

**ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII
OSCYLACYJNEJ W ZAKRESIE NIR DO ŚLEDZENIA
MODYFIKACJI KONFORMACYJNYCH
ZACHODZĄCYCH W HYDROFOBOWYM
OBSZARZE MODELOWYCH DWUWARSTW
LIPIDOWYCH**

**APPLICATION OF NIR RANGE VIBRATIONAL
SPECTROSCOPY TO FOLLOW THE
CONFORMATIONAL MODIFICATIONS OCCURRING
IN THE HYDROPHOBIC REGION OF MODEL LIPID
BILAYERS**

Marta Kuć, Katarzyna Cieślik-Boczula*, Maria Rospenk

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: katarzyna.cieslik-boczula@uwr.edu.pl

Praca dedykowana
Panu Profesorowi Jerzemu Piotrowi Hawrankowi

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Błony biologiczne

1.1. Budowa i funkcje błon biologicznych

1.2. Właściwości błon biologicznych

2. Liposomy jako modele błon biologicznych

3. Przejścia fazowe modelowych dwuwarstw lipidowych

4. Metody badawcze układów bilamelarnych


4.1. Wspomagana analizą chemometryczną (PCA) spektroskopia FTIR
w zakresie NIR jako alternatywna metoda w badaniu przejść
fazowych modelowych układów błonowych w zakresie MIR

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane


Dr Marta Kuć – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (2013). Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2022 roku w Uniwersytecie Wrocławskim na podstawie przedstawionej pracy doktorskiej zatytułowanej: „Wpływ wybranych cząsteczek o właściwościach anestetycznych na struktury modelowych błon lipidowych.”. Praca wykonana została pod opieką naukową prof. Marii Rospenk i dr hab. Katarzyny Cieślik-Boczuli.



 <https://orcid.org/0000-0001-7872-8649>


Dr hab. 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. Tytuł doktora habilitowanego uzyskała w roku 2020 za pracę pod tytułem „Wpływ związków o aktywności anti- i pro-neurodegeneracyjnej na strukturę poli-L-lizyny i modelowych błon lipidowych.” 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, Wydziału 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 między- cząsteczkowego wiązania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.



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

ABSTRACT

Biomembranes, which are the structural and functional basis of the cells of all living organisms, have been an extremely interesting research object for biology and chemistry scientists for years. The multitude of elements constituting the components of natural lipid membranes, however, is associated with interpretation difficulties regarding the nature of the processes taking place in them. A useful research object that is a model of bilamellar biosystems with a significantly simplified composition and at the same time retaining properties that can be a reference point in relation to natural membranes are lipid membranes in the form of one or several component liposomes. It is precisely such systems built of molecules of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) or dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG), and analogous systems with the addition of cholesterol (Chol), that were the subject of research in this work.

Near-infrared (NIR) vibrational spectroscopy provides a suitable method for the study of the hydrated samples. In most cases it can be alternatively adopted instead of commonly used mid-infrared (MIR) vibrational spectroscopy. This technique was applied for the first time to identify the spectral changes associated with the conformational changes in the hydrophobic region of model lipid bilayers. *Trans/gauche* isomerization of CH₂ groups of lipid hydrocarbon chains is accompanied by characteristic changes in spectral parameters of both $\nu_{as,s}$ CH₂ bands and their first overtones ($2\nu_{as,s}$ CH₂). The heating of all types of analyzed liposomes results in main phase transition (T_m) accompanied by *trans* to *gauche* isomerization of CH₂ groups of lipid hydrocarbon chains. The NIR-spectroscopy was able to describe in proper way (similar to MIR results) the character of T_m in studied bilayers.

Keywords: lipid bilayers, liposome, main phase transition, Mid-infrared vibrational spectroscopy (MIR), Near-infrared vibrational spectroscopy (NIR), Principal Component Analysis (PCA)

Słowa kluczowe: dwuwarstwa lipidowa, liposom, główne przejście fazowe, spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni (MIR), spektroskopia oscylacyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR), Analiza Składników Głównych (PCA)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AFM** – mikroskopia sił atomowych (z ang. Atomic Force Microscopy)
- ATR-IR** – spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni (z ang. Attenuated Total Reflection – Infrared Spectroscopy)
- BPF** – dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek (z ang. bilayered phospholipid flake)
- Chol** – cholesterol
- DPPC** – dipalmitoilofosfatydylocholina
- DPPG** – dipalmitoilofosfatydyloglicerol
- DSC** – różnicowa kalorymetria skaningowa (z ang. Differential Scanning Calorimetry)
- EPR** – spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (z ang. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy)
- FIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie dalekiej podczerwieni (z ang. Far Infrared Spectroscopy)
- FT-ATR-MIR** – spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy)
- FTIR-ATR** – spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (z ang. Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflection Spectroscopy)
- GUV** – (z ang. giant unilamellar vesicles) olbrzymie, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$
- H_I** – dwuwymiarowa cylindryczna faza heksagonalna
- H_{II}** – dwuwymiarowa odwrócona faza heksagonalna
- IR** – spektroskopia w zakresie podczerwieni (z ang. Infrared Spectroscopy)
- L_α** – faza lamelarna ciekła (z ang. lamellar liquid-crystalline phase)
- L_β** – faza żelowa uporządkowana (z ang. lamellar gel phase)
- L_c** – faza lamelarna krystaliczna (z ang. lamellar crystalline phase)
- LUV** – (z ang. large unilamellar vesicles) duże, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-400 nm
- MIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni (z ang. Mid Infrared Spectroscopy)
- NIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (z ang. Near Infrared Spectroscopy)
- MLV** – (z ang. multilamellar vesicles) wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 500 \text{ nm}$,
- MVV** – (z ang. multivesicular vesicles) wielopęcherzykowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$
- NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
- OLV** – (z ang. oligolamellar vesicles) kilkuwarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-500 nm
- P_β** – faza żelowa pomarszczona (z ang. lamellar rippled gel phase)
- PCA** – analiza głównych składowych (z ang. Principal Component Analysis)
- S_u** – krytyczny współczynnik upakowania
- SUV** – (z ang. small unilamellar vesicles) małe, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 20-100 nm
- SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. Scanning Electron Microscopy)
- T_m** – temperatura głównego przejścia fazowego
- T_p** – temperatura przedprzejścia
- T_s** – temperatura subprzejścia

WPROWADZENIE

Selektywna przepuszczalność umożliwiająca transport substancji z udziałem różnego rodzaju białek oraz zapewnienie odrębności i integralności obszarów, w których zachodzą wzajemnie wykluczające się reakcje chemiczne, stanowią niezwykle istotne funkcje wszystkich błon biologicznych [1-4]. Badanie na poziomie molekularnym za pomocą technik pomiarowych i analiza uzyskanych rezultatów niezwykle skomplikowanych strukturalnie układów, jakimi są naturalnie występujące błony, nastęrcza naukowcom wielu problemów. Jako rozwiązanie wspomnianego problemu badawczego w badaniach biochemicznych powszechnie stosuje się modelowe układy dwuwarstwowe zwane liposomami [1,5,6].

Dwuwarstwy lipidowe zagregowane w liposomy, będące modelem naturalnie występujących błon, są powszechnie badanymi i analizowanymi układami na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci [7-12]. Spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni – FT-ATR-MIR (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy) jest jedną z technik eksperymentalnych stosowanych powszechnie do badania zarówno modelowych jak i występujących naturalnie systemów biologicznych [13-22]. Dane strukturalne, informacje o stopniu i sposobie interakcji międzycząsteczkowych a także modyfikacjach strukturalnych będących wynikiem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, pH, czy stopnia uwodnienia, możliwe są do uzyskania z analizy widm mierzonych metodą FT-ATR-MIR [19,20]. Jednym z ograniczeń przy badaniu układów biologicznych za pomocą wspomnianej metody jest konieczność przeprowadzania pomiarów w obecności wody. Problematyczna jest w konsekwencji właściwa interpretacja otrzymanych wyników, ponieważ w zakresach istotnych z punktu widzenia analizy pojawiają się intensywne sygnały pochodzące od drgań grup OH cząsteczek wody.

1. BŁONY BIOLOGICZNE

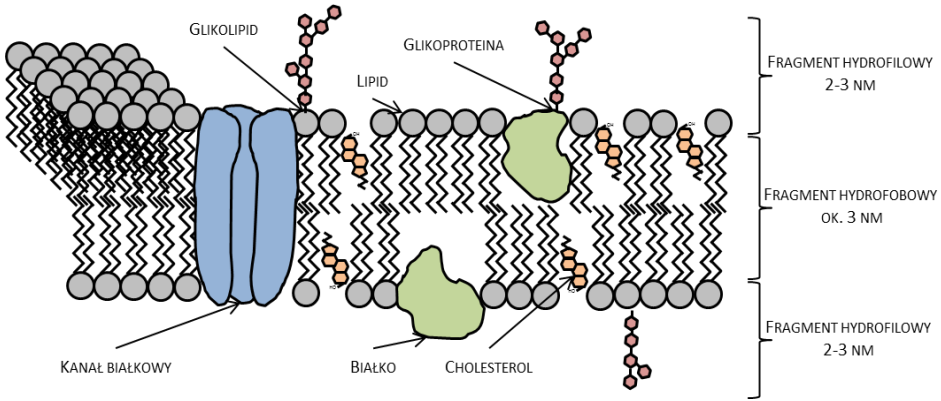
Błony biologiczne zapewniają autonomię i ograniczają powierzchnię zarówno całej komórki jak i zanurzonych w cytosolu komponentów, takich jak jądro komórkowe, lizosomy, mitochondria, aparaty Golgiego, chloroplasty, rybosomy etc. gwarantując funkcjonalizację poszczególnych organelli o odmiennych składach chemicznych (różna wartość pH, swoisty skład jonów). Z drugiej strony stanowią półprzepuszczalną barierę umożliwiając łączność i wymianę substancji między macierzą zewnątrzkomórkową a wnętrzem komórki. [1-4].

1.1. BUDOWA I FUNKCJE BŁON BIOLOGICZNYCH

Mimo różnorodności strukturalnej naturalnych membran, wyróżnić można kilka komponentów charakterystycznych dla wszystkich błon biologicznych [1,2]. Podstawę ich składu stanowią lipidy zagregowane w formie dwuwarstw z całkowicie (integralnie) lub częściowo (powierzchniowo lub peryferycznie) zanurzonymi w niej białkami. W skład błon biologicznych wchodzi również glikoproteiny i glikolipidy, czyli sacharydy kowalencyjnie przyłączone odpowiednio do białek lub lipidów [3,5].

Grubość naturalnych dwuwarstw wynosi zazwyczaj od 6 do 10 nm [1], z czego ok. 3 nm przypadają na wewnętrzną hydrofobową część lipidów, zaś zewnętrzną hydrofilo-

wym fragmentom lipidów a także powierzchniowym oraz peryferycznym białkom błonowym przypisuje się grubość w granicach 2-3 nm dla każdej z warstw [3]. Schemat przedstawiający strukturę błony biologicznej z zaznaczonymi jej elementami i wyszczególnionymi fragmentami pokazany został na **Rysunku 1**.



Rysunek 1. Schemat budowy błony biologicznej z zaznaczonymi grubościami poszczególnych fragmentów dwuwarstwy

Figure 1. Scheme of the structure of biological membrane with marked thickness of particular parts of the bilayer

Z budową błon biologicznych związane są ściśle ich funkcje. Do podstawowych zaliczyć można:

- ✓ ograniczanie obszaru komórki oraz organeli wewnątrzkomórkowych od środowiska zewnętrznego,
- ✓ odbieranie i przekazywanie bodźców zewnętrznych a także w obrębie komórki,
- ✓ pośredniczenie w wymianie i przetwarzaniu informacji oraz transporcie jonów i cząsteczek,
- ✓ tworzenie przedziałów międzykomórkowych zapewniających integralność różnych obszarów, egzo- i endocytoza [1-4].

Amfifilowość jest niezwykle istotną cechą strukturalną cząsteczek lipidów błonowych [1,3,23], która determinuje szereg ich właściwości fizykochemicznych, takich jak słaba rozpuszczalność w wodzie a dobra w rozpuszczalnikach niepolarnych (chloroform, metanol, eter) [24,25]. Strukturę amfifilowej molekuly lipidu stanowi część hydrofilowa (tzw. polarna „głowa”) oraz fragment hydrofobowy (tzw. apolarny „ogon”) zawierający łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych.

Bazując na budowie chemicznej, lipidy błonowe podzielić można na cztery główne klasy:

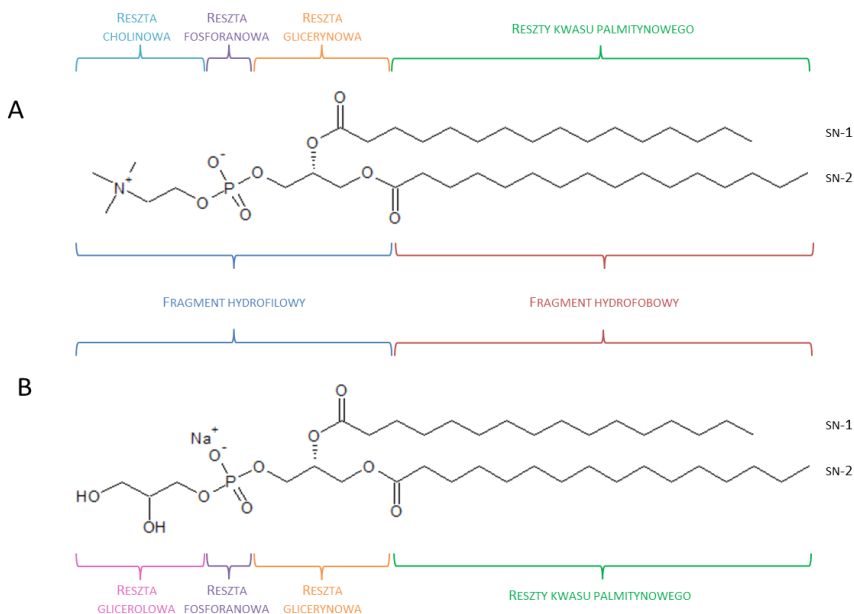
- ✓ diacylofosfoglicerydy (fosfolipidy)
- ✓ diacyloglikoglicerydy (glikolipidy)
- ✓ sfingolipidy
- ✓ sterole i ich pochodne [3,26,27].

W niniejszej pracy wykorzystano lipidy z grup fosfolipidów i steroli.

Fosfolipidy - strukturę cząsteczki fosfolipidu tworzy glicerol połączony trzema wiązaniami estrowymi, z których dwa (sn-1 i sn-2 znajdujące się odpowiednio przy pierwszym i drugim atomie węgla glicerolu) tworzone są z łańcuchami acylowymi kwa-

sów tłuszczowych, zaś trzecie (sn-3 umiejscowione przy trzecim atomie węgla glicerolu) z ufosforylowaną pochodną alkoholową [1,3,26-28].

Podstawę niniejszej pracy stanowiły badania modelowych błon lipidowych zbudowanych z cząsteczek dipalmitoilofosfatydylochliny (DPPC) lub dipalmitoilofosfatydyloglicerolu (DPPG). Oba z wybranych do analizy fosfolipidów tworzą w środowisku wodnym struktury dwuwarstwowe i są powszechnie stosowane jako modele błon biologicznych, stanowiąc dobre odniesienie do właściwości naturalnych membran [29]. Molekuły pierwszego z wymienionych fosfolipidów przyjmują w roztworach wodnych postać zwitterjonów [30-32], zaś drugiego – naładowanych ujemnie indywidualów, których ładunek zlokalizowany jest w obszarze grupy fosforanowej [32,33]. Fragmenty hydrofobowe obu analizowanych fosfolipidów tworzą dwie reszty kwasu palmitynowego połączone wiązaniami estrowymi z glicerolowym rdzeniem. Część hydrofilową cząsteczek DPPC stanowią grupy cholinowa oraz fosforanowa przyłączone do rdzenia glicerolu wiązaniem estrowym, zaś grupy glicerolowa i fosforanowa połączone z rdzeniem glicerolowym za pomocą wiązania estrowego charakterystyczne są dla molekuł DPPG. Schemat budowy badanych fosfolipidów z zaznaczonymi charakterystycznymi grupami przedstawiony został na **Rysunku 2**.

