelové oxidované membrány v přítomnosti KCl

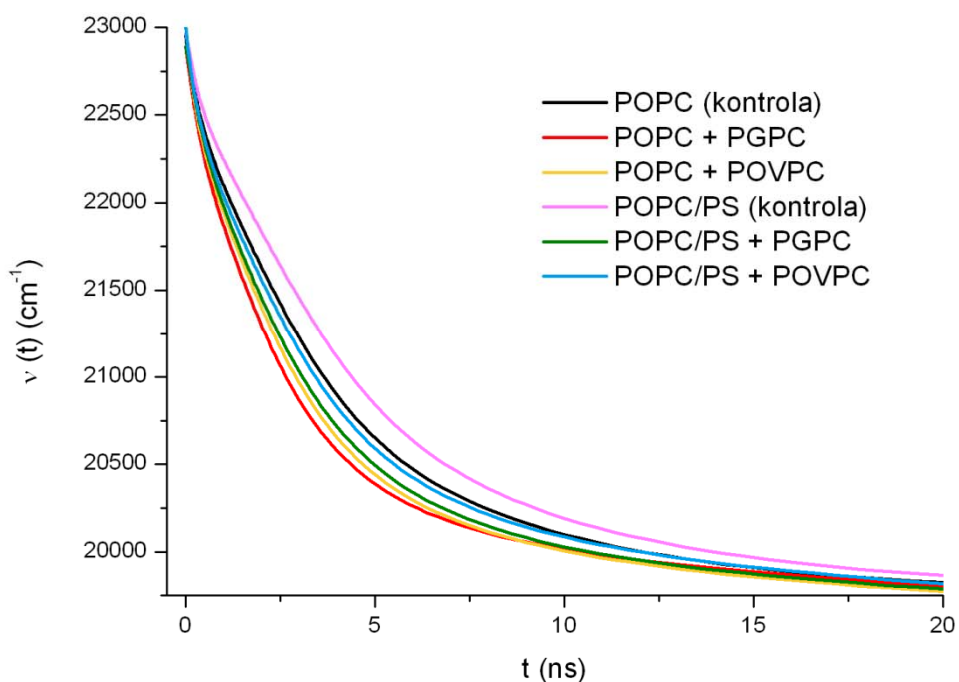
Dále byly použity stejné lipidové systémy jako v předchozím případě, tentokrát byly však v přítomnosti 150 mM KCl.

Všechny FWHM profily opět vykazovaly jasné maximum, relaxace rozpouštědla proběhla během časového rozlišení měření [21].

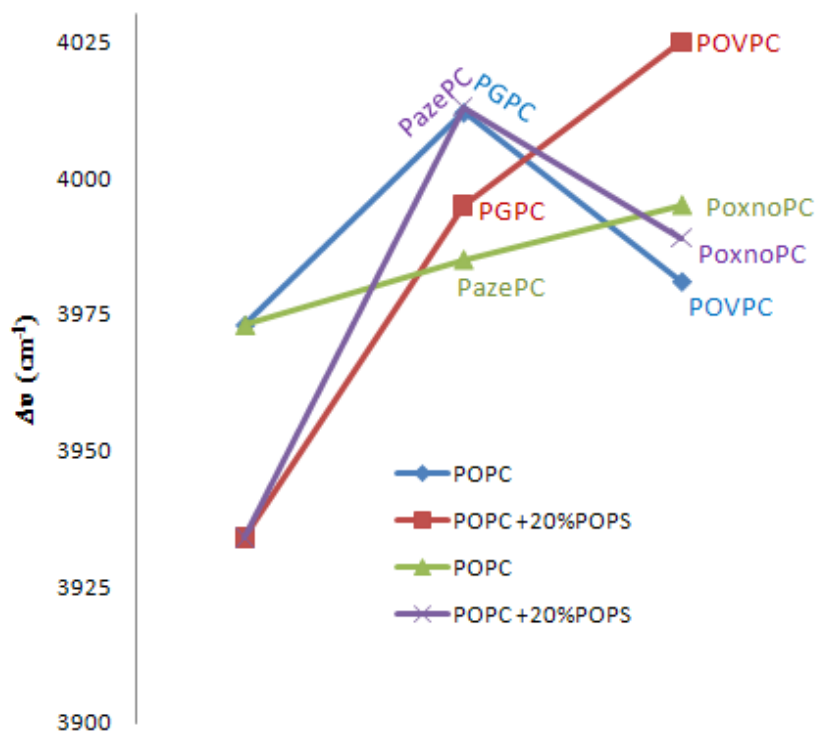
V pořadí křivek $v(t)$ pozorujeme v přítomnosti KCl opačný trend než bez soli. Podobnost křivek $v(t)$ u dvojvrstev oxidovaných lipidů se stejnými funkčními skupinami v přítomnosti KCl již nepozorujeme, to je vykresleno na obrázku č. 29. Na obrázku č. 30 jsou pro větší přehlednost uvedeny pouze křivky $v(t)$ dvojvrstev s pěti uhlíkatými oxidovanými lipidy. V čase 5 ns po excitaci řadíme křivky podle hodnot $v(t)$ následovně: POPC+karboxyly (červené) < POPC+aldehydy (oranžové) < POPC/PS+karboxyly (zelené) < POPC/PS+aldehydy (modré) < POPC-kontrola (černá) < POPC/PS-kontrola (růžová).



