

WPŁYW ANESTETYKÓW WZIEWNYCH NA MODELOWĄ BŁONĘ BIOLOGICZNĄ

INFLUENCE OF INHALATION ANESTHETICS ON A MODEL BIOLOGICAL MEMBRANE

**Martyna Horochowska, Katarzyna Cieślak-Boczula,
Maria Rospenk***

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: maria.rospenk@chem.uni.wroc.pl*

Praca dedykowana Profesorowi Aleksandrowi Kollowi z okazji 80. rocznicy urodzin

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Anestetyki wziewne
 - 1.1. Właściwości fizykochemiczne wziewnych substancji znieczulających
 - 1.2. Mechanizm działania anestetyków wziewnych
2. Własności błony lipidowej w kontekście interakcji ze środkami znieczulającymi
 - 2.1. Struktura dwuwarstwy lipidowej
 - 2.2. Mechanizm oddziaływania anestetyku z błoną lipidową
3. Gramicydyna jako model białka transbłonowego
 - 3.1. Zmiany konformacyjne Gramicydyny zależne od rodzaju rozpuszczalnika
 - 3.2. Wpływ anestetyków na strukturę Gramicydyny

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr Martyna Horochowska – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (2013). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 2018 roku na podstawie pracy „Zbadanie oddziaływań anestetyków wziewnych z grupy halogenoeterów z lipidowymi i białkowymi składnikami błony komórkowej” wykonanej pod kierunkiem prof. Marii Rospenk.



 <https://orcid.org/0000-0001-9398-5520>

Dr Katarzyna Cieślik-Boczula w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizyko-chemicznych badań cieni erytrocytów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo-zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.



 <https://orcid.org/0000-0002-0240-9366>

Prof. dr hab. Maria Rospenk absolwentka chemii na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiązania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnątrz- i międzycząsteczkowego wiązania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.



 <https://orcid.org/0000-0003-3023-0619>

ABSTRACT

General anesthesia is defined as impairment of the central nervous system (UON) caused by intravenous or volatile anesthetics. The state of loss of consciousness or even amnesia and the disappearance of perception into external stimuli is achieved by the use of a large group of chemical compounds. The use of nitrous oxide in 1844 revolutionized surgery and medicine at that time. From that moment, anesthesiology develops dynamically, allowing more and more complex procedures. Despite more than 170 years of history of anesthesia, understanding the mechanism of reversible loss of awareness and sensitivity to pain caused by the action of general anesthetics is one of the greatest challenges of modern pharmacology and neuroscience. Incredibly high diversity of anesthetics, including both noble gases and complex steroids, combined with human sensation makes the above problem extremely difficult to solve.

The reversibility of the anesthesia phenomenon suggests that the analyzed phenomenon is based on disturbance of weak intermolecular interactions, such as hydrogen bond or van der Waals forces. Anesthetic molecules may bind directly to the hydrophobic region of protein, which causes its conformational changes or disturb ion channel activity by anesthetic-induced perturbations of lipid bilayers. The mechanism of anesthesia is thus very often attributed to both protein and lipid membrane targets. The influence of anesthetic molecules on biomolecular systems can be studied successfully using many different physico-chemical methods, such as, infrared, fluorescence or nuclear magnetic resonance spectroscopy. Vibrational circular dichroism as well as differential scanning calorimetry can also be used.

Keywords: inhalation anesthetics, anesthesia, weak intermolecular interactions, lipid membrane

Słowa kluczowe: anestetyki wziewne, anestezja, słabe oddziaływania międzycząsteczkowe, błona lipidowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

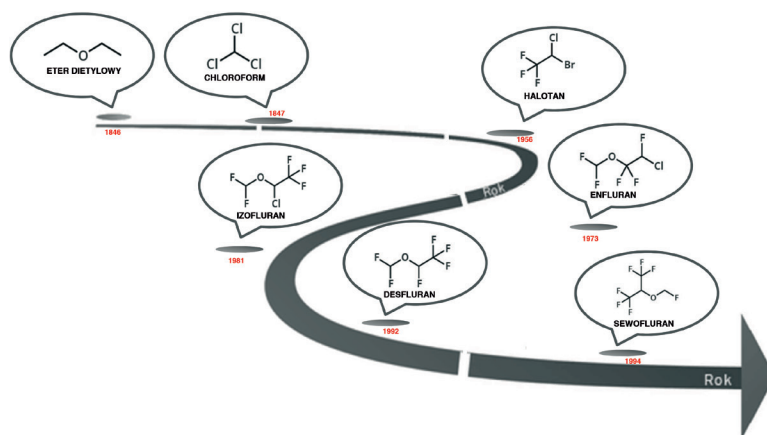
$\beta^{6,3}$ helisa	– β -helisa zawierająca 6,3 reszt aminokwasowych na skręt
DPPC	– dipalmitoilofosfatydylocholina (ang. <i>dipalmitoilphosphatidylcholine</i>)
DSC	– różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. <i>differential scanning calorimetry</i>)
GABA	– kwas gamma-aminomasłowy (ang. <i>gamma aminobutyric acid</i>)
L_{α}	– lamelarna faza ciekłokrystaliczna (ang. <i>lamellar liquid crystalline</i>)
L_{β}	– lamelarna faza żelowa (ang. <i>lamellar gel phase</i>)
$L_{\beta I}$	– lamelarna faza przemienna (ang. <i>lamellar interdigitated phase</i>)
L_c	– lamelarna faza krystaliczna (ang. <i>lamellar crystalline phase</i>)
MAC	– minimalne stężenie pęcherzykowe (ang. <i>minimum alveolar concentration</i>)
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
P_{β}	– pofalowana faza żelowa (ang. <i>rippled gel phase</i>)
T_m	– temperatura głównego przejścia fazowego (ang. <i>the temperature of the main phase transition</i>)

WPROWADZENIE

Znieczulenie ogólne jest definiowane jako upośledzenie ośrodkowego układu nerwowego (UON) wywołane przez dożylnie bądź lotnie anestetyki [1, 2]. Stan utraty świadomości czy nawet amnezji oraz zaniku percepcji na zewnętrzne bodźce osiągnięty jest przez zastosowanie licznej grupy związków chemicznych. Wykorzystanie w 1844 roku, po raz pierwszy w historii, podtlenku azotu zrewolucjonizowało ówczesną chirurgię i medycynę. Od tego momentu anestezjologia rozwija się prężnie, umożliwiając przeprowadzanie coraz bardziej złożonych zabiegów [3]. Mimo ponad 170-letniej historii, zrozumienie mechanizmu odwracalnej utraty świadomości i czułości na ból, wywołanej działaniem środków znieczulenia ogólnego, jest jednym z największych wyzwań współczesnej farmakologii i neuronauki. Niewiarygodnie duża różnorodność anestetyków, obejmująca zarówno gazy szlachetne jak i złożone steroidy, w połączeniu z ludzkim odczuwaniem czyni powyższy problem niezwykle trudny do rozwiązania.

1. ANESTETYKI WZIEWNE

Pierwsze środki znieczulenia ogólnego, jak eter dietylowy czy chloroform, charakteryzowały się łatwopalnością i wysoką toksycznością (Rys. 1). W celu zwiększenia bezpieczeństwa operowanego pacjenta dążono do redukcji niepożądanych efektów, m.in. przez podstawienie atomów wodoru atomami fluorowców.



Rysunek 1. Historia rozwoju anestezjologii
Figure 1. History of development of anesthesia

W roku 1960 wprowadzono do użytku klinicznego metoksyfluran, będący pochodną eterową. Mimo eliminacji wielu efektów ubocznych, wywołanie anestezji przez ten związek trwało zbyt długo. Równie trudne okazało się wybudza-

nie pacjenta. W niewielkim odstępie czasowym wdrożono dwa izomery: enfluran i izofluran, spośród których izofluran charakteryzował się większą odpornością na metabolizm, a tym samym nie wywierał szkodliwego wpływu na organy. Dążąc do uzyskania farmakologicznie perfekcyjnego środka znieczulającego, nie porzeczano na izofluranie. Usunięcie wszystkich halogenów, za wyjątkiem fluoru poskutkowało otrzymaniem niepalnej cieczy o niezwykłej wytrzymałości na metabolizm. Desfluran, eter etylowo-metylowy, w którym wszystkie wodory zostały zastąpione atomami fluoru, wprowadzono w 1992 roku. Dwa lata później zsyntezowano pochodną eteru metylo-izopropylowego, sewofluran. Spełnienie niemal wszystkich wymagań stawianych idealnemu środkowi znieczulającemu pozwoliło na stosowanie zarówno sewofluranu jak i desfluranu we współczesnej anestezjologii [2–6].

