

Janina Kuczera

WPLYW AMFIFILOWYCH DETERGENTÓW NA BŁONY LIPOSOMÓW1. WSTĘP

Jedną z najczęściej stosowanych błon modelujących błonę biologiczną jest błona liposomów. Liposomami nazywane są układy złożone z koncentrycznych, dwumolekularnych warstw fosfolipidowych, które tworzą zamknięte pęcherzyki. Sferyczne liposomy jednowarstwowe stanowią szczególnie dogodny model do badania procesów transportu substancji przez błony modyfikowane i niemodyfikowane.

Istnieje bardzo obszerna grupa substancji biologicznie czynnych, które oddziałując z błonami biologicznymi wpływają modyfikująco na ich strukturę i funkcje. Do grupy tej należą m.in. antybiotyki, anestetyki i środki bakterio-, chwasto- i grzybobójcze. Wpływ tych substancji polega bardzo często na zaburzeniu podstawowych procesów membranowych, którymi są m.in. procesy przenikania substancji przez błony komórkowe. Wpływ tych substancji (zwanych niekiedy permeatoksynami) zaburzających procesy przenikania innych substancji jest ściśle związany z zaburzeniami procesów metabolicznych w całej komórce, które z kolei mogą prowadzić do stanów patologicznych organizmów żywych, a nawet ich całkowitego zniszczenia. Poznanie mechanizmów działania permeatoksyn może mieć, poza znaczeniem poznawczym, również znaczenie aplikacyjne.

2. MODELE BŁON BIOLOGICZNYCH I BŁONY MODELowe

Badania nad strukturą i funkcją błon biologicznych znajdują się od wielu lat w centrum zainteresowań zarówno biologów, jak i biochemików, i biofizyków. Powstało wiele koncepcji dotyczących molekularnej organizacji błon. Chociaż liczba tych koncepcji

sięga ok. 50 [91], nie znaleziono do tej pory takiego modelu, który byłby w stanie wyjaśnić wszystkie jej funkcje. We wszystkich prawie modelach, poczynawszy od pierwszego, opartego na badaniach fizycznych, modelu G o r t e r a-G r e n d e l a z 1925 r. [58] poprzez uznawany przez wiele lat model D a n i e l l i e g o-D a v s o n a z 1935 r. [32] oraz wiele innych, aż do najnowszego modelu płynnej mozaiki, który został zaproponowany na początku lat siedemdziesiątych [166, 178] i zmodyfikowanego przez J a i n a i W h i t e'a w 1977 r. [91] domenowego modelu płynnej mozaiki, zakłada się istnienie w błonie biologicznej dwumolekularnej warstwy fosfolipidowej, stanowiącej rdzeń strukturalny tej błony.

W modelu G o r t e r a-G r e n d e l a błonę stanowi dwumolekularna warstwa lipidowa, w modelu D a n i e l l i e g o-D a v s o n a zakłada się, że taka sama, dwumolekularna warstwa lipidowa pokryta jest warstwą białek zarówno od strony ośrodka zewnętrznego, jak i od strony wnętrza komórki. W modelu płynnej mozaiki białka i lipidy tworzą mozaikę, w której fundament stanowi dwumolekularna warstwa lipidowa, a białka są rozłożone nie tylko na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni tej warstwy (tzn. białka powierzchniowe), lecz także wewnątrz warstwy (tzw. białka integralne). Rozkład białek i lipidów jest asymetryczny. Błona ta ma właściwości dynamiczne i charakteryzuje się płynnością. W domenowym modelu płynnej mozaiki przyjmuje się istnienie w błonie biologicznej pewnej ilości obszarów - domen o różnym składzie i różnym stopniu uporządkowania, przemieszczających się względem siebie [91, 97, 173].

Ze względu na złożoność błon biologicznych koncepcje dotyczące struktury i funkcji błon opierały się, w większości przypadków, na odpowiednich modelach doświadczalnych.

Wartość doświadczalnego modelu zależy od jego trafności i jego prostoty. Powinien on możliwie dokładnie odzwierciedlać pewne cechy obiektu, który ma modelować i musi być jednocześnie na tyle prosty, by pozwolić na kontrolowanie badanych parametrów w stopniu większym, aniżeli ma to miejsce w modelowanym obiekcie.

Można wyróżnić dwa rodzaje błon modelowych. Do pierwszej grupy należą takie, które nie są podobne do błon biologicznych ani pod względem składu chemicznego, ani pod względem poprzecznych wymiarów, ale są podobne pod względem pewnych właściwości. Przykładem może być tutaj syntetyczna błona jonowymienna, na któ-

rej można sprawdzać koncepcje jonowymiennych właściwości błony biologicznej. Nie można jednak na podstawie tego typu badań wnioskować np. o wzajemnej zależności między tą właściwością a strukturą błony biologicznej.

Drugą grupę błon modelowych stanowią błony uformowane z substancji wchodzących w skład błon biologicznych; mogą one mieć podobne wymiary poprzeczne oraz podobne niektóre cechy strukturalne. Błony takie umożliwiają badanie pewnych właściwości błon biologicznych, np. elektrycznych i niektórych funkcji błon, np. transportu substancji przez błony. Spośród błon tego typu najwcześniej została zastosowana lipidowa błona monomolekularna utworzona na powierzchni wody [18, 53, 58, 159]. Błona tego typu jest do dnia dzisiejszego szeroko stosowanym modelem, szczególnie użytecznym do badań nad oddziaływaniem lipidów z innymi cząsteczkami np. białkami [17, 39 182].

W 1962 r., udało się M u e l l e r o w i i współprac. [123] uformować dwumolekularną błonę lipidową (tzw. czarną błonę lipidową) oddzielającą dwa wodne ośrodki. Odkrycie to okazało się bardzo efektywne w badaniach modelowych, bowiem błona ta spełnia wiele warunków stawianych błonom modelowym. Błona ta ma taką strukturę, jaką wg powszechnych opinii charakteryzuje się warstwa lipidowa w błonach biologicznych. Wiele właściwości fizycznych tej błony jest podobnych do właściwości błon biologicznych (np. grubość, oporność i pojemność elektryczna, współczynniki przenikania dla niektórych substancji [84, 89, 147, 175, 180]). Model ten jest szczególnie dogodny do badania właściwości elektrycznych błon [176]. Błona czarna oprócz niewątpliwych zalet ma jednak pewne wady. Powierzchnia czarnej błony lipidowej, jaką udało się dotychczas uzyskać nie przekracza kilku milimetrów kwadratowych. Uniemożliwia to mierzenie przy jej użyciu dyfuzyjnych strumieni substancji przenikających przez błony. Wytrzymałość mechaniczna tej błony jest niewielka; czas życia waha się od kilku sekund do kilku godzin, co ogranicza prowadzenie bardziej długotrwałych badań. Błona ta, w odróżnieniu od błon biologicznych jest błoną płaską, nie można więc w badaniach uwzględniać zjawisk związanych z krzywizną błon biologicznych. W czarnej błonie oraz w roztworach otaczających tę błonę znajduje się zawsze pewna ilość rozpuszczalnika organicznego.

W 1965 r. B a n g h a m i współprac. [11] zastosowali dyspersję fosfolipidów w wodzie i w roztworach wodnych do badań

modelowych. Fosfolipidy te tworzą spontanicznie w roztworach wodnych układy, tzw. liposomy, złożone z wielu koncentrycznych, zamkniętych dwumolekularnych warstw, przedzielonych fazą wodną. Każda warstwa jest całkowicie zamkniętym pęcherzykiem. Przy zastosowaniu odpowiednich technik można uformować liposomy jednowarstwowe. Jeśli stężenie lipidów jest dostatecznie duże, wówczas i łączna powierzchnia błon liposomów jest dostatecznie duża, co pozwala na mierzenie strumieni dyfuzyjnych, nawet w przypadku słabo przenikliwych substancji. Czas życia liposomów wynosi kilka dni w temperaturach pokojowych, a kilka tygodni w temperaturach niższych [75]. Krzywizna błon liposomów jest porównywalna z krzywizną wielu błon biologicznych. W badaniach zjawisk membranowych przy użyciu liposomów można stosować wiele fizykochemicznych metod doświadczalnych, takich jak: wirowanie, przepuszczanie przez kolumny, elektroforezę, spektroskopię, m.in. NMR i EPR, mikrokalorymetrię i inne.

Liposomy i czarne błony fosfolipidowe są wzajemnie uzupełniającymi się modelami. Wybór modelu jest uzależniony od założonego celu badawczego. W przypadku więc potrzeby określenia np. parametrów elektrycznych stosujemy czarne błony fosfolipidowe, w przypadku natomiast potrzeby określania strumieni dyfuzyjnych stosujemy liposomy.

3. UKŁADY ZAWIERAJĄCE SUBSTANCJE AMFIFILOWE

3.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI AMFIFILOWYCH

Fosfolipidy oraz omawiane w tym artykule detergenty należą do związków amfifilowych o dualistycznym charakterze oddziaływań z wodą, ponieważ grupy polarne cząsteczek amfifilowych są hydrofilowe, a części niepolarne – hydrofobowe. W roztworach wodnych niektóre części grupy polarnej mogą przyjmować ładunek dodatni lub ujemny; są to np. grupy aminowe, siarczanowe, fosforanowe lub karboksylowe. Spotykamy również grupy elektrycznie obojętne np. grupy karbonylowe i estrowe. Grupy obojętne są mniej hydrofilowe niż grupy naładowane elektrycznie. Hydrofobowe części niepolarne omawianych związków są dobrze rozpuszczalne w wielu rozpuszalniakach organicznych, lecz tylko nieznacznie w wodzie; tymi niepolarnymi elementami cząsteczek amfifilowych mogą być grupy aromatyczne lub alifatyczne. Długie łańcuchy węglowodorowe dążą do

maksymalnego ograniczenia kontaktu z wodą i oddziałują na siebie znacznymi siłami dyspersyjnymi.

Substancje amfifilowe mogą tworzyć zarówno ciekłe kryształy termotropowe, jak i ciekłe kryształy liotropowe - inaczej mówiąc, substancje te wykazują mezomorfizm termotropowy i mezomorfizm liotropowy. Nieuwodnione substancje amfifilowe mogą istnieć w różnych postaciach ciekłokrystalicznych: lamelarnej, nematycznej i cholesterolowej w zależności od tego, jak ułożone są długie osie cząsteczek [45, 173].

Ciekłe kryształy w obecności wody mogą przyjmować różne formy: lamelarną oraz komórkową o trzech różnych strukturach. W kryształach lamelarnych dwumolekularne warstwy cząsteczek amfifilowych przedzielone są warstwami wody. W kryształach komórkowych komórki w kształcie prętów o rdzeniu organicznym lub wodnym ułożone są równolegle w układzie tetragonalnym lub heksagonalnym, a komórki kuliste lub graniaste uporządkowane są przestrzennie w sieci kubicznej. Występowanie poszczególnych form krystalicznych zależy od rodzaju substancji, temperatury oraz od ilości wody, która w zależności od rodzaju substancji zawiera się w zakresie 5-80% w stosunku do ilości tej substancji. Przy wzroście stężenia wody powyżej 30-90% następuje przedzielenie fazą wodną poszczególnych komórek (lub ich części) w przypadku kryształów komórkowych, albo też poszczególnych warstw lub układu warstw w przypadku kryształów lamelarnych. W pierwszym przypadku powstają agregaty koloidalne o strukturze radialnej tzw. micle, których wnętrze stanowią części hydrofobowe cząsteczek, a w drugim przypadku zamknięte struktury lamelarne - liposomy. Kształt tych agregatów zależy w dużej mierze od geometrii cząsteczek. W uproszczeniu można przyjąć, że cząsteczki o kształcie klinowym tworzą micle, a cząsteczki o kształcie cylindrycznym tworzą liposomy [87].

Klasyfikacja związków amfifilowych może być przeprowadzona w oparciu o ich zachowanie się w wodzie. Zgodnie z klasyfikacją S m a l l a [169] można je podzielić na trzy grupy: A - nierozpuszczalne i niepęczniejące w wodzie (np. cholesterol), B - nierozpuszczalne, lecz pęczniejące w wodzie, wykazujące mezomorfizm liotropowy (np. fosfolipidy), C - rozpuszczalne w wodzie: a - wykazujące mezomorfizm liotropowy (np. lizolecytyna, sole amoniowe), b - nie wykazujące mezomorfizmu liotropowego (np. sole kwasów żółciowych).

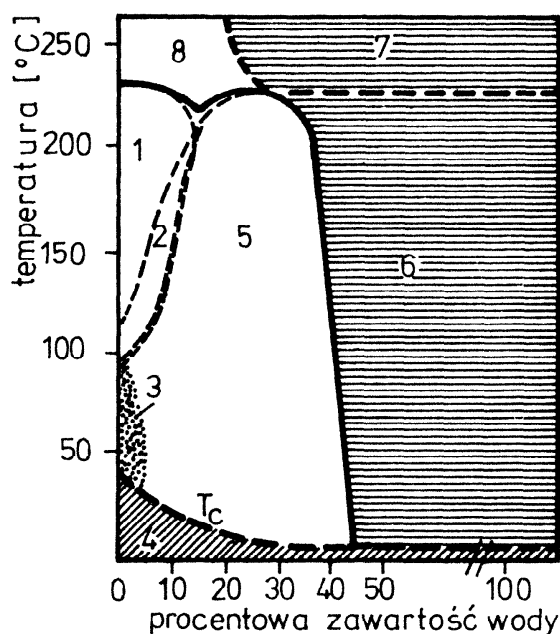
Substancje z grupy C, tj. substancje amfifilowe rozpuszczalne w wodzie i wykazujące równocześnie zdolność rozpuszczania lipidów nazywać będziemy detergentami. Termin ten w podanym znaczeniu używany jest w opracowaniach dotyczących membranologii [np. 10, 78, 171, 179].