Obrázek č. 29 - Křivky závislosti $v(t)$ na čase pro Laurdan v dvojvrstvách POPC a POPC/POPS s příslušnými oxidovanými lipidy (molární poměry jednotlivých lipidů jsou uvedeny v textu). Dvojvrstvy byly ve formě LUV. Měřeno při 283 K v přítomnosti 150 mM KCl.



Obrázek č. 30 - Křivky závislosti $\nu(t)$ na čase pro Laurdan v dvojvrstvách POPC a POPC/POPS s příslušnými pěti uhlíkatými oxidovanými lipidy (molární poměry jednotlivých lipidů jsou uvedeny v textu). Dvojvrstvy byly ve formě LUV. Měřeno při 283 K v přítomnosti 150 mM KCl.



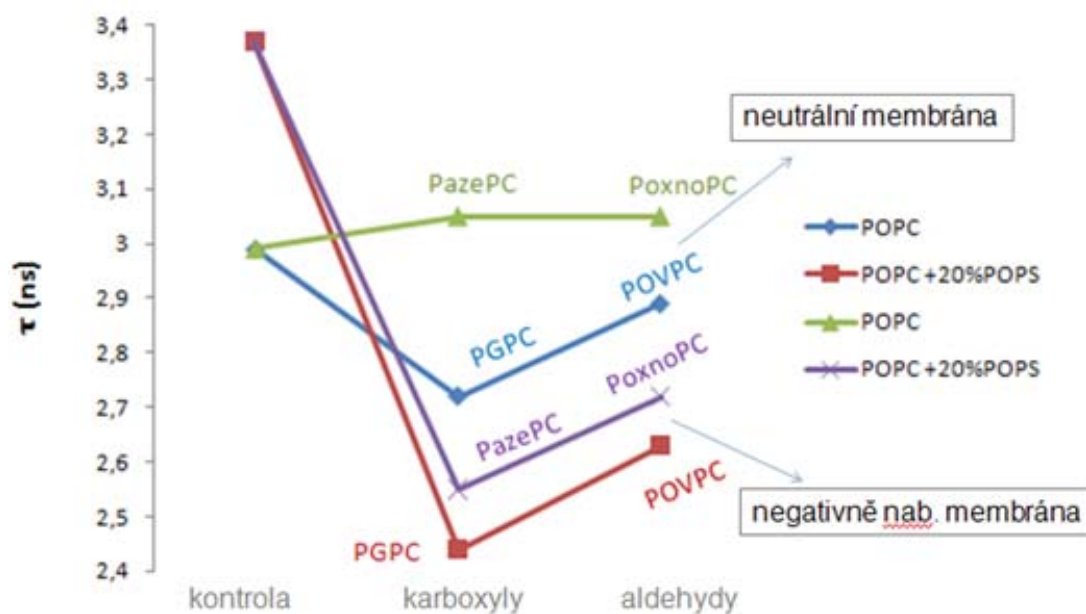
Obrázek č. 31 - Hodnoty $\Delta\nu$ pro Laurdan ve smíšených dvojvrstvách POPC/POPS a neutrálních dvojvrstvách POPC (ve formě LUV) v přítomnosti příslušných oxidovaných lipidů. Dvojvrstvy byly v přítomnosti 150 mM KCl. Měření byla provedena při 283 K.