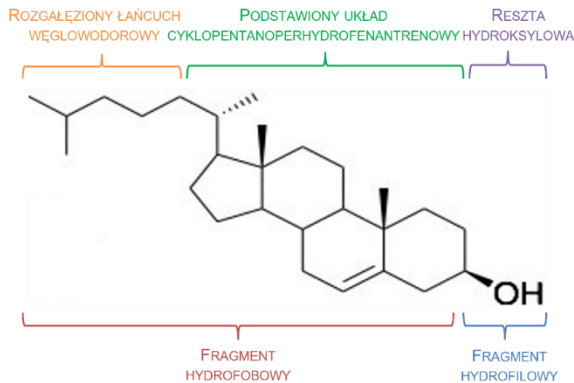


Rysunek 2. Schemat budowy cząsteczek badanych fosfolipidów: A - DPPC (dipalmitoilofosfatydylochliny); B - DPPG (dipalmitoilofosfatydyloglicerolu)

Figure 2. Scheme of the structure of the molecules of the studied phospholipids : A – DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine); B - DPPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol)

Sterole – odmienność budowy cząsteczek steroli w porównaniu do innych klas lipidów błonowych ma swoje odzwierciedlenie w niższym stopniu polarności steroli względem pozostałych. W cząsteczce sterolu fragment hydrofilowy występuje w postaci pojedynczej grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie C-3 pierwszego pierścienia będącego częścią układu cyklopentanoperhydrofenantrenowego. Ugrupowanie to, pod-

stawione często dodatkowo przy atomie C-17 prostym lub rozgałęzionym łańcuchem alifatycznym, stanowi część hydrofobową molekuł steroli [34-37]. Najpowszechniej występującym w komórkach eukariotycznych zwierzęcych sterolem jest cholesterol (Chol), którego domieszki stosowano w niniejszej pracy. Schemat budowy cząsteczki cholesterolu przedstawia **Rysunek 3**.



Rysunek 3. Schemat budowy cząsteczki cholesterolu
Figure 3. Scheme of the structure of cholesterol

Molekuły Chol dzięki lokowaniu pierścieni steroidowych równoległe do łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowym obszarze błon lipidowych oraz oddziaływaniom grup – OH z resztami estrowymi cząsteczek lipidów błonowych przyjmują odpowiednią orientację w dwuwarstwie fosfolipidowej [31,34-36,38-43]. Amfifilowy charakter molekuł Chol umożliwia im selektywne wbudowywanie się w strukturę dwuwarstw, a co za tym idzie modyfikację fizykochemicznych właściwości membran, takich jak płynność czy przepuszczalność [30,31,36-50]. Wpływ cholesterolu na regulację płynności modelowych błon biologicznych został poddany analizie w niniejszej pracy.

1.2. WŁAŚCIWOŚCI BŁON BIOLOGICZNYCH

Niespełna 100 lat temu Gorter i Grendel [51] przeprowadzając badania czerwonych krwinek udowodnili dwuwarstwową organizację lipidów w naturalnych błonach. Układ taki wynika przede wszystkim z amfifilowej struktury lipidów błonowych. Na bilamelarną formę błon wpływ mają również takie cechy jak kształt czy różnorodność grup funkcyjnych budujących cząsteczki lipidów [52].

Na rozwinięcie i uściślenie teorii opisującej strukturotwórcze procesy zachodzące w błonach biologicznych przyszło poczekać od odkrycia Gortera i Grendela kolejne 50 lat, kiedy to Singer i Nicolson [53] zaproponowali, uznawany do dziś za najbliższy stanowi faktycznemu, *mobilis in mobili*, czyli model płynnej mozaiki. Jako pierwszy uwzględnił on możliwość występowania szeregu słabych, niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy białkowymi i lipidowymi komponentami tworzącymi naturalne membrany, takich jak: oddziaływania wodorowe, elektrostatyczne, dipolowe czy Van der Waalsa, zapewniających integralność składników błon. Ich istnienie generuje ponadto możliwość pełnienia przez białka określonych funkcji [1]. Zachodzące pomiędzy polarnymi fragmentami lipidów oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe oraz przyciągające siły Van der Waalsa występujące między łańcuchami węglowodorowymi

hydrofobowych części lipidów są interakcjami pozwalającymi na zachowanie dwuwarstwowej struktury błon [1,5,52,54].

Model płynnej mozaiki przedstawia błony jako płynne struktury zorientowanych przestrzennie molekuł lipidów, uformowanych w dwuwarstwy, z asymetrycznie rozmieszczonymi wewnątrz integralnymi i powierzchniowymi białkami błonowymi [1,5]. Model ten zakłada również występowanie w naturalnych membranach szeregu specyficznych właściwości, takich jak dynamika, płynność, selektywność czy asymetria, które determinowane są przez skład lipidowy błon [52].

Dynamika błon biologicznych związana jest ze znacznym stopniem mobilności budujących membranę komponentów. Zanurzone w dwuwarstwie lipidowej, jak w swoistym „rozpuszczalniku”, białka błonowe posiadają zdolność do wykonywania ruchów bocznych oraz do rotacji. Spowodowane jest to zrywaniem i tworzeniem się nowych słabych wiązań i oddziaływań z cząsteczkami lipidów stanowiących strukturę membran [1,26]. Z uwagi na wielkość białek i hydrofobowy charakter wewnętrznej części błon niemożliwe jest z kolei przemieszczanie się białek z jednej strony dwuwarstwy na drugą [1].

W obrębie każdej z monowarstw tworzących naturalne membrany zauważalny jest również duży stopień swobody ruchów molekuł lipidów – wyróżniamy dwa rodzaje ich ruchu:

- ✓ boczne przemieszczanie w obrębie monowarstwy, czyli tak zwana dyfuzja lateralna – odbywa się w kierunku równoległym do płaszczyzny dwuwarstwy,
- ✓ rotacja pojedynczej molekuly lipidu – obrót cząsteczek lipidów wokół własnej osi [3,52].

Teoretycznie możliwe są również tzw. ruchy flip-flop, czyli przemieszczanie się cząsteczek lipidów z jednej monowarstwy do drugiej, jednak translokacja taka z uwagi na bardzo długi czas jej zachodzenia, związany z koniecznością niekorzystnego energetycznie oddziaływania polarnej części lipidu z apolarną częścią dwuwarstwy, nie jest procesem, który zaobserwować można w czasie rzeczywistym [1,3,5,52].

Tworzenie różnorodnych pod względem składu lipidowego struktur a także mobilność amfifilowych molekuł determinują następną z właściwości naturalnych membran, jaką jest płynność [1]. Cecha ta wynika bezpośrednio ze składu lipidowego, którego modyfikacje, np.: ilości czy rodzaju tworzących dwuwarstwę lipidów, generują zmiany stopnia płynności błon. Im krótszy łańcuch węglowodorowy, tym mniejsza powierzchnia oddziaływań Van der Waalsa, czego konsekwencją jest spadek stopnia uporządkowania i wzrost płynności dwuwarstwy [1-3,55]. Również brak wiązań nienasyconych w obrębie ogonów acylowych skutkuje występowaniem stabilnej, gęsto upakowanej struktury dwuwarstwy, wynikającej z dużej ilości oddziaływań Van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi w konformacji *trans*. Z kolei występowanie nienasyconych wiązań w hydrofobowym fragmencie dwuwarstwy powoduje przejście łańcuchów w konformację *gauche*, czego efektem jest spadek ścisłego upakowania dwuwarstwy oraz wzrost stopnia jej płynności [1]. Obecność Chol w naturalnych błonach jest kluczowa w procesie regulacji stopnia ich płynności. Prostopadle względem płaszczyzny dwuwarstwy wbudowywanie się molekuł Chol w membranę w znacznym stopniu rozluźnia jej upakowaną strukturę, ale również częściowo hamuje ruchy lipidów, wywołując ambiwalentny efekt na płynność błon [3,31,34-50]. Płynność dwuwarstw może być również regulowana poprzez modyfikacje struktury hydrofilowych fragmentów lipidów błonowych. Siła wiązań wodorowych pojawiających się w obrębie główek fosfolipidowych zależy od rodzaju pochodnej alko-

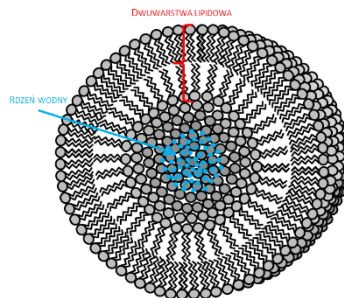
holowej estryfikującej resztę fosforanową – wzrost płynności dwuwarstwy powodowany jest przez zwiększenie ilości fosfatydylocholin w strukturze dwuwarstwy, zaś dodatek do błon fosfatydyloetanolamin w znacznym stopniu je stabilizuje [31].

Selektywność membran biologicznych jest ściśle związana z przepuszczalnością przez obszar dwuwarstw określonego rodzaju substancji i zależna od ich wielkości oraz stopnia polarności. Niewielki rozmiar oraz brak ładunku takich cząsteczek, jak O_2 , CO_2 , N_2 czy proste węglowodory, pozwala na swobodne przenikanie ich przez dwuwarstwę. Stosunkowo łatwo pokonywać błonę lipidową mogą również małe cząsteczki polarne, takie jak woda czy mocznik. Apolarny rejon dwuwarstw jest jednak fragmentem ograniczającym możliwość dyfuzji większych cząsteczek polarnych, np.: glukozy czy aminokwasów a także uniemożliwiającym przenikanie do i z wnętrza komórki jonów, takich jak: H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$. Przemieszczanie tych indywidualiów poprzez membrany możliwe jest wyłącznie poprzez odpowiednie pompy i kanały jonowe, których podstawą strukturalną są białka [3,55,56].

Asymetryczność błony związana jest z nieprzypadkowym rozmieszczeniem lipidów i białek w dwuwarstwie [1,3,24]. Silniejsze wiązanie białek przez zewnętrzną powierzchnię błon biologicznych skutkuje występowaniem większej ich ilości po stronie macierzy zewnątrzkomórkowej [1]. Również cholesterol, fosfolipidy, takie jak fosfatydylocholiny i sfingomielin występują w większej ilości, a wykazujące całkowitą asymetrię glikolipidy znajdują się jedynie po zewnętrznej stronie błony. Z kolei wewnętrzna monowarstwa naturalnych membran bogata jest w fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny [1-3,55].

2. LIPOSOMY JAKO MODELE BŁON BIOLOGICZNYCH

Opisane wcześniej właściwości amfifilowe cząsteczek lipidów determinują amfipatyczność powstającego układu lamelnego, którego zewnętrzne fragmenty hydrofilowe wchodzi w liczne interakcje z otaczającymi je cząsteczkami wody poprzez oddziaływania elektrostatyczne i tworzenie wiązań wodorowych. Hydrofobowe wnętrze dwuwarstwy lipidowej jest izolowane od polarnego środowiska [1,5,6]. W celu zniwelowania niekorzystnych energetycznie oddziaływań łańcuchów węglowodorowych znajdujących się na krawędziach membran z molekułami wody, poprzez zakrzywienie dwuwarstwy formują się struktury kuliste, zwane liposomami. Liposomy są to zamknięte, sferyczne pęcherzyki posiadające wewnętrzny rdzeń wodny otoczony przez jedną lub kilka dwuwarstw lipidowych rozmieszczonych wokół niego koncentrycznie i oddzielonych od siebie przestrzeniami wodnymi [6,57-64]. Schemat budowy liposomu jednowarstwowego z elementami jego struktury przedstawiono na **Rysunku 4**.



Rysunek 4. Schemat budowy jednowarstwowego pęcherzyka liposomowego
Figure 4. Scheme of the structure of a unilamellar liposomal vesicle

Predyspozycja dwuwarstw do organizowania się w struktury kuliste została po raz pierwszy zauważona przez Banghama [65] w latach 60. ubiegłego wieku. Prekursorowi technologii liposomowej udało się otrzymać pęcherzyki wielowarstwowe [68,77], zaś kilka lat później, dzięki długotrwałemu procesowi sonifikacji lipidów w środowisku wodnym, Papahadjopoloulos [66,67] uzyskał dyspersję liposomów jednowarstwowych. Strukturalny i funkcjonalny paralelizm liposomów do błon biologicznych warunkuje ich aplikacyjność jako modeli naturalnych membran – biokompatybilnych i biodegradowalnych nośników leków, białek błonowych, sond, antygenów i innych makromolekuł [58-61,68,69].

Rozpatrując morfologię tworzących się w roztworach wodnych pęcherzyków liposomowych wyróżnić można ich kilka podstawowych rodzajów:

- ✓ SUV – (z ang. small unilamellar vesicles) małe, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 20-100 nm,
- ✓ LUV – (z ang. large unilamellar vesicles) duże, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-400 nm,
- ✓ GUV – (z ang. giant unilamellar vesicles) olbrzymie, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$,
- ✓ OLV – (z ang. oligolamellar vesicles) kilkuwarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-500 nm,
- ✓ MLV – (z ang. multilamellar vesicles) wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 500 \text{ nm}$,
- ✓ MVV – (z ang. multivesicular vesicles) wielopęcherzykowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$ [2,5,6,58,70].

Próby opisanie mechanizmu formowania się struktur liposomowych zostały podjęte wielokrotnie. Już w latach 80. XX wieku Lasic [71] postulował, iż bez względu na zastosowaną technikę preparacji liposomów, produktem pośrednim będzie BPF czyli dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek (z ang. bilayered phospholipid flake). Ze względu na wysoce niekorzystne energetycznie napięcie na krawędziach dwuwarstwy, BPF w wyniku działania energii krawędzi i energii zaginania płaskiej dwuwarstwy zostaje uformowany w liposom. Nie jest on jednak układem termodynamicznie stabilnym ze względu na swoją krzywiznę. Do powstania liposomów konieczne jest więc dostarczenie energii z zewnątrz, na sposób np.: temperatury, wytrząsania, sonifikacji czy ekstruzji [6,71].

Do powszechnie stosowanych metod preparacji liposomów należą:

- ✓ uwadnianie cienkiego filmu lipidowego,
- ✓ działanie falami ultradźwiękowymi – sonifikacja,
- ✓ kalibracja przy pomocy membran o zdefiniowanej średnicy porów – ekstruzja,
- ✓ odparowanie techniką odwróconych faz,
- ✓ stosowanie prasy Frencha,
- ✓ wstrzykiwanie roztworu eterowego lub etanolowego,
- ✓ dializa detergentowa [6,72-78].

W zależności od potrzeb, możliwe jest uzyskanie różnego rodzaju liposomów dobierając odpowiednią technikę lub łącząc kilka metod ich preparacji [71,72]. W niniejszej pracy połączono uwadnianie cienkiego filmu lipidowego, sonifikację oraz ekstruzję. Możliwymi do kontrolowania na etapie preparacji cechami liposomów są ich skład, struktura oraz wielkość [58-61]. Stosowanie pęcherzyków lipidowych utworzonych z lipidów syntetycznych jako modeli naturalnych membran pozwala na ich wykorzystanie między innymi w medycynie, biologii czy kosmetologii, umożliwiając:

- ✓ kształtowanie i odtwarzanie procesów zachodzących w naturalnych membranach,
- ✓ badanie właściwości białek błonowych oraz ich interakcji z otaczającym je środowiskiem lipidowym,
- ✓ kontrolowane modyfikacje składu dwuwarstw generujące zmiany właściwości modelowych błon,
- ✓ transport do wnętrza komórek trudno rozpuszczalnych i łatwo utleniających się w wodzie ingrediencji,
- ✓ przenoszenie substancji polarnych (wnętrze liposomów) oraz apolarnych (obszar dwuwarstw),
- ✓ implementowanie substancji bioaktywnych (przeciwciał, genów, antygenów, leków) do miejsc docelowych – tzw. terapię celowaną,
- ✓ intensyfikację odpowiedzi immunologicznej [6,55].

3. PRZEJŚCIA FAZOWE MODELOWYCH DWUWARSTW LIPIDOWYCH

Zmiany właściwości fizykochemicznych błon biologicznych generowane są przez czynniki zewnętrzne, tj.: modyfikacje temperatury, pH, ciśnienia, dodatek Chol czy stopień uwodnienia. Reorganizacje strukturalne membran zachodzące skokowo określane są mianem przejść fazowych dwuwarstw lipidowych [2,79].

Amfifilowe właściwości cząsteczek lipidów są podstawą występowania w tworzonych przez nie układach mezomorfizmu liotropowego, czyli procesu powstawania w obecności rozpuszczalnika (w strukturach biologicznych najczęściej wody) ciekłych kryształów o zróżnicowanej morfologii [3,5]. Amfipatyczność molekuł lipidów przejawia się w skłonności do tworzenia w roztworach wodnych różnorodnych liotropowych agregatów, w których polarne fragmenty cząsteczek lipidów wyeksponowane są „na zewnątrz” i zdolne do tworzenia oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych z otaczającymi je cząsteczkami wody, zaś części hydrofobowe ukryte są „w środku” układu, co pozwala im na ograniczenie niekorzystnych energetycznie oddziaływań z grupami hydrofilowymi korpuskuł wody. Różnice strukturalne wchodzących w skład błony cząsteczek lipidów mają swoje odzwierciedlenie w zachodzących w dwuwarstwach zmianach fizykochemicznych.