3.2. UKŁAD FOSFOLIPIDY-WODA

Fosfolipidy stanowią grupę lipidów, w których jedna z grup hydroksylowych glicerolu została zastąpiona przez kwaśną sól kwasu fosforowego i organicznej zasady, tworząc w ten sposób część hydrofilową cząsteczki. Część niepolarną stanowią dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych (lub jeden w przypadku lizofosfatydów). Poszczególne fosfolipidy różnią się między sobą charakterem części polarnej, która może być jonowa lub amfolityczna oraz długością łańcuchów węglowodorowych i stopniem ich nienasycenia. Łańcuchy te zawierają na ogół od 12 do 24 atomów węgla i mogą posiadać podwójne wiązania. Podwójne wiązania występują zazwyczaj tylko w jednym łańcuchu, który usytuowany jest bliżej części polarnej cząsteczki [118].

Kształt cząsteczek fosfolipidowych jest w przybliżeniu cylindryczny. Grupa polarna usytuowana jest na końcu długiej osi cylindra, w wyniku czego część hydrofilowa jest wyraźnie oddzielona od części hydrofobowej. Z tych względów preferowaną formą ciekłych kryształów fosfolipidowych jest struktura lamelarna, aczkolwiek przy niskich stężeniach wody obserwuje się niekiedy struktury heksegonalne i kubiczne (rys. 1) [168]. Struktury krystaliczne, jakie tworzą różne fosfolipidy zależą, jak już wspomniano, od ilości wody, temperatury, ładunku grupy polarnej, kształtu cząsteczek oraz od właściwości ośrodka [26, 87]. Cząsteczki lecytyny tworzą w zasadzie kryształy o strukturze lamelarniej [76]. Fosfatydylcetanamina tworzy zarówno struktury lamelarne, jak i heksegonalne przy czym obydwie formy mogą współistnieć [111]. Nawet w przypadku fosfolipidów jonowych, w których tylko jeden ładunek elementarny przypada na grupę polarną, najbardziej stabilną formą jest forma lamelarna. Przy wyższym ładunku preferowaną formą są cylindryczne micle [129]. Struktura ciekłych kryształów fosfolipidowych zależy od innych substancji znajdujących się w ośrodku wodnym. Fosfatydyloseryna, fosfolipid

jonowy, tworzy formy radialne przy niskiej sile jonowej ośrodka, natomiast przy wysokiej sile jonowej tworzy struktury lamelarne. Działanie odpychające ładunków części polarnych jest bowiem neutralizowane wówczas przez przeciwjony rozpuszczonej soli [129]. Ułożenie grup polarnych cząsteczek lecytyny w warstwie powierzchniowej błony jest problemem dyskusyjnym. Ostatnio jednak przeważa pogląd, że główki ułożone są równoległe do powierzchni błony, a ich orientacja wynika z oddziaływań elektrostatycznych z sąsiednimi cząsteczkami [161, 190].



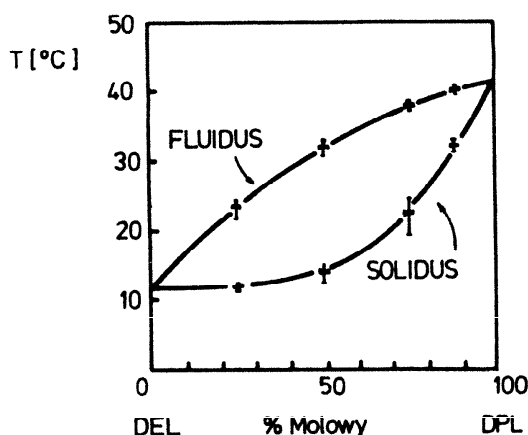
Rys. 1. Schemat dwuskładnikowego układu fazowego złożonego z lecytyny i wody w funkcji temperatury

1 - ciekłokrystaliczna faza heksagonalna; 2 - ciekłokrystaliczna faza kubiczna; 3 - obszar, w którym lamelarna faza ciekłokrystaliczna może współistnieć z inną ciekłokrystaliczną fazą; 4 - faza krystaliczna (żel); 5 - czysta faza lamelarna; 6 - obszar, w którym przy nadmiarze wody istnieją dwie fazy: woda i ciekłe kryształy lamelarne - liposomy; 7 - obszar, w którym przy wysokich temperaturach istnieją dwie fazy ciekłe: woda i fosfolipidy; 8 - jedna faza - ciekłe fosfolipidy

Linia T_c odpowiada temperaturze przejścia fazowego, temperaturze topnienia łańcuchów węglowodorowych (wg pracy 168)

Stopień uporządkowania łańcuchów w warstwach lamelarnych zależy od temperatury [26]. W dostatecznie niskich temperaturach łańcuchy alkilowe są sztywne, ułożone równoległe względem siebie i nachylone pod pewnym kątem względem powierzchni międzyfazowej.

Przy wzroście temperatury następują przejścia fazowe w pewnych, określonych temperaturach. U większości lipidów membranowych można wyróżnić dwa typy przejść konformacyjnych łańcuchów lipidowych - wstępne przejście fazowe i główne przejście fazowe. W temperaturze wstępnego przejścia fazowego łańcuchy zmieniają jedynie nachylenie, przyjmując kierunek prostopadły do powierzchni międzyfazowej z wodą. W temperaturze głównego przejścia fazowego, wyższej od temperatury wstępnego przejścia fazowego, następuje przejście fazowe ze stanu żelu do stanu ciekłokrystalicznego, łańcuchy tracą uporządkowanie i warstwa hydrofobowa uzyskuje znaczną płynność [26, 27, 64, 93, 94, 112]. Płynność warstwy hydrofobowej wzrasta wraz z odległością od części polarnej w głąb dwuwarstwy [33, 113].



Rys. 2. Diagram fazowy mieszanki fosfatydylocholin: dwupalmitynowej (DPL) i dwuelaidynowej (DEL) w funkcji temperatury (wg pracy [59]) (objaśnienia w tekście)

Temperatury przejść fazowych zależą od długości łańcuchów oraz stopni ich nienasycenia [12, 21]. Są one tym niższe, im krótsze są łańcuchy oraz im więcej mają nienasyconych wiązań. Temperatura ta jest również zależna od stopnia uwodnienia i budowy chemicznej części polarnej cząsteczek [184] i zależy ponadto od obecności kationów w ośrodku [133].

W temperaturach przejść fazowych następuje zmiana niektórych właściwości fizycznych fosfolipidów [26, 27, 154, 160].

Dwumolekularna warstwa lipidowa jest tworem dynamicznym. Cząsteczki dyfundują w płaszczyźnie błony (dyfuzja lateralna), jak również między obydwiema monomolekularnymi warstwami (flip-flop). Współczynnik dyfuzji lateralnej cząsteczek w błonie fosfolipidowej wynosi $(10^{-12} - 10^{-13}) \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, a częstotliwość wymiany ok. 10^7 s^{-1} ; flip-flop jest procesem bardzo powolnym, częstotliwość wymiany wynosi ok. 10^{-4} s^{-1} [104, 121, 151, 153].

Dwumolekularne warstwy utworzone z mieszaniny lipidów różniących się geometrią cząsteczek lub też ładunkiem części polarnej, wykazują zdolność do lateralnej separacji faz i tworzenia domen [15, 54, 59, 91, 113, 121, 125, 153, 154].

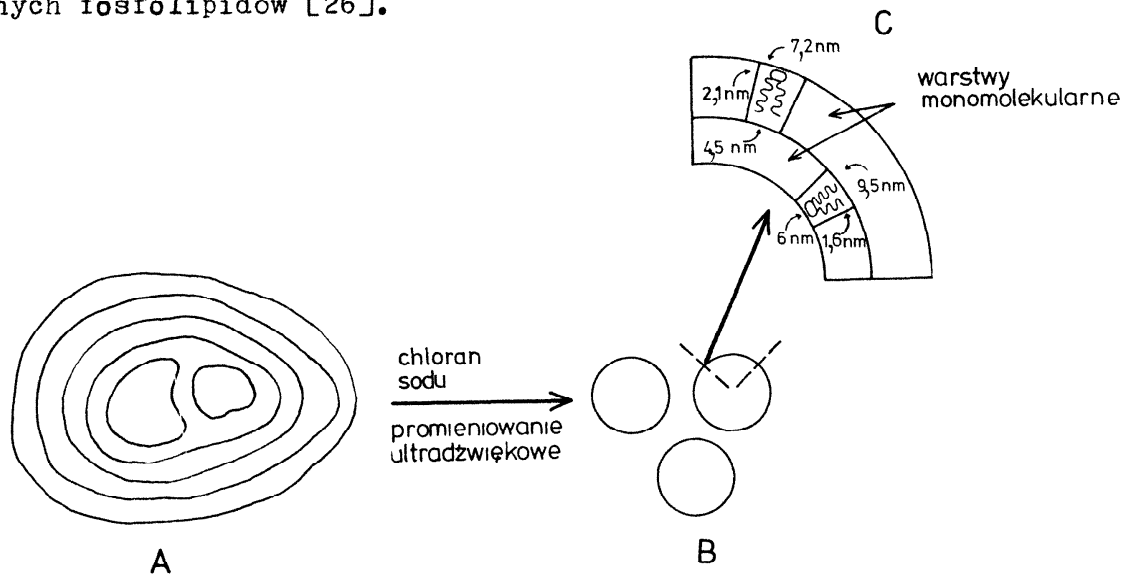
Na rysunku 2 przedstawiono diagram fazowy dla układu zawierającego dwa różne fosfolipidy w wodzie, fosfatydylocholinę dwu-elaidynową (DEL) i fosfatydylocholinę dwupalmitynową (DPL). W temperaturze powyżej krzywej „fluidus” obydwa lipidy znajdują się w homogenym, płynnym stanie. W temperaturze poniżej krzywej „solidus” lipidy znajdują się w stanie żelu. W zakresie temperatur pomiędzy obydwiema krzywymi obserwuje się zjawisko separacji faz - współistnienie obszarów - domen w fazie ciekłokrystalicznej i w fazie żelu. Podobnie jak w przypadku ciał stałych, separacja uporządkowanych obszarów od obszarów nieuporządkowanych jest naturalną konsekwencją specyficznych oddziaływań międzycząsteczkowych i deformacji sieciowych [54, 91].

W dwumolekularnych błonach fosfolipidowych zawierających fosfolipidy obojętne i fosfolipidy ujemne (np. kwasy fosfatydowe) obecność jonów Ca^{2+} może prowadzić do separacji faz i powstania domen zawierających naładowane fosfolipidy z zaadsorbowanymi jonami Ca^{2+} , a ponadto do fuzji warstw do wzrostu temperatury przejścia fazowego [69, 88, 119, 136].

W zależności od geometrii cząsteczek oraz oddziaływań między nimi można spodziewać się, że domeny będą miały krzywiznę dodatnią, ujemną lub równą zero, oraz różne rozmiary. Wartość krzywizny jest tym większa, im większa jest różnica między powierzchnią przekroju poprzecznego przypadającą na główkę i powierzchnią przekroju poprzecznego przypadającą na łańcuchy [141, 142].

Liposomami, jak już wspomniano, nazywa się układ złożony z jednej lub z wielu dwumolekularnych, koncentrycznych, zamkniętych warstw fosfolipidowych, o kształcie w przybliżeniu sferycznym lub niekiedy cylindrycznym [11]. Warstwy fosfolipidowe oddzielone są jedna od drugiej warstwy wody lub roztworu wodnego

o grubości 0,2-0,3 nm, przy czym najbardziej wewnętrzna warstwa lipidowa zamyka również przedział wodny (rys. 3). Liposomy mogą powstawać tylko powyżej temperatury głównego przejścia fazowego. Temperatury przejść fazowych większości naturalnych fosfolipidów i ich mieszanin zawierają się zazwyczaj w zakresie temperatur spotykanych w biologicznych układach. Wynika to z obecności nie-nasyconych wiązań w łańcuchach węglowodorowych. Tak więc liposomy mogą być formowane w temperaturze pokojowej z większości naturalnych fosfolipidów [26].



Rys. 3. Schematyczny obraz liposomów
A - liposom wielowarstwowy, B - liposom jednowarstwowy, C - przekrój przez warstwę dwumolekularną liposomu
Dane liczbowe dotyczą liposomów formowanych metodą ultradźwiękową (wg pracy [118])

Wodne dyspersje fosfolipidowe były badane od wielu lat [6, 28, 42], lecz, jak już wspomniano, dopiero w 1965 r. B a n g h a m, S t a n d i s h i W a t k i n s [11] zastosowali je jako model błon biologicznych do badania transportu jednowartościowych kationów. Zastosowana przez nich metoda formowania wielowarstwowych liposomów polegała na ręcznym wytrząsaniu wodnej dyspersji fosfolipidów i prawie w niezmienionej formie przetrwała ona do dzisiaj. Wielowarstwowe liposomy otrzymywano nie tylko przez ręczne wytrząsanie dyspersji suchych fosfolipidów w wodzie, lecz również przez dodawanie do wody fosfolipidów rozpuszczonych w rozpuszczalniku organicznym i usunięcie następnie rozpuszczalnika na drodze dializy [163].

Obraz liposomów wielowarstwowych dyspergowanych ręcznie, oglądany w mikroskopie elektronowym wykazuje ich dużą niejednorodność ze względu na rozmiary od $0,5\mu\text{m}$ do $20\mu\text{m}$, kształty oraz ilość dwumolekularnych warstw fosfolipidowych. Niejednorodność liposomów dyspergowanych ręcznie oraz ich dążność do tworzenia precipitatów były podstawą do krytycznej oceny przydatności tego modelu do badań [5, 95]. Jeśli jednak warunki doświadczalne są zachowane zarówno przy formowaniu liposomów, jak i podczas wykonywania pomiarów, wówczas badania przy użyciu takich liposomów mogą prowadzić do użytecznych wyników jakościowych [8]. Za pomocą tego modelu nie można jednak wyznaczać wartości bezwzględnych pewnych wielkości, jak np. współczynników przenikania.

W celu otrzymania bardziej jednorodnej i bardziej stabilnej dyspersji fosfolipidów poddawano wodną zawiesinę fosfolipidów działaniu fal ultradźwiękowych [3, 9]. Również w przypadku liposomów wykorzystywanych jako model błony biologicznej, metoda ultradźwiękowa ich formowania była stosowana w pracach [29, 138].