Nyní se zaměříme na hydrataci dvojvrstvy v oblasti glycerolu. Jak je patrné z obrázku č. 31, přítomnost oxidovaného lipidu v negativně nabitě dvojvrstvě vyvolá v přítomnosti 150 mM KCl hydrataci membrány. Negativně nabitá dvojvrstva je oproti své kontrole silně hydratována ($\Delta V_{(POPC/PS)} = 3930 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta V_{(POPC/PS + oxidované lipidy)} = 3990 - 4030 \text{ cm}^{-1}$). Rozdíly Δv mezi kontrolou a jednotlivými oxidovanými lipidy v neutrální membráně POPC jsou v rámci experimentální chyby ($\Delta V_{(POPC)} = 3970 \text{ cm}^{-1}$, $\Delta V_{(POPC + oxidované lipidy)} = 3980 - 4010 \text{ cm}^{-1}$). Přesné hodnoty Δv pro jednotlivé dvojvrstvy jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 - Parametry relaxace rozpouštědla získané pro POPC/POPS a POPC a příslušných oxidovaných lipidů. Dvojvrstvy byly ve formě LUV a v přítomnosti 150 mM KCl. Použitá fluorescenční značka byla Laurdan. Měření byla provedena při 283K.

POPC/POPS				POPC		
ox. lipid	$\Delta V \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$T_r \text{ (ns)}$	pozorováno (%)	$\Delta V \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$T_r \text{ (ns)}$	pozorováno (%)
PazePC	4010	2,55	78	3990	3,05	77
PoxnoPC	3990	2,70	76	4000	3,05	79
PGPC	4000	2,45	77	4010	3,70	77
POVPC	4030	2,65	80	3980	2,90	81
kontrola	3930	3,35	79	3970	3,00	79

Relaxační čas τ_r , vypovídá o mobilitě dvojvrstvy (obrázek č. 32). Ve většině případů způsobí přítomnost oxidovaných lipidů v dvojvrstvě zvýšení její mobility. Zřetelněji je tento rozdíl vidět v negativně nabitě dvojvrstvě POPC/PS ($\tau_r \text{ (POPC/PS)} = 3,35 \text{ ns}$, $\tau_r \text{ (POPC/PS + oxidované lipidy)} = 2,45 - 2,70 \text{ ns}$). V neutrální membráně nelze hovořit o jednoznačném výsledku. Modelové membrány POPC s oxidovanými lipidy s devíti uhlíkatými řetězci mobilitu membrány nezmění, oxidované lipidy s pěti uhlíkatými řetězci však mobilitu zvyšují. ($\tau_r \text{ (POPC)} = 3,00 \text{ ns}$, $\tau_r \text{ (POPC + 9-uhlíkaté ox. lipidy)} = 3,05 \text{ ns}$, $\tau_r \text{ (POPC + 5-uhlíkaté ox. lipidy)} = 2,70 - 2,90 \text{ ns}$). Experimentální chyba je 0,05 ns. V přítomnosti KCl zvyšují karboxyly (v oxidovaných lipidech) mobilitu systému více než aldehydy, rozdíl se pohybuje okolo 0,2 ns.



Obrázek č. 32 - Hodnoty τ pro Laurdan ve smíšených dvojvrstvách POPC/POPS a neutrálních dvojvrstvách POPC (ve formě LUV) v přítomnosti příslušných oxidovaných lipidů. Dvojvrstvy byly v přítomnosti 150 mM KCl. Měření byla provedena při 283 K.

3.2.4 Diskuze

3.2.4.1 Délka oxidovaných řetězců / funkční skupiny:

Nejprve se zaměříme na to, čím se sobě navzájem jednotlivé oxidované lipidy podobají (tzn., že mají podobný vliv na vlastnosti lipidových dvojvrstev). Nabízejí se nám dvě možnosti. První z nich je podobnost na základě délky oxidovaného řetězce. V tom případě bychom utvořili 2 dvojice: devíti uhlíkaté řetězce mají PoxnoPC a PazePC, pěti uhlíkaté řetězce mají POVPC a PGPC. Druhou možností je dělit lipidy podle funkční skupiny na konci oxidovaného řetězce. Opět bychom utvořili 2 dvojice. Karboxylovou funkční skupinu mají PazePC a PGPC, aldehydovou funkční skupinu obsahují PoxnoPC a POVPC.