1.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE WZIEWNYCH SUBSTANCJI ZNIECZULAJĄCYCH

Grupa środków znieczulenia ogólnego obejmuje szereg strukturalnie różnorodnych związków, które mogą być podawane na sposób wziewny lub iniekcyjny. Anestetyki inhalacyjne należą do trzech rozległych klas: eterów, alkanów oraz substancji, które w temperaturze i ciśnieniu standardowym występują w gazowym stanie skupienia. Nowoczesne środki znieczulające to w głównej mierze pochodne eterów, których cząsteczki w swej strukturze posiadają atomy fluoru oraz chloru, zastępujące atomy wodoru. Zabieg halogenacji prowadzi do redukcji toksyczności leków oraz do wzrostu oporności na metabolizm w organizmie pacjenta. Analogi eterów i alkanów w warunkach normalnych występują jako lotne ciecze, których temperatury wrzenia sięgają 50–60°C. Nowoczesne anestetyki wziewne są niepalne, jak również nie posiadają właściwości wybuchowych [7–11].

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne wybranych anestetyków wziewnych [2]
Table 1. Physicochemical properties of selected inhaled anesthetics [2]

Właściwości	N ₂ O	Enfluran	Izofluran	Sewofluran	Desfluran
Masa cząsteczkowa [g]	44	184,5	184,5	200	168
Gęstość	–	1,520	1,502	1,520	1,465
Temperatura wrzenia [°C]	–88,5	56,5	48,5	58,5	22,8
Prężność pary [mm Hg; 20°C]	39,8	172	240	170	669
Współczynnik podziału krew:gaz	0,46	1,90	1,46	0,65	0,42
MAC [%]	104,00	1,68	1,14	2,05	6,00

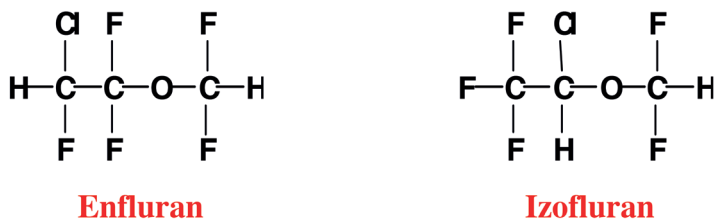
Transport anestetyków wziewnych w organizmie, w odróżnieniu od leków podawanych dożylnie, zależy od efektywności poboru leku przez płuca, a następ-

nie dostarczenia do miejsca ich działania w ośrodkowym układzie nerwowym [7]. Wydajność dystrybucji leku jest związana z ich właściwościami fizycznymi, rozpuszczalnością we krwi oraz prężnością pary (Tab. 1).

Rozpuszczalność środków znieczulenia ogólnego we krwi jest charakteryzowana przez współczynnik podziału krew/gaz. To stosunek stężeń anestetyku wziewnego we krwi oraz w fazie lotnej. Wysoki współczynnik wiąże się z silnym powinowactwem leku do krwi. Przeciwnie jest w przypadku niskiej wartości tego parametru. Innymi słowy anestetyki o niewielkich współczynnikach charakteryzują się szybkim wywołaniem znieczulenia z jednoczesnym krótkim czasem wybudzenia. Obok desfluranu najniższą wartość stosunku krew/gaz posiada sewofluran (0,65). Natomiast rzadziej stosowane we współczesnej anestezjologii, izofluran i enfluran, posiadają współczynniki znacznie wyższe [9].

Siła działania anestetyków wziewnych jest powszechnie wyrażana przez minimalne stężenie pęcherzykowe (ang. *minimum alveolar concentration*, MAC). Interpretowane jest jako stężenie anestetyku wziewnego konieczne do powstrzymania reakcji ruchowych u 50% populacji ludzi dorosłych w odpowiedzi na określone bodźce. Wysoka wartość parametru MAC wiąże się ze wzmożonym poborem gazu znieczulającego, co oznacza, że siła działania anestetyku jest niska. Wśród analizowanych leków najsilniejszy jest izofluran, którego minimalne stężenie pęcherzykowe wynosi 1,17% [7].

W warunkach klinicznych wykorzystywane są mieszaniny racemiczne leków. Mimo to stereoselektywność potencjału znieczulającego halogenoeterów jest tematem licznych rozważań. Halotan, enfluran, izofluran oraz desfluran posiadają czynny optycznie chiralny atom węgla. Optyczne izomery izofluranu wykazują różnicę w oddziaływaniu z receptorami białkowymi np. z receptorem kwasu γ -aminomasłowego ($GABA_A$). Ponieważ współczynnik bezpieczeństwa dla anestetyków wziewnych jest bardzo niski, sugeruje się że nawet stosunkowo niewielki stopień stereoselektywności może spowodować znaczącą kliniczną przewagę jednego z enancjomerów nad mieszaniną racemiczną [4, 12].



Rysunek 2. Struktura chemiczna enfluranu i izofluranu
Figure 2. The structure of enflurane and isoflurane

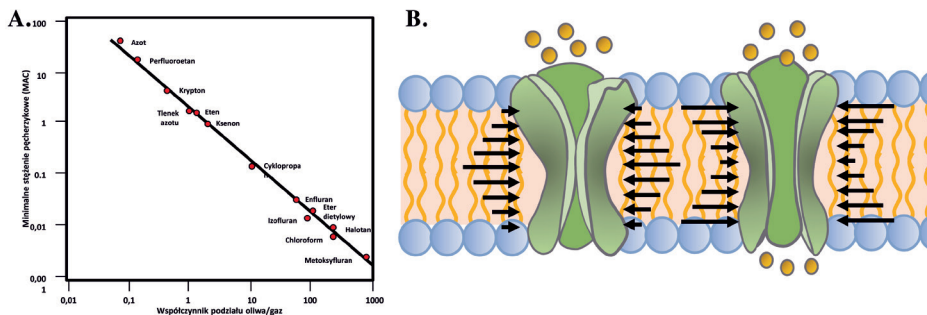
Enfluran i izofluran (Rys. 2) to izomery strukturalne, posiadające jednakową masę oraz objętość cząsteczkową, ok. 110 \AA^3 . Izofluran posiada niemal dwukrotnie większy moment dipolowy niż enfluran. Ich wartości wynoszą odpowiednio:

2,0 D dla izofluranu i 0,7 D dla enfluranu. W tej rozbieżności upatruje się różnicę w oddziaływaniu anestetyków z białkami, a tym samym odchylen w toksyczności związków [13].

1.2. MECHANIZM DZIAŁANIA ANESTETYKÓW WZIEWNYCH

Zrozumienie mechanizmu działania środków znieczulenia ogólnego, prowadzącego do odwracalnej utraty świadomości i czułości na ból, jest jednym z największych wyzwań farmakologii. Niezwykła różnorodność strukturalna anestetyków sprawia, że jest to szczególnie trudny problem do rozwiązania.

Na poziomie komórkowym, anestetyki wpływają na funkcjonowanie komórek nerwowych, upośledzając aktywność synaps, a tym samym pracę kanałów jonowych. W standardowych warunkach te wyspecjalizowane białka błonowe są aktywowane poprzez sygnały chemiczne bądź modyfikacje otoczenia błony komórkowej [14–16]. Po aktywacji, kanały zmieniają pobudliwość elektryczną neuronów, kontrolując przepływ przez błonę jonów pobudzających lub hamujących. Działanie środków znieczulenia ogólnego opiera się przede wszystkim na wzmocnieniu ruchu jonów hamujących bądź blokowanie sygnałów pobudzających. W odniesieniu do tych rozważań istnieją dwie teorie: lipidowa i białkowa [17, 18].