Napromieniowanie ultradźwiękami powoduje rozbitcie wielowarstwowej struktury liposomów, lecz, jak to zostało stwierdzone za pomocą promieni rentgenowskich, podstawowa dwumolekularna struktura warstwy fosfolipidowej zostaje zachowana [74, 183]. Rozmiary liposomów pod wpływem tego zabiegu ulegają zmniejszeniu z $0,5\text{--}20\mu\text{m}$ do $25\text{--}100\text{ nm}$, a więc ok. 100-krotnie [29, 83].

Podatność na dyspergujące działanie ultradźwięków nie jest jednakowa dla wszystkich fosfolipidów; szczególnie oporna jest lecytyna. Długotrwałe napromieniowanie, trwające kilka godzin, odwirowanie i przepuszczenie otrzymanej zawiesiny liposomów w wodzie przez kolumnę utworzoną z żelu Sepharose 4B pozwala na otrzymanie liposomów jednowarstwowych o jednakowych rozmiarach [83, 85, 175].

Ultradźwiękowa metoda dyspergowania liposomów ma jednak pewne wady. Badając dyspersję utworzoną z lecytyny żółtek jaj kurzych, stwierdzono, że długotrwałe (ok. 2,5 h) napromieniowanie wiązką fal o słabym natężeniu, lub krótkotrwałe napromieniowanie wiązką fal o dużym natężeniu powoduje chemiczną degradację cząsteczek oraz utlenienie nienasyconych wiązań w łańcuchach węglowodorowych [72, 74]. Jeśli działanie ultradźwięków odbywa się w atmosferze azotu efekty te są słabsze, lecz również mają miejsce. Dalszą poważną wadą metody ultradźwiękowej okazało się korodowanie metalowych sond i skażenie układu jonami tych metali [72]. Przedłużo-

ne działanie ultradźwiękowe nie może więc być stosowane do formowania liposomów, jeśli wymagana jest wysoka czystość lecytyny. Dodatek 4% kwasu fosfatydowego pozwala na znaczne zmniejszenie czasu napromieniowania [96]. Wykazano również, że przedłużanie czasu działania ultradźwięków tylko w niewielkim stopniu poprawia jednorodność dyspersji, bowiem już w ciągu dwóch pierwszych minut powstaje ok. 90% jednowarstwowych liposomów; liposomy jednak wykazują wówczas dążność do agregacji [48, 74].

W celu uformowania liposomów jednowarstwowych używa się również innych metod, są one jednak znacznie rzadziej stosowane. Zasada ich działania opiera się na dodawaniu do wody lub do roztworu wodnego odpowiedniej ilości fosfolipidów rozpuszczonych w rozpuszczalniku organicznym. Po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego powstają jednowarstwowe liposomy. B a t z r i i K o r n [13] stosowali etanol, otrzymując liposomy o średnicy ok. 25 nm; D e a m e r i B a n g h a m [34, 35] stosowali eter etylowy i przy wysokiej temperaturze odparowywania eteru otrzymywali w większości jednowarstwowe liposomy o średnicy 10-krotnie większej od średnicy liposomów otrzymywanych przez B a t z r i i K o r n a. Wadą tej metody jest uzyskiwanie niskich stężeń liposomów. Eter naftowy stosowali S c h i e r e n i współprac. [157] uzyskując również duże liposomy. Bardzo duże liposomy, 30-krotnie większe niż w metodzie B a t z r i i K o r n a otrzymali S z o k a i P a p a h a d j o p o u l o s [172] przez połączenie metody sonifikowania i stosowanie rozpuszczalników organicznych.

Coraz częściej, nawet rutynowo, w odpowiednim urządzeniu produkowanym fabrycznie, do formowania jednowarstwowych liposomów stosowana jest metoda, w której czynnikiem powodującym rozdrobnienie dużych, wielowarstwowych liposomów jest sól kwasu żółciowego, cholan sodu [22, 122]. Liposomy takie można nazywać liposomami cholowymi.

Niektóre właściwości liposomów produkowanych dwiema najbardziej popularnymi metodami, tj. metodą cholową i metodą ultradźwiękową zostały przedstawione w tab. 1.

T a b e l a 1

Fizyczne właściwości jednowarstwowych liposomów: A - produkowanych metodą cholową [22], B - produkowanych metodą ultradźwiękową [118]

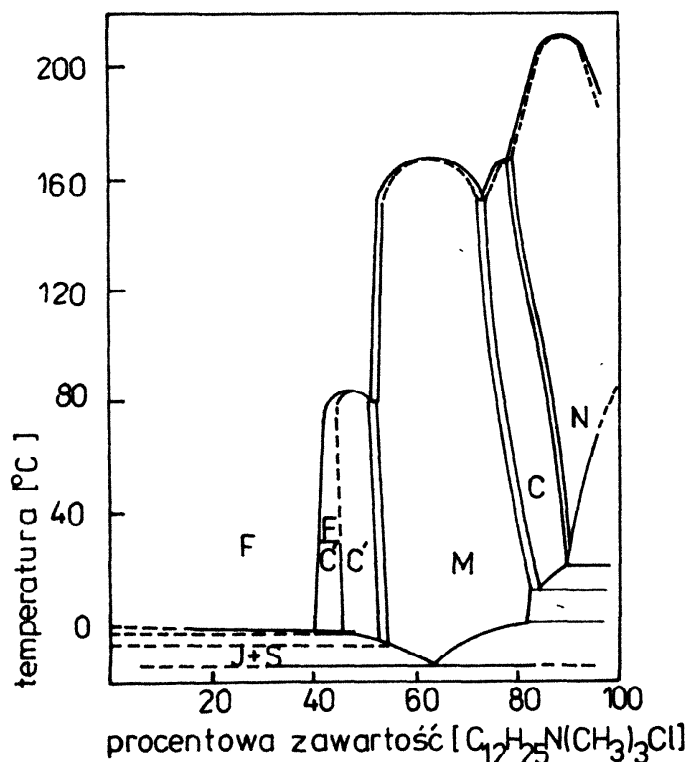
Właściwość	A	B
Promień zewnętrzny liposomu wraz z otoczką wody związanej (nm)	15	10,5
Grubość błony dwumolekularnej (nm)	3,7	3,7
Grubość monomolekularnej warstwy zewnętrznej (nm)		2,1
Grubość monomolekularnej warstwy wewnętrznej (nm)		1,6
Objętość cieczy zamkniętej w liposomie (l/mol lecytyny)	0,47	0,154
Ilość cząsteczek lecytyny w liposomie	5970	2335
Stosunek ilości cząsteczek w warstwie zewnętrznej do ilości cząsteczek w warstwie wewnętrznej	1,98	2,1
Ciężar cząsteczkowy	$4,6 \cdot 10^6$	$1,88 \cdot 10^6$
Współczynnik dyfuzji ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$0,7 \cdot 10^{-7}$	$2,03 \cdot 10^{-7}$

Analiza danych przedstawionych w tab. 1 pozwala stwierdzić, że rozmiary liposomów cholowych są nieco większe od rozmiarów liposomów produkowanych metodą ultradźwiękową, z czego wynikają różne wartości porównywanych parametrów. Duża krzywizna liposomów opisanych w tab. 1 oraz ich małe rozmiary są odpowiedzialne za asymetrię w budowie zewnętrznej i wewnętrznej warstwy błony [116, 118, 126]. Około 2/3 cząsteczek fosfolipidów zgrupowanych jest w zewnętrznej jednomolekularnej warstwie błony [96]. Obydwie jednomolekularne warstwy wykazują różną geometrię upakowania cząsteczek i różną grubość [116, 118, 126] (rys. 3c).

W przypadku liposomów utworzonych z mieszaniny fosfolipidów ich lokalizacja w obydwu monowarstwach nie jest jednakowa: na ogół kwaśne fosfolipidy (fosfatydyloseryna, kwas fosfatydowy) lokują się w wewnętrznej warstwie [23]. Dla mieszaniny sfingomieliny i lecytyny w wewnętrznej warstwie obserwuje się niewielki nadmiar lecytyny [24].

3. 3. UKŁAD DETERGENTY-WODA

Detergenty, substancje należące do grupy C związków amfifilowych, są rozpuszczalne w wodzie. Jeśli niewielka ilość detergentów zostanie dodana do wody, to część występować będzie w wodzie w postaci monomerów, część zaś zgromadzi się na powierzchni wody. Wraz ze wzrostem stężenia detergentów w wodzie wzrasta również stężenie monomerów. Gdy stężenie detergentów osiągnie pewną krytyczną wartość, cząsteczki tej substancji utworzą micelle. Najniższe stężenie, przy którym powstają micelle, nosi nazwę krytycznego stężenia micelnego (cmc). Należy tu raczej mówić o wąskim zakresie stężeń, a nie o określonej jego wartości [124]. Powyżej cmc stężenie monomerów dla wielu detergentów pozostaje niemal stałe i jest równe krytycznemu stężeniu micelnemu. Tworzenie miceli może być obserwowane jedynie powyżej pewnej określonej temperatury, zwanej krytyczną temperaturą micelną.



Rys. 4. Schemat dwuskładnikowego układu fazowego złożonego z chloru dodecylotrimetyloamoniowego i wody
 F – ciecz izotropowa (zawiesina micelarna i roztwór monomerów),
 C' i C – faza kubiczna, M – faza heksagonalna, N – faza lamelarna,
 J + S – kryształy lodu i soli amoniowych
 Linie ciągłe oznaczają granice doświadczalne, linie przerywane oznaczają granice ekstrapolowane (wg pracy [4])

Wartość krytycznego stężenia micelnego zależy od parametrów charakteryzujących zarówno części hydrofobowe, jak i części hydrofilowe cząsteczki. Dla łańcuchów alkilowych np. ujemny logarytm z cmc wzrasta proporcjonalnie wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu [173]. Dla jonowych cząsteczek amfifilowych wartość cmc jest znacznie wyższa aniżeli dla niejonowych, ponieważ siły elektrostatyczne przeciwdziałają formowaniu się miceli.

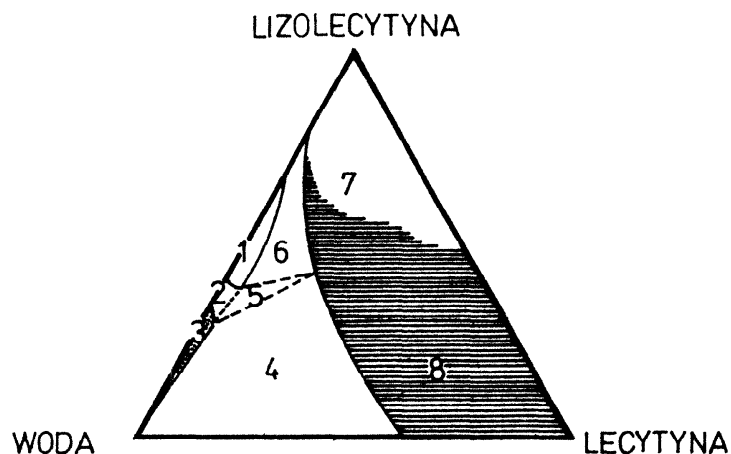
Micela mogą występować w postaci kul, elipsoid i cylindrów. Średnia liczba cząsteczek w miceli, tzw. stała agregacji, jest różna dla różnych substancji amfifilowych. Jest ona duża w przypadku substancji z grupy (C, a) i wynosi od ok. 60 do ok. 200, natomiast niewielka w przypadku substancji z grupy (C, b), nie przekraczająca liczby 10 [78, 124, 169].

Wraz ze wzrostem stężenia detergentów powyżej cmc wzrasta również stężenie miceli w roztworze. Przy wysokich stężeniach detergentów w wodzie pojawiają się fazy krystaliczne. Na rysunku 4 przedstawiono schemat układu fazowego dla jednej z soli amoniowych, a mianowicie dla chlorku dodecylotrimetyloamoniowego w wodzie w postaci zależności między procentową zawartością tej soli w wodzie i temperaturą. W niskich temperaturach obserwuje się występowanie kryształów lodu i soli amoniowych. W wyższych temperaturach, przy niskich stężeniach detergentu obserwuje się roztwór wodny monomerów i zawiesinę micelną, natomiast przy wyższych stężeniach - różne fazy ciekłokrystaliczne: kubiczne, heksagonalne i lamelarne.

3. 4. UKŁAD FOSFOLIPIDY-DETERGENTY-WODA

W układzie złożonym z fosfolipidu, detergentu i wody mogą występować zarówno micela, liposomy, jak i ciekłe kryształy w innych formach krystalicznych; zależy to m.in. od rodzaju i stężenia poszczególnych składników [115]. W układzie tym część cząsteczek detergentu występuje w postaci monomerów, a część wiąże się z fosfolipidami, tworząc mieszane kryształy, liposomy lub micela.

Na rysunku 5 przedstawiono, dla przykładu, schemat trójskładnikowego układu fazowego dla lecytyny, lizolecytyny (amfifilowego detergentu) i wody. Lecytyna została zmieszana z lizolecytyną, do tej mieszaniny dodano następnie wodę i pozostawiono



Rys. 5. Schemat trójskładnikowego układu fazowego złożonego z lecytyny-lizolecytyny-wody
 1 - faza heksagonalna; 2 - dwie fazy: heksagonalna i micelarna;
 3 - faza micelarna; 4 - dwie fazy: liposomy i woda; 5 - trzy fazy: liposomy, micelle i woda; 6 - dwie fazy: heksagonalna i lamelarna; 7 - faza krystaliczna; 8 - ciekłokrystaliczna faza lamelarna (wg pracy [169])

układ dla ustalenia się równowagi. Obserwacje prowadzone były w temp. 52°C, powyżej temperatury Kraffta każdego ze składników. Naroża trójkąta (rys. 5) prezentują czyste substancje, natomiast boki trójkąta przedstawiają układy dwuskładnikowe. Wewnątrz trójkąta każdy punkt reprezentuje jakiś układ trójskładnikowy, zależny od stężenia każdego ze składników. Występować mogą różne fazy: krystaliczna, ciekłokrystaliczna lamelarna, ciekłokrystaliczna heksagonalna i micelarna. Prawa strona trójkąta odpowiada fazie lamelarnej, uzyskiwanej przy wszystkich proporcjach lizolecytyny i lecytyny, aż do 95% lizolecytyny i 5% lecytyny, przy małej ilości wody. Powyżej ok. 40% wody tworzą się mieszane liposomy, zawierające różne ilości lecytyny i lizolecytyny, w zależności od ich stężeń. Lewa strona trójkąta odpowiada małej ilości lecytyny. W tym obszarze wraz ze zmniejszaniem się ilości lizolecytyny w wodzie pojawia się najpierw faza ciekłokrystaliczna w przedziale 30-60% wody, następnie współistniejące dwie fazy: heksagonalna i micelarna i powyżej 65% wody, aż do krytycznego stężenia micelnego - faza micelarna.