Jak znázorňují obrázky č. 24 a 25, blízké jsou si vždy křivky s oxidovanými lipidy se stejnou funkční skupinou. To platí pro neutrální i pro negativně nabitě dvojvrstvy. Podobnost při fluorescenční relaxaci rozpouštědla tedy nezáleží na stejné délce oxidovaného řetězce, ale na stejné funkční skupině na konci oxidovaného řetězce.

Porovnáme-li povrchové napětí a elektroforetickou mobilitu agregátů oxidovaných lipidů, potom pozorujeme podobnost opět mezi lipidy se stejnou funkční skupinou [37]. Tyto výsledky jsou tedy ve shodě s výsledky relaxace rozpouštědla.

Ve všech uvedených případech (měříme-li relaxaci rozpouštědla, povrchové napětí nebo elektroforetickou mobilitu) jsou při měření rozhodující změny v oblasti fosfolipidových hlaviček. Víme, že dochází k vytáčení řetězců oxidovaných lipidů nesoucích aldehydové nebo karboxylové funkční skupiny. Tyto funkční skupiny jsou tedy umístěny na různých místech v oblasti fosfolipidových hlaviček - podle míry své hydrofilicity. Tím oxidované lipidy ovlivňují polární oblast fosfolipidových hlaviček. Nezáleží tedy na délce oxidovaného řetězce, ale na typu funkční skupiny.

3.2.4.2 Hydratace:

Zaměříme se nyní na hydrataci membrány. V první studii této diplomové práce bylo zjištěno, že přidavek POPS do neutrální membrány POPC v přítomnosti KCl způsobí dehydrataci dvojvrstvy a v nepřítomnosti soli nevyvolá změnu hydratace dvojvrstvy.

Nyní se zaměříme na to, jaký vliv na hydrataci má přidavek oxidovaných lipidů do těchto systémů. Signifikantní zvýšení hydratace membrány v přítomnosti oxidovaných lipidů pozorujeme v dvojvrstvě POPC bez soli a POPC/PS v KCl, v ostatních případech se míra hydratace nemění.

Ve studii [41] byl studován vliv oxidovaných lipidů na expanzi lipidových monovrstev složených z DPPC+PoxnoPC a DPPC+PazePC (DPPC znamená 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin). Bylo zjištěno, že v přítomnosti oxidovaných lipidů dochází k expanzi monovrstev. Čím více oxidovaného lipidu, tím větší expanze. Monovrstvy s PazePC byly expandovanější než ty s PoxnoPC. Expanze je vysvětlována reorientací řetězců s hydrofilními skupinami. To je ve shodě s výsledky této diplomové práce. Hydratace je zvýšena, je-li membrána expandovanější – voda se do ní tedy lépe dostane.

3.2.4.3 Mobilita:

Po přidání oxidovaných lipidů do neutrální dvojvrstvy POPC pozorujeme vzrůst mobility systému a to jak v systémech bez soli, tak v přítomnosti KCl. Pohyblivost molekul v oblasti fosfolipidových hlaviček je tedy zvýšena.

V negativně nabitých membránách (POPC/PS) se výsledky pro systémy bez soli a systémy s KCl liší. V KCl vyvolá přítomnost oxidovaných lipidů zvýšenou pohyblivost systému, v nepřítomnosti soli dochází naopak k snížení pohyblivosti systému.

Systémy bez soli jsou pohyblivější v přítomnosti oxidovaných lipidů s aldehydovou funkční skupinou (POVPC, PoxnoPC). V přítomnosti KCl jsou naopak pohyblivější systémy obsahující oxidované lipidy s karboxylovou funkční skupinou (PGPC, PazePC). Karboxylová skupina může být odpuzována fosfátovou skupinou (PO^{4-}). Je však možné, že je tato fosfátová skupina neutralizována draselným kationtem (K^+) a repulze oxidovaných řetězců PGPC a PazePC je tak zeslabena.

V první studii této diplomové práce bylo zjištěno, že přidavek negativně nabitého POPS do neutrální membrány POPC v přítomnosti KCl způsobí snížení

mobility systému. Přídavek 20 % (molárních) tedy vyvolal snížení mobility membrány. V této práci bylo do stejného systému přidáno dalších 10 % (molárních) negativně nabitých oxidovaných lipidů. Mohli bychom proto očekávat, že to povede ještě k většímu snížení mobility systému (díky většímu negativnímu náboji). Pozorujeme ovšem přesně opačný efekt na membránu, než jaký bychom předpokládali – mobilita membrány je zvýšena. Přesný důvod neznáme.