Polimorfizm termotropowy, czyli determinowana zmianą temperatury zdolność agregatów lipidowych do modyfikacji strukturalnych ma swoje podłoże w reorganizacji upakowania, a co za tym idzie, stopnia swobody ruchów molekuł lipidów [2,80]. Naturalnie występujące błony, zbudowane w przeważającej ilości z fosfolipidów mają tendencję do tworzenia struktur dwuwarstwowych [5], a między innymi od długości i stopnia nasycenia łańcuchów alifatycznych, jak również od wielkości i rodzaju fragmentów hydrofilowych cząsteczek lipidów zależą temperatury, w których następuje skokowa zmiana parametrów fizykochemicznych dwuwarstwy związana ze zmianą jej morfologii i nazywana temperaturą przejścia fazowego [3,5,80,81].

Czynnikiem generującym zachodzenie przejścia fazowego w obrębie dwuwarstwy lipidowej są modyfikacje strukturalne pojedynczych molekuł wchodzących w skład błon. Wspomniane modyfikacje dotyczyć mogą temperaturowo-zależnych zmian konformacyjnych (przejścia z formy *trans* do *gauche*) znajdujących się w hydrofobowym obszarze dwuwarstw łańcuchów acylowych lub mogą być wywołane zmianą stopnia uwodnienia hydrofilowych fragmentów membran [2,79-81].

Do opisu faz występujących w dwuwarstwach lipidowych, których istnienie zależne jest od temperatury, powszechnie używana jest nomenklatura Luzzati’ego [83]. Skokowe

zmiany parametrów fizykochemicznych zbudowanych z cząsteczek DPPC dwuwarstw generowane wzrostem temperatury badanego układu widoczne są na wykresach otrzymanych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (z ang. Differential Scanning Calorimetry - DSC) jako trzy odrębne procesy utożsamiane z trzema przemianami fazowymi pierwszego rzędu, do których zajścia potrzebne jest dostarczenie energii z zewnątrz: subprzejściem, przedprzejściem i głównym przejściem fazowym [2,80,84,85].

Występowanie dwuwarstw lipidowych w czterech odmiennych morfologicznie fazach:

- ✓ L_c – lamelarnej krystalicznej (z ang. lamellar crystalline phase),
- ✓ L_β – lamelarnej żelowej uporządkowanej (z ang. lamellar gel phase),
- ✓ P_β – lamelarnej żelowej pomarszczonej (z ang. lamellar rippled gel phase),
- ✓ L_α – lamelarnej ciekłej (z ang. lamellar liquid-crystalline phase),

ściśle skorelowane jest z temperaturą układu [86].

W najniższych temperaturach dwuwarstwa lipidowa przyjmuje fazę lamelarną krystaliczną, zwaną również subżelową. Równolegle uporządkowane, ściśle upakowane, sztywne, ułożone pod niewielkim kątem względem normalnej dwuwarstwy łańcuchy węglowodorowe, w których strukturze wiązania węgiel-węgiel występują w konformacji *all-trans*, stabilizowane są licznymi oddziaływaniami Van der Waalsa [2,5,46,84,87,88]. Ścisłe upakowanie hydrofilowych części membrany hamuje wnikanie molekuł wody w głąb dwuwarstwy [84]. Ograniczona częstotliwość rotacji wzdłuż wiązań C-C a także znikoma ruchliwość łańcuchów alifatycznych wynikające ze sztywnej, trójskośnej symetrii upakowania wzrastają wraz z dostarczeniem do układu energii termicznej [84,87].

Wartość temperatury, w której następuje pierwsze przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej z fazy lamelarnej krystalicznej do fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej, czyli tak zwane subprzejście (z ang. subtransition), zależna jest od rodzaju lipidu budującego membranę [3,5,80]. Nazywana jest ona temperaturą subprzejścia – T_s [5,84,88]. Proces ten cechuje się wzrostem poziomu hydratacji polarnego obszaru dwuwarstwy na skutek wnikania molekuł wody otaczających dwuwarstwę (z ang. bulk water) do wewnętrznych jej obszarów, gdzie znajdują się „związane” cząsteczki wody (z ang. bound water) [89,90]. Jest to możliwe w efekcie modyfikacji symetrii bocznego upakowania molekuł lipidów oraz zmniejszenia stopnia uporządkowania lipidów w błonie [84,87,89-94]. Domieszkowanie membran pewnymi dodatkami skutkować może zahamowaniem subprzejścia. Do czynników takich należą Chol, którego ingrediencja na poziomie 20 mol% powoduje zanik tego przejścia fazowego [46,95].

Skutkiem subprzejścia są modyfikacje strukturalne prowadzące do pojawienia się fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej, którą cechuje niewielki wzrost kąta nachylenia łańcuchów węglowodorowych do powierzchni dwuwarstwy oraz zwiększenie jej grubości przy zachowaniu relatywnie wysokiego stopnia upakowania molekuł lipidów w dwuwarstwie [5,87]. Wzmocniony zostaje ruch rotacyjny łańcuchów acylowych, zaś wiązania C-C pozostają względem siebie w konformacji *trans* [5]. Dalszy wzrost temperatury prowadzi do zmian w symetrii upakowania cząsteczek lipidów z trójskośnego na ortorombowe [84,91,92].

Temperaturą przedprzejścia (T_p) określana jest temperatura, w której zachodzi przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej z fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej do fazy lamelarnej żelowej pomarszczonej, noszące nazwę przedprzejścia fazowego (z ang. pretransition). Jest ono spowodowane zwiększeniem intensywności rotacji wzdłuż długiej osi łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów [79,84,87,88,96]. Poziom

hydratacji polarnej części błony oraz parametry strukturalne dwuwarstwy ulegają zmianie [97,98]. Występowanie również tego przejścia fazowego zależne jest od dodatku do membran cząsteczek Chol. Już 20 mol% tego sterolu hamuje zachodzenie przedprzejścia [95].

Wynikiem przedprzejścia fazowego są dalsze zmiany w organizacji przestrzennej bilamelarnie zagregowanych cząsteczek lipidów prowadzące do pojawienia się fazy lamelarnej żelowej pomarszczonej [79,84]. Następuje dalszy wzrost nachylenia łańcuchów acylowych względem normalnej dwuwarstwy oraz zwiększenie jej grubości skutkujące modyfikacją płaskiej dotąd powierzchni w pofałdowaną [5,90,97,98]. Wzrasta poziom hydratacji oraz swobody ruchów rotacyjnych hydrofobowych łańcuchów, których większość pozostaje w konformacji *trans*. W hydrofobowym rejonie dwuwarstwy powstają domeny bogate w molekuły zawierające w strukturze konformery *gauche* [97,98]. Wzrost nieuporządkowania dwuwarstwy skutkuje także modyfikacją symetrii upakowania molekuł lipidów z ortorombowego na heksagonalne [87,88,90,97,98].

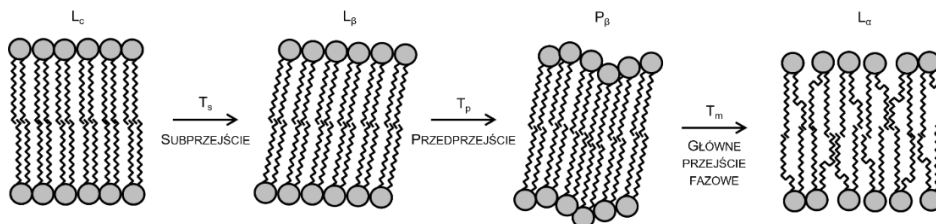
Ponowny wzrost temperatury aż do wartości zwanej temperaturą głównego przejścia fazowego (T_m) prowadzi do przemiany dwuwarstwowych agregatów lipidowych z fazy lamelarnej żelowej pomarszczonej do fazy lamelarnej ciekłej, w nomenklaturze określane jako główne przejście fazowe (z ang. main phase transition) [46,79,80,84]. Zachodzące podczas tej przemiany tak zwane topnienie łańcuchów węglowodorowych lipidów związane jest ze zmianą konformacji wiązań C-C z *trans* na *gauche* na skutek energii termicznej dostarczonej do układu [2,3,5,82]. Łańcuchy alifatyczne bogate w konformery *gauche* charakteryzują się wzrostem częstości rotacji wzdłuż wiązania węgiel-węgiel. Skutkuje to znacznym rozluźnieniem ciasno upakowanej dotąd struktury błony, dzięki spowodowanemu powstawaniem zagięć łańcuchów ograniczeniu powierzchni interakcji hydrofobowych, np.: oddziaływań Van der Waalsa [2,3,5,84,99]. Chol w stężeniu 20 mol% znacznie ogranicza kooperatywność (równoczesne modyfikacje całego układu) głównego przejścia fazowego a dodatek 40-50 mol% tego sterolu do membrany skutkuje zupełnym zanikiem tej przemiany [95]. Wartość temperatury głównego przejścia fazowego zależy od wielu czynników, do których należą rodzaj i stężenie lipidu, ładunek oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych grup polarnych a także długość i stopień nasycenia łańcuchów węglowodorowych [2,5].

Efektom głównego przejścia fazowego jest pojawienie się fazy lamelarnej ciekłej, którą wyróżniają:

- ✓ znaczny w porównaniu do niskotemperaturowych faz poziom nieuporządkowania, powodujący rozluźnienie upakowania membrany, wzrost stopnia jej uwodnienia oraz poziomu przepuszczalności,
- ✓ zwiększenie stopnia swobody ruchów rotacyjnych cząsteczek lipidów,
- ✓ wysoki współczynnik dyfuzji lateralnej przejawiający się we wzroście płynności błony,
- ✓ zaburzenie symetrii heksagonalnego upakowania lateralnego [2,5,84,88].

Liczba zagięć łańcuchów alifatycznych powodowanych występowaniem w strukturze lipidów konformerów *gauche* wynosi około 4-5 na jeden łańcuch węglowodorowy i skutkuje zmniejszeniem ich długości oraz wzrostem zajmowanej powierzchni [5,84,99]. Molekuły Chol wykazują ambiwalentny wpływ na płynność błon w zależności od fazy, w której dwuwarstwa występuje. W temperaturach poniżej głównego przejścia fazowego sterol ten upłynnia znajdującą się w fazie żelowej błonę przez zmniejszenie liczby oddziaływań Van der Waalsa między hydrofobowymi częściami molekuł lipidów. W temperaturach powyżej głównego przejścia fazowego

Chol usztywnia i uporządkowuje ciekłokrystaliczną strukturę membrany poprzez ograniczenie mobilności łańcuchów alifatycznych [2,5,46,95]. Schemat determinowanych wzrostem temperatury przejść fazowych dwuwarstwy lipidowej z zaznaczonymi rodzajami poszczególnych faz oraz łączącymi je etapami przemian fazowych przedstawiony został na **Rysunku 5**.



Rysunek 5. Schemat determinowanych wzrostem temperatury przejść fazowych dwuwarstwy lipidowej
Figure 5. Scheme of temperature-dependent phase transitions of a lipid bilayer

4. METODY BADAWCZE UKŁADÓW BILAMELARNYCH

Do konwencjonalnych technik eksperymentalnych stosowanych w badaniu systemów bilamelarnych należą m.in.: spektroskopia w zakresie podczerwieni (z ang. Infrared Spectroscopy – IR) [45,47,49,82,87-89,93,100], różnicowa kalorymetria skaningowa (z ang. Differential Scanning Calorimetry – DSC) [80,96,100-102], spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR) [38,40,45,100], spektroskopia fluorescencyjna [96,100], spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (z ang. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy – EPR) [96,100,102-104], spektroskopia Ramana [101], skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. Scanning Electron Microscopy – SEM) [66,105], mikroskopia sił atomowych (z ang. Atomic Force Microscopy – AFM) [106], spektroskopia rozpraszania promieni X (z ang. X-ray Scattering Spectroscopy – X-ray) [42,91,94,107]. Oprócz technik eksperymentalnych do śledzenia fluktuacji biomembran coraz szerzej stosowane są również badania dynamiki molekularnej [35,36,50,98,99].

Każda z wymienionych metod badawczych umożliwia śledzenie odmiennych zjawisk zachodzących w obszarze dwuwarstw lipidowych będących wynikiem modyfikacji parametrów fizykochemicznych (temperatura, pH, stopień uwodnienia) mierzonych układów, czy domieszkowania błon różnymi dodatkami. Każda posiada również szereg cech predysponujących ale również i utrudniających jej zastosowanie w analizie układów błonowych. Wybrane możliwości i ograniczenia metod badawczych służących do pomiarów modelowych błon lipidowych zebrane zostały w **Tablei 1** [45,98-107].

W niniejszej pracy skupiono się na sprawdzeniu, czy stosowaną powszechnie w badaniu modelowych układów błonowych spektroskopię oscylacyjną w zakresie średniej podczerwieni (MIR) można zastąpić nie wykorzystywaną do analizy tego rodzaju systemów spektroskopią w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Systemy zbudowane z molekuł dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) lub dipalmitoilofosfatydyloglicerolu (DPPG), oraz analogiczne układy z dodatkiem cholesterolu (Chol), stanowiły obiekt badań w niniejszej pracy. Do realizacji celu wykorzystano metody spektroskopowe wspomagane analizą chemometryczną:

- ✓ technikę spektroskopii oscylacyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR),
- ✓ technikę spektroskopii oscylacyjnej w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR).

Tabela 1. Możliwości i ograniczenia metod eksperymentalnych stosowanych do badania modelowych błon lipidowych[45,98-107]

Table 1. Possibilities and limitations of experimental methods used to study model lipid membranes[45,98-107]

METODA BADAWCZA	MOŻLIWOŚCI	OGRANICZENIA
DSC	WYZNACZANIE WARTOŚCI TEMPERATUR PRZEJŚĆ FAZOWYCH ORAZ OKREŚLANIE STOPNIA ICH KOOPERATYWNOŚCI	BADANIE UKŁADÓW ZAWIERAJĄCYCH LOTNE SKŁADNIKI
SPEKTROSKOPIA NMR	MONITOROWANIE MOLEKULARNEGO UPORZĄDKOWANIA ORAZ TYPÓW AGREGACJI DZIĘKI TECHNIKOM ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR	BADANIE PROSTYCH, JEDNO LUB DWUSKŁADNIKOWYCH UKŁADÓW
SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA	ŚLEDZENIE PROCESU GŁÓWNEGO PRZEJŚCIA FAZOWEGO	KONIECZNOŚĆ STOSOWANIA SOND FLUORESCENCYJNYCH
SPEKTROSKOPIA EPR	WYZNACZANIE PARAMETRÓW OPISUJĄCYCH SZEREG WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH UKŁADÓW DZIĘKI MONITOROWANIU RÓŻNYCH OBSZARÓW BŁONY	KONIECZNOŚĆ STOSOWANIA SOND SPINOWYCH
SPEKTROSKOPIA IR	RÓWNOCZESNE MONITOROWANIE WSZYSTKICH OBSZARÓW DWUWARSTWY W FUNKCJI ZMIENNEGO PARAMETRU (TEMPERATURY, pH, STOPNIA UWODNIENIA)	KONIECZNOŚĆ ELIMINOWANIA Z WIDM PASM POCHODZĄCYCH Z ABSORPCJI CZĄSTECZEK WODY
SPEKTROSKOPIA RAMANA	PRZEPROWADZANIE POMIARÓW UKŁADÓW W ŚRODOWISKU WODNYM	STOSUNKOWO NISKA CZUŁOŚĆ APARATURY POMIAROWEJ
SPEKTROSKOPIA ROZPRASZANIA X-RAY	WYZNACZANIE PARAMETRÓW OKREŚLAJĄCYCH STOPIEŃ UPAKOWANIA I UPORZĄDKOWANIA ŁAŃCUCHÓW WĘGLOWODOROWYCH	BADANIE UKŁADÓW W FORMIE NATYWNEJ – KONIECZNOŚĆ WYSTĘPOWANIA PRÓBKII W FORMIE KRYSZTAŁICZNEJ
AFM	PRACA Z NANOSKOPOWĄ ROZDZIELCZOŚCIĄ	PRÓBKA WYMAGA IMMOBILIZOWANIA POWIERZCHNI

Spektroskopia oscylacyjna w zakresach MIR i NIR zastosowana została w celu określenia zmian w stanie konformacyjnym grup CH_2 łańcuchów lipidowych stanowiących hydrofobowy obszar modelowych błon. U podstaw tej techniki leży absorbancja promieniowania przez oscylujące molekuly. Wzajemne ruchy atomów w cząsteczkach generują modyfikacje struktury geometrycznej molekuł, tj. zmiany wielkości kątów, czy długości wiązań między atomami. Selekttywne pochłanianie promieniowania z zakresu $12500\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ przez cząsteczki skutkuje wzbudzeniem drgań wiązań między atomami tworzącymi molekuly. Częstotliwość promieniowania w zakresie IR jest bowiem zbliżona do częstotliwości drgań wiązań chemicznych w cząsteczkach związków organicznych. Warunkiem koniecznym do pojawienia się pasm pochodzących od drgań wiązań w molekule jest zmiana momentu dipolowego podczas oscylacji. Obecność określonych grup funkcyjnych będących elementami składowymi molekuł, predestynuje występowanie w nich drgań, które są podstawą do pojawiania się na widmach IR tzw. pasm charakterystycznych, położenie, kształt i intensywności których pozwala na wnioskowanie o składzie i organizacji cząsteczek.