Mieszane micelle różnią się rozmiarami i kształtami od miceli jednoskładnikowych. Różnice te zależne są zarówno od rodzaju de-

tergentu, jak i stosunku molarnego fosfolipidu i detergentu [191]. Mieszane micelle tworzą się łatwiej aniżeli micelle jednoskładnikowe, gdyż mieszane micelle cechują się większą ciekłością wnętrza miceli [45]. Micelle utworzone z jonowych detergentów, w wyniku sił odpychania naładowanych główek, są niezbyt trwałe; dodanie innych cząsteczek amfifilowych, np. lecytyny, powoduje osłabienie tych sił, co zwiększa stabilność mieszanych miceli [14]. Cząsteczki lub jony z krótkimi łańcuchami alkilowymi, które same nie tworzą miceli, mogą tworzyć mieszane micelle z innymi cząsteczkami amfifilowymi o długich łańcuchach [173].

W przypadku gdy detergenty są dodawane do uformowanych już liposomów układ zachowuje się nieco inaczej aniżeli wówczas, gdy detergent mieszany jest z fosfolipidami przed dodaniem wody. Taki wykres fazowy nie został do tej pory sporządzony. Wydaje się jednak, że wykres ten powinien być pod względem jakościowym podobny do prezentowanego uprzednio.

Proces tworzenia się miceli z liposomów, inaczej mówiąc, proces solubilizacji liposomów zachodzi tylko przy dostatecznie dużym stosunku molarnym detergentu do fosfolipidu i zależy od wielu czynników. Podobnie jak w przypadku opisanym uprzednio (tj. gdy detergent był mieszany z fosfolipidami przed dodaniem wody) proces tworzenia miceli zależy m.in. od rodzaju detergentu, rodzaju i składu lipidów, temperatury, siły jonowej i pH. Badania przeprowadzone z pewnymi detergentami wykazały, że posiadają one różną zdolność do solubilizacji błon fosfolipidowych, lecz ze względu na zbyt małą ilość danych doświadczalnych, nie udało się określić bardziej ogólnych zasad. Wykazano, że zdolność solubilizacyjna zależy od rodzaju lecytyny, a mianowicie od długości łańcuchów i stopnia ich nienasycenia [40, 78, 79, 149, 150, 167, 169, 181, 191].

Wpływ temperatury na solubilizację liposomów był badany m.in. przez H a r l o s a i współprac. [68]. Stwierdzili oni, że w pobliżu temperatury przejścia fazowego dezoksyliżolecytyna wpływa najsilniej na solubilizację liposomów utworzonych z lecytyny dwumirystylowej. D e n n i s i O v e n s [40] w swoich badaniach przy zastosowaniu NMR wykazali, że solubilizacja liposomów utworzonych z lecytyny jaj kurzych jest niezależna od temperatury, natomiast lecytyna dwupalmitynowa wykazuje taką zależność.

Dane uzyskane w wyniku badań nad solubilizacją liposomów wnoszą niewiele informacji o zjawiskach zachodzących w liposomach pod wpływem detergentów przy stosunku molarnym detergentu do fosfolipidu niższym od litycznego, tj. przy stosunku niższym niż konieczny do całkowitej przemiany fazowej z formy lamelarnej do micelarnej.

W opublikowanych dotychczas pracach o wpływie detergentów (o stężeniu niższym od litycznego) na dwumolekularne warstwy fosfolipidowe wnioskowano na podstawie badania niektórych właściwości tej błony. Stosowano w tym celu różne metody pomiarowe. Metodę mikrokalorymetryczną do badania przejść fazowych zastosowało wielu autorów m.in. [20, 46, 49, 61], stwierdzając zwiększenie ciekłości warstwy hydrofobowej lecytyny pod wpływem soli trimetyloalkiloamonowych. Metodę NMR zastosowali B e y e r i K l i n g e n b e r g [16] do badania zmian struktury warstwy fosfolipidowej pod wpływem niejonowych detergentów, lecz nie stwierdzili żadnych zmian w strukturze warstwy hydrofobowej.

Wpływ detergentów, o stężeniu niższym od litycznego, na błony fosfolipidowe może być również określany na podstawie badania transportu substancji przez te błony, co zostanie omówione w następnym rozdziale.

4. TRANSPORT SUBSTANCJI PRZEZ BŁONY FOSFOLIPIDOWE W OBECNOŚCI DETERGENTÓW

Transport substancji przez lipidowe błony modelowe zachodzi w sposób bierny. Ogólne zasady rządzące procesem transportu biernego są dobrze znane; bierny transport substancji przez błony zarówno biologiczne, jak i modelowe odbywać się może w procesie dyfuzji prostej, złożonej lub ułatwionej. Nie są natomiast na ogół dostatecznie poznane mechanizmy procesów biernego transportu w przypadku poszczególnych substancji i poszczególnych błon.

Badania modelowe oraz badania na obiektach biologicznych wskazują, że stałe szybkości biernego transportu wody i wielu nieelektrolitów przez błony erytrocytów i dwumolekularne błony fosfolipidowe są porównywalne [36, 37 133]. Istotne różnice występują natomiast w przypadku biernego transportu jonów. Wysoka nieprzenikalność niemodyfikowanych błon fosfolipidowych dla jonów jest jedną z najbardziej charakterystycznych i ważnych cech tej błony.

Współczynniki przenikania przez błony fosfolipidowe dla jonów jednowartościowych sięgają rzędu wielkości $10^{-16} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ i są o kilka rzędów wielkości niższe od współczynników przenikania dla nie-elektrolitów [107]. Są one również o kilka rzędów wielkości niższe od analogicznych współczynników przenikania dla błon biologicznych. Szczególnego rodzaju różnice występują w przypadku anionów. Podczas gdy dla błon fosfolipidowych stałe szybkości przenikania jonów Cl^- są o ok. 3 rzędy wielkości większe od stałych szybkości dla kationów alkalicznych [74], to w przypadku błon biologicznych różnica ta sięga 6 rzędów wielkości [65]. Porównanie to sugeruje istnienie specjalnych struktur w fosfolipidowym rdzeniu błon biologicznych, odpowiedzialnych za stosunkowo szybki transport jonów. Bierny transport anionów przez błony biologiczne, w których taki transport zachodzi (np. w błonach erytrocytów ssaków) odbywa się przede wszystkim za pośrednictwem pewnego białka integralnego (w błonach erytrocytów jest nim tzw. białko pasma trzeciego) [139, 140, 152].

W badaniach transportu anionów przez błony modelowe najwięcej prac poświęcono jonom chloru [11, 74, 105, 135]. Stwierdzono pewną selektywność w przenikaniu anionów przez błony fosfolipidowe [7, 11] podobnie jak w przypadku błon biologicznych [189]. Najszybciej są przez błony biologiczne transportowane jony Cl^- i J^- , a wolniej jony F^- , NO_3^- , SO_4^{2-} i HPO_4^{2-} . Autorzy przypuszczają, że istotną rolę odgrywa tu promień uwodnionego jonu, ponieważ wraz ze wzrostem promienia uwodnionego jonu szybkość przenikania maleje.

Badania transportu kationów przez dwumolekularne błony fosfolipidowe poświęcone były w głównej mierze jonom jednowartościowym. Współczynniki przenikania jednowartościowych kationów przez błony tego typu są rzędu wielkości $10^{-15} - 10^{-16} \text{ m/s}$ [74, 95, 135], są więc o 2-3 rzędy wielkości niższe od współczynników przenikania tych jonów przez błony czerwonych ciałek krwi [31]. Badania nad przenikaniem jednowartościowych kationów przez błony fosfolipidowe pozwoliły stwierdzić, że błony te podobnie, jak błony biologiczne, wykazują pewną, aczkolwiek niewielką, dyskryminację między jonami Na^+ i K^+ [100, 131]. Wydaje się, że odpowiedzialne za tę dyskryminację są przede wszystkim główki cząsteczek fosfolipidowych, gdyż najsilniejszy efekt wykazują błony utworzone z fosfatydyloglicerolu, słabszy - z kwasu fosfatydowego przy niskim pH; nie stwierdzono natomiast żadnej selektywności

w przypadku błon z czystej lecytyny o nasyconych łańcuchach. Współczynnik przenikania np. jonów potasu dla błony utworzonej z fosfatydyloglicerolu jest niemal o 2 rzędy wielkości większy aniżeli dla błony z fosfatydylocholiny, przy takiej samej długości łańcuchów alkilowych [135]. Pewną nieznaczną dyskryminację jonów K^+/Na^+ zaobserwowano również dla błon fosfatydylocholinowych, lecz tylko w przypadku łańcuchów kwasów tłuszczowych o wysokim stopniu nienasycenia [156].

Badania transportu kationów dwuwartościowych przez błony biologiczne dotyczyły w głównej mierze jonów wapnia, ze względu na szczególnie ważną rolę tego jonu w procesach biologicznych. Bierny transport jonów wapnia przez błony biologiczne jest bardzo powolny i ze względu na trudności techniczne ich współczynniki przenikania nie zostały do tej pory określone [47]. Wyznaczenie tych współczynników jest tym trudniejsze, że wapń jest w bardzo silnym stopniu wiązany przez białka i lipidy komórkowe [56]. Wapń jest silniej wiązany przez lipidy jonowe, natomiast słabiej wiązany jest przez lipidy obojętne, np. przez lecytynę [60, 127, 128, 146, 162], lecz nawet w tym przypadku zawartość tych jonów w błonie liposomu przekracza 90% ilości wszystkich jonów Ca^{2+} zawartych w całym liposomie [110].

Ładunek powierzchniowy błony fosfolipidowej ma znaczny wpływ na jej przenikalność dla jonów dodatnich i ujemnych. Obecność ujemnie naładowanych grup w warstwie główek zwiększa przenikalność kationów, a obniża przenikalność anionów, natomiast obecność dodatnio naładowanych grup wywołuje efekt odwrotny [11, 67, 135]. Równie istotny wpływ na przenikanie substancji przez błony fosfolipidowe mają właściwości łańcuchów alkilowych. Badania prowadzone przy użyciu fosfolipidów syntetycznych o określonej długości łańcuchów i o określonym stopniu ich nienasycenia pozwoliły stwierdzić, że przepuszczalność błon fosfolipidowych wzrasta wraz ze wzrostem stopnia nienasycenia łańcuchów i wraz ze zmniejszeniem ich długości [38, 102]. Jak stwierdzili również de G i e r i współprac. [38] asymetria łańcuchów powoduje większą przepuszczalność błony aniżeli symetryczny ich układ.

Kolejnym czynnikiem warunkującym transport jonów jest ruchliwość łańcuchów oraz stopień ich uporządkowania. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta ruchliwość łańcuchów oraz samych jonów, a w związku z tym wzrasta szybkość przenikania jonów. Poniżej temperatury przejścia fazowego wzrost ten jest powolny, a powyżej

szybszy [117], natomiast w pobliżu temperatury przejścia fazowego występuje ostre maksimum szybkości przenikania [132, 137]. Stwierdzono również istnienie podobnego efektu dla czarnych błon utworzonych z syntetycznych fosfolipidów [2]. Jak już wcześniej wspomniano, w pobliżu temperatury przejścia fazowego składników błony odbywa się lateralna separacja faz i, jak przypuszczają P a p a h a d j o p o u l o s i współprac. [132], w warunkach porządkowania łańcuchów transport może być szybszy.

Koncepcje dotyczące przechodzenia jonów przez dwumolekularną błonę fosfolipidową uwzględniają fazy przejścia przez warstwy główek oraz warstwę łańcuchów. Przy przejściu jonu ze środowiska wodnego do hydrofobowego wnętrza warstwy fosfolipidowej musi nastąpić dehydratacja jonu, wymagająca znacznego nakładu energii [30]. Przejście przez obszar główek może być ułatwione w wyniku fluktuacji powierzchniowego upakowania lipidów, które tworząc drobne luki umożliwiają jonom wejście do błony [125]. Podobne koncepcje są wysuwane również przez innych autorów. W jednej z tych koncepcji sugeruje się istnienie por funkcjonalnych w odróżnieniu od zakładanych hipotetycznych por strukturalnych [18], w jeszcze innej zakłada się istnienie por termicznych w warstwie hydrofobowej błony umożliwiających dyfuzję jonów [145], lub też sugeruje się, że w błonie fosfolipidowej mogą powstawać chwilowe pory, wyłożone główkami cząsteczek fosfolipidowych, inaczej mówiąc - micidele z hydrofilowym wnętrzem, przez które mogłyby dyfundować jony [36]. Lateralna separacja faz, występująca w błonach utworzonych z mieszaniny fosfolipidów może spowodować powstanie defektów na granicy domen; przez luki powstałe na granicy ciekłych i stałych domen, mogłyby odbywać się transport jonów [19]. W przypadku obecności w błonie innych domieszek transport taki mógłby się odbywać poprzez luki utworzone przez te domieszki [143].

Jak już wspomniano niemodyfikowane błony fosfolipidowe są bardzo trudno przenikliwe dla jonów. Jednakże przenikalność błon fosfolipidowych dla jonów może być zwiększona o kilka rzędów wielkości, i to w sposób specyficzny, przez wiele związków zwanych jonoforami.

Dla kationów jednowartościowych są to w większości przypadków makrocycliczne związki wykazujące lipofilowe właściwości, dzięki którym mają zdolność rozpuszczania się w lipidowej błonie, oraz polarną strukturę wewnętrzną, dzięki której mogą tworzyć kom-

pleksy z jonami. Związki te na ogół mają właściwości antybiotyków. Przykładem mogą być dwa najczęściej badane jonofory: walinomycyna i gramicydyna A. Obydwa te jonofory przyspieszają transport jednowartościowych kationów, aczkolwiek mechanizm ich działania jest, jak się przypuszcza, różny. Walinomycyna działa jako nośnik, natomiast gramicydyna tworzy hydrofilowe „pory” w błonie fosfolipidowej, przez które jony mogą przenikać [43, 44, 55, 76, 106].