Rysunek 3. (A) Wykres zależności Mayer'a – Overton'a [4] (B) Schemat obrazujący mechanizm znieczulenia oparty na zmianie ciśnienia lateralnego w błonach [29]

Figure 3. (A) Mayer – Overton correlation [4] (B) The anesthesia mechanism based on the membrane lateral pressure change [29]

Wraz z odkryciem, że błona biologiczna jest zbudowana głównie z lipidów wysnuto hipotezę, że działanie anestetyków wziewnych ukierunkowane jest na dwuwarstwę lipidową [19]. Fundamentem tej teorii są prace Mayer'a i Overton'a [20, 21] przedstawiająca korelację pomiędzy siłą działania środków znieczulających, a ich rozpuszczalnością w tłuszczach (Rys. 3A). Cząsteczki anestetyku wnikając do wnętrza błony komórkowej, w chwili przekroczenia stężenia krytycznego, zmieniają właściwości dwuwarstwy lipidowej. Transformacje błony towarzyszące pojawieniu się cząsteczek anestetyków objawiają się m.in. powiększeniem jej objętości [22], dez-

organizacją ułożenia lipidów lub modyfikacją profilu ciśnienia lateralnego w błonie [23]. Większość teorii opartych na zależności Mayer'a i Overton'a [24, 25] postuluje, że zaburzenia struktury dwuwarstwy lipidowej, wywołane obecnością anestetyków w układzie, wpływają na funkcje białek błonowych obecnych w komórkach nerwowych.

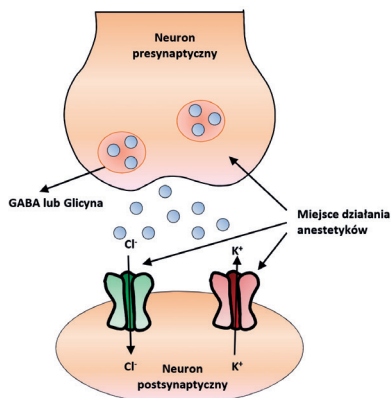
W 1973 roku Miller i współpracownicy [26] zaproponowali hipotezę krytycznej objętości błony lipidowej, w której to wysnuto przypuszczenia, że hydrofobowe cząsteczki anestetyków gromadzą się w neuronowych dwuwarstwach lipidowych wpływając na profil ciśnienia lateralnego w poprzek błony i powodując jej rozszerzenie. Zwiększenie objętości błony prowadzi do odwracalnych zmian w funkcjonowaniu kanałów jonowych, wywołując ostatecznie stan znieczulenia.

Nieco inne podejście przedstawił Mohr [27], który sugerował, że działanie środków znieczulenia ogólnego związane jest z wyraźną zmianą ciśnienia lateralnego w błonach. Każda błona lipidowa posiada odrębny profil rozkładu ciśnień lateralnych, które charakteryzują się wysokimi wartościami (Rys. 3B). Modyfikacje tego parametru zaburzają równowagę konformacyjną białek błonowych, wykazujących wysoką czułość na tego typu zjawiska. Wniknięcie do wnętrza błony cząsteczek amfifilowych, takich jak anestetyki, zwiększa selektywnie ciśnienie lateralne w pobliżu powierzchni dwuwarstwy. Następnie jest ono wyrównywane w kierunku środka błony. Gdy w odpowiedzi na impuls nerwowy kanał jonowy próbuje się otworzyć, powiększa się jego powierzchnia w pobliżu zetknięcia się z wodą. Jakiegokolwiek zmiany hamują proces otwarcia, uniemożliwiając transport neurotransmiterów [28, 29].

Teoria lipidowa oparta na regule Mayer'a i Overton'a [24, 25] posiada pewne ograniczenia. Koblin i Eger [30] udowodnili, że istnieje szeroka gama związków, m.in. polihalogenowe alkanany, które mimo dobrej rozpuszczalności w tłuszczach nie wykazują sugerowanego działania znieczulającego. Ponadto przytoczone zmiany zachodzące w błonie lipidowej, wymagają użycia anestetyków w stężeniach znacznie przewyższających te niezbędne do wywołania znieczulenia [31]. Warto jednak zauważyć, że rozmieszczenie leków w błonie komórkowej nie jest jednorodne. W wielu przypadkach cząsteczki substancji aktywnych kumulują się w obszarach łączenia białka z lipidami, co skutkuje wysokim stężeniem lokalnym specyfiku. Dlatego nie wyklucza się, że zastosowanie stężeń klinicznych anestetyków jest niewystarczające do wywołania zmian strukturalnych dwuwarstwy lipidowej w komórce nerwowej [25].

Równocześnie z pojawieniem się pierwszych wątpliwości co do słuszności teorii lipidowej, zaczęto badać struktury białkowe (neurotransmitery, receptory czy kanały jonowe) pod kątem potencjalnych celów działania anestetyków. Franks i Lieb [32] zaprezentowali wyniki ukazujące zdolność środków znieczulających do zahamowania bioluminescencyjnych funkcji lucyferazy. Eksperymenty przeprowadzone *in vitro* potwierdziły wpływ środków znieczulenia ogólnego na funkcje białek. Dlatego uważa się, że stan znieczulenia może wiązać się z zakłóceniem procesu

wiązania liganda przez białeczkę lub zaburzeniem zdolności białka do zmian konformacyjnych istotnych dla jego funkcjonowania [33–35].



Rysunek 4. Schemat działania anestetyków na receptory GABA_A i glicynowe [4]
 Figure 4. The scheme of anesthetic actions on GABA_A and glycine receptors [4]

W strukturze białkowej występuje szereg aminokwasów tworzących kieszenie hydrofobowe, które mogą być zajmowane przez anestetyki. Ponadto hydrofobowe aminokwasy są głównymi składnikami α -helis, a ich łańcuchy boczne są wyeksponowane na powierzchni białka, która styka się z błoną lipidową. Cząsteczki środków znieczulających, wnikać w przestrzeń łączącą białko z lipidami, mogą zakłócić ich oddziaływanie i bezpośrednio wpłynąć na konformację białka [2].

W ciągu ostatnich lat, badania nad mechanizmem działania anestetyków skupiły się głównie na kanałach jonowych, które znajdują się w błonie komórek nerwowych. W stężeniach klinicznych środki znieczulenia ogólnego wpływają na właściwości wydzielnicze neuronów, pozostawiając w ten sposób aksonalne przewodnictwo potencjału czynnościowego, w znacznym stopniu nienaruszone. Jednym z najczęściej badanych jest receptor GABA_A należący do rodziny kanałów jonowych bramkowanych napięciem. Wraz z receptorem glicynowym stanowią grupę receptorów hamujących (Rys. 4). Kwas γ -aminomasłowy (GABA) pobudza receptory GABA_A, które zwiększają przepuszczalność kanałów chlorkowych oraz wywołują hiperpolaryzację błony komórkowej. Większość anestetyków wziewnych, wliczając w to wszystkie pochodne eterów i wybrane alkanany wzmacniają funkcje receptorów [35, 36].

2. WŁASNOŚCI BŁONY LIPIDOWEJ W KONTEKŚCIE INTERAKCJI ZE ŚRODKAMI ZNIECZULAJĄCYMI

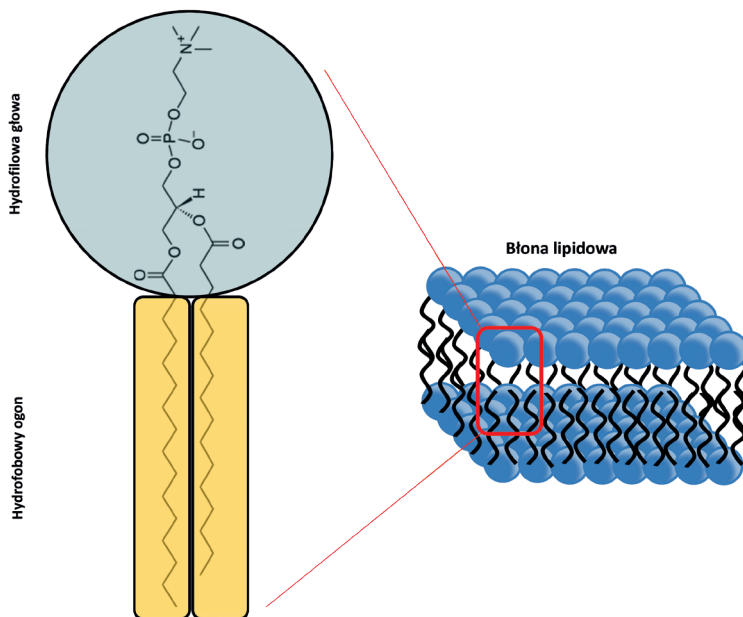
Błony stanowią ośrodek wielu procesów zachodzących w komórkach organizmów żywych. Pośredniczą w ustalaniu i utrzymywaniu gradientów transbłono-

wych, regulują transport z i do komórki, biorą udział w komunikacji międzykomórkowej oraz tworzą środowisko dla licznych reakcji biochemicznych [37–40]. Biorąc pod uwagę mnogość funkcji błon jest oczywiste, że wszelkie modyfikacje strukturalne mogą wpływać na fizjologię organizmu [41].