Spektrum długości fali, które podczerwień obejmuje podzielić można na trzy obszary:

- ✓ bliska podczerwień (NIR, z ang. Near Infrared Spectroscopy) – $12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$,
- ✓ średnia podczerwień (MIR, z ang. Mid Infrared Spectroscopy) – $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$,
- ✓ daleka podczerwień (FIR, z ang. Far Infrared Spectroscopy) – $400\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ [13-15].

Efektom zaabsorbowania przez molekuly promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni jest widmo, na którym zaobserwować można szereg pasm pochodzących od drgań grup atomów tworzących cząsteczkę, od których masy oraz siły wiązania zależy umiejscowienie sygnału na widmie. W zależności od wartości energii koniecznej do dostarczenia w celu przejścia drgającego układu ze stanu podstawowego na wzbudzony wyróżnić można trzy typy pasm absorpcji:

- ✓ pasma podstawowe, u podstawy istnienia których leży transformacja układu oscylacyjnego z poziomu podstawowego na pierwszy poziom wzbudzony. Pasma te zaobserwować można głównie w zakresie średniej podczerwieni;
- ✓ pasma nadtonów, które widoczne są podczas przechodzenia układu drgającego z poziomu podstawowego na drugi i kolejne wyższe wzbudzone poziomy energetyczne. Obecność tych pasm stwierdza się przeważnie w zakresie bliskiej podczerwieni;
- ✓ pasma kombinacyjne są z kolei wynikiem sumy lub różnicy drgań dwóch różnych oscylatorów. Także one obecne są najczęściej w zakresie bliskiej podczerwieni [13-16].

Zmiany w parametrach spektralnych pasm pochodzących od drgań grup CH budujących cząsteczki lipidów, zachodzące pod wpływem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, umożliwią śledzenie zmian strukturalnych zachodzących w hydrofobowej części modelowych błonach lipidowych. Do tego typu pasm zaliczamy między innymi sygnały pochodzące od drgań rozciągających symetrycznych (ν_s) i asymetrycznych (ν_{as}) grup metylenowych (CH_2) i terminalnych metylowych (CH_3) budujących łańcuchy acylowe cząsteczek lipidów. Pasma te znajdują się w obszarze wysokich częstości zakresu średniej podczerwieni, a intensywność pierwszych z nich jest najwyższa ze wszystkich pochodzących od drgań cząsteczek fosfolipidów sygnałów. Ich maksima znajdują się odpowiednio przy ok. 2920 cm^{-1} dla $\nu_{as}\text{ CH}_2$, 2850 cm^{-1} dla $\nu_s\text{ CH}_2$, 2955 cm^{-1} dla $\nu_{as}\text{ CH}_3$ oraz 2870 cm^{-1} dla $\nu_s\text{ CH}_3$ [17,18,93,109]. W przypadku sygnałów pochodzących od pierwszych nadtonów drgań rozciągających symetrycznych ($2\nu_s$) i asymetrycznych ($2\nu_{as}$) grup metylenowych (CH_2) budujących łańcuchy węglowodorowe molekuł fosfolipidów, których występowanie zaobserwować można w zakresie bliskiej podczerwieni, maksima pasm znajdują się przy około 5780 cm^{-1} dla $2\nu_{as}\text{ CH}_2$ oraz 5660 cm^{-1} dla $2\nu_s\text{ CH}_2$ [110-112]. Kształt i położenie tych pasm w znacznym stopniu skorelowane jest z termo- i liotropowym typem fazy zagregowanych fosfolipidów. Na fragmentach widm IR w zakresie $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ układów bilamelarnych rejestrowanych w funkcji wzrastającej temperatury zaobserwować można szereg modyfikacji parametrów spektralnych, takich jak: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowych oraz przesunięcie maksimów pasm $\nu_{as,s}\text{ CH}_2$ w kierunku wyższych wartości liczb falowych [17,18,109]. Analogiczne zmiany położenia i kształtu pasm pochodzących od drgań cząsteczek bogatych w długie fragmenty alifatyczne zaobserwować można w przypadku sygnałów pochodzących od $2\nu_s$ i $2\nu_{as}$ występujących w zakresie $6000\text{-}5500\text{ cm}^{-1}$ na widmach IR [110-112]. Zarejestrowane dla stanowiących obiekt badań układów lipidowych zmiany parametrów spektralnych w wersji graficznej przedstawione zostaną w dalszej części pracy.

Spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni – FT-ATR-MIR (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy) jest jedną z technik eksperymentalnych stosowanych powszechnie do badania zarówno modelowych jak i występujących naturalnie systemów biologicznych [13-22]. Dane strukturalne, informacje o stopniu i sposobie interakcji międzycząsteczkowych a także

modyfikacjach strukturalnych będących wynikiem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, pH, czy stopnia uwodnienia, możliwe są do uzyskania z analizy widm mierzonych metodą FT-ATR-MIR [19,20]. Do największych ograniczeń tej metody podczas badania układów biologicznych należy konieczność rejestrowania widm w środowisku wodnym. Nastręcza to wielu problemów przy interpretacji mierzonych systemów z uwagi na pojawiające się w istotnych, z punktu widzenia analizy, zakresach pasm o dużej intensywności pochodzących od drgań grup –OH cząsteczek wody. Częściowe zniwelowanie tej trudności możliwe jest dzięki zastosowaniu transformacji Fouriera (FT), która ułatwia gromadzenie dużej ilości interferogramów oraz wpływa na wzrost stosunku sygnał/szum, umożliwiając rejestrowanie widm o dobrej rozdzielczości [19]. Użyteczne może okazać się również zastosowanie tzw. ciężkiej wody – D₂O, której wykorzystanie pozwala na wyeliminowanie pasm pochodzących od drgań grup –OH cząsteczek H₂O.

Spektroskopia oscylacyjna w zakresie NIR jest techniką, której zastosowanie przy badaniu i analizie modyfikacji strukturalnych modelowych błon lipidowych nie było powszechne. W literaturze przed 2014 rokiem (rozpoczęcie niniejszych badań) nie udało się natrafić na żadną pracę, w której użyto by techniki spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR do badania tego typu systemów. Niemniej opierając się na jej analogicznym względem metody MIR fizycznym podłożu, bazującym na występowaniu w analizowanych układach drgań grup funkcyjnych w cząsteczkach lipidów oraz ich pierwszych nadtonów, przypuszczać można, iż podobnie jak spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni również technika NIR może okazać się użytecznym narzędziem dostarczającym szeregu informacji dotyczących struktury i właściwości fizykochemicznych modeli błon biologicznych.

Intensywny rozwój aparatury pomiarowej związany przede wszystkim ze wzrostem stopnia ich zautomatyzowania, mający miejsce na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, wiąże się z koniecznością analizy obszernych zbiorów danych doświadczalnych. Mnogość wyników w znacznym stopniu ogranicza możliwość ich eksploracji za pomocą klasycznych metod analitycznych. Narzędziem pomocnym przy interpretacji wielowymiarowych danych jest chemometria, u której podstaw leżą statystyczne i matematyczne metody analizy danych, prowadzące do otrzymania szeregu informacji dotyczących modyfikacji zachodzących w badanych układach [113-116].

Do głównych celów chemometrii zaliczyć można:

- ✓ gromadzenie, kompresję, eksplorację oraz wizualizację danych pomiarowych,
- ✓ modelowanie, kalibrację i kontrolę statystyczną procesów,
- ✓ klasyfikację, grupowanie i korekcję sygnałów,
- ✓ identyfikację i interpretację wzorców i trendów [113-115,117,118].

Wyniki pomiarów przeprowadzanego eksperymentu stanowią najczęściej szeroki zbiór będący rezultatem zbadania szeregu obiektów. Eksplikacja z wielowymiarowych danych charakterystyki analizowanych próbek oraz ich cech poprzez redukcję wymiaru jest nadrzędną intencją stosowania metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych [113,119-121].

Jedną z powszechnie stosowanych metod projekcji danych jest metoda analizy składników głównych (z ang. Principal Component Analysis – PCA). Analiza PCA jest użytecznym narzędziem chemometrycznym umożliwiającym kompresję wielowymiarowych danych, będących wynikiem np. pomiarów spektroskopowych, poprzez zastąpienie wyjściowych danych jednym lub kilkoma tzw. czynnikami (lub składnikami) głównymi (z ang. principal components, PC) czyli liniowymi kombinacjami zmiennych wyjściowych, pozostającymi względem siebie w relacji ortogonalnej i opisu-

jącymi zasadniczą część wariancji danych. Iteracyjny sposób wyznaczania czynników głównych pozwala na zachowanie przez nie wysokiego stopnia zawartych w oryginalnych danych informacji przy jednoczesnym zachowaniu maksymalnego poziomu wariancji poddawanego analizie układu. Pierwszy czynnik główny (PC1) wyznaczany jest zgodnie z kierunkiem obejmującym największy rozrzut obiektów, a co za tym idzie opisującym maksimum całkowitej zmienności zachodzącej w badanym układzie. Każdy kolejny czynnik główny przedstawia inną, nieopisaną przez poprzedni część zmienności [117,119-121]. Poddanie danych eksperymentalnych szeregowi procedur przygotowawczych takich jak: odsumianie, korekcja linii bazowej, normalizacja czy centrowanie (usunięcie powielanych oraz nieistotnych informacji ze zbioru widm) ma na celu wyeliminowanie niespecyficznego i niebędącej podstawą badanego procesu, zmienności [117,119,122,123]. Wyjściowe dane wygenerowane w postaci macierzy są poprzez algorytm PCA poddawane procesowi dekompozycji do iloczynu dwóch macierzy T i P, czyli macierzy wartości czynnikowych (z ang. scores) zawierającej współrzędne obiektów i macierzy ładunków czynnikowych (z ang. loadings) charakteryzującej parametry, zorientowanych w taki sposób, aby zoptymalizować w maksymalnym stopniu opis wariancji danych [122]. Dzięki zastosowaniu metody PCA możliwa jest więc również graficzna wizualizacja zależności wiążących obiekty i parametry, co ułatwia w znacznym stopniu interpretację analizowanych danych [117,119-125]. Wartości czynnikowe dla każdego obiektu opisywane są jako odległość ich prostopadłego rzutu na oś PC1. Im większa wartość scores, tym większa zmienność wnoszona przez dany obiekt do układu. Zbliżone wartości scores dla kilku próbek sugerują z kolei ich analogiczny wkład w wariancję analizowanego systemu [119,125]. Ładunki czynnikowe kolejnych zmiennych równe są *cosinusowi* kąta między osią danego obiektu a osią PC1. Przyjmują one zatem wartości od 1 do -1. Wartości te są ściśle zależne od wariancji kolejnej zmiennej – im większy wpływ zmienności na kierunek osi PC1, tym bliższa jedności wartość ładunku czynnikowego (ponieważ *cos* kąta wynosi 0). I odwrotnie – im bardziej równolegle względem siebie biegną osie zmiennej i PC1, tym bliższa zeru wartość *cos* kąta między osiami i tym mniejszy wkład w opis zależnej od PC1 części wariancji ma określona dana – wartość liczby falowej [119,125].

Oparte na założeniach statystyki i modelach matematycznych metody chemometryczne okazują się być wsparciem i uzupełnieniem technik badawczych, którymi na przestrzeni ostatnich lat próbuje się na wielu płaszczyznach analizować coraz bardziej skomplikowane i różnorodne pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym systemy [126-129]. Graficzne przedstawienie otrzymanych w wyniku przeprowadzenia analizy PCA udziałów wartości i ładunków czynnikowych w ogólnej zmienności badanego układu pozwala na uzyskanie szeregu istotnych informacji dotyczących złożonych układów, takich jak modyfikowane licznymi parametrami modelowe błony lipidowe [128,130-133].

W niniejszej pracy metoda PCA zastosowana została w celu śledzenia i interpretacji monitorowanych przy użyciu spektroskopii IR modyfikacji strukturalnych w hydrofobowym obszarze dwuwarstw lipidowych, będących skutkiem zmian temperatury modelowych błon. Do realizacji postawionych celów pracy, konieczna była preparacja próbek wodnych dyspersji liposomowych, których pomiary prowadzono w funkcji wzrastającej temperatury technikami spektroskopii MIR i NIR [134-136].

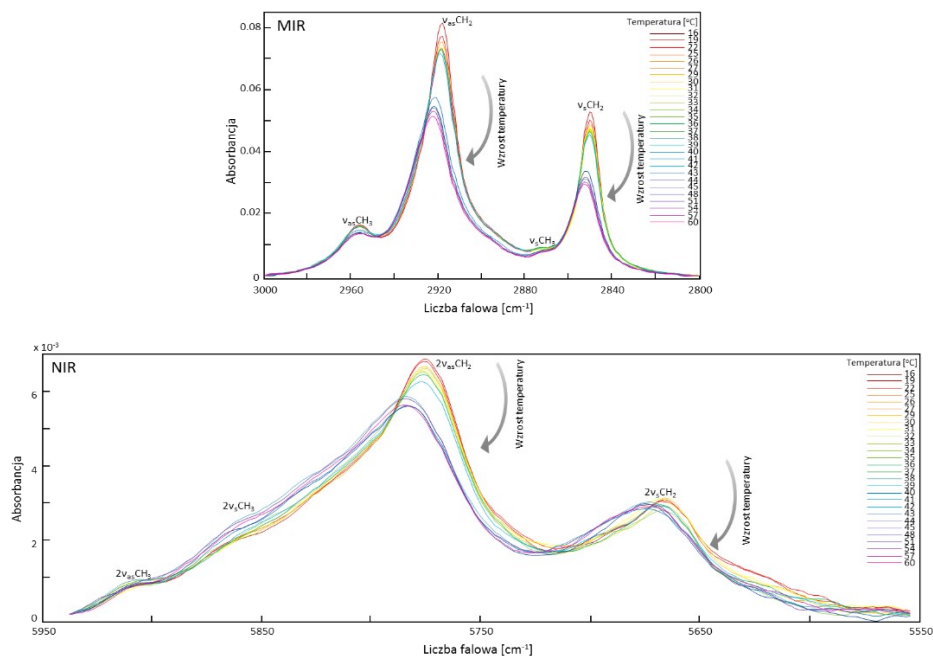
4.1. Wspomagana analizą chemometryczną (PCA) spektroskopia FTIR w zakresie NIR jako alternatywna metoda w badaniu przejść fazowych modelowych układów błonowych w zakresie MIR

Większość charakterystycznych pasm występujących w cząsteczkach związków organicznych, pochodzących od drgań podstawowych, związanych z przejściem cząsteczki z poziomu podstawowego na pierwszy poziom wzbudzony, zaobserwować można w zakresie MIR. Z kolei przeważającą część pierwszych i kolejnych nadtonów sygnałów pochodzących od tych drgań, będących efektem przechodzenia cząsteczki ze stanu podstawowego na drugi i wyższe poziomy wzbudzone, oraz tzw. pasma kombinacyjne wynikające z nakładania się kilku rodzajów drgań, znaleźć można w zakresie NIR [13]. Nadtony powinny podlegać analogicznym modyfikacjom spektralnym, jak odpowiadające im pasma pochodzące od drgań podstawowych, ponieważ u ich podłoża leżą te same rodzaje oscylacji, monitorujące to samo zjawisko zachodzące w badanym układzie [13,16]. Badania w pełni uwodnionych błon lipidowych pozwalają na lepsze przybliżenie procesów zachodzących w układach modelowych dwuwarstw do tych mających miejsce w naturalnie występujących błonach, które znajdują się we w pełni uwodnionym stanie. Poważny problem eksperymentalny, jaki w zakresie MIR stanowi silne nakładanie się pasm pochodzących od grup funkcyjnych lipidów budujących błony z szerokim pasmem o wysokiej intensywności będącym wynikiem drgań grup –OH cząsteczek wody zostaje częściowo zniwelowany w zakresie NIR, gdzie wspomniane pasma są lepiej rozseparowane. Możliwość przeanalizowania alternatywnego zakresu spektralnego w celu zbadania tego samego procesu zachodzącego w badanych układach pozwoliła na optymalne pod względem technicznym i ekonomicznym dobranie parametrów technicznych przeprowadzanych pomiarów [134-136].

Badania MIR i NIR modelowych błon DPPC – w pierwszej kolejności przeprowadzono pomiary powszechnie stosowaną do badania systemów lipidowych techniką FTIR-ATR w zakresie MIR wodnych dyspersji liposomowych DPPC w funkcji wzrastającej temperatury. Analizie poddano zakres $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, w którym znajdują się pasma pochodzące od drgań $\nu_{\text{as,s}}\text{CH}_2$ charakteryzujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidów. W serii zmierzonych w funkcji wzrastającej temperatury widm, zgodnie z oczekiwaniami, zauważono szereg zmian spektralnych: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz przesunięcie maksimum pasm $\nu_{\text{as,s}}\text{CH}_2$ w kierunku wyższych wartości liczb falowych. Modyfikacje te są wynikiem zmian konformacyjnych wzdłuż wiązań C-C w łańcuchach alifatycznych z konformacji *trans* do *gauche* i związanego z tym przejścia fazowego dwuwarstwy z uporządkowanej fazy żelowej do rozluźnionej fazy ciekłokrystalicznej. Fakt ten jest potwierdzony licznymi eksperymentami opisanymi w literaturze [18,130-133,137-140].