Mohlo by to být způsobeno tím, že dochází k repulzi mezi záporně nabitými hlavičkami POPS a funkčních skupin oxidovaných řetězců. Může proto docházet k přemístování funkčních skupin oxidovaných řetězců z oblasti fosfolipidových hlaviček buďto ven z membrány nebo naopak do oblasti fosfolipidových řetězců.

Také si musíme uvědomit, že pracujeme s velmi složitým systémem - tvar všech tří druhů molekul se liší. Molekuly POPC mají přibližně válcovitý tvar ($CPP \approx 1$) (CPP viz teoretický úvod). Hlavička POPS je menší, zatímco velikost řetězců je stále stejná ($CPP > 1$). V případě oxidovaných lipidů je situace naprosto odlišná – prostor jedné hlavičky je rozšířen o oxidované řetězce a nepolární řetězec je v membráně zanořen pouze jeden, v oblasti fosfolipidových ocasů je tedy více prostoru ($CPP < 1$). Seskupení těchto tří lipidů odlišného tvaru, může mít vliv na změny v mobilitě systému.

3.2.5 Závěr

Práce měla objasnit, jaký vliv bude mít přidavek fyziologického množství oxidovaných lipidů na vlastnosti smíšených neutrálních a negativních membrán. Vzorky byly studovány v přítomnosti 150 mM KCl a v nepřítomnosti soli. Měření byla provedena metodou relaxace rozpouštědla.

Přítomnost oxidovaných lipidů v dvojvrstvě POPC bez soli a POPC/PS v KCl vyvolá zvýšení hydratace membrány, v ostatních případech se hydratace nemění.

V neutrálních dvojvrstvách POPC pozorujeme po přidání oxidovaných lipidů vzrůst mobility systému a to jak v systémech bez soli, tak v přítomnosti KCl.

V negativně nabitých membránách se výsledky pro systémy bez soli a systémy s KCl liší. V KCl vyvolá přítomnost oxidovaných lipidů zvýšenou pohyblivost systému, v nepřítomnosti soli dochází naopak k snížení pohyblivosti systému.

Systémy bez soli jsou pohyblivější v přítomnosti oxidovaných lipidů s aldehydovou funkční skupinou (POVPC, PoxnoPC). V přítomnosti KCl jsou naopak pohyblivější systémy obsahující oxidované lipidy s karboxylovou funkční skupinou (PGPC, PazePC).

3.3 Závěr obou studií

Byly studovány smíšené negativně nabitě membrány POPC/POPS a neutrální membrány POPC. Zkoumány byly především fyzikální vlastnosti – jako jsou hydratace a pohyblivost v oblasti fosfolipidových hlaviček. Nejprve byl zkoumán specifický vliv kationtů (NaCl, KCl a CsCl) na tyto membrány. Poté vliv oxidovaných lipidů (PazePC, PoxnoPC, PGPC a POVPC) opět na stejné membrány a to buď v přítomnosti KCl, nebo bez soli. Měření byla provedena metodou fluorescenční relaxace rozpouštědla.

V přítomnosti vybraných kationtů je v negativních membránách POPC/POPS pohyblivost v oblasti fosfolipidových hlaviček snížena. Přítomnost kationtů v membráně vyvolá také její dehydrataci. Stejný, ale slabší trend pozorujeme i v neutrálních membránách POPC.

Po přidání oxidovaných lipidů pozorujeme v neutrálních dvojvrstvách POPC vzrůst pohyblivosti systému a to jak v systémech bez soli, tak v přítomnosti KCl. V negativně nabitých membránách POPC/POPS se výsledky pro systémy bez soli a systémy s KCl liší. V KCl vyvolá přítomnost oxidovaných lipidů zvýšenou pohyblivost systému, v nepřítomnosti soli dochází naopak k snížení pohyblivosti systému. Přítomnost oxidovaných lipidů v dvojvrstvě POPC bez soli a POPC/PS v KCl vyvolá zvýšení hydratace membrány, v ostatních případech nepozorujeme změny v hydrataci membrány.