Lipidy i białka stanowią integralną część błon biologicznych otaczających komórki organizmów żywych. Skład lipidowo-białkowy błony oraz występujące pomiędzy nimi oddziaływania ściśle koreluje z jej funkcjonalnością [42]. W wielu przypadkach, rodzaj lipidów, które oddziałują z aminokwasami jest w pewnym stopniu określony przez typ białka, z którym sąsiaduje. Białka transbłonowe wpływają także na właściwości strukturalne dwuwarstwy lipidowej [43, 44]. Oddziaływania białkowo-lipidowe są więc istotnym czynnikiem warunkującym strukturę i funkcję struktur komórkowych.

2.1. STRUKTURA DWUWARSTWY LIPIDOWEJ

Podstawą strukturalną wszystkich błon biologicznych jest dwuwarstwa lipi-dowa. Zbudowana z dwóch przeciwstawnych warstw cząsteczek lipidów, których polarne głowy skierowane są w stronę fazy wodnej, a hydrofobowe łańcuchy wę-glowodorowe tworzą wewnątrz agregatu (Rys. 5) [39, 41].

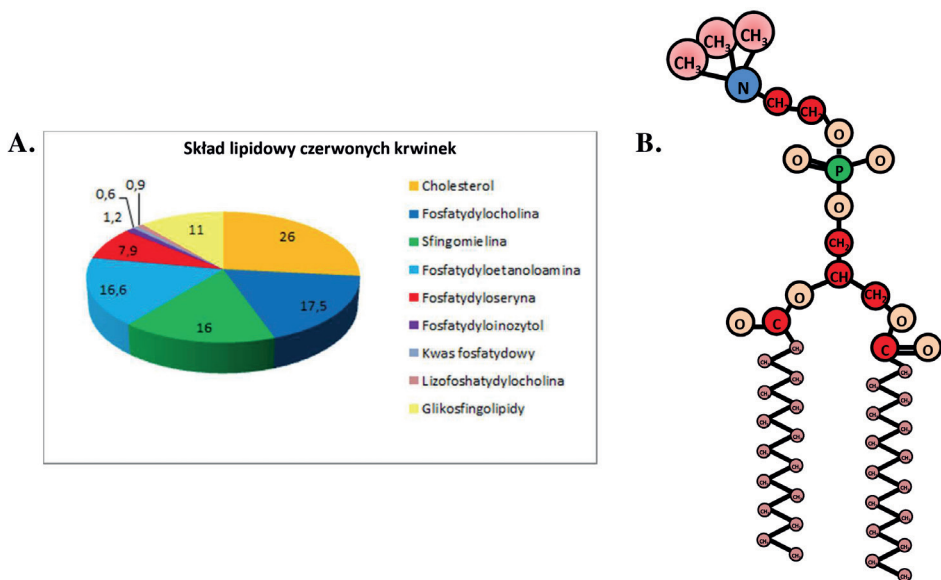


Rysunek 5. Schemat budowy cząsteczki lipidu będącego elementem dwuwarstwy lipidowej [45]
Figure 5. Structure of lipid molecule as the element of lipid bilayer [45]

Lipidy zorganizowane w dwuwarstwy lipidowe należą do cząsteczek amfifilowych, których hydrofilowe głowy wchodzą w skład kilku klas chemicznych [46]. Ponadto kwasy tłuszczowe tworzące ogon lipidowy mogą należeć do związków nasyconych bądź nienasyconych o różnej długości łańcucha. Wyodrębniono ponad 100 różnych lipidów, których zawartość w komórce waha się od 20 do 80% wszystkich składników [47]. Ze względu na budowę chemiczną lipidy można podzielić na cztery klasy [46, 48]:

- fosfolipidy (diacylofosfoglicerydy)
- glikolipidy (diacyloglikoglicerydy)
- sfingolipidy
- sterole.

Fosfolipidy dominują pod względem zawartości w błonach biologicznych, a wśród nich fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina (Rys. 6.A). Oprócz łańcuchów węglowodorowych w swej strukturze posiadają resztę glicerolową i fosforanową, a także alkohol, definiujący ich rodzaj (Rys. 6B) [48, 49].

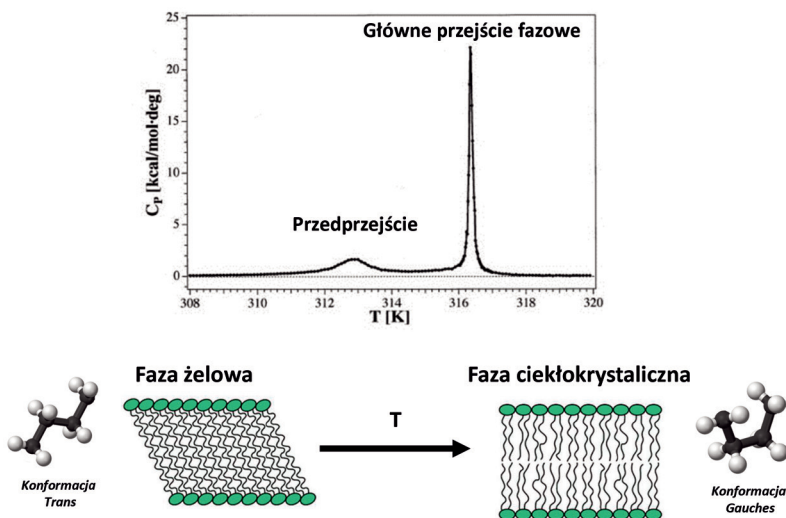


Rysunek 6. (A) Skład lipidowy błon ludzkich czerwonych krwinek [49] (B) Schemat fosfolipidu DPPC [50]
Figure 6. (A) Lipid composition of human red blood cells [49] (B) DPPC structure [50]

Obecność części hydrofobowej w cząsteczce lipidu sprawia, że większość z nich jest słabo rozpuszczalna w wodzie i tworzy agregaty lipidowe, które skupiają grupy hydrofobowe wewnątrz klasteru oraz ekspozycją hydrofilowe rejony na otaczający polarny rozpuszczalnik [51]. W zależności od środowiska oraz natury lipidów można wyodrębnić m.in. struktury micelarne, dwuwarstwowe tworzące liposomy. Dla cząsteczek o główkach polarnych zbliżonych rozmiarem do przekroju łańcuchów węglowodorowych i przypominających kształtem walec, preferowane są

struktury dwuwarstwy lipidowej, która spontanicznie zwiija się tworząc pęcherzyki zwane liposomami. Zamknięta powierzchnia liposomów eliminuje niekorzystną ekspozycję części hydrofobowych na działanie wody [49, 51, 52].