Znane są również jonofory dla kationów dwuwartościowych. Są to na ogół związki niecykliczne, które dzięki specyficznej strukturze tworzą kompleksy z dwuwartościowymi kationami, podobnie jak w przypadku związków makrocyklicznych. Jako jonofory wapnia stosowane są najczęściej związki oznaczone symbolami A23187 oraz X-537A [25, 47, 148].

Pewne makrocykliczne antybiotyki wywołują również wzrost przenikalności błon fosfolipidowych dla anionów, i to w sposób selektywny, zależny od ich rozmiarów [98].

Oprócz wyżej wspomnianych jonoforów, wywołujących znaczny wpływ na transport jonów, istnieje duża grupa substancji zwiększających również transport jonów, aczkolwiek w słabszym stopniu. Do tych substancji należą niektóre białka [99, 152], alkohole [81], anestetyki [73, 80, 82, 130], różne inne substancje, jak np. czterotlenek osmu [143, 145] oraz detergenty.

Badania wpływu detergentów na transport substancji przez błony fosfolipidowe oraz na właściwości tej błony były prowadzone zarówno dla czarnych błon fosfolipidowych, jak i liposomów, aczkolwiek w niewielkim stopniu i nie w sposób systematyczny.

Poniżej swego krytycznego stężenia micelnego detergenty powodują wzrost przewodnictwa elektrycznego czarnych błon fosfolipidowych [1, 10, 66, 70, 71, 164, 165, 179]. Zmiany przewodnictwa są zależne zarówno od rodzaju jednowartościowych kationów [164, 179], jak i zastosowanego detergentu [165]. Wyniki uzyskane dla niejonowych, anionowych i kationowych detergentów wykazują, że detergenty dodane z jednej strony błony indukują niewielką różnicę potencjałów, której znak jest zależny od ładunku główki detergentu. Różnica potencjałów indukowana przez detergenty niejonowe i anionowe ma ten sam znak, przeciwny do znaku różnicy potencjałów indukowanej przez detergenty kationowe [164, 165]. Dla układu zawierającego detergenty po obydwu stronach błony w jednakowym stężeniu stwierdzono, że Triton X-100 wywołuje

szczególnie duży wzrost przewodnictwa w porównaniu z SDS¹, cholanem sodu i dezoksycholanem sodu [10]. Przeciwny wynik dla Tritonu X-100 i SDS uzyskano dla błony uformowanej z fosfolipidów i cholesterolu [1]. W wyżej wymienionych pracach sugeruje się, że detergenty wbudowują się do błony i zmieniają jej właściwości, lub też tworzą przewodzące „pory”, podobnie jak to ma miejsce w przypadku polienowych antybiotyków [10].

Przypadkowe fluktuacje przewodnictwa czarnych błon fosfolipidowych były obserwowane dla SDS i soli trimetyloamoniowych [108] oraz dla Tritonu X-100 [158]. Częstotliwość tych fluktuacji rośnie wraz ze spadkiem stabilności błony, a wielkość elementarnego skoku potencjału nie zależy od detergentu. Sugeruje się, że takie fluktuacje wynikają z pojawienia się i zanikania kanałów w błonie.

Na czarnych błonach fosfolipidowych była badana również zależność oporności elektrycznej błony od długości łańcucha alkilowego dla 4, 9, 12 i 16 węgli w łańcuchu chlorków trimetyloalkiloamoniowych. Stwierdzono tym silniejszy efekt, im większa była długość łańcucha [62].

Transport substancji przez błony fosfolipidowe w obecności detergentów był również badany na liposomach, jednakże w bardzo niewielkim zakresie.

Badano wpływ niejonowego detergentu, Tritonu X-100, na transport glukozy [79, 86]. Stwierdzono, że poniżej cmc Triton X-100 wywołuje zwiększenie wypływu glukozy z liposomów, które jest zależne od składu fosfolipidów w liposomach. Autorzy przypuszczają, że podobnie jak to ma miejsce w czarnych błonach cząsteczki detergentu wnikają do błony i zwiększają ciekłość wnętrza błony. Dla kationowych detergentów bromków alkilotrimetyloamoniowych stwierdzono, że związki, w których liczba atomów węgla jest niższa od 11 nie wpływają na transport glukozy, lecz silnie zmieniają transport mocznika [62]. Autorzy ci badali również wpływ bromku heksadecylotrimetyloamoniowego na wpływ jonów fosforanowych z liposomów i stwierdzili, że związek ten znacznie zwiększa ten wpływ.

Badano wpływ homologicznego szeregu alifatycznych karbaminianów na wpływ jonów sodu z lecytynowych liposomów [188]. Dla stężeń wyższych od $10^{-3}M$ obserwowano wzrost wypływu jonów Na^+ , przy czym efekt ten, podobnie jak w pracy [63], wzrastał wraz

¹Sól sodowa siarczanu dodecyłu.

ze wzrostem długości łańcucha. Badany równocześnie współczynnik rozdziału wykazywał tę samą zależność, co pozwoliło autorom wnioskować, że wzrost ilości wbudowanych cząsteczek powoduje większe zaburzenie w błonie, które ułatwia wypływ jonów z liposomów.

Wpływ błękitu metylenowego, będącego jonem hydrofobowym, z błon liposomów pod wpływem detergentu - chlorku alkiloimidazolowego tłumaczono krótkotrwałymi uszkodzeniami błony spowodowanymi przez wbudowujące się do błony cząsteczki detergentu. Przez te uszkodzenia wypływają duże cząsteczki błękitu metylenowego [171].

Jak wynika z przedstawionych rozważań badania dotyczące oddziaływania detergentów z błonami fosfolipidowymi były prowadzone w dość skromnym zakresie. Badania te dotyczyły w głównej mierze solubilizacji błon, a więc wpływu stężeń wyższych od litycznego. Mechanizm działania detergentów na błony fosfolipidowe w stężeniach niższych od litycznego, jak również ich wpływ na transport substancji przez te błony nie został jeszcze zadowalająco poznany. Systematyczne badania nad tym zagadnieniem zostały podjęte w Zakładzie Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu, a niektóre wyniki prac zostały już opublikowane [51, 52, 102, 109, 155]. W dalszej części artykułu zostanie omówiony wpływ pewnych właściwości amfifilowych detergentów na błonę jednowarstwowych liposomów i na procesy transportu jonów przez tę błonę.

Należało się spodziewać, że wpływ amfifilowych detergentów na transport substancji przez błony fosfolipidowe powinien być zależny od strukturalnych właściwości tych detergentów. W związku z tym badane detergenty zostały tak dobrane, aby mogły reprezentować określone właściwości zarówno ich części hydrofobowej, jak i części hydrofilowej. W celu określenia roli części hydrofobowej badano taki podstawowy parametr, jakim jest długość łańcucha alkilowego, natomiast w celu określenia roli części hydrofilowej zmieniano jej rozmiary i rozkład ładunku elektrycznego. Przebadano [14] związków przedstawionych w tab. 2. Są to w większości nowo syntetyzowane sole amoniowe (SA) o właściwościach grzybobójczych [185-187].

Części hydrofobowe cząsteczek związków z grupy I i IV są jednakowe, różnice występują jedynie w częściach hydrofilowych. Wypadkowy ładunek elektryczny jest w każdym przypadku jednakowy, zmienia się jednak w poszczególnych związkach rozkład tego ładunku. Związek IC posiada dodatni ładunek zlokalizowany przy ato-

T a b e l a 2

Wybrane detergenty amfifilowe

Lp.	Symbol	Nazwa związku	Wzór chemiczny
1	IA	chlorek N-dodecylo-N, N-dimetylo-N-[3-(β -metylo-4-nitrowinylo)-6-metoksybenzylo] amoniowy	
2	IB	chlorek N-dodecylo-N, N-dimetylo-N-benzylo-amoniowy	
3	IC	chlorek N-dodecylo-N, N, N-trimetyloamoniowy	
4	II	4-metoksy-beta-metylo-beta-nitrostyren	
5-11	IIIn	chlorki N-alkoksymetylenc-N, N, N-trimetyloamoniowe, zawierające 4, 9, 10, 12, 14, 16 i 18 atomów węgla w łańcuchu alkilowym	
12	IVA	chlorek N-dodecylo-N-[3-(β -metylo-beta nitrowinylo)-4-metoksybenzylo] morfoliniowy	
13	IVB	chlorek N-benzylo-N-dodecylo-morfoliniowy	
14	IVC	chlorek N-dodecylo-N-metylo-morfoliniowy	

mie azotu. W przypadku pozostałych związków z tej grupy rozkład ładunku jest nieco bardziej złożony. Związek IB różni się od związku IC tym, że jedna grupa metylowa jest w nim zastąpiona podstawnikiem benzylovym, będącym grupą elektroujemną, w wyniku czego następuje zmiana rozkładu ładunku elektrycznego, przy jednoczesnym wzroście rozmiarów części hydrofilowej. Związek IA zawiera w swej części polarnej zarówno grupę amoniową, pierścień aromatyczny, jak i grupę nitrowinylovą. Grupa nitrowinylova posiada również wiązania podwójne i razem z grupą benzylovą tworzy układ pięciu sprzężonych wiązań podwójnych o zwiększonym, w porównaniu z cząsteczką IB, zdelokalizowanym ładunku ujemnym i zwiększonych rozmiarach. Związki z grupy IV różnią się od swoich odpowiedników z grupy I obecnością pierścienia morfolinowego, co powoduje wzrost rozmiarów grup polarnych bez zmian ich właściwości elektrycznych. Związki z grupy IIIn mają jednakową część hydrofilową; różnice występują w części hydrofobowej - różnią się mianowicie długością łańcucha alkilowego.

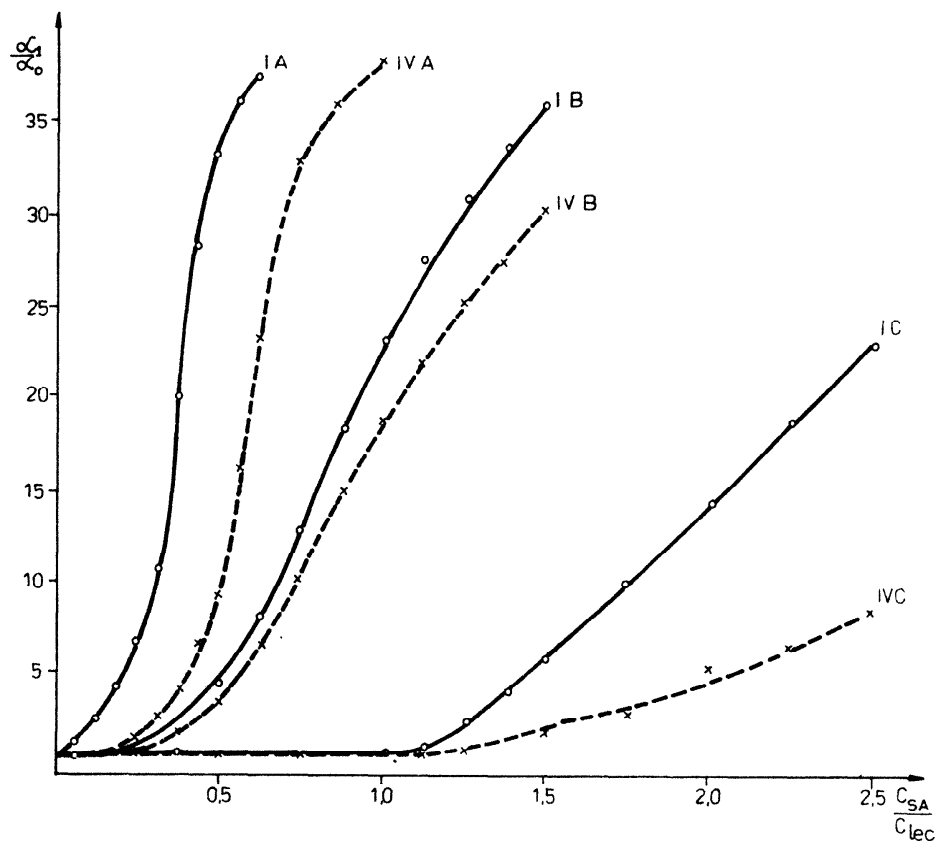
Badano transport elektrolitów, dwuwartościowych jonów Ca^{2+} i SO_4^{2-} , metodą izotopów znaczonych, przez błonę fosfolipidową jednowarstwowych liposomów uformowanych z lecytyny metodą „cholo-wą” [22].

Jak wykazano w pracy [110] jony SO_4^{2-} nie są wiązane, natomiast jony Ca^{2+} są wiązane przez błonę liposomów lecytynowych, przy czym ok. 90% jonów Ca^{2+} zawartych w liposomie wiązanych jest przez tę błonę. Wynika stąd wniosek, że obserwowany proces kinetyczny jest procesem przenikania jonów przez błonę liposomu w przypadku jonów SO_4^{2-} , a procesem desorpcji z błony w przypadku jonów Ca^{2+} .

Współczynniki kinetyczne obydwu procesów transportu jonów były wyznaczane w oparciu o metodę graficzną opracowaną na podstawie analizy trójprzedziałowej [120].

Określone były zależności względnych stałych kinetycznych, $\alpha = \alpha_1/\alpha_0$, od względnego stężenia związków $C_w = C_{SA}/C_{lec}$, gdzie: α_1 - stała szybkości procesu wymiany jonów dla błony liposomów w obecności związków SA w dyspersji liposomów, α_0 - stała szybkości procesu wymiany jonów dla błony, przy nieobecności związków SA w dyspersji liposomów, C_{SA} - stężenie molowe związków SA w dyspersji liposomów, C_{lec} - stężenie lecytyny w dyspersji liposomów. Zakres stężeń badanych związków w dyspersji liposomów został w przypadku każdego związku tak dobrany, aby błona liposomu sta-

nowiła integralny zamknięty pęcherzyk, inaczej mówiąc - badania transportu odbywały się przy stężeniach detergentów niższych od litycznego.