W kolejnym kroku po raz pierwszy miało miejsce poddanie dyspersji liposomowych DPPC pomiarom spektroskopowym w zakresie NIR w celu analizy sygnałów pochodzących od drgań $2\nu_{\text{as,s}}$ grup CH_2 lipidowych łańcuchów alifatycznych i sprawdzenie stopnia korelacji pomiędzy wynikami otrzymanymi dla zakresów MIR i NIR [13,110,134]. Zauważono, iż także w przypadku analizy zakresu NIR na zmierzonych w funkcji temperatury widmach widoczne są analogiczne modyfikacje spektralne badanych sygnałów, czyli obniżenie intensywności, poszerzenie i wysoko-częstościowe przesunięcie maksimum pasm pochodzących od drgań $2\nu_{\text{s}}$ (z 5775 cm^{-1} w fazie żelowej, do 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_{\text{as}}$ (z 5662 cm^{-1} w fazie żelowej, do 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów węglowodoro-

wych cząsteczek lipidów [110,134]. Temperaturowe ewolucje widm FT-IR zmierzonych w zakresie MIR i NIR obejmujących odpowiednio pasma $\nu_{as,s}CH_2$ i $\nu_{as,s}CH_3$ oraz $2\nu_{as,s}CH_2$ i $2\nu_{as,s}CH_3$ dla wodnych dyspersji liposomowych DPPC przedstawione zostały na Rysunku 6.



Rysunek 6. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresach MIR i NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPC

Figure 6. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the MIR and NIR ranges, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPC systems

Przypisania pasm zaprezentowanych powyżej dokonano w oparciu o dane literaturowe [110-112] dotyczące układów lipidowych oraz innych cząsteczek związków organicznych, zawierających w swojej budowie różne fragmenty alifatyczne. Podobnie jak w spotykanych w literaturze przykładach, również w badanych błonach DPPC, zarówno w zakresie MIR jak i NIR, intensywność sygnału pochodzącego od drgań rozciągających asymetrycznych CH_2 jest większa, niż dla pasma drgań rozciągających symetrycznych CH_2 [110-112]. Pasma o niewielkiej intensywności przy 5859 i 5832 cm^{-1} przypisano odpowiednio pierwszym nadtonom drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych terminalnych grup CH_3 wchodzących w skład łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów. Zgodne z danymi literaturowymi [110,141], nieco zmodyfikowane względem zakresu MIR, wzajemne położenie pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}CH_2$ oraz $2\nu_{as,s}CH_3$ zostało również zaobserwowane w przypadku analizowanych systemów lipidowych, a ilość grup metylenowych (15) i metylowych (1) w szesnastowęglowych łańcuchach alifatycznych cząsteczek badanych lipidów ma swoje odzwierciedlenie w intensywności sygnałów.

Proces głównego przejścia fazowego, czyli wynikająca ze zmiany konformacji wiązań (*trans-gauche*) między atomami węgla w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów modyfikacja strukturalna dwuwarstwy ze ściśle upakowanej, uporządkowanej

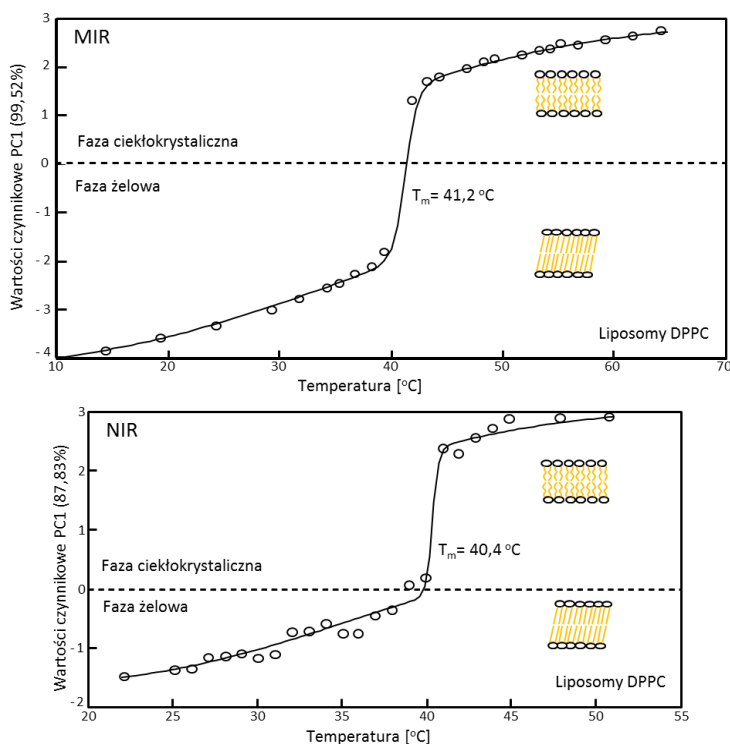
(faza żelowa) do bardziej płynnej i rozluźnionej (faza ciekłokrystaliczna) znajduje swoje odzwierciedlenie w zmianie opisanych powyżej parametrów spektralnych widm modulowanych temperaturą układów liposomowych. Obie przedstawione metody pomiarowe opierające się na analizie odmiennych zakresów spektralnych dają spójne wyniki: ewolucja położenia i kształtu pasm $2\nu_{as,s}CH_2$ była analogiczna z kierunkiem zmian położenia i kształtu pasm $\nu_{as,s}CH_2$.

Użycie narzędzi chemometrycznych w kolejnym kroku analizy umożliwiło uzyskanie z wyższą dokładnością większej ilości informacji o modyfikacjach strukturalnych związanych z obserwowanymi na widmach zmianami spektralnymi. W przypadku analizowanych układów informacji takich dostarczyła, pozwalająca na redukcję wielowymiarowości danych, analiza czynników głównych (PCA).

Analiza PCA widm modelowych błon DPPC zmierzonych w zakresie MIR i NIR

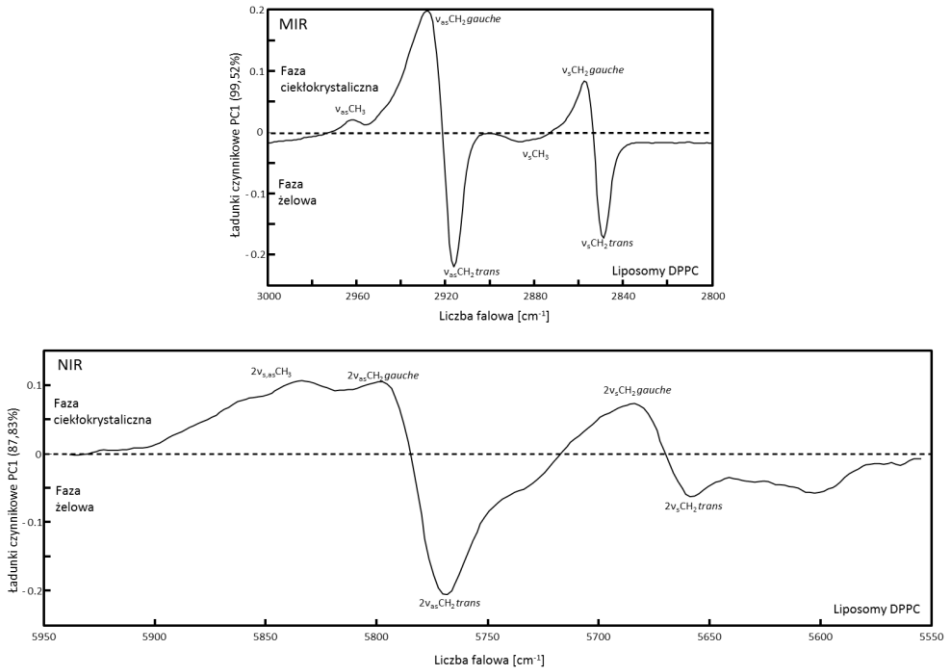
– modele PCA zostały sporządzone oddzielnie dla każdego z poddanych analizie zakresów. W obu przypadkach przeważającą część (MIR: 99,52%, NIR: 87,83%) obserwowanych na widmach absorpcyjnych zmienności zachodzących w układzie przypisano jednemu, głównemu procesowi związanemu ze zmianą temperatury. Za pozostały udział w całkowitej zmienności absorbancji odpowiadają nie tylko obserwowane na widmach szumy, ale również inne losowe zmiany absorbancji związane z nieoptymalną korekcją linii bazowej oraz odjęciem widma wody od widma badanej dyspersji liposomowej. Na widmach mierzonych techniką FT-IR wszystkich opisanych w tej pracy rodzajów układów błonowych pojawiały się incydentalne modyfikacje absorbancji o analogicznym podłożu. Obliczenia modelu PCA przeprowadzone zostały na macierzy stworzonej z mierzonych w funkcji temperatury widm liposomów DPPC. W rejonie średniej podczerwieni analizie PCA poddano zakres $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, zaś w rejonie bliskiej podczerwieni zakres $5940-5555\text{ cm}^{-1}$.

Konstruowanie modelu PCA, na którego podstawie wyznaczone zostały udziały poszczególnych czynników w całkowitej zmienności absorbancji w układzie, składało się z kilku kroków, mających na celu wyekspozowanie maksymalnej ilości informacji z danych wyjściowych. I tak dzięki odpowiedniej projekcji danych otrzymano dla zakresów MIR i NIR wykresy wartości czynnikowych, na których graficznie zilustrowane zostały korelacje pomiędzy mierzonymi w kolejnych temperaturach widmami. Wykresy te przedstawione zostały na **Rysunku 7**.



Rysunek 7. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPC mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresach MIR i NIR
 Figure 7. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPC liposomes measured by vibrational spectroscopy in the MIR and NIR ranges

Zaprezentowane na **Rysunku 7** wykresy przedstawiają krzywe sigmoidalne wygenerowane przez dopasowanie funkcji do otrzymanych w analizie PCA punktów układających się specyficznie na płaszczyźnie wartości czynnikowe – temperatura. Zbliżonym wartościom czynnikowym dla czynnika pierwszego przypisuje się znaczne podobieństwo opisywanych przez nie widm. Z kolei duża zmiana wartości czynnikowych, odczytywana jest jako tożsama z widmami znacznie się od siebie różniącymi [130]. Równocześnie z wykresami wartości czynnikowych w funkcji temperatury, wygenerowane zostały wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej, które pokazują odpowiadającą udziałowi czynnika pierwszego, zmianę absorbancji przy poszczególnych wartościach liczb falowych w analizowanym zakresie spektralnym w całkowitej zmienności spektralnej układu. Duża wartość ładunku czynnikowego oznacza, iż zmiany absorbancji przy danej wartości liczby falowej mają znaczny wkład w zachodzący w układzie proces [125]. Ładunki czynnikowe wskazujące, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych w zakresach MIR i NIR zaobserwować można największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej, zaprezentowane zostały na **Rysunku 8**.



Rysunek 8. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPC mierzonych w zakresach MIR i NIR
 Figure 8. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPC liposomes measured in the MIR and NIR ranges

Sigmoidalny kształt obu, tzn. wygenerowanych dla zakresów MIR i NIR, wykresów wartości czynnikowych w funkcji temperatury jest charakterystyczny dla układów lipidowych, w których zachodzi zjawisko głównego przejścia fazowego [130]. Ujemne wartości czynnikowe opisują dwuwarstwę w fazie żelowej, zaś dodatnie przypisywane są błonie w stanie ciekłokrystalicznym, co można było stwierdzić porównując zależności wartości czynnikowych z odpowiadającymi im zmianami na wykresach ładunków czynnikowych. Z miejsca przebiegu krzywej sigmoidalnej, określającego, między którymi mierzonymi w funkcji temperatury widmami występują największe różnice spektralne, wyznaczone zostały wartości temperatur głównych przejść fazowych, które wynoszą odpowiednio: dla regionu MIR: $T_m = 41,2$ °C, dla NIR: $T_m = 40,4$ °C. Wartości te są do siebie zbliżone i zgodne z danymi literaturowymi [130,142,143].

Wygenerowane wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej dla obu studiowanych rejonów spektralnych pozwoliły na charakterystykę stanu konformacyjnego badanej błony w obu fazach oraz określenie kierunku zmian konformacyjnych zachodzących podczas głównego przejścia fazowego. W niskotemperaturowej fazie żelowej ładunki czynnikowe posiadały charakterystyczne dla bogatej w konformery *trans* fazy żelowej ujemne wartości, których maksima zlokalizowane były w pozycjach odpowiednio dla rejonu MIR 2850 i 2917 cm^{-1} , a dla rejonu NIR 5662 i 5775 cm^{-1} . Z kolei nieuporządkowaną, wysokotemperaturową fazę ciekłokrystaliczną cechuje występowanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych właściwych występowaniu sygnałów w rejonie MIR 2853 i 2923 cm^{-1} i NIR 5672 i 5785 cm^{-1} , będących następstwem drgań rozciągających

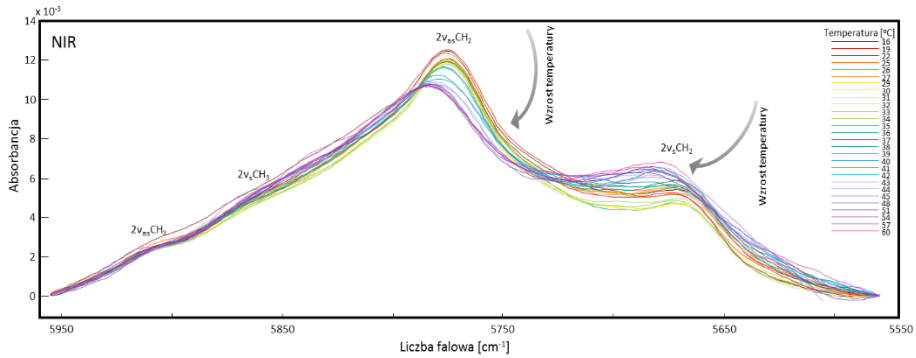
symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych, w których zaobserwować można pojawienie się między atomami węgla wiązań w konformacji *gauche*. Również pojawienie się mało intensywnych maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych odpowiadających pasmom podstawowym i pierwszym nadtonom drgań $\nu_{as,s}$ terminalnych grup CH_3 w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów sugeruje znaczne rozluźnienie struktury bilamelarnej w fazie ciekłokrystalicznej, dzięki którym możliwe są intensywne ruchy konformacyjne w obrębie końcowych fragmentów łańcuchów alifatycznych molekuł budujących dwuwarstwę [82,130]. Wszystkie powyższe rozważania prowadzą do konkluzji, iż wygenerowany w analizie PCA pierwszy czynnik (PC1) zarówno w przypadku regionu MIR jak i NIR opisuje ten sam proces – główne przejście fazowe błon DPPC.

Otrzymane wyniki wskazują, iż technika NIR może być z powodzeniem stosowana do śledzenia procesu głównego przejścia fazowego i innych temperaturowo-zależnych zmian w wodnych dyspersjach liposomowych, jako metoda alternatywna do stosowanej powszechnie w badaniach tego typu systemów spektroskopii oscylacyjnej w zakresie MIR.

Badania NIR modelowych błon DPPG – oprócz najpowszechniej występujących w większości żywych komórek lipidów zwitterjonowych, jak np. fosfatydylocholin, istotne znaczenie dla struktury i funkcji mają również, zawierające się w mniejszym procencie całkowitej ilości lipidów błonowych, lipidy ujemnie naładowane, do których zaliczyć można między innymi fosfatydyloglicerole [144-146]. Budowa i funkcje biologiczne wielu enzymów, białkowych kanałów jonowych (np. potasowych) czy receptorów (np. acetylocholinowych) są często utrzymywane i modulowane przez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi lipidami błonowymi [147-150].

Modelowe dwuwarstwy DPPG studiowano z pomocą spektroskopii NIR a analizie poddano pasma pochodzące od drgań $2\nu_{as,s}$ grup CH_2 budujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidów [13,110,135]. Na zmierzonych metodą NIR w funkcji temperatury widmach błon DPPG zaobserwowano szereg modyfikacji spektralnych badanych sygnałów, takich jak: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej i batochromowe przesunięcie maksimów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów alifatycznych molekuł lipidów [110,135]. Temperaturowo-zależne modyfikacje fragmentów widm NIR zawierających pierwsze nadtony pochodzące od drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów niedomieszkwanych dyspersji liposomowych DPPG pokazano na **Rysunku 9**.