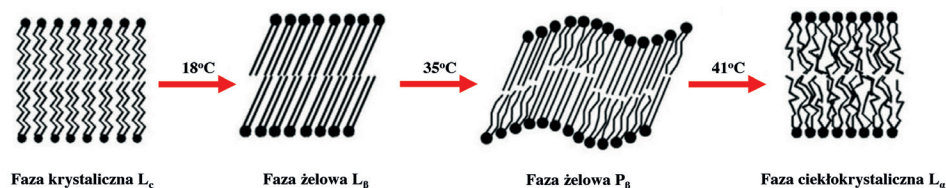
Błony lipidowe są układami polimorficznymi, których struktura nie zależy jedynie od budowy samej cząsteczki lipidu czy od jej stopnia uwodnienia, ale także od czynników zewnętrznych takich jak temperatura, ciśnienie, pH i siła jonowa [51, 53]. W warunkach fizjologicznych większość błon lipidowych występuje w fazie ciekłokrystalicznej (L_α) bądź w fazie żelowej (L_β). Unikalną cechą dwuwarstwy jest zdolność do przemiany fazowej będącej odwracalnym i wysoce kooperatywnym procesem, opierającym się na topnieniu lipidowych łańcuchów acylowych. Konwersja uporządkowanej fazy żelowej, w której sztywne łańcuchy węglowodorowe są bogate w konformery *trans*, do nieuporządkowanej fazy ciekłokrystalicznej, charakteryzującej się ruchliwymi łańcuchami acylowymi o konformacji typu *gauche*, nazywana jest głównym przejściem fazowym (Rys. 7). Objawia się zmniejszeniem grubości dwuwarstwy i jednoczesnym wzrostem całkowitej objętości zajmowanej przez cząsteczki lipidów. Topnienie łańcuchów węglowodorowych zwiększa obszar hydrofilowy dostępny dla penetrujących go cząsteczek wody [53–55].



Rysunek 7. Model głównego przejścia fazowego wywołany wzrostem temperatury oraz odpowiadająca mu krzywa DSC [38]

Figure 7. The main phase transition caused by an increase in temperature and corresponding DSC curve [38]

Główne przejście fazowe może być wywołane zmianami temperatury otoczenia. Przemianę fazową osiąga się po przekroczeniu tzw. temperatury głównego przejścia, która jest charakterystyczna dla danego rodzaju lipidów. Dla dipalmitoilofosfatydylocholino (DPPC) przemianę fazową *trans* – *gauche* obserwuje się w temperaturze 41°C [56].



Rysunek 8. Przemiany fazowe zachodzące w uwodnionej dwuwarstwie DPPC [51]

Figure 8. Phase transition processes of hydrated DPPC bilayer [51]

Fosfatydylocholino, które należą do grupy najczęściej występujących lipidów mogą ulegać dodatkowo dwóm innym przemianom fazowym (Rys. 8). W najniższych temperaturach agregaty lipidowe występują w fazie krystalicznej (L_c). Ze wzrostem temperatury oddziaływania van der Waalsa stabilizujące L_c ulegają osłabieniu, prowadząc do otrzymania fazy żelowej (L_β) [51]. Proces nazywany jest subprzejściem dla błon DPPC [57] i pojawia się przy 18 °C [58]. W fazie żelowej lipidy są słabiej upakowane, a przestrzeń pomiędzy główkami jest silniej uwodniona [51, 59]. Dalsze grzanie prowadzi do wzrostu ruchliwości łańcuchów węglowodorowych pozostających nadal w konformacji *trans*. Po osiągnięciu temperatury zwanej temperaturą przedprzejścia, faza żelowa L_β przechodzi w fazę pofałdowaną P_β [51, 57, 60]. Dla DPPC przemiana pojawia się przy temperaturze 35°C [58] i nosi nazwę przedprzejścia. Faza P_β charakteryzuje się periodycznie pofalowaną powierzchnią błony wynikającą ze wzrostu uwodnienia przestrzeni między główkami. W fazie żelowej pofałdowanej dominującą konformacją łańcuchów węglowodorowych jest nadal *trans*, ale rośnie ich swobodna rotacja [60–62].

2.2. MECHANIZM ODDZIAŁYWANIA ANESTETYKU Z BŁONĄ LIPIDOWĄ

Wszelkie procesy związane z obecnością leków w organizmie, z uwagi na ich dynamiczną naturę są wysoce złożone i trudne do zrozumienia. Badania nad oddziaływaniem lek – błona lipidowa pozwalają przewidywać właściwości farmakokinetyczne substancji leczniczych. Ponadto mogą zostać wykorzystane do projektowania i rozwijania skutecznych systemów dostarczania leków.

Mechanizmy działania wielu leków opierają się na zmianie właściwości fizycznych błony lipidowej wynikających z bezpośredniego wiązania się z cząsteczkami lipidów [63–65]. Siła działania związków chemicznych, w tym anestetyków, zależy więc od zdolności do modyfikacji struktury i dynamiki dwuwarstwy lipidowej. Zmiany na poziomie cząsteczkowym, wywołane występowaniem leków w układzie, rzutują na właściwości makroskopowe błony takie jak: płynność [66], objętość [67] uporządkowanie [68], zwiększona przepuszczalność [69] czy przesunięcie temperatury głównego przejścia fazowego [70]. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) umożliwia monitorowanie przemian fazowych zachodzących w układach lipidowych [71]. W konsekwencji obserwowalny jest wpływ obecności anestetyków

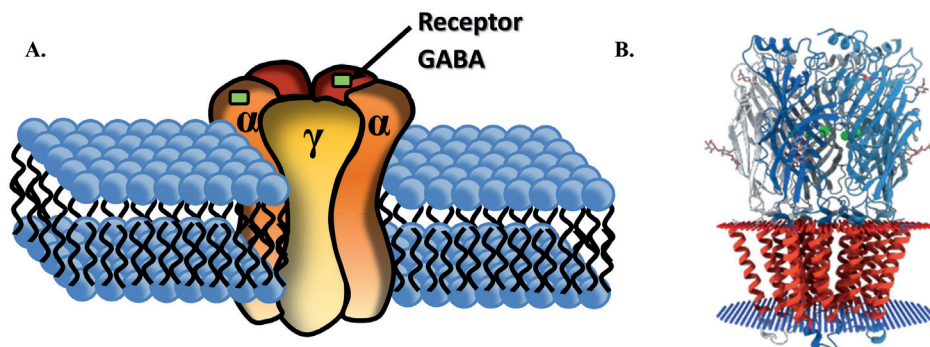
lipidową w fazie ciekłej. Natomiast powyżej stężenia progowego, etanol oddziałuje z grupami chemicznymi obecnymi w główkach lipidów co powoduje stabilizację fazy żelowej, a w konsekwencji podwyższenie T_m [82, 83].

Obecność cząsteczek anestetyków w układzie wpływa na ciśnienie lateralne błony lipidowej. Wyniki oparte na obliczeniach teoretycznych dowodzą, że cząsteczki o właściwościach znieczulających lokują się zarówno w części hydrofilowej jak i interfazie błony. Mechanizmy zapoczątkowane przez konkurencyjne tworzenie się wiązań wodorowych prowadzą do zmian w profilu ciśnienia lateralnego. Modyfikacje właściwości błony przyczyniają się do zmian konformacyjnych białek błonowych [23, 84–86].

3. GRAMICYDYNA JAKO MODEL BIAŁKA TRANSBŁONOWEGO

Zaproponowana przez Franks'a i Lieb'a [32, 87] teoria białkowo-zależna anestezji przewiduje, że wskutek bezpośredniego oddziaływania z białkami błonowymi, anestetyki na poziomie komórkowym wpływają na funkcję neuronów. Przewodnictwo w aksonach oraz aktywność synaps są odpowiednio zależne od białkowych kanałów jonowych bramkowanych napięciem lub ligandem. Liczne badania wykazały, że zarówno kanały sodowe jak i potasowe, zaliczane do grupy zależnej od potencjału, nie wykazują szczególnej wrażliwości na działanie środków znieczulających [33, 88]. Natomiast kanały aktywowane przez ligandy, a w szczególności przez glutaminian oraz GABA, zaliczane są do głównych celów wpływu anestetyków.

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest najważniejszym hamującym neuroprzekaznikiem w ośrodkowym układzie nerwowym. Pośredniczy w przepływie jonów chlorkowych przez błony synaptyczne, prowadząc do jej hiperpolaryzacji (Rys. 10). W efekcie zostaje zmniejszona pobudliwość neuronów oraz zahamowane przewodzenie impulsów [33, 89]. Receptory GABA mogą być modulowane przez liczną grupę substancji chemicznych [33, 35, 90, 91]. Wiele z tych związków zaliczanych jest do cząsteczek amfifilowych, których właściwości mogą również wpływać na strukturę i dynamikę otaczającej błony lipidowej. Modyfikacje strukturalne zachodzące w sąsiadujących z białkiem cząsteczkach lipidów często wpływają na jego aktywność. Pojawiające się oddziaływania hydrofobowe między regionem transbłonowym białka, a rdzeniem dwuwarstwy, wywołują miejscowe odkształcenia błony, które jednocześnie mogą wymusić zmiany konformacyjne łańcucha polipeptydowego [92].