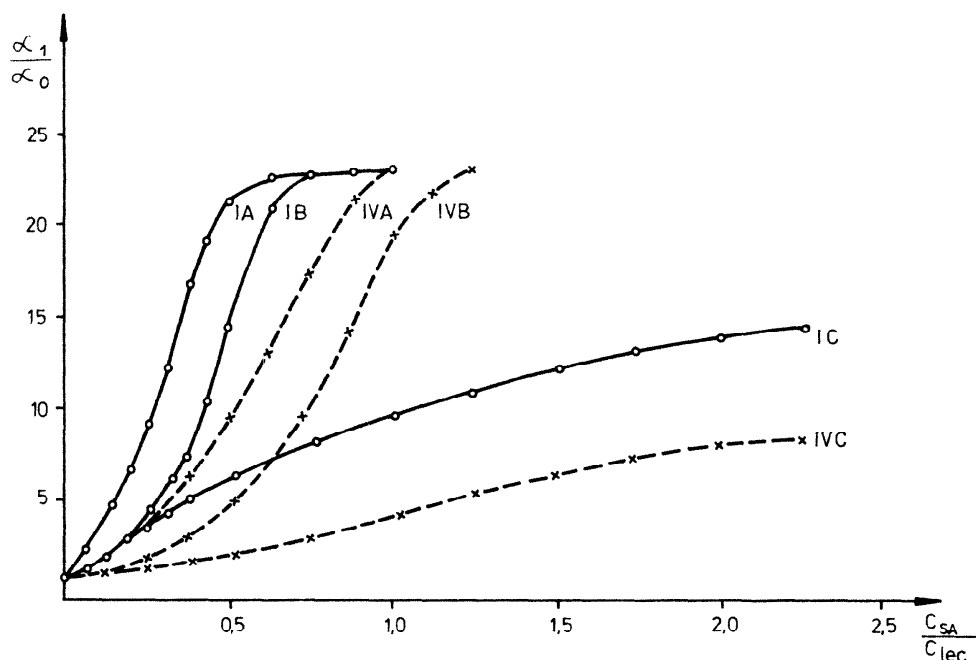


Rys. 6. Zależność względnej stałej szybkości α/α_0 procesu desorpcji jonów Ca^{2+} z błony liposomów od względnego stężenia $C_{\text{SA}}/C_{\text{lec}}$ związków z grupy I (linie ciągłe) oraz związków z grupy IV (linie przerywane)

Na rysunkach 6 i 7 przedstawiono zależności względnych stałych kinetycznych od względnego stężenia związków z grupy I (linie ciągłe) oraz związków z grupy IV (linie przerywane) dla jonów Ca^{2+} i SO_4^{2-} .

Analiza krzywych na tych rysunkach pozwala na następujące stwierdzenia:

- wszystkie przebadane związki amfifilowe powodują wzrost stałych kinetycznych zarówno dla jonów Ca^{2+} , jak i SO_4^{2-} ;
- wzrost stałych kinetycznych jest silnie zależny od stężenia związków SA;
- dla jonów Ca^{2+} występuje efekt stężeniowy, tzn., że poniżej pewnego, granicznego stężenia związków nie stwierdza się wzrostu



Rys. 7. Zależność względnej stałej szybkości α_1/α_0 procesu przenikania jonów SO_4^{2-} przez błony liposomów od względnego stężenia $C_{\text{SA}}/C_{\text{lec}}$ związków z grupy I (linie ciągłe) oraz związków z grupy IV (linie przerywane)

stałej szybkości. Dla jonów siarczanowych efekt stężeniowy nie występuje; przyspieszający wpływ obserwuje się już od najniższych stężeń;

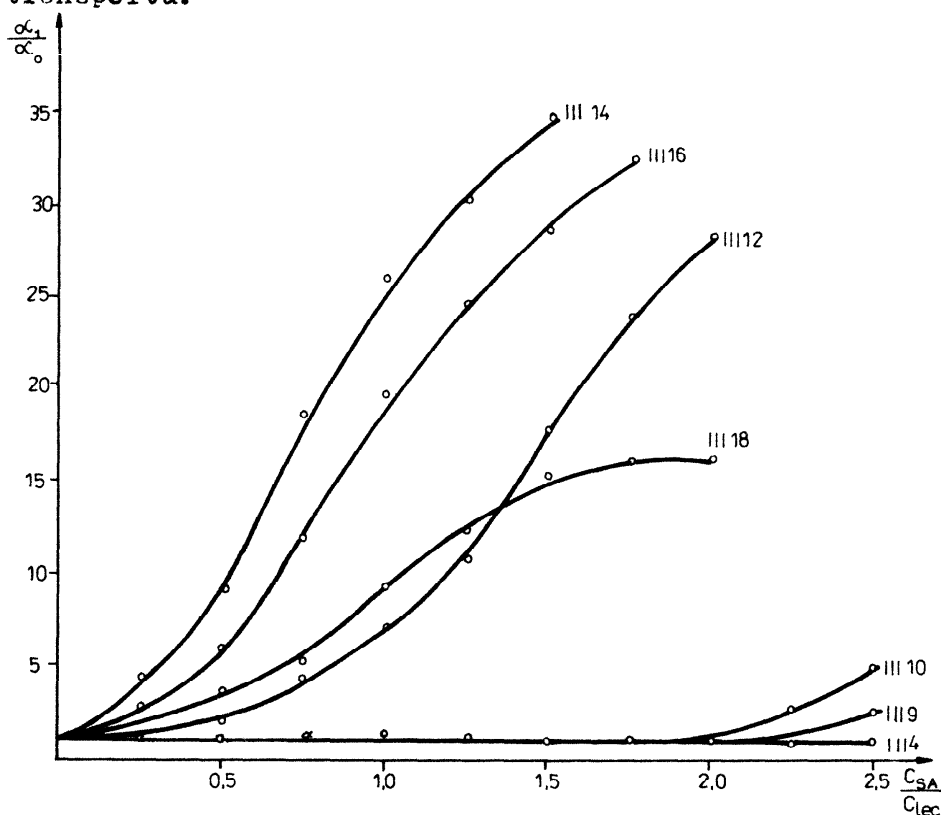
- uszeregowanie krzywych względem osi stężeń dla związków IA, IB, IC oraz IVA, IVB i IVC wskazuje, że w grupie związków I najsilniej działa związek IA, słabiej IB, a najslabiej IC, natomiast w grupie związków IV najsilniej działającym związkiem jest IVA, słabiej IVB, a najslabiej IVC.

- związki z grupy I wywierają silniejszy wpływ aniżeli ich odpowiedniki z grupy IV.

Związki IB, IC, II oraz związki z grupy IV są analogami fragmentów związku IA. Wszystkie te analogi związku IA wykazują słabsze działanie aniżeli związek IA. Związek IA jest połączeniem dwóch z tych analogów, a mianowicie związku II oraz związku IC. Związek II, prawie nierozpuszczalny w wodzie, nie wywołuje zmian stałych szybkości, najprawdopodobniej ze względu na brak kontaktu z liposomami. Związek IC można zaliczyć do słabo działających związków. Silne działanie związku IA, będącego połączeniem dwóch

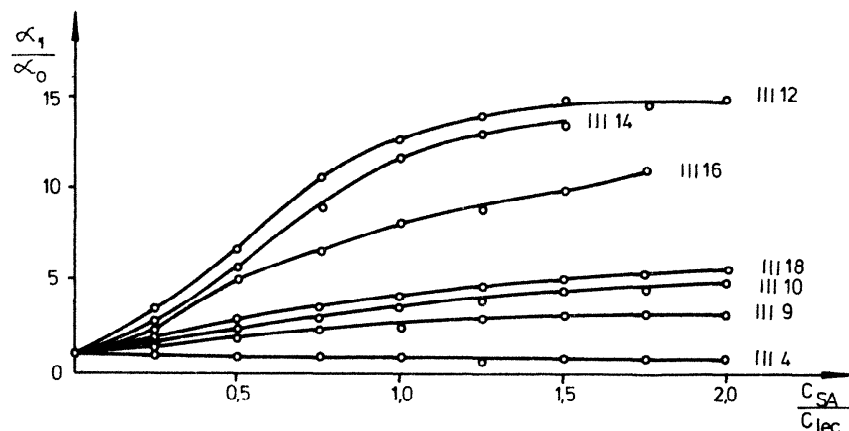
słabo, lub też w ogóle nie działających fragmentów mogłoby więc wynikać z ich współdziałania.

Jak już wspomniano uprzednio cząsteczki amfifilowych związków wbudowują się do błony lecytynowej [np. 13, 18, 48, 64, 87]. Wbudowane do błony cząsteczki mogą wpływać na zmiany szybkości procesu desorpcji jonów Ca^{2+} i procesu przenikania jonów SO_4^{2-} . Analizując właściwości związków SA i ich wpływ na kształt i uszerogowanie krzywych na rys. 6 i 7 można sformułować pewne wnioski dotyczące znaczenia poszczególnych właściwości związków na procesy transportu.

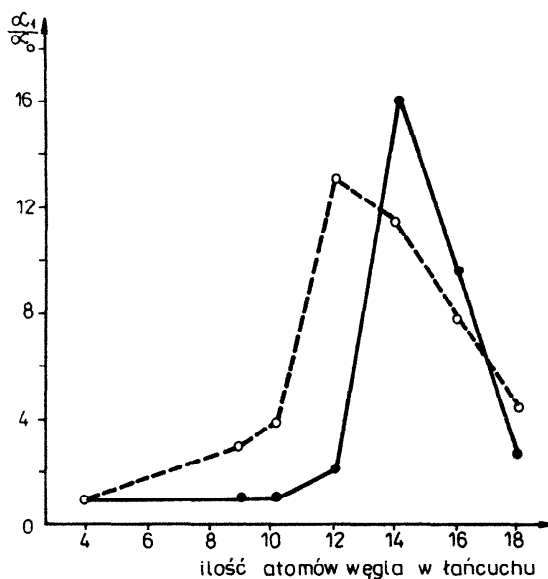


Rys. 8. Zależność względnej stałej szybkości α_1/α_0 procesu desorpcji jonów Ca^{2+} z błony liposomów od względnego stężenia $C_{\text{SA}}/C_{\text{lec}}$ związków z grupy IIIIn

Wzrost ilości grup elektroujemnych w części polarnej związków z grupy I i IV powoduje zwiększenie aktywności związku. Najsłabiej działające związki IC i IVC posiadają dodatni ładunek zlokalizowany przy atomie azotu. Silniej od nich działające związki IB i IVB zawierają w swoich częściach polarnych elektroujemne grupy benzytowe. Najsilniej działające związki IA i IVA zawierają ponadto elektroujemne grupy nitrowinytowe.



Rys. 9. Zależności względnej stałej szybkości α_1/α_0 procesu przenikania jonów SO_4^{2-} przez błony liposomów od względnego stężenia C_{SA}/C_{lec} związków z grupy IIIIn



Rys. 10. Zależność względnej stałej szybkości α_1/α_0 procesu desorpcji jonów Ca^{2+} z błony liposomów (linia ciągła) oraz procesu przenikania jonów SO_4^{2-} przez błonę liposomów (linia przerywana) od ilości atomów węgla w łańcuchu alkilowym

W związkach tych wraz ze wzrostem ilości grup elektroujemnych wzrastają również rozmiary części polarnych. Jednakże zwiększenie rozmiarów części polarnej bez jednoczesnych zmian w rozkładzie

pola elektrycznego w tej części związku powoduje obniżenie efektywności działania, bowiem wszystkie związki w grupie związków morfoliniowych działają słabiej na transport jonów aniżeli ich odpowiedniki z grupy I.

Na rysunkach 8 i 9 przedstawiono zależności względnych stałych kinetycznych od względnego stężenia związków z grupy IIIn dla jonów Ca^{2+} i SO_4^{2-} . Z rysunków tych wynika, że również w przypadku tej grupy związków obserwuje się wzrost stałych kinetycznych wraz ze wzrostem względnego ich stężenia. Działanie związków z grupy IIIn zależy od długości łańcucha alkilowego i jak wyrażnie wynika z rys. 10 zależność ta jest nieliniowa i charakteryzuje się istnieniem maksimum. Najsilniej działającym związkiem z grupy IIIn jest w przypadku jonów Ca^{2+} związek III14, a w przypadku jonów SO_4^{2-} związek III12.

Wyniki uzyskane w badaniach wpływu amfifilowych detergentów na transport substancji przez błony fosfolipidowe mogą stanowić podstawę dla hipotez dotyczących molekularnego mechanizmu działania takich związków zarówno na strukturę błony fosfolipidowej, jak i zjawisko transportu substancji przez taką błonę.

5. MECHANIZM MOLEKULARNEGO ODDZIAŁYWANIA AMFIFILOWYCH DETERGENTÓW Z BŁONĄ LECYTYNOWĄ

Koncepcje dotyczące mechanizmu oddziaływania badanych związków z błoną liposomów lecytynowych i ich wpływu na proces transportu jonów muszą opierać się zarówno na właściwościach badanych związków, jak i właściwościach błony liposomów i na właściwościach badanych jonów.

Przy rozpatrywaniu właściwości badanych związków SA należy uwzględnić właściwości części polarnych, właściwości części niepolarnych oraz wpływ stężenia tych związków. O tym, że właściwości części polarnych odgrywają istotną rolę świadczą wyniki uzyskane dla związków z grupy I i IV, natomiast o znaczeniu części niepolarnej świadczą wyniki uzyskane dla związków z grupy IIIn.

Można przypuszczać, że jeśli cząsteczka SA zderza się z błoną liposomu to w pierwszej chwili dochodzi do oddziaływań między częściami polarnymi cząsteczki SA i cząsteczek lecytyny. Oddzia-

ływania elektryczne umożliwiają cząsteczkom zaczepienie się na powierzchni, co z kolei ułatwia łańcuchom alkilowym wnikięcie do węglowodorowego wnętrza błony.

Rozpatrywać należy dwojakie oddziaływania: oddziaływanie łańcucha alkilowego z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy fosfolipidowej oraz oddziaływanie elektrycznie naładowanej, hydrofilowej części soli amoniowych z polarnymi główkami cząsteczek fosfolipidowych.