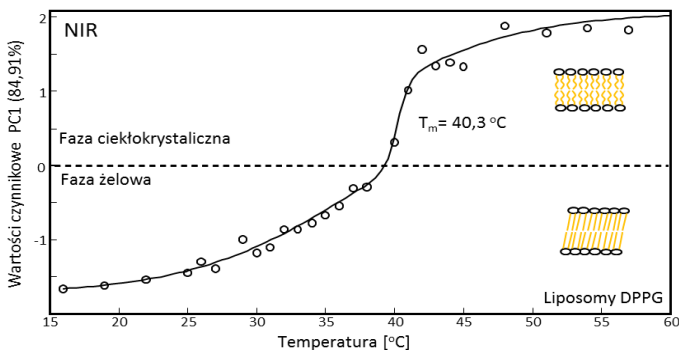
Układ pasm będących efektem drgań grup metylenowych i metylenowych cząsteczek DPPG jest taki sam, jak w przypadku molekuł DPPC. Powodem tego może być między innymi fakt, iż hydrofobowy fragment obu poddanych analizie lipidów jest identyczny. Uzyskanie szczegółowych danych dotyczących zachodzących w analizowanym układzie modyfikacji strukturalnych generujących zmiany spektralne na zmierzonych w funkcji temperatury widmach NIR, możliwe było dzięki zastosowaniu analizy PCA. Jej przeprowadzenie pozwoliło na śledzenie procesu głównego przejścia fazowego błon DPPG, będącego konsekwencją modyfikacji konformacyjnych *trans/gauche* w obrębie wiązań C-C łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów, warunkujące przejście fazowe dwuwarstwy DPPG z fazy żelowej charakteryzującej się znacznym uporządkowaniem i ścisłym upakowaniem do fazy ciekłokrystalicznej, którą cechuje bardziej płynna i rozluźniona struktura.



Rysunek 9. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPG

Figure 9. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPG systems

Analiza PCA widm modelowych błon DPPG zmierzonych w zakresie NIR – model PCA wyliczony został dla analizowanego zakresu spektralnego, w którym dokonano pomiarów niedomieszkowanych bilamelarnych układów DPPG w funkcji wzrastającej temperatury. Przeważająca część (84,91%) pojawiających się na widmach zmian absorbancji w układzie odpowiada głównemu procesowi strukturalnemu generowanemu zmianą temperatury. Resztę wkładu w całkowitą zmienność absorbancji miały zauważalne na widmach szumy a także pozostałe, losowe zmiany absorbancji wynikające z nieprecyzyjnego odjęcia widm wody od widm dyspersji liposomowych lub nieidealnej korekcją linii bazowej. Analogicznie jak dla czystych liposomów DPPC, także dla ujemnie naładowanych liposomów DPPG obliczenie modelu PCA wykonano na macierzy uzyskanej z połączenia mierzonych w funkcji temperatury widm, w zakresie $5940\text{--}5555\text{ cm}^{-1}$. Korelacje pomiędzy mierzonymi w kolejnych temperaturach widmami przedstawione zostały jako zależność wartości czynnikowych od temperatury na **Rysunku 10**.

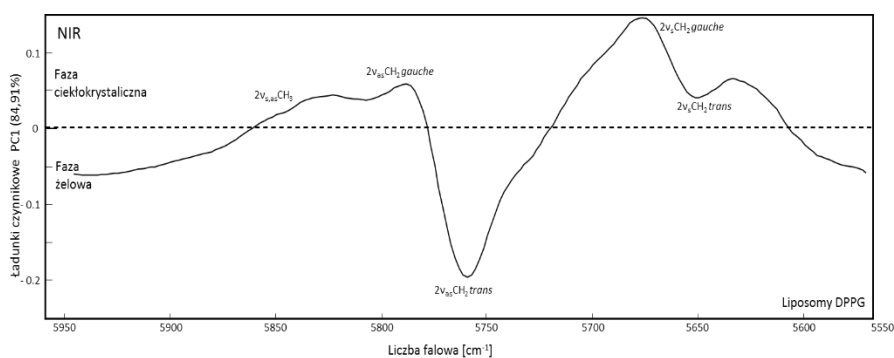


Rysunek 10. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPG mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 10. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPG liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Skonstruowanie modelu PCA umożliwiło monitorowanie przebiegu procesu zachodzącego w poddawanych analizie błonach DPPG. Przedstawiony powyżej wykres

wartości czynnikowych w funkcji temperatury pozwala wnioskować o podobieństwie (zbliżone wartości czynnikowe) bądź odmienności (odległe wartości czynnikowe) między charakteryzowanymi przez nie widmami. Znaczna zmiana wartości czynnikowych, świadczy o znacznym wkładzie poszczególnych widm w zmienność absorbancji opisanej za pomocą czynnika pierwszego. Obok wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury, w toku analizy PCA wygenerowano również wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej, który dla czynnika pierwszego (PC1), ilustruje udział zmian absorbancji w analizowanym zakresie spektralnym wynikających z modyfikacji strukturalnych wywołanych zajściem procesu głównego przejścia fazowego. Na **Rysunku 11** pokazane zostały ładunki czynnikowe w funkcji liczb falowych. Na wykresie tym zaobserwować można, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych dostrzegalne są największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej.



Rysunek 11. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPG mierzonych w zakresie NIR

Figure 11. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPG liposomes measured in the NIR range

Analiza PCA umożliwiła otrzymanie dla niskotemperaturowej fazy żelowej maksimum ładunków czynnikowych o ujemnej wartości zlokalizowanym w pozycji charakterystycznej (5775 cm^{-1}) dla pasma pochodzącego od pierwszego nadtonu drgań rozciągających asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów alifatycznych znajdujących się w konformacji *trans*. Nieuporządkowaną, wysokotemperaturową fazę ciekłokrystaliczną cechuje zaś występowanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych właściwych występowaniu sygnałów odpowiednio przy 5672 i 5785 cm^{-1} , będących następstwem pierwszego nadtonu dla drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych, w których zaobserwować można pojawienie się między atomami węgla wiązań w konformacji *gauche*. Również powstawanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych odpowiadających sygnałom pierwszych nadtonów drgań $2\nu_{s,as}$ terminalnych grup CH_3 łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów dowodzi, że w układzie następuje rozluźnienie struktury bilamelarnej w fazie ciekłokrystalicznej, dzięki któremu możliwe są ruchy konformacyjne w obrębie końcowych odcinków łańcuchów alifatycznych cząsteczek budujących dwuwarstwę [82,130]. O zachodzeniu zjawiska głównego przejścia fazowego w badanym układzie lipidowym świadczy również charakterystyczny, sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury [130]. Uporządkowaną dwuwarstwę w fazie żelo-

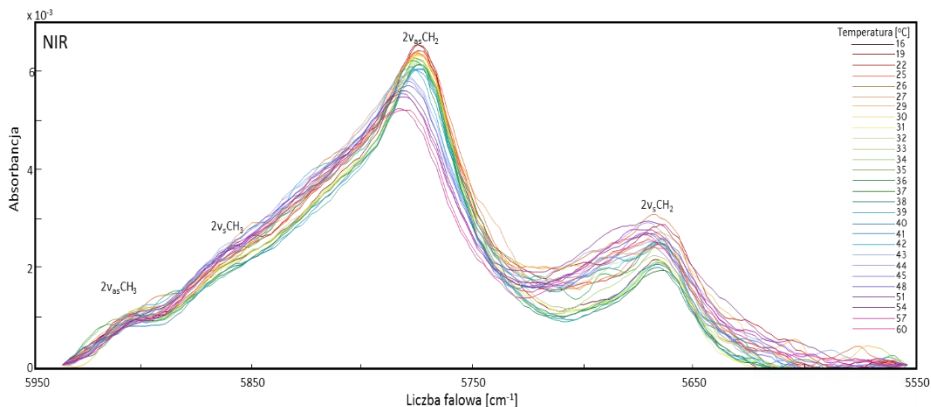
wej obrazują ujemne wartości czynnikowe, z kolei rozluźnionej błonie w fazie ciekłokrystalicznej odpowiadają dodatnie wartości czynnikowe. Temperatura głównego przejścia fazowego analizowanego systemu bilamelarnego wyznaczona została w miejscu przecięcia krzywej sigmoidalnej, które tożsame jest z największymi zmianami parametrów spektralnych między kolejnymi widmami mierzonymi w funkcji temperatury. Tak wyznaczona wartość $T_m = 40,3$ °C, co jest zgodne z danymi literaturowymi [33,45,96,142,143,151-153]. Przeprowadzone badania modelowych błon ujemnie naładowanych molekuł DPPG i ich interpretacja pozwalają postulować, że otrzymany w analizie PCA pierwszy czynnik opisuje ten sam proces, który zachodzi również w zwitterjonowych dwuwarstwach zbudowanych z cząsteczek DPPC, czyli główne przejście fazowe.

Badania NIR modelowych błon DPPC/Chol – cholesterol, jak już wspomniano, jest jednym ze steroli wchodzących w skład błon biologicznych. Jego cząsteczki mają zdolność do wbudowywania się w określone miejsce dwuwarstw lipidowych [34-44]. Istotną jego funkcją jest zdolność do modyfikowania właściwości fizykochemicznych dwuwarstw lipidowych. Wpływ stężenia cholesterolu na rozluźnienie błony w fazie żelowej, jej usztywnienie w fazie ciekłokrystalicznej i wynikający z tego faktu spadek kooperatywności a finalnie zupełny zanik przejścia fazowego modelowych dwuwarstw, jest powszechnie znany [37,38,45-51,154-156]. Stężenie Chol zostało odpowiednio dobrane tak, aby przejście fazowe było nadal obserwowalne, podczas gdy jego kooperatywność została znacznie obniżona [34,38,45-51].

Badania rozpoczęto od pomiarów modelowych błon lipidowych DPPC domieszkowanych Chol w stężeniu 10 mol%. Pomiarów dyspersji liposomowych DPPC/Chol w funkcji temperatury dokonano wykorzystując spektroskopię NIR. Charakterystykę modyfikacji strukturalnych zachodzących w analizowanym układzie oparto o zmiany spektralne pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}$ grup CH_2 budujących łańcuchy acylowe molekuł lipidów [13,110,136]. Zmiany te przejawiały się jako spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej i przesunięcie w kierunku wyższych wartości liczb falowych maksimów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów [110,136]. **Rysunek 12** przedstawia spowodowane wzrostem temperatury zmiany spektralne na fragmentach widm NIR obejmujących pierwsze nadtony drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek DPPC w układach DPPC/Chol.

Również na powyższym rysunku widoczny jest charakterystyczny dla fosfolipidów układ pasm będący konsekwencją drgań grup CH_2 i CH_3 łańcuchów alifatycznych w cząsteczkach lipidów. Na temperaturowo-zależną ewolucję sygnałów składa się spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz ich wysoko-częstościowe przesunięcie. Podłoża takich modyfikacji parametrów spektralnych dopatrywać się należy w wynikającym ze wzrostu temperatury przyroście populacji konformerów *gauche* wiązań między grupami CH_2 znajdującymi się w obrębie łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów. Stąd wniosek, iż zwiększenie temperatury w błonach DPPC/Chol skutkuje zachodzeniem głównego przejścia fazowego (uporządkowana faza żelowa \rightarrow rozluźniona faza ciekłokrystaliczna) związanego z izomeryzacją *trans/gauche* wiązań C-C w acylowych łańcuchach lipidowych. Przeprowadzona na zmierzonych techniką NIR w funkcji wzrastającej temperatury widmach dyspersji liposomowych DPPC/Chol analiza PCA potwierdziła te przypuszczenia oraz dostarczyła kompleksowych informacji dotyczących zmian spektra-

lnych, u których podłoża leżą modyfikacje strukturalne mające miejsce w studiowanym układzie.

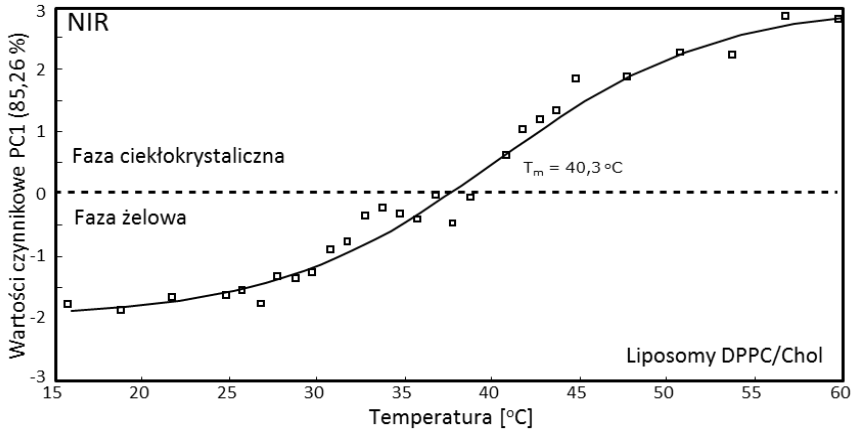


Rysunek 12. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPC/Chol

Figure 12. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPC/Chol systems

Analiza PCA widm modelowych błon DPPC/Chol zmierzonych w zakresie NIR – mierzone w zakresie NIR w funkcji temperatury widma bilamelarnych układów DPPC/Chol poddane zostały analizie PCA, która umożliwiła wygenerowanie modelu opisującego fluktuacje charakteryzowanego systemu. Zachodzący w układzie temperaturowo-zależny proces, którego przebieg monitorowano, generował dominujący procent (85,28 %) widocznych na widmach absorpcyjnych zmienności. U podłoża reszty całkowitej zmienności absorbancji leżą takie zjawiska, jak przypadkowe zmiany absorbancji wynikające z niedokładnej korekcji linii bazowej, czy nieidealnego odjęcia widma wody od widma liposomów, a także widoczne na widmach szumy. Zarejestrowane w funkcji wzrastającej temperatury widma dyspersji liposomowej DPPC/Chol stanowiły składowe macierzy, która posłużyła do obliczenia modelu PCA. Analizie PCA poddano zakres 5940-5555 cm^{-1} .

Analogicznie jak w przypadku modeli PCA sporządzanych dla wcześniej analizowanych układów, również w przypadku modelowych błon DPPC/Chol wyznaczenie udziałów poszczególnych czynników w całkowitej zmienności absorbancji w systemie doprowadziło do otrzymania maksymalnej ilości informacji z danych wyjściowych. Optymalna projekcja danych umożliwiła uzyskanie wykresu wartości czynnikowych, obrazującego wzajemne powiązania między widmami NIR zarejestrowanymi w funkcji wzrastającej temperatury. **Rysunek 13** ilustruje opisane wyżej korelacje.

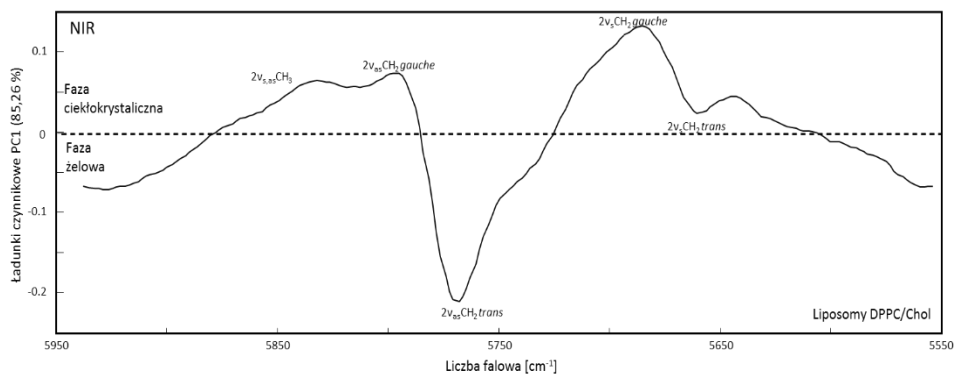


Rysunek 13. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPC/Chol mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 13. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPC/Chol liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Charakterystyczna relacja między uzyskanymi z analizy PCA punktami odpowiadającymi wartościom czynnikowym otrzymanym dla widm mierzonych w kolejnych temperaturach, pozwoliła na dopasowanie do ich przebiegu krzywej, która ma kształt sigmoidalny. Ze zbliżonymi wartościami czynnikowymi dla czynnika pierwszego utożsamiany jest paralelizm widm przez nie charakteryzowanych. Znaczna zmiana wartości czynnikowych cechuje z kolei widma zdecydowanie się od siebie różniące.

Oprócz wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury, z analizy PCA uzyskano także wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej. Wykres ten przedstawia modyfikacje absorbancji przy kolejnych wartościach liczb falowych w poddanym analizie zakresie spektralnym, która odpowiada udziałowi czynnika pierwszego w całkowitej zmienności spektralnej układu. Znaczna wartość ładunku czynnikowego sugeruje duży udział zmian absorbancji przy danej wartości liczby falowej w proces mający miejsce w badanym systemie. Na **Rysunku 14** przedstawiono wykres ładunków czynnikowych, na którym zilustrowane zostało, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych NIR zauważalne są największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej.