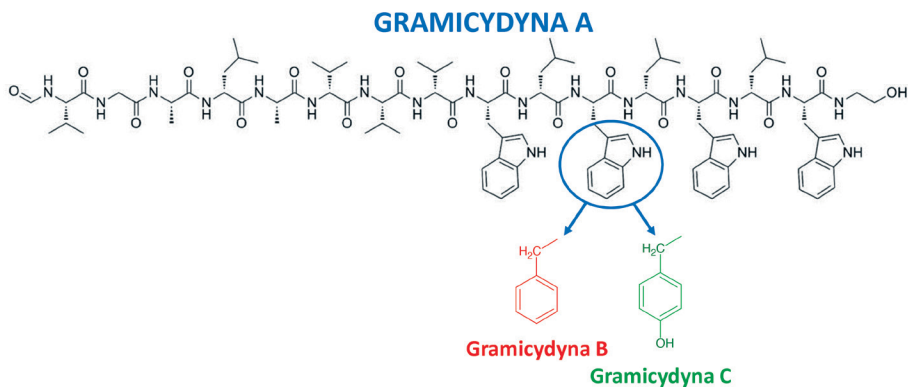
Rysunek 10. (A) Schemat budowy receptora $GABA_A$ z podziałem na podjednostki [93]. (B) Struktura krystaliczna ludzkiego receptora GABA [opracowane na podstawie danych bazy PDB]

Figure 10. (A) GABA_A receptor model [93]. (B) Crystal structure of GABA receptor [on the base on PDB data]

Zrozumienie pełnego mechanizmu anestezji na poziomie molekularnym wymaga uwzględnienia w badaniach informacji o modyfikacjach strukturalnych kanałów jonowych. Mimo postępów w dziedzinie obrazowania biocząsteczek [94], analiza oddziaływań receptorów z anestetykami stanowi duże wyzwanie [95]. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie dobrze zdefiniowanych układów modelowych jak albumina surowicy bydłowej [96], albumina surowicy ludzkiej [97] czy lucyferaza muchy [98]. Rozpuszczalne w wodzie białka globularne dostarczyły wiele istotnych danych na temat oddziaływań białko-anestetyk. Jednak, aby odnieść się do działań środków znieczulających na strukturę białek błonowych wykorzystuje się modelowy kanał jonowy jakim jest Gramicydyna [99–101].

3.1. ZMIANY KONFORMACYJNE GRAMICYDYNY ZALEŻNE OD RODZAJU ROZPUSZCZALNIKA

Gramicydyna to liniowy peptyd o właściwościach antybiotycznych. Wytwarzany przez bakterie glebowe *Bacillus brevis*, zbudowany jest z 15 reszt aminokwasowych L- i D-ułożonych naprzemiennie [102, 103]. W warunkach naturalnych Gramicydyna występuje w formie mieszaniny, której głównym składnikiem jest Gramicydyna A (85%). Ponadto obserwuje się obecność Gramicydyny B oraz C różniących się naturą aromatycznej reszty aminokwasowej w pozycji 11 [104] (Rys. 11).



Rysunek 11. Sekwencja aminokwasów w Gramicydynie A, B i C [105]

Figure 11. Amino acid sequence of Gramicidin A, B and C [105]

Unikalna sekwencja L- i D- aminokwasów sprawia, że Gramicydyna wykazuje silną wrażliwość na działanie otaczającego środowiska. Obserwowalne jest przyjmowanie przez peptyd szerokiego spektrum zależnych od otoczenia konformacji. Stąd niejednokrotnie wykorzystywany jest jako model realistycznego określenia konformacyjnej preferencji białek w środowisku błony. Zidentyfikowano dwa główne motywy fałdowania Gramicydyny [102]:

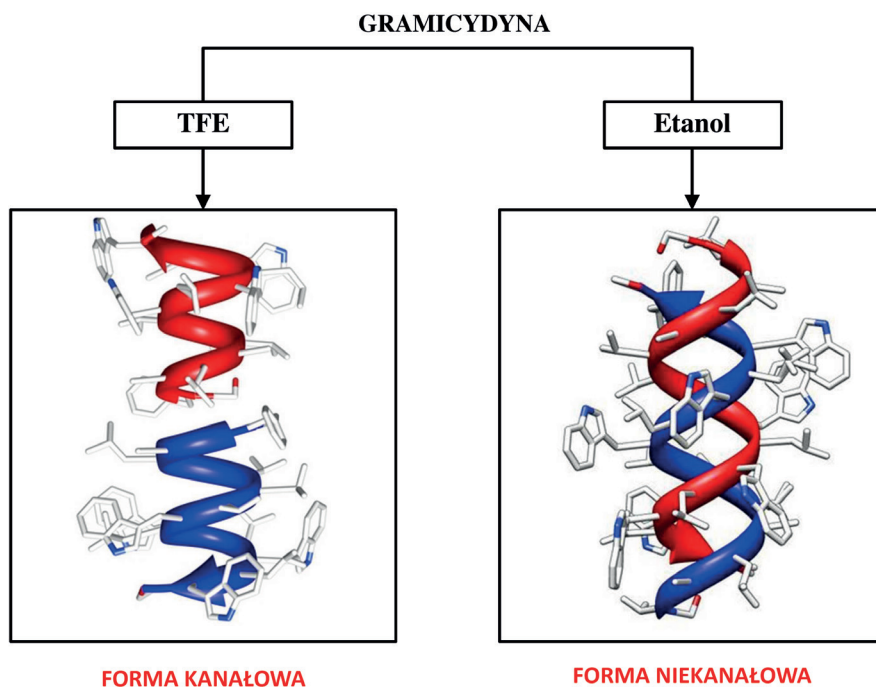
- a) „głowa do głowy”
- b) podwójna helisa

Konformacja podwójnej helisy dominuje w rozpuszczalnikach organicznych. Natomiast konformacja jaką przyjmuje Gramicydyna wbudowująca się do wnętrza błony lipidowej jest zależna od natury rozpuszczalnika, w jakim została wstępnie rozpuszczona (Rys. 12) [104].

Motyw podwójnej helisy, formuje się na skutek tworzenia się pomiędzy dwoma łańcuchami polipeptydowymi licznych, międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Następnie łańcuchy aminokwasów związają się w helisy. Tego typu struktura często określana jest symbolicznie jako struktura $\pi\pi^{5,6}$ lub $\pi\pi^{6,4}$, gdzie górny indeks wskazuje liczbę reszt przypadających na jeden skręt w helikalnym monomerze [102, 104, 106]. Jak już zostało nadmienione, początkowa konformacja jaką przyjmuje Gramicydyna wbudowująca się w błonę zależy od rozpuszczalnika. Rozpuszczenie peptydu w roztworach metanol/chloroform, benzen/metanol lub etanolu prowadzi do uzyskania motywu podwójnej helisy uznawanej za formę nie-kanałową [104, 107, 108].

Użycie trifluoroetanolu (TFE) jako rozpuszczalnika prowadzi do uzyskania formy kanałowej Gramicydyny po wbudowaniu się w strukturę błony lipidowej. W helikalnym dimerze, każdy z łańcuchów polipeptydowych tworzy serię wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych. Reszty aminokwasowe na N-końcu każdej helisy tworzą natomiast międzycząsteczkowe wiązania wodorowe dzięki czemu uzyskuje się konformację dimeru „głowa do głowy” ($\beta^{6,3}$). Wnętrze kanału jest zbudowane

wane z polarnego szkieletu peptydowego. Na zewnątrz wyeksponowane są łańcuchy boczne aminokwasów, które są w kontakcie z łańcuchami acylowymi sąsiadujących lipidów oraz pomagają w regulowaniu przewodnictwa kanału. Rozmiar porów kanału jest wystarczająco duży by umożliwić przejście jednododatnim kationom [104, 108].