Możliwy model oddziaływania z błoną lecytynową, jaki można by w tym przypadku przyjąć, jest następujący. Część hydrofilowa związku IC posiadająca zlokalizowany przy atomie azotu dodatni ładunek elektryczny wystaje nad powierzchnią błony (co wynika z prac [46, 61]), a łańcuch jest zakotwiczony we wnętrzu błony. Obecny w cząsteczce związku IB płaski pierścień aromatyczny jest grupą elektroujemną. Przy zetknięciu cząsteczki IB z błoną i po wnikięciu łańcucha do wnętrza błony, część hydrofilowa w wyniku oddziaływań kulombowskich, przyjmie takie położenie, w którym dodatnia grupa amoniowa znajdzie się w pobliżu ujemnie naładowanej grupy fosforanowej cząsteczki fosfolipidowej, natomiast pierścień fenylowy, dzięki zlokalizowanym elektronom π znajdzie się w pobliżu dodatnio naładowanej grupy cholinowej i przyjmie pozycję równoległą do błony. Oddziaływanie pierścienia fenylowego z błoną wzmacnia działanie grupy amoniowej, w wyniku czego może nastąpić zmniejszenie odległości między częścią polarną cząsteczki IB i błoną. Mogą to być oddziaływania w obrębie jednej cząsteczki lecytyny lub oddziaływania z dwiema cząsteczkami lecytyny, tj. grupy amoniowej cząsteczki IB z grupą fosforanową jednej cząsteczki lecytyny oraz pierścienia fenylowego cząsteczki IB z grupą cholinową drugiej cząsteczki lecytyny. Może również nastąpić częściowe wbudowanie się grupy polarnej tego związku do polarnej warstwy błony.

Związek IA zawiera w swojej części polarnej dodatkową grupę elektroujemną, nitrowinyłową, wprowadzającą dalsze zmiany w rozkładzie ładunku elektrycznego i w rozmiarach. Można przypuszczać, że zwiększona ilość elektronów π oddziałujących z cząsteczkami fosfolipidowymi na zwiększonym obszarze spowoduje dalsze w porównaniu z cząsteczką IB, zbliżenie do polarnej warstwy błony, głębsze wnikięcie części polarnej związku i głębszą penetrację łańcucha w głąb węglowodorowego wnętrza błony.

Związki z grupy IV (tab. 2) różnią się od związków z grupy I obecnością grupy morfolinowej. Pierścień morfolinowy zwiększa znacznie rozmiary polarnej główki przy zaniedbywalnych zmianach w rozkładzie pola elektrycznego. Obecność pierścienia morfolinowego może spowodować zwiększenie odległości części polarnej związków z grupy IV od błony, a więc osłabić siły oddziaływania i zmniejszyć głębokość wnikania tych związków do błony. Eliasz i współprac. [48] stwierdzili podobne, osłabiające działanie wynikające ze wzrostu rozmiarów główki, na przesunięcie temperatury przejścia fazowego dla układu złożonego z lecytyny oraz soli trimetylo-, trietylo- i tributyloloalkiloamoniovych. Podobnie jak to miało miejsce w grupie związków I, związek IVB różni się od związku IVC obecnością podstawnika benzyłowego, a związek IVA - dodatkowo obecnością grupy nitrowinyłowej. Należy się więc spodziewać najsilniejszych oddziaływań z błoną w przypadku związku IVA, słabszych dla związku IVB, a najsłabszych w przypadku związku IVC.

W oddziaływaniach poszczególnych związków z grupy I i IV z błoną liposomów lecytynowych istotną rolę odgrywa więc współdziałanie dwóch czynników charakteryzujących główki tych związków: rozkład pola elektrycznego i rozmiary przekroju poprzecznego. Wydaje się jednak, że istotne znaczenie ma nie tyle maksymalny przekrój poprzeczny główki, ile przekrój efektywny, tzn. przekrój tej części główki, która znajduje się wewnątrz warstwy główek lecytyny. W obrębie każdej z grup związków I i IV przekrój efektywny rośnie wraz ze wzrostem rzeczywistych rozmiarów główki. Porównanie związków z grupy I z ich odpowiednikami w grupie IV (tab. 1) wskazuje, że w każdym przypadku przekrój efektywny główek związków z grupy I powinien być większy aniżeli efektywny przekrój główek ich odpowiedników z grupy IV.

W przypadku najsilniej działających związków z grupy I i IV, a więc w przypadku związków IA, IVA, IB i IVB, wspólne działanie części hydrofobowej i części hydrofilowej tych związków z częściami lecytyny, powodujące wciągnięcie główek związków SA do wnętrza hydrofilowej warstwy błony, może wywołać lateralną ekspansję błony w obszarze hydrofilowym [52] i zwiększenie odległości między łańcuchami.

Cząsteczka badanych SA wbudowując się do błony lecytynowej oddziałuje ze swym najbliższym otoczeniem, co może prowadzić do

deformacji tego otoczenia. Należy się spodziewać, że wywołane w ten sposób deformacje błony będą tym większe, im silniejsze będą oddziaływania między związkami SA i cząsteczkami lecytyny.

Wpływ części niepolarniej na badane tutaj procesy określono na podstawie ich zależności od długości łańcucha alkilowego grupy związków alkoksymetylenotrimetyloamoniowych. Zależności na rys. 8 i 9 wydają się wskazywać na istotne znaczenie oddziaływań hydrofobowych.

Wzrost długości łańcuchów powoduje wzrost oddziaływań między hydrofobowymi łańcuchami i co za tym idzie, głębsze wnikięcie łańcuchów do warstwy węglowodorowej [191]. Jeśli łańcuch będzie bardzo krótki, jak np. w przypadku związku III4, to ponieważ główka tego związku wystaje na zewnątrz, a oddziaływania hydrofobowe są bardzo słabe, związek ten może w ogóle nie wbudować się do błony. W przypadku związków o dłuższym łańcuchu, łańcuch ten dzięki ruchom termicznym może przeniknąć przez warstwę hydrofilową błony, wywołać lateralną ekspansję główek lecytyny i wnikać do obszaru łańcuchów kwasów tłuszczowych. Krótkie łańcuchy związków III9 i III10 będą ulokowane w górnej części warstwy hydrofobowej, w wyniku czego mogą wywołać nieznaczne tylko zaburzenia w tej części warstwy oraz w głębszej, środkowej części dwuwarstwy fosfolipidowej. Dłuższy łańcuch związków III12 i III14, krótszy jednak od średniej długości łańcuchów lecytyny, może rozdzielić całkowicie sąsiadujące z nim łańcuchy kwasów tłuszczowych, w wyniku czego może powstać luka termiczna. W takiej luce termicznej łańcuchy mogą wykazywać większą ruchliwość, nastąpić więc może wzrost ciekłości środkowej części dwuwarstwy fosfolipidowej. Jeszcze dłuższe łańcuchy związków III16 i III18 mogą spowodować zmniejszenie tych luk; długość tych łańcuchów jest już zbliżona do długości łańcuchów kwasów tłuszczowych znacznej części cząsteczek lecytyny.

Powyższe rozumowanie wskazuje na możliwość istnienia maksymalnego rozluźnienia wnętrza dwuwarstwy lecytyny w zależności od długości łańcucha wbudowującego się związku. Występowanie optymalnej długości łańcucha wywołującego największy wzrost ciekłości błony stwierdzili również inni autorzy, stosując badania mikrokalorymetryczne przejść fazowych dla soli n-alkilotrimetyloamoniowych [52, 64].

Na zjawisko oddziaływania związków SA z błoną liposomów lecy-

tynowych, oprócz omawianych wyżej czynników, mają również wpływ właściwości transportowanych jonów Ca^{2+} i SO_4^{2-} oraz stężenie związków SA.

Obecność jonów Ca^{2+} w błonie lecytynowej powoduje istnienie w niej lokalnych, dodatnich pól elektrycznych i nadaje całej błonie ładunek dodatni. Oddziaływania części polarnych cząsteczek lecytynowych z dodatnią główką wbudowanych do błony badanych cząsteczek SA mogą spowodować osłabienie sił wiązania dodatnich jonów wapniowych w warstwie główek lecytyny i w efekcie wypływ tych jonów z błony liposomów. Można tu, jak się wydaje, mówić o konkurencji kationowych cząsteczek amfifilowych z kationami wapniowymi.

Deformacje wywołane przez pojedyncze cząsteczki związków SA, zwłaszcza w przypadku związków słabiej działających, mogą być zbyt małe, aby spowodować uwolnienie jonu Ca^{2+} z błony. Dopiero większa ilość wbudowanych cząsteczek SA, w wyniku działania ich sumarycznego pola elektrostatycznego może w wystarczającym stopniu osłabić siły wiązania jonu Ca^{2+} w błonie i umożliwić mu wypływ. W ten sposób można by wytłumaczyć istnienie efektu stężeniowego. Stężenie związków SA inicjujące wzrost stałej szybkości wypływu jonów Ca^{2+} z błony jest tym większe, im słabsze jest oddziaływanie danego związku SA z błoną.

Na podstawie stwierdzonej tutaj zależności stałej szybkości wypływu jonów Ca^{2+} od długości łańcucha można, jak się wydaje, wyciągnąć wniosek, że współczynnik rozdziału związków IIIn między błoną liposomu i ośrodkiem zewnętrznym powinien również być zależny od długości łańcucha i zależność ta powinna również charakteryzować się występowaniem maksimum dla określonej długości łańcucha. Przy największym bowiem współczynniku rozdziału tych związków powinien wystąpić największy wzrost stałej szybkości wypływu jonów Ca^{2+} z błony. Należy jednak, jak się wydaje, oczekiwać, że obecne w błonie jony Ca^{2+} nadające błonie dodatni ładunek wypadkowy mogą mieć wpływ na zależność współczynnika rozdziału od długości łańcucha.

Badania przenikania jonów siarczanowych przez błonę liposomów odbywały się w roztworze nie zawierającym jonów Ca^{2+} . Błona liposomów w nieobecności związków SA w roztworze posiada w przybliżeniu zerowy ładunek wypadkowy. Badane związki SA, wbudowując się do błony lecytynowej ładują tę błonę, a właściwie jej zewnętrzną powierzchnię ładunkiem dodatnim. Wzrost współczynnika przenikania

anionów przez płaską błonę lecytynową pod wpływem związków typu IC, znajdujących się po obydwu stronach błony, stwierdzono w pracy [2] uzasadniając to zmianą ładunku powierzchniowego błony. W naszym przypadku, w wyniku wbudowania się badanych SA do warstwy zewnętrznej liposomu powstanie gradient potencjału chemicznego badanych związków i ponadto gradient potencjału elektrycznego między zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony liposomu. Istnienie niewielkiej różnicy potencjałów na czarnych błonach fosfolipidowych, równej ok. 10 mV, pod wpływem anionowych detergentów, stwierdzono w pracy [179], przy czym wzrost stężenia powyżej 0,5 mM nie powodował wzrostu różnicy potencjałów. W naszym przypadku należy również spodziewać się niewielkiej różnicy potencjałów elektrycznych, ułatwiającej wypływ jonów SO_4^{2-} z wnętrza liposomu.

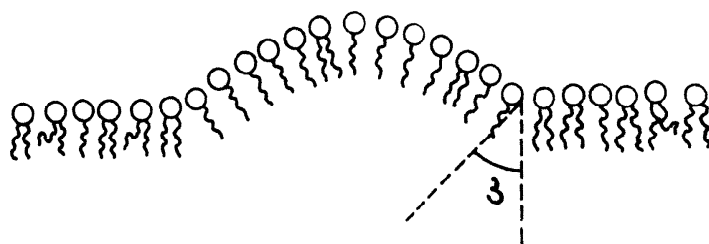
Brak efektu stężeniowego w przypadku jonów SO_4^{2-} wydaje się wynikać stąd, że każda wbudowana cząsteczka SA może stać się źródłem deformacji, źródłem dodatkowych „por” dla przenikających jonów. Wraz ze wzrostem stężenia wzrasta ilość takich deformacji i, co za tym idzie, wzrasta również stała szybkości przenikania jonów SO_4^{2-} przez błonę liposomu.

Krzywe odpowiadające najsilniej działającym związkom, tj. IA, IB, IVA i IVB można podzielić na dwie części różniące się nachyleniem. Dla niższych stężeń tych związków stałe kinetyczne wzrastają wolniej aniżeli dla wyższych stężeń. Jeśli wbudowane do błony związki występują w niej tylko w postaci monomerów, to wraz ze wzrostem stężenia tych związków w ośrodku zewnętrznym powinna zwiększyć się proporcjonalnie ilość wbudowanych do błony cząsteczek. Wyrażna zmiana nachylenia krzywych (rys. 6 i 7) może sugerować, że wbudowane do błony związki tworzą przy wyższych stężeniach struktury inne od monomerów. Zjawiska zaobserwowane dla związków SA przy wyższych stężeniach mogą być, jak się wydaje, wyjaśnione w oparciu o teorię domenową.

Jak wspomniano w rozdziale 3. 2. mieszaniny lipidów, w których cząsteczki charakteryzują się różną symetrią, różnymi kształtami lub różnymi ładunkami główek wykazują tendencję do lateralnej separacji faz. Koncepcję tę dla układów złożonych z lipidów i innych substancji wykorzystali w swoich pracach niektórzy autorzy: dla układu złożonego z lipidów i niektórych alkoholi oraz anestetyków J a i n i współprac. [92], T r u d e l l [177];

dla układu złożonego z lecytyny, sfingomieliny i niejonowego detergentu I s r a e l a c h w i l i i współprac. [87] oraz dla układu zawierającego feofitynę H u a n g i T h o m p s o n [85].