Rysunek 14. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPC/Chol mierzonych w zakresie NIR

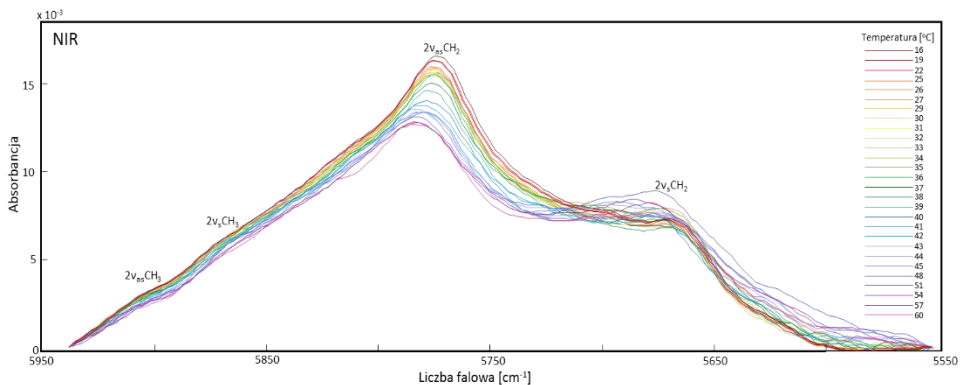
Figure 14. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPC/Chol liposomes measured in the NIR range

Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury jest typowym dla tego rodzaju systemów efektem mającym miejsce w studiowanym układzie lipidowym DPPC/Chol procesu głównego przejścia fazowego. Ujemne wartości czynnikowe charakteryzują modelową błonę w niskotemperaturowej fazie żelowej. Dodatnie utożsamiane są z kolei z wysokotemperaturowym stanem ciekłokrystalicznym dwuwarstwy. Stwierdzenie to opiera się na porównaniu zależności wartości czynnikowych z adekwatnymi zmianami na wykresach ładunków czynnikowych. Kształt przebiegu krzywej wartości czynnikowych w funkcji temperatury dla lipidowych systemów DPPC/Chol jest jednak znacznie bardziej „płaski” i nie tak „skokowy”, jak miało to miejsce w przypadku analogicznego wykresu niedomieszkiwanego cholesterolu czystych błon DPPC. Podłoża takiego efektu doszukiwać się należy we wspomnianym już w niniejszej pracy spadku kooperatywności głównego przejścia fazowego determinowanego przez obecność w strukturze błon lipidowych molekuł Chol [34,37,38,45-51]. Do wyznaczenia wartości temperatury głównego przejścia fazowego posłużyło zlokalizowanie miejsca przegięcia krzywej sigmoidalnej, determinujące równocześnie, między którymi mierzonymi w funkcji temperatury widmami pojawiają się największe różnice spektralne. Dla układu DPPC/Chol wartość ta wynosiła $T_m = 40,3$ °C i korelowała z danymi literaturowymi [142,143].

Wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej dla poddanego analizie zakresu spektralnego umożliwiły przeprowadzenie analizy stanu konformacyjnego modelowej dwuwarstwy DPPC/Chol w każdej z faz oraz ustalenie kierunku modyfikacji stanu konformacyjnego obserwowanych w trakcie trwania procesu głównego przejścia fazowego. Niskotemperaturową fazę żelową cechowało występowanie ładunków czynnikowych z maksimami zlokalizowanymi w pozycjach 5662 i 5775 cm^{-1} , mających wartości ujemne utożsamiane ze znaczną liczebnością konformerów *trans*. Zaś dla wysokotemperaturowej fazy ciekłokrystalicznej charakterystyczna jest obecność dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych 5672 i 5785 cm^{-1} . Są one efektem drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych bogatych w wiązania w konformacji *gauche* między atomami węgla.

Kolejnym dowodem na rozluźnienie struktury dwuwarstwowej w fazie ciekłokrystalicznej i wynikające z tego wzmożone ruchy konformacyjne w obszarze końcowych fragmentów łańcuchów alifatycznych cząsteczek tworzących błonę, jest pojawienie się maksimum ładunków czynnikowych o niewielkiej intensywności przy wartościach liczb falowych odpowiadającym drganiom $2\nu_{as,s}$ terminalnych grup CH_3 [82,279]. Podsumowując – w inkorporowanych cząsteczkami Chol modelowych błonach DPPC, podobnie, jak w przypadku czystych dyspersji liposomowych DPPC zachodzi temperaturowo-zależny proces głównego przejścia fazowego, który zdefiniowany został dzięki otrzymanemu w analizie PCA pierwszemu czynnikowi (PC1).

Badania NIR modelowych błon DPPG/Chol – do uzyskania pełnego obrazu dotyczącego poziomu oddziaływania molekuł Chol na poddane analizie układy błonowe, przeprowadzono analogiczne, jak dla obojętnych błon DPPC/Chol badania posiadających ujemny ładunek w hydrofilowym obszarze dwuwarstwy systemów DPPG/Chol. W poddanej analizie układzie DPPG/Chol udział molowy cholesterolu wynosił 10 mol%. Pomiary przy pomocy spektroskopii NIR przeprowadzone zostały w funkcji temperatury na dyspersjach liposomowych DPPG/Chol. Analizowano zachodzące w obrębie hydrofobowych fragmentów dwuwarstw lipidowych modyfikacje strukturalne, których odzwierciedlenie spektralne znaleźć można w interpretacji zmian parametrów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}$ CH_2 [13,110]. Ewolucje spektralne wspomnianych sygnałów opierały się na spadku ich intensywności, wzroście szerokości połówkowej oraz wysoko-częstościowym przesunięciu maksimum pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów acylowych cząsteczek lipidów tworzących modelowe błony lipidowe [110]. Zależne od temperatury modyfikacje rejonów widm NIR zawierających pierwsze nadtony drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych w łańcuchach alifatycznych molekuł DPPG układów liposomowych DPPG/Chol, ilustrujących reorganizację hydrofobowego obszaru analizowanych dwuwarstw, przedstawione zostały na **Rysunku 15**.



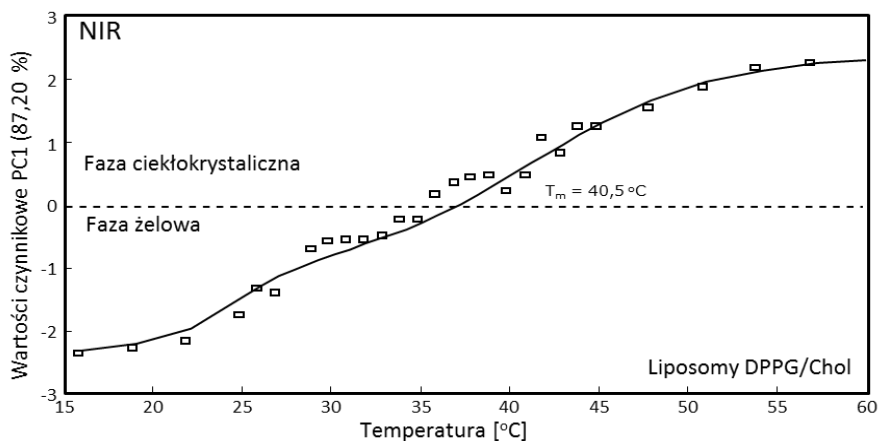
Rysunek 15. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPG/Chol

Figure 15. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPG/Chol systems

Określona konfiguracja sygnałów będąca następstwem drgań grup metylenowych i metyloowych w łańcuchach węglowodorowych molekuł lipidów zilustrowana została na

powyższym rysunku. Modyfikacje spektralne wynikające z podwyższenia temperatury układu podczas pomiarów są skorelowane ze wzrostem udziału konformerów *gauche* w wiązaniach C-C w obrębie hydrofobowego obszaru dwuwarstw DPPG/Chol. Analiza PCA wspomnianego zakresu pozwoliła na otrzymanie wyczerpujących informacji odnośnie molekularnego podłoża zachodzących w układzie zmian. Powiązano je z głównym przejściem fazowym modelowych dwuwarstw DPPG/Chol z uporządkowanej fazy żelowej do rozluźnionej fazy ciekłokrystalicznej będącego rezultatem izomeryzacji *trans/gauche* grup CH₂ łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów analizowanych błon.

Analiza PCA widm modelowych błon DPPG/Chol zmierzonych w zakresie NIR – przeprowadzona została na zakresie spektralnym monitorującym temperaturowo-zależne modyfikacje w układzie DPPG/Chol. Dominująca składowa (87,20 %) widocznych na widmach NIR zmienności w analizowanym systemie determinowana jest zachodzeniem pod wpływem wzrostu temperatury głównego procesu strukturalnego. Na całkowitą zmienność absorbancji odpowiadają poza tym dostrzegalne na widmach losowe modyfikacje absorbancji, których podłożem są nieidealne odjęcie widm wody od widm dyspersji liposomowych oraz nieprecyzyjna korekcja linii bazowej jak również dostrzegalne na widmach szumy. Macierz otrzymana dzięki połączeniu zarejestrowanych w funkcji temperatury fragmentów widm NIR w zakresie 5940-5555 cm⁻¹ posłużyła do obliczenia modelu PCA. Korelacje pomiędzy widmami w kolejnych temperaturach zaprezentowano na **Rysunku 16** jako zależność wartości czynnikowych w funkcji temperatury.

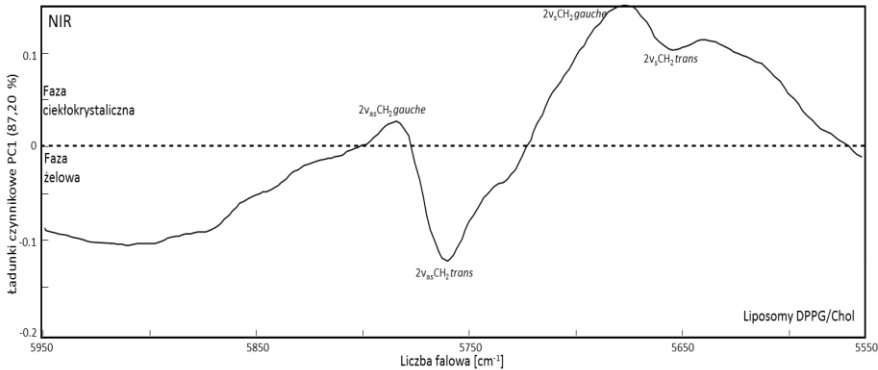


Rysunek 16. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPG/Chol mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 16. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPG/Chol liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Monitorowanie przebiegu procesu mającego miejsce w studiowanych modelowych błonach DPPG/Chol możliwe było dzięki stworzeniu modelu PCA. Zaprezentowany na **Rysunku 16** wykres wartości czynnikowych w funkcji temperatury charakteryzuje poziom podobieństwa ilustrowanych przez nie widm. Przebieg punktów definiujących wartości czynnikowe w kolejnych temperaturach ma charakterystyczny dla układów lipidowych sigmoidalny kształt. Z analizy PCA otrzymano również wykres wartości ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej. Obrazuje on zmiany absorbancji przy

określonych wartościach liczb falowych w badanym zakresie spektralnym determinowane zmianami strukturalnymi związanymi z przebiegiem procesu głównego przejścia fazowego. **Rysunek 17** przedstawia wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczb falowych, na którym zauważyć można, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach NIR pojawiają się największe zmiany odpowiednio dla fazy żelowej oraz ciekłokrystalicznej.



Rysunek 17. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPG/Chol mierzonych w zakresie NIR

Figure 17. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPG/Chol liposomes measured in the NIR range

Przeprowadzenie analizy PCA pozwoliło na określenie rodzaju zachodzącego w badanym układzie DPPG/Chol procesu. Przebieg wykresu wartości czynnikowych wyznaczanych w funkcji wzrastającej temperatury ma typowy dla układów modelowych dwuwarstw fosfolipidowych, sigmoidalny kształt, wynikający z zachodzącego w nim procesu głównego przejścia fazowego. Ujemne wartości czynnikowe cechują niskotemperaturową fazę żelową modelowej błony DPPG/Chol, zaś dodatnie odzwierciedlają wysokotemperaturowy stan ciekłokrystaliczny bilamelarnego systemu. Podstawą do wysnucia takiego wniosku są relacje między wykresem wartości czynnikowych i wykresem ładunków czynnikowych.

Analogicznie jak dla układów DPPC/Chol, również w przypadku domieszkowanych cholesterolu ujemnie naładowanych błon DPPG zauważalny jest „spłaszczony” kształt krzywej wartości czynnikowych w funkcji temperatury w stosunku do czystych dwuwarstw DPPG. Widoczny spadek kooperatywności przejścia fazowego zachodzącego w modelowych błonach DPPG/Chol wynika z występowania cząsteczek cholesterolu w strukturze analizowanych systemów [34,37,38,45-51]. Wyznaczenie wartości temperatury głównego przejścia fazowego Układu DPPG/Chol możliwe było dzięki zlokalizowaniu miejsca przegięcia krzywej sigmoidalnej definiującej, między którymi widmami rejestrowanymi w funkcji temperatury widoczne są największe zmiany parametrów spektralnych. Otrzymana wartość $T_m = 40,5$ °C, jest zgodna ze znanymi danymi literaturowymi [142,143].

Klasyfikacja stanu konformacyjnego modelowej błony DPPG/Chol odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej a także określenie tendencji jego zmian wynikających z faktu zachodzenia procesu głównego przejścia fazowego możliwe było dzięki analizie wykresów ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej charakteryzowanego zakresu spektralnego. Niskotemperaturowa faza żelowa określona

została przez ujemne wartości ładunków czynnikowych z maksimum w pozycji 5775 cm^{-1} , za które odpowiada znaczna ilość konformerów *trans*. Z kolei wysokotemperaturowej fazie ciekłokrystalicznej odpowiada obecność dodatnich maksimumów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych 5672 i 5785 cm^{-1} . Maksima te są konsekwencją drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów alifatycznych bogatych w konformery *gauche* między atomami węgla [82,136]. Ilustrowany przez otrzymany z analizy PCA pierwszy czynnik główny, potwierdza, iż proces głównego przejścia fazowego zachodzi pod wpływem wzrostu temperatury w układzie DPPG/Chol, analogicznie, jak w niedomieszkowanych molekułami cholesterolu ujemnie naładowanych dwuwarstw DPPG.

UWAGI KOŃCOWE

W prezentowanych badaniach zastosowano po raz pierwszy analizę pierwszych nadtonów drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów budujących struktury dwuwarstwowe do określenia przejść fazowych mających miejsce w strukturach liposomowych. Podłoża strukturalnego wspomnianych przejść fazowych upatrywać należy w modyfikacjach konformacyjnych *trans/gauche* wiązań między atomami węgla w łańcuchach węglowodorowych stanowiących hydrofobową część poddawanych analizie modelowych błon lipidowych. Ewolucja parametrów spektralnych zarówno dla drgań ν_s i ν_{as} grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów jak i ich pierwszych nadtonów przebiegała w sposób analogiczny. Wykazano zatem, że metoda spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR może z powodzeniem stanowić alternatywę stosowanej powszechnie techniki FT-IR w zakresie MIR, gdy np. istnieją techniczne przeszkody uniemożliwiające zastosowanie tej drugiej.

Analiza widm zmierzonych dla układów błonowych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR w funkcji wzrastającej temperatury umożliwiła zaobserwowanie ewolucji szeregu parametrów spektralnych tj. spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz przesunięcie w kierunku wyższych wartości liczb falowych maksimumów pasm pochodzących od drgań $2\nu_s$ i $2\nu_{as}$ grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów. Dzięki zastosowaniu analizy PCA możliwe było wyodrębnienie obszarów na widmach absorpcyjnych, w których pod wpływem temperatury zaobserwowano największe zmiany parametrów spektralnych odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej badanej błony. Analiza PCA pozwoliła również na uzyskanie informacji na temat ewolucji procesu głównego przejścia fazowego, który ma miejsce w hydrofobowym obszarze dwuwarstw lipidowych, a także na określenie wartości temperatur głównego przejścia fazowego dla wszystkich mierzonych układów błonowych.