Z obou studií je zřetelné, že přídavek negativně nabitého lipidu POPS do neutrální membrány POPC způsobí snížení pohyblivosti systému.

V budoucnu by bylo vhodné věnovat se detailněji studiu oxidovaných lipidů:

- 1) Provést tato měření s jinou fluorescenční značkou umístěnou v jiné hloubce membrány - a to jak v oblasti ocasů, tak v oblasti fosfolipidových hlaviček.
- 2) Provést molekulárně dynamické simulace těchto systémů s oxidovanými lipidy a porovnat je s experimentálními daty.
- 3) Zaměřit se také na vliv oxidovaných fosfoserinů (PS) na daný typ modelových membrán.

4 Literatura

- [1] Karlson P. *Základy biochemie* **1981**, Academia, Praha
- [2] Kolektiv pracovníků katedry biochemie, *Biochemie – Základní kurz* **1995**, Univerzita Karlova, Praha
- [3] Voet D.; Voetová J. *Biochemie* **1995**, Victoria Publishing
- [4] Gago-Dominguez m.; Castelao j. e.; Pike M. C. et al. Role of Lipid Peroxidation in the Epidemiology and Prevention of Breast Cancer *Cancer, Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**, 14, 2829-2839
- [5] Vohlídal J. *Makromolekulární chemie* **1995**, Univerzita Karlova, Praha
- [6] Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipid active in physiological and/or pathological conditions, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2009**, 157, 1-11
- [7] Matsura T. et al. The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface, *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, 1736, 181-188
- [8] Pégorier S.; Stengel D.; Durand H.; Croset M; Ninio E; Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages Implication in atherosclerosis, *Atherosclerosis* **2006**, 188, 433- 443
- [9] Fruhwirth et al. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease, *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1772, 718-736
- [10] Kontorová K., Zídková J, Palečková P, Sajdok J. Role preteinu CD36 jako významného rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění, *Chemické Listy* **2006**, 100, 17-23
- [11] Markesbery W. R. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 23, 134-147
- [12] M. Bělohradský, F. Hampl, J. Hodačová, M. Glogarová, V. Král, P. Lhoták, P. Lubal, I. Stibor, K. Svoboda, *Supramolekulární chemie II.* **2005**, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR
- [13] Jurkiewicz P. Fluorescence solvent relaxation technique in biomembranes, doctoral thesis, *Wroclaw University of Technology* **2007**
- [14] Marrink S. J.; Berendsen H.J.C. *Journal of Physical chemistry* **1994**, 98, 4155-4168
- [15] Condon E. U. The Franck-Condon Principle and Related Topics, *American Journal of Physics* **1947**, 15, 365-374

- [16] Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Application* **2006**, Weinheim, Wiley-VCH
- [17] Horng M. L.; Gardecki J. A.; Papazyan A.; Maroncelli M. Subpicosecond Measurements of Polar Solvation Dynamics: Coumarin 153 Revisited; *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 17311-17337
- [18] Jurkiewicz P.; Sykora J.; Olzynska A.; Humpolickova J.; Hof M.; Solvent Relaxation in Phospholipid Bilayers: Principles and Recent Applications, *Journal of Fluorescence* **2005**, 15, 883-892
- [19] Svetlichny V. Y.; Merola F.; Dobretsov G. E.; Gularyan S. K.; Syreishchikova T. I.; Dipolar relaxation in lipid bilayer detected by a fluorescent probe, 4''-dimethylaminochalcone, *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, 145, 13-26
- [20] Fee R. S.; Maroncelli M.; Estimating the time-zero spectrum in time-resolved emission measurements of solvation dynamics, *Chemical Physics* **1994**, 183, 235-247
- [21] Sykora J.; Kapusta P.; Fidler V.; Hof M.; On What Time Scale Does Solvent Relaxation in Phospholipid Bilayers Happen?, *Langmuir* **2002**, 18, 571-574
- [22] Sykora J.; Hof M.; Solvent relaxation in phospholipid bilayers: Physical understanding and biophysical applications, *Cellular & Molecular Biology Letters* **2002**, 7, 259-261
- [23] Vequi-Suplicy C. C.; Benatti C. R.; Lamy M. T.; Laurdan in Fluid Bilayers: Position and Structural Sensitivity, *Journal of Fluorescence* **2006**, 16, 431-439
- [24] Sachl R.; Stepanek M; Prochazka K; Fluorescence Study of Solvation of Fluorescent Probes Prodan and Laurdan in Poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(ethylene oxide) Vesicles in Aqueous Solutions with Tetrahydrofurane, *Langmuir* **2008**, 24, 288-295
- [25] Klasczyk B.; Knecht V; Lipowsky R.; Dimova R.; Interactions of Alkali Metal Chlorides with Phosphatidylcholine Vesicles, *Langmuir* **2010**, 26, 18951-18958
- [26] Vacha R. et. al.; Effect of Alkali Cations and Halide Anions on the DOPC Lipid Membrane, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 7235-7243
- [27] Vacha R. et. al.; Mechanism of Interaction of Monovalent Ions with Phosphatidylcholine Lipid Membranes, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 9504-9509
- [28] Gurtovenko A. A.; Vattulainen I.; Effect of NaCl and KCl on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Lipid Membranes: Insight