Rysunek 12. Konformacje dimerów peptydowych Gramicydiny zależne od rodzaju rozpuszczalnika
Figure 12. Solvent dependent Gramicidin dimer conformations

3.2. WPLYW ANESTETYKÓW NA STRUKTURĘ GRAMICYDINY

Działanie środków znieczulających na białka błonowe może opierać się na bezpośrednim wiązaniu się anestetyku do kanału jonowego lub na pośrednim wpływie na jego aktywność przez zaburzenie struktury i dynamiki błony lipidowej [109].

Próby identyfikacji miejsca wiązania się anestetyków do modelowego białka błonowego, jakim jest Gramicydyna, zostały podjęte przez Tang'a i współpracowników, przy wykorzystaniu technik NMR [99], znakowania fotopowinnowactwa [101] czy modelowania molekularnego [110]. Silna zależność częstotliwości rezonansowej protonu amidowego w pierścieniu indolowym od stężenia halotanu pozwoliła ustalić, że strukturalnie selektywne oddziaływania pomiędzy Gramicydyną i środkiem znieczulającym występują w pobliżu reszt tryptofanowych peptydu przyjmującego konformację kanałową. Natomiast, reorganizacja dimeru do

formy podwójnej helisy prowadzi do niemal całkowitego zaniku tego zjawiska. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że reszty tryptofanowe nie są jedynym czynnikiem determinującym oddziaływanie anestetyk – Gramicydyna, ale istotne jest również rozmieszczenie łańcuchów bocznych aminokwasów w dimerze peptydowym. Unikalna orientacja pierścieni indolowych względem otoczenia lipidowego, zwłaszcza Trp-9 i Trp-15 pozwala na utworzenie kieszeni amfifilowych preferowanych przez środki znieczulenia ogólnego. Ponadto przypuszcza się, że oddziaływanie Trp-9 z wodą, utrudnione przez bliską obecność łańcucha bocznego Trp-15, jest możliwe po wprowadzeniu do układu cząsteczek anestetyków [99, 101].

UWAGI KOŃCOWE

Najważniejszym wyzwaniem współczesnej anestezjologii jest optymalizacja dawkowania środków znieczulenia ogólnego. Powszechnie praktykowana jest tzw. anestezja złożona polegająca na połączeniu kilku specjalistycznych leków umożliwiających ograniczenie niepożądanego wpływu anestetyków, przy jednoczesnym skutecznym znieczuleniu. Sprecyzowanie molekularnego mechanizmu działania środków znieczulenia ogólnego pozwoliłoby uzyskać adekwatną, dostosowaną do potrzeb pacjenta kontrolowaną utratą świadomości. Odwracalność zjawiska anestezji sugeruje, że analizowane zjawisko opiera się na zaburzeniu słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, jak wiązanie wodorowe i siły van der Waalsa. Cząsteczki anestetyków mogą więc wiązać się bezpośrednio z hydrofobowymi regionami białka, wywołując jego zmiany konformacyjne bądź wywierając wpływ na lipidy otaczające receptory prowadzące do modyfikacji strukturalnych oraz organizacyjnych błony, które zaburzają aktywność białek.

Wyniki uzyskane do tej pory wskazują na dwutorowy mechanizm znieczulenia ogólnego, w którym to anestetyki wnikają w obszar interfazy błony lipidowej, gdzie za pomocą obecnych w ich strukturze kwasowych wodorów, oddziałują zarówno z grupami karbonyłowymi lipidów, jak i resztami tryptofanowymi białka.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Larsen, *Anestezjologia*, Tom I, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2013.
- [2] P.G. Barash, B.F. Cullen, R.K. Stoelting, M.K. Cahalan, M.C. Stock, R. Ortega, *Clinical anesthesia*, Lippincott Williams & Wilkins, USA 2009.
- [3] I.I. Eger, I. Edmond, L.J. Saidman, R.N. Westhorpe, *The wondrous story of anesthesia*, Springer New York 2014.
- [4] R.D. Miller, M. Pardo, *Basics for anesthesia*, Elsevier Health Sciences, USA 2011.
- [5] O.C. Wenker, *Int. J. Anesthesiol.*, 1999, 3, 1.
- [6] F.X. Whalen, D.R. Bacon, H.M. Smith, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 2005, 19, 323.
- [7] H.C. Hemmings, T.D. Egan, *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application*, Elsevier Health Sciences, USA 2012.

- [8] G. Torri, *Minerva Anesthesiol.*, 2010, **76**, 215.
- [9] I.I. Eger, I. Edmond, *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2004, **61**.
- [10] T.L. Lemke, D.A. Williams, *Foye's Principles Medicinal Chemistry*, Lippincott Williams & Wilkins, USA 2008.
- [11] E.I. Eger, *Semin. Anesth, Perioperative Medicine and Pain*, 2005, **24(2)**, 89
- [12] S. Mitra, P. Chopra, *Indian J. Anaesth*, 2011, **55(6)**, 556
- [13] R. Liu, R.G. Eckenhoff, *Anesthesiol.*, 2005, **102(4)**, 799.
- [14] G.A. Mashour, S.A. Forman, J.A. Campagna, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 2005, **19(3)**, 349.
- [15] J.A. Campagna, K.W. Miller, S.A. Forman, *N. Engl. J. Med.*, 2003, **348(21)**, 2110.
- [16] C.D. Richards, *J. Anaesth.*, 2002, **89**, 79.
- [17] U. Rudolph, B. Antkowiak, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2004, **5**, 709.
- [18] N. Franks, W. Lieb, *Toxicol. Lett.*, 1998, **100-101**, 1.
- [19] A.D. Kaye, A.M. Kaye, R.D. Urman, *Essentials of pharmacology for anesthesia, pain medicine, and critical care*, Springer New York, USA 2015.
- [20] H. Meyer, *Arch. Exp. Path. Pharmacol. (Naunyn Schmiedebergs)*, 1899, **42**, 109.
- [21] S. Taheri, M.J. Halsey, J. Liu, E.I. Eger, D.D. Koblin, M.J. Laster, *Anesth. Analg.*, 1991, **72**, 627.
- [22] N.P. Franks, W.R. Lieb, *Nature*, 1981, **292**, 248.
- [23] R.S. Cantor, *Biochemistry*, 1997, **36(9)**, 2339.
- [24] H. Tsuchiya, M. Mizogami, *Anesthesiol. Res. Pract.*, 2013, **2013**, 1.
- [25] S. Vemparala, L. Saiz, R.G. Eckenhoff, M.L. Klein, *Biophys. J.*, 2006, **91(8)**, 2815.
- [26] K.W. Miller, W.D. Paton, R.A. Smith, E.B. Smith, *Mol. Pharmacol.*, 1973, **9(2)**, 131.
- [27] J.T. Mohr, G.W. Gribble, S.S. Lin, R.G. Eckenhoff, R.S. Cantor, *J. Med. Chem.*, 2005, **48(12)**, 4172.
- [28] R.A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94(25)**, 13375.
- [29] R.G. Eckenhoff, *Mol. Interv.*, 2001, **1**, 258.
- [30] D.D. Koblin, B.S. Chortkoff, M.J. Laster, E.I. Eger, M.J. Halsey, P. Ionescu, *Prog. Anesth. Mech.*, 1995, **3**, 451.
- [31] E. J. Bertaccini, *Pharmaceuticals*, 2010, **3(7)**, 2178.
- [32] N.P. Franks, W.R. Lieb, *Nature*, 1984, **310**, 599.
- [33] N.P. Franks, W.R. Lieb, *Nature*, 1994, **367**, 607.
- [34] H.C. Hemmings, M.H. Akabas, P.A. Goldstein, J.R. Trudell, B.A. Orser, N.L. Harrison, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 2005, **26(10)**, 503.
- [35] C. J. Weir, *Critical Care & Pain*, 2006, **6(2)**, 49.
- [36] P. Århem, G. Klement, J. Nilsson, *Neuropsychopharmacol.*, 2003, **28(S1)**, 40.
- [37] R.K. Murray, *Harper's illustrated biochemistry*, McGraw Hill Professional, USA 2015.
- [38] R.H. Garrett, C.M. Grisham, *Biochemistry*, Cengage Learning, USA 2016.
- [39] W. Stillwell, *An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts*, Newnes, USA 2013.
- [40] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9(2)**, 112.
- [41] G. Pabst, N. Kučerka, M. Nieh, J. Katsaras, *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application*, CRC Press, USA 2014.
- [42] P.V. Escribá, G.L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1838(6)**, 1449.
- [43] P.V. Escribá, J.M. Gonzalez-Ros, F.M. Goni, P.K.J. Kinnunen, L. Vigh, L. Sanchez-Magraner, A.M. Fernandez, X. Busquets, I. Horvath, G. Barcelo-Coblijn, *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, **12(3)**, 829.
- [44] P.V. Escribá, P.B. Wedegaertner, F.M. Goñi, O. Vögler, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768(4)**, 836.
- [45] <https://www.khanacademy.org/science/biology> [Data odczytu: 24.08.2017 11:47].
- [46] M. Panasewicz-Gierula, *KOSMOS*, 2009, **58**, 49.
- [47] J.W. Baynes, M.H. Dominiczak, *Medical Biochemistry E-Book*, Elsevier Health Sciences, USA 2014
- [48] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła, *Błony biologiczne*, Śląsk, Katowice 2003.
- [49] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman, USA 2012.