Porównanie fosfolipidów charakteryzujących się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi miało na celu na uzyskanie wielostronnego i przez to bardziej obiektywnego obrazu zjawisk obserwowanych w modelowych błonach lipidowych oraz odniesienie ich do tych mających miejsce w różnych obszarach naturalnych dwuwarstw. Realizacja postawionego w niniejszym eksperymencie zadania była możliwa dzięki wykorzystaniu techniki spektroskopii oscylacyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR) i bliskiej podczerwieni (NIR), w funkcji wzrastającej temperatury, wspomaganą, w celu wyodrębnienia specyficznej wariacji wywołanej badanym efektem, analizą chemometryczną PCA. Spektroskopia FT-IR w zakresie NIR zastosowana została po raz pierwszy do monitorowania modyfikacji zachodzących w hydrofobowym rejonie mode-

lowych dwuwarstw lipidowych. Wykazano, iż z powodzeniem może ona stanowić alternatywę do używanej powszechnie w badaniu tego rodzaju układów techniki FT-IR w zakresie MIR.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Budowa i dynamika błony, w *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [2] A. Kozubek, A. F. Sikorski, J. Szopa, Molekularna organizacja komórki, t. II: Lipidy, liposomy i błony biologiczne, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 1996.
- [3] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła, Błony biologiczne, Śląsk – Wydawnictwo Naukowe, Katowice – Warszawa, 2003.
- [4] L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.
- [5] M. Bryszewska, W. Leyko, *Biofizyka dla biologów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997.
- [6] A. Kozubek, *Wstęp do technologii liposomowej*, Wrocław 2004.
- [7] J. R. Trudell, D. G. Payan, J. H. Chin, E. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **373**, 436.
- [8] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, G. Poste, G. Shepherd, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **394**, 504.
- [9] J. M. Vanderkooi, R. Landesberg, H. Selick II, G. G. McDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **464**, 1.
- [10] H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **779**, 381.
- [11] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J. M. Ruyschaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1422**, 105.
- [12] P. Garidel, A. Blume, W. Hübner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1466**, 245.
- [13] J. M. Chlammers, P. R. Griffith, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, t. 1-5, John Wiley & Sons, London, 2002.
- [14] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996.
- [15] A. S. Kassis, *Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy (ATR-IR) as an In Situ Technique for Dissolution Studies*, Seton Hall University, 2011.
- [16] L. Piel, *Idee chemii kwantowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006.
- [17] K. Cieślík-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, A. Koll, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15495.
- [18] K. Cieślík-Boczula, B. Czarnik-Matuszewicz, M. Perevozkina, A. Filarowski, N. Boens, W. M. de Borggraeve, A. Koll, *J. Mol. Struct.*, 2008, **878**, 162.
- [19] R. A. Dluhy, S. M. Stephens, S. Widayati, A. D. Willims, *Spectrochim. Acta A*, 1995, **51**, 1413.
- [20] H. Fabian, C. P. Schultz, *Fourier transform infrared spectroscopy of peptide and protein analysis*, w: R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [21] L. K. Tamm, S. A. Tatulian, *Q Rev. Biophys.*, 1997, **30**, 365.
- [22] J.L.R. Arrondo, F. M. Goñi, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **96**, 53.
- [23] H. R. Matthews, R. A. Freedland, R. I. Miesfeld, *Biochemia i biologia molekularne w zarysie*, Wydawnictwo Prószyński i S-ka, Warszawa, 2000.
- [24] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, *Biology*, Thomson Books/Cole, Belmont USA, 2008.
- [25] M. Pasenkiewicz-Gierula, *KOSMOS*, 2009, **58**, 49.
- [26] G. Karp, *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, John Wiley, 2010.
- [27] B. Alberts, *Podstawy biologii komórek 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005.
- [28] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill Jr., R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Sepner, G. Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2005, **107**, 337.
- [29] J. Ulander, A. D. J. Haymet, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3475.
- [30] R. Harrison, G. G. Lunt, *Błony biologiczne struktura i funkcje*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1980.

- [31] A. Blume, Lipids, w D. Waltz, J. Teissie, G. Milazzo (Eds.) *Biochemistry of Membranes*, Birkhäuser, Verlag Basel/Switzerland, 2004.
- [32] A.S. Janoff, K.W. Miller, w D. Chapman (Ed.), *Biological Membranes*, t. 4 (strony: 417-467), Academic Press, New York, 1982.
- [33] M. F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, T. Heimburg, *PNAS*, 1999, **96**, 14312.
- [34] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte, *Prog. Lipid. Res.*, 2002, **41**, 393.
- [35] M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Róg, K. Kitamura, A. Kusymi, *Biophys. J.*, 2000, **78**, 1376.
- [36] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2009, **1788**, 97.
- [37] T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2004, **8**, 459.
- [38] O. Soubias, F. Jolibois, A. Milon, V. Réat, *Compets. Rendus. Chimie*, 2006, **9**, 393.
- [39] A.M. Smondyrev, M.L. Berkowitz, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2075.
- [40] D. Marquardt, N. Kučerka, S.R. Wassall, T.A. Harroun, J. Katsaras, *Chem. Phys. Lipids*, 2016, **199**, 17.
- [41] National Center for Biotechnology Information, USA.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>, 2017 (dostęp: 8.11.2017).
- [42] N. Borochof, E.J. Wachtel, D. Bach, *Chem. Phys. Lipids*, 1995, **76**, 85.
- [43] P.W.M. van Dijck, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **555**, 89.
- [44] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochem.*, 1993, **32**, 516.
- [45] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 345.
- [46] K.M.G. Taylor, R.M. Morris, *Thermochim. Acta*, 1995, **248**, 289.
- [47] M.G.K. Benesch, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids*, 2015, **191**, 123.
- [48] M.G.K. Benesch, R.N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids*, 2016, **195**, 21.
- [49] M.G.K. Benesch, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 168.
- [50] F. de Meyer, B. Smit, *PNAS*, 2009, **106**, 3654.
- [51] E. Gorter, F. Grendel, *J. Experiment. Med.*, 1925, **41**, 439.
- [52] B. D. Hames, N. M. Hooper, J. D. Houghton, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
- [53] J. S. Singel, G. L. Nicolson, *Science*, 1972, **175**, 720.
- [54] J. Koolman, K. H. Roehm, *Color atlas of biochemistry*, Thieme, New York, 2005.
- [55] P. A. Mayes, *Lipidy o znaczeniu fizjologicznym*, D. K. Granner, Błony: struktura, organizacja i funkcja, w *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998.
- [56] C. A. Ville, *Błony plazmatyczne*, w *Biologia*, Wydanie VIII według VII wydania amerykańskiego, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1987.
- [57] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2002.
- [58] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 2012, **1**, 147.
- [59] Y. P. Patil, S. Jadhav, *Chem. Phys. Lip.*, 2014, **177**, 8.
- [60] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, *ISRN Pharm*, 2012, **2012**.
- [61] V. V. Mody, M. I. Nounou, M. Bikram, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 795.
- [62] J. S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari, *Int. J. Pharm. Stud. Res.*, 2012, **3**, 14.
- [63] K. P. S. Kumar, D. Bhowmik, L. Deb, *Pharma Innovation*, 2012, **3**, 29.
- [64] H. Anwekar, S. Patel, A. K. Singhai, *Int. J. Pharm. Life Sciences*, 2011, **2**, 945.
- [65] A. D. Bangham, *Adv. Lipid Res.*, 1963, **1**, 63.
- [66] D. Papahadjopoulos, N. Miller, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1967, **135**, 624.
- [67] D. Papahadjopoulos, J. C. Watkins, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1967, **135**, 639.
- [68] G. Sessa, G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, 1968, **9**, 310.
- [69] A. Sharma, U.S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, 1997, **154**, 123.
- [70] A. Gómez-Hens, J. M. Fernández-Romero, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 9.
- [71] D. D. Lasic, *Biochem. J.*, 1988, **256**, 1.
- [72] D. D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, 1993.
- [73] A. Wagner, K. Voraue-Uhl, *J. Drug. Deliv.*, 2011, **2011**, 1.

- [74] N. Düzgüneş, G. Gregoriadis, Introduction: the origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham (strony: 1-3), D. Nejat (Ed.), *Methods in enzymology*, Academic Press, San Diego, 2005.
- [75] C. H. Huang, *Biochem.*, 1969, **8**, 344.
- [76] R. H. Müller, G. E. Hildebrand, R. Jachowicz, A. A. Kubicz, J. Klawe, M. Bröker, *Technologia nowoczesnych postaci leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2003.
- [77] Y. Barenholtz, S. Amselem, D. Lichtenberg, *FEBS Lett.*, 1979, **99**, 210.
- [78] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1979, **557**, 9.
- [79] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1376**, 91.
- [80] K. Brandenburg, P. Garidel, J. Howe, J. Andrä, L. Hawkins, M. H. J. Koch, U. Sydel, *Thermochim. Acta*, 2006, **445**, 133.
- [81] D. Chapman, *Q Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [82] K. Cieślik, A. Koll, J. Grdadolnik, *Vibr. Spectr.*, 2006, **41**, 14.
- [83] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 711.
- [84] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers*, w P. L. Yeagle, *The Structure of Biological Membranes*, CRC Press, 2004.
- [85] A. Henrich, K. Michalak, *Ćwiczenia laboratoryjne z biofizyki. Skrypt dla studentów medycyny*, Wyd. Akademii Medycznej we Wrocławiu, Wrocław, 2002.
- [86] J. M. Seddon, R. H. Templer, *Polymorphism of lipid – water systems* w R. Lipowsky, E. Sackman (Eds.), *Handbook of Biological Physics*, t. 1 (strony: 97-151), Elsevier Science B. V., 1995.
- [87] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **96**, 9.
- [88] T. Le Bihan, M. Pezolet, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **94**, 13.
- [89] E. Okamura, J. Umemura, T. Takenaka, *Vibr. Spectr.*, 1991, **2**, 95.
- [90] D. M. Small, R. A. Zoeller, *Lipids, Structure and Biochemistry*, w *Encyclopedia of Human Biology*, t. 4 (strony: 725-748), Academic Press, Inc., 1991.
- [91] D. Marsh, *Chem. Phys. Lip.*, 165 (2012) 59-76.
- [92] S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R. M. Suter, C. R. Worthington, W. J. Sun, J. F. Nagle, *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1097.
- [93] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**, 2347.
- [94] N. Kučerka, M. P. Nieh, J. Katsaras, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1808**, 2761.
- [95] A. I. Boyanov, R. D. Koynova, B. G. Tenchov, *Chem. Phys. Lip.*, 1986, **39**, 155.
- [96] K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 954.
- [97] M. Kranenburg, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 6553.
- [98] J. M. Rodgers, J. Sørensen, F. J. M. de Meyer, B. Schiott, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 1551.
- [99] M. Eeman, M. Deleu, *Biotechnol. Argon Soc. Environ.*, 2010, **14**, 719.
- [100] D. Chapman, *Q Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [101] S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **79**, 3862.
- [102] M. Budai, Zs. Szabó, M. Szógyi, P. Gróf, *Int. J. Pharma*, 2003, **250**, 239.
- [103] N. Usova, L. Persson, P.-O. Westlund, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 2785.
- [104] M. Raguz, L. Mainali, J. Widomska, W. K. Subczyński, *Chem. Phys. Lip.*, 2011, **164**, 819.
- [105] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, *Int J Pharm*, 2011, **417**, 138.
- [106] B. Ruozzi, D. Belletti, A. Tombesi, G. Tosi, L. Bondioli, F. Forni, M.A. Vandelli, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 557.
- [107] N. Škalko, J. Bouwstra, F. Spies, M. Stuart, P. M. Frederik, G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1370**, 151.
- [108] K.A. Okotrub, S.Y. Amstislavsky, N.V. Surovtsev, *Arhiv. Biochem. Biophys.*, 2017, **635**, 37.
- [109] X. Bin, I. Zawisza, J. D. Goddard, J. Lipkowski, *Langmuir*, 2005, **21**, 330.
- [110] J. Workman Jr., L. Weyer, *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*, 2nd Edn., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2012.
- [111] M. Buback, A. A. Harfoush, *Z. Naturforsch. A*, 1983, **38**, 528.
- [112] L. Ricard-Lespade, G. Longhi, S. Abbate, *Chem. Phys.*, 1990, **142**, 245.
- [113] J. Mazerski, *Chemometria z lotu ptaka*, w: D. Zuba, A. Parczewski (Eds.), *Chemometria w nauce i praktyce*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2009.

- [114] N. Kumar, A. Bansal, G. S. Sarma, R. K. Rawal, *Talanta*, 2014, **123**, 186.
- [115] I. Singh, P. Juneja, B. Kaur, P. Kumar, *ISRN Anal. Chem.*, 2013, **2013**, 1.
- [116] R. G. Brereton, *Analyst.*, 1987, **112**, 1635.
- [117] B. Krakowska, D. Custers, E. Deconinck, M. Daszykowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **127**, 112.
- [118] E. Szymańska, J. Gerretzen, J. Engel, B. Geurts, L. Blanchet, L. M. C. Buydens, *Trends Anal. Chem.*, 2015, **69**, 34.
- [119] M. Daszykowski, B. Walczak, *Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych*, w: D. Zuba, A. Parczewski (Eds.), *Chemometria w analityce*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2008.
- [120] T. Laskowski, J. Mazerski, *Chemometria w praktyce. Ćwiczenia laboratoryjne*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2011.
- [121] J. Kupis, *Chemometria*, w: J. Kupis, M. Skowron-Jaskólska, D. Szczukocki, B. Krawczyk, *Metrologia i Chemometria w Analityce Środowiska*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 2016.
- [122] J. Mazerski, *Podstawy chemometrii*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2000.
- [123] A. Astel, J. Mazerski, J. Namieśnik, *Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach analitycznych środowiska*, w: J. Namieśnik, W. Crzanowski, P. Szpinek (Eds.), *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiska*, Centrum Dokładności Analityki i Monitoringu Środowiska, Gdańsk, 2003.
- [124] J.E. Jackson, *A User's Guide to Principal Components*, Wiley & Sons, New York, 1991.
- [125] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz, *Chemometrics: a Practical Guide*, Wiley, 1998.
- [126] O. Y. Rodionova, L. P. Houmøller, A. L. Pomerantsev, P. Geladi, J. Burger, V. L. Dorofeyev, A. P. Arzamastsev, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **549**, 151.
- [127] A. Rohman, Y. B. Che Man, *Vibr. Spectr.*, 2011, **55**, 141.
- [128] A. Porfire, I. Tomuta, L. Tefas, S. E. Leucuta, M. Achim, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **63**, 87.
- [129] H. L. Huang, P. Antonelli, *J. Appl. Meteorol.*, 2001, **40**, 365.
- [130] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, P. Świątek, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, W. Malinka, *Chem. Phys.*, 2015, **458**, 9.
- [131] J. Petrus, B. Czarnik-Matusewicz, R. Petrus, K. Cieślík-Boczula, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, *Chem. Phys. Lip.*, 2015, **186**, 51.
- [132] O. Wesołowska, J. Gąsiorowska, J. Petrus, B. Czarnik-Matusewicz, K. Michalak, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2014, **1838**, 173.
- [133] K. Cieślík-Boczula, *Chem. Phys. Lip.*, 2018, **214**, 24.
- [134] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *Vibr. Spectr.*, 2016, **85**, 55.
- [135] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectr.*, 2017, **186**, 37.
- [136] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *J. Mol. Struct.*, 2018, **1162**, 17.
- [137] A. Murawska, K. Cieślík-Boczula, B. Czarnik-Matusewicz, *J. Mol. Struct.*, 2012, **974**, 183.
- [138] K. Cieślík-Boczula, P. Świątek, A. Jaszczyszyn, P. Zawilska, K. Gąsiorowski, W. Malinka, G. Köhler, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 3605.
- [139] K. Cieślík-Boczula, J. Maniewska, G. Gryniewicz, W. Szeja, A. Koll, A. B. Hendrich, *Vib. Spectrosc.*, 2012, **62**, 64.
- [140] K. Cieślík-Boczula, S. Küpcü, D. Rünzler, A. Koll, G. Köhler, *J. Mol. Struct.*, 2009, **919** 373.
- [141] C. Tosi, A. Pinto, *Spectrochim. Acta A Mol. Spectrosc.*, 1972, **28**, 585.
- [142] A. B. Hendrich, O. Wesołowska, K. Michalak, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1510**, 414.
- [143] Avanti Polar Lipids Inc., *Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids*, <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/> (dost.16.11.17).
- [144] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, **66**, 199.
- [145] J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, *Phospholipids*, Elsevier Biomedical Press, Nowy Jork, 1982.
- [146] R. B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, Nowy Jork, 1989.
- [147] I. Vorobyov, T. W. Allen, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1808**, 1673.
- [148] C. J. DaCosta, S. A. Medaglia, N. Lavigne, S. Wang, C. L. Craswell, J. E. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33841.
- [149] A. M. Powl, J. M. East, A. G. Lee, *Biochemistry*, 2005, **44**, 5873.

- [150] F. I. Valiyaveetil, Y. F. Zhou, R. Mackinnon, *Biochemistry*, 2002, **41**, 10771.
- [151] Y. P. Zhang, R. N. Lewis, R. N. McElhaney, *Biophys. J.*, 1997, **72**, 779.
- [152] J. Pan, F. A. Heberle, S. Tristram-Nahle, M. Szymański, M. Koepfinger, J. Katsaras, N. Kučerka, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1818**, 2135.
- [153] R. M. Epand, B. Gabel, R. F. Epand, A. Sen, S. W. Hui, A. Muga, W. K. Surewicz, *Biophys. J.*, 1992, **63**, 327.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 marca 2023 r.