- from Atomic-Scale Simulations for Understanding Salt-Induced Effects in the Plasma Membrane, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 1953-1962
- [29] Leontidis E.; Aroti A.; Liquid Expanded Monolayers of Lipids As Model Systems to Understand the Anionic Hofmeister Series: 2. Ion Partitioning Is Mostly a Matter of Size, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 1460-1467
- [30] Žďárská Alžběta, *Vliv monovalentních iontů an hydrataci a pohyblivost oblasti polárních hlaviček fosfolipidové dvojvrstvy*, bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha **2009**
- [31] Clarke R. J.; Lupfert C.; Influence of Anions and Cations on the Dipole of Phosphatidylcholine Vesicles: A Basis for the Hofmeister Effect, *Biophysical Journal* **1999**, 76, 2614-2624
- [32] Ryhanen S. J.; Saily V. M.; Kinnunen P. K. J.; Cationic lipid membranes-specific interactions with counter-ions, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, 18, 1139-1150
- [33] Olzyska A.; Jurkiewicz P.; Hof M.; Properties of Mixed Cationic Membranes studied by Fluorescence Solvent Relaxation, *Journal of Fluorescence* **2008**, 18, 925-928
- [34] Jurkiewicz P.; Olzyska A.; Langner M. et al.; Headgroup hydration and mobility of DOTAP/DOPC bilayers: A fluorescence solvent relaxation study, *Langmuir* **2006**, 22, 8741-8749
- [35] Pandit S. A.; Bostick D.; Berkowitz M. L.; Mixed Bilayer Containing Dipalmitoylphosphatidylcholine and Dipalmitoylphosphatidylserine: Lipid Complexation, Ion Binding, and Electrostatics, *Biophysical Journal* **2003**, 85, 3120-3131
- [36] Murzyn K.; Rog T.; Pasenkiewicz-Gierula M.; Phosphatidylethanoamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane, *Biophysical Journal* **2005**, 88, 1091-1103
- [37] Pande A. H.; Kar S.; Tripathy R. K.; Oxidatively modified fatty acyl chain determines physicochemical properties of aggregates of oxidized phospholipids, *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1798, 442-452
- [38] Cwiklik L.; Jungwirth P.; Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration, *Chemical Physics Letters* **2010**, 486, 99-103

- [39] Mattila J-P.; Sabatini K.; Kinnunen P. K. J.; Interaction of Cytochrome c with 1-Palmitoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: Evidence for Acyl Chain Reversal, *Langmuir* **2008**, 24, 4157-4160
- [40] Mattila J-P.; Sabatini K.; Kinnunen P. K. J.; Oxidized phospholipids as potential molecular target for antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**, 1778, 2041-2050
- [41] Sabatini K.; Mattila J-P.; Megli F. M.; Kinnunen P. K. J.; Characterization of Two Oxidatively Modified Phospholipids in Mixed Monolayers with DPPS, *Biophysical Journal* **2006**, 90, 4488-4499
- [42] Beranova L.; Cwiklik L.; Jurkiewicz P.; Hof M.; Jungwirth P.; Oxidation Changes Physical Properties of Phospholipid Bilayers: Fluorescence Spectroscopy and Molecular Simulations, *Langmuir* **2010**, 26, 6140-6144
- [43] Martinet W.; Kockx M. M.; Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation, *Current Opinion in Lipidology* **2001**, 12, 535-541