- [50] G. Milano, T. Kawakatsu, A. De Nicola, *Phys. Biol.*, 2013, **10**(4), 1.
- [51] P.L. Yeagle, *The Structure of Biological Membranes*, CRC Press, USA 2011.
- [52] S. Przystalski, J. Sarapuk, H. Kleszczyńska, J. Gabrielska, J. Hładyszewski, Z. Trela, J. Kuczera, *Acta Biochim. Polonica*, 2000, **47**, 627.
- [53] R.N. Lewis, D.A. Mannock, R.N. McElhaney, *Curr. Top. Membr.*, 1997, **44**, 25.
- [54] R. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**(10), 2347.
- [55] M.O. Eze, *Biochem. Educ.*, 1991, **19**(4), 204.
- [56] F.M. Harris, K.B. Best, J.D. Bell, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1565**, 123.
- [57] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1376**, 91.
- [58] S.C. Chen, J.M. Sturtevant, B.J. Gaffney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, **77**(9), 5060.
- [59] M.J. Ruocco, G.G. Shipley, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, **691**(2), 309.
- [60] K.A. Riske, R.P. Barroso, C.C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V.B. Henriques, M.T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 954.
- [61] M.P. Hentschel, F. Rustichelli, *Phys. Rev. Lett.*, 1991, **66**, 903.
- [62] C. Leidy, K. Gousset, J. Ricker, W.F. Wolkers, N.M. Tsvetkova, F. Tablin, J.H. Crowe, *Cell Biochem. Biophys.*, 2004, **40**(2), 123.
- [63] A. Gawron, A. Gabizon, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1029**, 285.
- [64] O.G. Mouritsen, K. Jorgensen, *Pharm. Res.*, 1998, **15**(10), 1507.
- [65] O. Cramariuc, T. Rog, I. Vattulainen, *Curr. Phys. Chem.*, 2012, **2**, 379.
- [66] I. Ueda, M. Hirakawa, K. Arakawa, H. Kamaya, *Anesthesiology*, 1986, **64**, 67.
- [67] T. Mori, N. Matubayasi, I. Ueda, *Mol. Pharmacol.*, 1984, **25**, 123.
- [68] S.V. Balasubramanian, R.B. Campbell, R.M. Straubinger, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **114**, 35.
- [69] T. Andoh, T.J.J. Blanck, I. Nikonov, E. Recio-Pinto, *Br. J. Anaesth.*, 1997, **78**, 66.
- [70] H. Tsuchiya, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2001, **28**, 292.
- [71] C. Demetzos, *J. Liposome Res.*, 2008, **18**, 159.
- [72] M. Engelke, R. Jessel, A. Wiechmann, H.A. Diehl, *Biophys. Chem.*, 1997, **67**, 127.
- [73] Z.V. Leonenko, D.T. Cramb, *Can. J. Chem.*, 2004, **82**(7), 1128.
- [74] *The structure of biological membranes*, P.L. Yeagle (Red.), Wyd. 2, CRC Press, USA 2005.
- [75] J.L. Slater, C.H. Huang, *Prog. Lipid Res.*, 1998, **27**, 325.
- [76] J. Zeng, P. Lee-Gau Chong, *Biophys. J.* 1995, **68**, 567.
- [77] A.A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, USA, 2013.
- [78] T.J. McIntosh, R.V. McDaniel, S.A. Simon, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **731**, 109.
- [79] U. Vierl, L. LÖbbecke, N. Nagel, G. Cevc, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 1067.
- [80] L. LÖbbecke, G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1237**, 59.
- [81] M. Kranenburg, M. Vlaar, B. Smit, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 1596.
- [82] E.S. Rowe, *Biochem.*, 1983, **22**, 3299.
- [83] M.F.N. Rosser, H.M. Lu, P. Dea, *Biophys. Chem.*, 1999, **81**, 33.
- [84] E. Terama, O.S. Ollila, E. Salonen, A.C. Rowat, C. Trandum, P. Westh, I. Vattulainen, *J. Phys. Chem.*, 2008, **112**(13), 4131.
- [85] M.S.P. Sansom, P.C. Biggin, *Molecular simulations and biomembranes: from biophysics to function*, Royal Society of Chemistry, 2010.
- [86] R.S. Cantor, *Biophys. J.*, 2001, **80**(5), 2284.
- [87] N. Franks, W. Lieb, *Anesthesiol.*, 2004, **101**, 235.
- [88] N. Franks, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, **9**(5), 370.
- [89] M. Chebib, G.A. Johnston, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1999, **26**(11), 937.
- [90] P.S. Garcia, S.E. Kolesky, A. Jenkins, *Curr. Neuropharmacol.*, 2010, **8**(1), 2.

- [91] R. Søgaard, T.M. Werge, C. Bertelsen, C. Lundbye, K.L. Madsen, C.H. Nielsen, J.A. Lundbæk, *Biochem.*, 2006, **45**(43), 13118.
- [92] A.G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1666**(1), 62.
- [93] T.C. Jacob, S.J. Moss, R. Jurd, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, **9**(5), 331.
- [94] P.S. Miller, A.R. Aricescu, *Nature*, 2014, **512**(7514) 270.
- [95] R. Puthenkalam, *Front. Mol. Neurosci.*, 2016, 9.
- [96] R.G. Eckenhoff, J.W. Tanner, *Biophys. J.*, 1998, **75**(1), 477.
- [97] A.A. Battacharya, S. Curry, N.P. Franks, *J. Biol. Chem.* 2000, **275**(49), 38731.
- [98] N.P. Franks, *Biophys. J.*, 1998, **75**(5), 2205.
- [99] P. Tang, J. Hu, S. Liachenko, Y. Xu, *Biophys. J.*, 1999, **77**(2), 739.
- [100] P. Tang, V. Simplaceanu, Y. Xu, *Biophys. J.*, 1999, **76**(5), 2346.
- [101] P. Tang, R.G. Eckenhoff, Y. Xu, *Biophys. J.*, 2000, **78**(4), 1804.
- [102] B.A. Wallace, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1990, **19**, 127.
- [103] R.J. Dubos, C. Cattaneo, *J. Exp. Med.*, 1939, **70**, 249.
- [104] D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**(9), 2011.
- [105] T.G. Meikle, C.E. Conn, F. Separovic, C.J. Drummond, *RSC Adv.*, 2016, **6**(73), 68685.
- [106] B.A. Wallace, *J. Struct. Biol.*, 1998, **121**(2), 123.
- [107] J.A. Killian, K.U. Prasad, D. Hains, D.W. Urry, *Biochemistry*, 1988, **27**, 4848.
- [108] P.V. LoGrasso, F. Moll, T.A. Cross, *Biophys. J.*, 1988, **54**, 259.
- [109] B.W. Urban, M. Bleckwenn, M. Barann, *Pharmacol. Ther.*, 2006, **111**(3), 729.
- [110] P. Tang, I.Z. Zubrzycki, *Anesthesiol.*, 2000, **93**, 145.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lutego 2019 roku