Wydaje się, że w układach rozważanych w prezentowanej pracy należy również spodziewać się tendencji do lateralnej separacji i powstawania domen. Częsteczki związków SA różnią się bowiem od cząsteczek lecytyny w znacznym stopniu zarówno ładunkiem główek i ich kształtem, jak również częścią hydrofobową, posiadają bowiem tylko jeden łańcuch. Wydaje się więc prawdopodobne, że cząsteczki badanych soli amoniowych będą w błonie gromadzić się razem tworząc domeny, jeśli tylko oddziaływanie między łańcuchami będzie przewyższało odpychające działanie jednakowo naładowanych główek. Można przypuszczać, że pewna ilość cząsteczek lecytyny z przewagą cząsteczek o dwóch nasyconych łańcuchach będzie się również w tych domenach gromadzić. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że ich obecność może obniżyć odpychające działanie części polarnych badanych związków, podobnie jak ma to miejsce w mieszanych micelach [16], które tworzą się łatwiej aniżeli micelle jednoskładnikowe. Wokół domen wzbogaconych w cząsteczki fosfolipidów o łańcuchach nasyconych powinny wystąpić obszary błony wzbogacone w cząsteczki o łańcuchach nienasyconych. Powierzchnia błony przypadająca na cząsteczkę lecytyny o dwóch łańcuchach nasyconych jest mniejsza od powierzchni przypadającej na cząsteczkę posiadającą łańcuch nienasycony [147]. Wynika stąd wniosek, że w domenach zawierających cząsteczki SA i lecytyny o łańcuchach nasyconych wystąpi większa gęstość upakowania łańcuchów i główek aniżeli w obszarach błony otaczających domeny.



Rys. 11. Schemat przedstawiający możliwy model wycinka monowarstwy błony liposomu z domeną utworzoną z cząsteczek związków SA (⌘) i lecytyny (⌘)

ϵ - kąt charakterystyczny dla defektu na krawędzi domeny

Rozmiary główek są, w przypadku wszystkich badanych SA, większe aniżeli poprzeczne rozmiary łańcucha alkilowego, w wyniku czego domeny mogą mieć krzywiznę dodatnią. Wokół takich obszarów o znacznym sumarycznym ładunku dodatnim mogą wystąpić silniejsze deformacje elektryczne aniżeli wokół pojedynczych cząsteczek SA. Na granicy domen (rys. 11), jak również w środkowej części warstwy hydrofobowej mogą powstać defekty w postaci luk [58, 168]. Defekty takie mogą stanowić aktywne centra, w których mogą przebywać przenikające cząsteczki.

Wraz ze wzrostem stężenia badanych SA w ośrodku zewnętrznym większa ich ilość wbudowuje się do błony, co może spowodować zarówno wzrost ilości domen oraz wzrost zagęszczenia związków SA w domenach jak i wynikający z tego zagęszczenia wzrost krzywizny domen. Przy odpowiednio dużym stężeniu i wynikających stąd odpowiednio dużych deformacjach błony może nastąpić przemiana fazowa mieszanych liposomów na mieszane micle, czyli solubilizacja liposomów.

Wyjaśnienie efektu przyspieszenia wpływu jonów wapniowych z błony w oparciu o domenowy mechanizm działania związków może polegać na tym, że w dodatnio naładowanych domenach powstaje silne dodatnie pole elektryczne, które osłabia oddziaływanie między cząsteczkami lecytyny i jonami wapnia i umożliwia wpływ jonów wapnia z błony. Dodatnio naładowana domena osłabia również siły wiązania jonów Ca^{2+} w najbliższym swoim otoczeniu.

O roli części hydrofobowej jednołańcuchowych związków amfifilowych w tworzeniu domen oraz w wpływie jonów Ca^{2+} z błony lecytynowej mogą świadczyć wyniki uzyskane dla związków z grupy IIIIn. Związki z grupy IIIIn o krótkich łańcuchach alkilowych, wbudowane do błony, mogą nie wywoływać separacji faz, bowiem siły odpychania główek mogą w tym przypadku nie zostać skompensowane przez oddziaływania między łańcuchami. W przypadku związków o dostatecznie długich łańcuchach może dojść do separacji na fazy o większym i mniejszym zagęszczeniu związków z grupy IIIIn. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego tych związków wzrastają siły oddziaływania między łańcuchami w wyniku czego wzrośnie gęstość cząsteczek związków IIIIn w domenach. Przy większym zagęszczeniu dodatnich cząsteczek jednołańcuchowych w domenie, wzrasta, jak już wspomniano, jej sumaryczny ładunek dodatni i krzywizna jej powierzchni, co w rezultacie wywołuje wzrost wpływu jonów Ca^{2+} z błony.

O roli części hydrofilowej jednołańcuchowych związków amfifilowych w tworzeniu domen oraz w wpływie jonów Ca^{2+} z błony lecytynowej można wnioskować na podstawie wyników uzyskanych dla związków z grupy I i IV. Związki z grupy I i IV zawierające po 12 atomów węgla w łańcuchu alkilowym, a więc ilość odpowiadającą niemal optymalnej długości łańcucha dla badanych tutaj procesów, mogą, jak się wydaje, wykazywać dostatecznie duże działania między łańcuchami, aby móc tworzyć domeny. Wydaje się ponadto, że części polarne tych związków, które posiadają elektrycznie grupy mogą działać na siebie z mniejszymi siłami odpychania aniżeli związki IC, IVC lub związki z grupy IIIn i łatwiej tworzyć domeny o większym zagęszczeniu tych związków. Tworzeniu mieszanych domen, tj. złożonych zarówno z cząsteczek badanych związków, jak i z cząsteczek lecytyny będzie sprzyjać fakt silnego wzajemnego oddziaływania części polarnych tych związków. Krzywizna tych domen będzie zależna od efektywnego przekroju części polarnej związków. Wraz ze wzrostem efektywnego przekroju główki wzrośnie również krzywizna domen. Z powyższego rozumowania wypływa wniosek, że im silniejsze będą oddziaływania między cząsteczkami badanych związków i cząsteczkami lecytyny, im większe będą efektywne rozmiary główek badanych związków, tym bardziej zakrzywione powstaną domeny, a więc tym większe deformacje wystąpią w błonie i tym silniejszy będzie wpływ tych związków na badane procesy. Wniosek ten uzasadnia usytuowanie krzywych na rys. 6.

Przyspieszenie przenikania jonów siarczanowych przez błonę liposomu w oparciu o domenowy mechanizm działania badanych związków SA może być również wyjaśnione w oparciu o zmiany strukturalne błony zachodzące w wyniku utworzenia się domen. Jak już wspomniano, w wyniku separacji faz powstają najprawdopodobniej w błonie obszary wzbogacone w badane związki i cząsteczki lecytyny o dwóch łańcuchach nasyconych oraz obszary wzbogacone w cząsteczki lecytyny o łańcuchach nienasyconych. Obszary zawierające łańcuchy nienasycone są bardziej przenikliwe dla substancji ze względu na rzadsze upakowanie łańcuchów i główek, jak również ze względu na specyficzne oddziaływania elektryczne podwójnych wiązań [148]. Im większa nastąpi separacja faz, tym bardziej przenikliwa powinna stać się błona.

Wydaje się, że istotne znaczenie dla zjawiska przenikania jonów mogą mieć defekty powstające na granicy domen o wypukłej powierzchni (rys. 11). Defekty te mogą spełniać rolę kanałów dla

dyfundujących jonów. Następnym czynnikiem, który może spowodować przyspieszenie transportu jonów siarczanowych jest ładunek powierzchni domen. Na zewnętrznej powierzchni dodatnio naładowanych domen oraz w ich pobliżu mogą gromadzić się ujemnie naładowane jony, m.in. jony siarczanowe. W efekcie gęstość jonów SO_4^{2-} w pobliżu defektów będzie większa aniżeli poza domenami, co zwiększy prawdopodobieństwo ich wnikania do wnętrza błony. Ponieważ związki SA najsilniej oddziałujące z błoną są najbardziej efektywne w tworzeniu domen o dużej krzywiznie, więc związki te powinny najbardziej wpływać na wzrost transportu jonów siarczanowych. Wniosek ten uzasadnia uszeregowanie krzywych na rys. 7; najbardziej przyspieszają przenikanie jonów SO_4^{2-} związki IA i IVA, słabiej IB i IVB, a najsłabiej IC i IVC.

Nie można również wykluczyć hipotezy, że przy odpowiednio dużym stężeniu związków SA mogą w błonie powstać szczególne domeny - toroidalne pory o wnętrzu wypełnionym wodą i ściankach utworzonych z główek cząsteczek związków SA. Hipotezę taką wysunął P e t r o v [141] dla przypadku, gdy lipidy w kształcie klina (np. lizolecytyna) są obecne w błonie utworzonej z lipidów dwułańcuchowych. Koncepcja powstawania por wodnych w błonie liposomów pod wpływem związków SA mogłaby dobrze tłumaczyć silny wzrost stałych szybkości przenikania jonów siarczanowych przy odpowiednio dużych stężeniach silnie działających związków SA.

6. ZASTOSOWANIA

Niektóre z omawianych w poprzednim rozdziale związków zostały poddane testowi biologicznemu. Badano aktywność grzybobójczą tych związków w stosunku do *Aternaria tenuis* i *Botrytis cinerea* [185-187] oraz aktywność hemolityczną [103].

Wyniki prezentowane uprzednio dla obiektu modelowego oraz wyniki uzyskane dla obiektów biologicznych wykazują daleko idące podobieństwa.

Badania aktywności grzybobójczej związków III4, III9, III10 i III12 pozwoliły stwierdzić, że związki III4 i III9 nie wykazują niemal żadnej aktywności grzybobójczej, natomiast związki III10 i III12 wykazują taką aktywność, przy czym związek III12 jest 10-krotnie bardziej aktywny aniżeli związek III10 [187]. Aktywność hemolityczna związków z grupy III_n wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego [103]. Podobne wyniki dla innej

grupy soli alkiloamoniowych uzyskano w pracy [102]. Dla homologicznej grupy związków alkoksymetylenometylomorfolinowych stwierdzono występowanie maksimum aktywności grzybobójczej dla 12 atomów węgla w łańcuchu alkilowym (informacja prywatna). Powyższe wyniki wykazują zbieżność z wynikami uzyskanymi dla zjawisk kinetycznych w błonach liposomów.

Badania aktywności grzybobójczej związków IA i IB w stosunku do tych samych grzybów wykazały, że związek IA wykazuje większą aktywność aniżeli związek IB [185]. Stwierdzić więc można znowu zbieżność testu biologicznego z przedstawionymi tutaj wynikami. Podobną zbieżność wyników można również zaobserwować w przypadku roli grupy morfolinowej porównując działanie związków z grupy I i związków z grupy IV, a mianowicie zarówno wyższą aktywność grzybobójczą związku IA aniżeli IVA [186], jak i większą aktywność hemolityczną [103].

Na podstawie zbieżności wyników uzyskanych w testach biologicznych z wynikami uzyskanymi w badaniach nad zjawiskami transportowymi, przedstawionymi w tej pracy, nie można wykluczyć przypuszczenia, że grzybobójcze działanie badanych związków może wynikać z zaburzeń strukturalnych fazy lipidowej błon biologicznych i wynikających stąd zaburzeń procesów transportowych.

Daleko idąca zbieżność testu biologicznego z uzyskanymi tutaj wynikami pozwala również sugerować możliwość praktycznego wykorzystania badań transportowych na liposomach do testowania związków chemicznych ze względu na ich zastosowanie jako fungicydy w tych wszystkich przypadkach, kiedy związki biologicznie czynne oddziałują z fazą lipidową błon.

Reasumując można powiedzieć, że uzyskane w tej pracy wyniki dotyczące mechanizmu działania badanych związków na strukturę biologicznej błony modelowej oraz procesy transportu przez tę błonę mogą być pomocne w racjonalnej syntezie nowych związków biologicznie aktywnych i umożliwić wyznaczenie optymalnych elementów strukturalnych cząsteczek o określonej aktywności biologicznej.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 22 VI 1982

LITERATURA

- [1] Antonov V. F., Korepanova E. A., Vladimirov Yu. A., *studia biophysica*, 58, 87 (1976).
- [2] Antonov V. F., Petrov V. V., Moinar A. A.,

- Predvoditel'ev D. A., Ivanov A. S., *Nature*, 283, 585 (1980).
- [3] Attwood D., Saunders L., *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 344 (1965).
 - [4] Balmbra R. R., Clune J. S., Goodman J. F., *Nature*, 222, 1159 (1969).
 - [5] Bangham A. D., *Membrane Models with Phospholipids*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, ed. J. A. V. Butler, D. Noble, Pergamon Press, Oxford, 18, 29 (1968).
 - [6] Bangham A. D., Dawson R. M. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 59, 103 (1962).
 - [7] Bangham A. D., de Gier J., Greville G. D., *Chem. Phys. Lipids*, 1, 225 (1967).
 - [8] Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G. A., *Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes*, *Methods in Membrane Biology*, ed. E. D. Korn, Plenum Press, New York 1974, p. 1.
 - [9] Bangham A. D., Horn R. W., *J. Mol. Biol.*, 8, 660 (1964).
 - [10] Bangham A. D., Lea E. J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 511, 388 (1978).
 - [11] Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, 13, 238 (1965).
 - [12] Barton P. G., Gunstone F. D., *J. Biol. Chem.*, 250, 4470 (1975).
 - [13] Batzri S., Korn E. D., *J. Cell. Biol.*, 66, 621 (1975).
 - [14] Becher P., *Non-ionic Surfactants*, ed. M. J. Schnick, Marcell Dekker, New York 1967, p. 478.
 - [15] Berden J. A., Barker R. W., Radda G. K., *Biochim. Biophys. Acta*, 375, 186 (1975).
 - [16] Beyer K., Klingenberg M., *Biochemistry*, 17, 1424 (1978).
 - [17] Birdi K. S., *J. Colloid Interface Sci.*, 57, 228 (1976).
 - [18] Blank M., Britten J., *Physical Principles in Monolayer and Membrane Permeation*, *Physical Principles of Biological Membranes*, ed. F. Snell, J. Wolken, G. Iverson, J. Lam, Gordon and Breach Science Publishers, New York, London, Paris 1970, p. 184.
 - [19] Block M. C., van der Neut-Kok E. C. M., van Deenen L. L. M., de Gier J., *Biochim. Biophys. Acta*, 406, 187 (1975).
 - [20] Blume A., Arnold B., Weltzien H. U., *FEBS Lett.*, 61, 199 (1976).
 - [21] Blume A., Ackerman T., *FEBS Lett.*, 43, 71 (1974).
 - [22] Brunner J., Skrabal P., Hauser H., *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 322 (1976).
 - [23] Butler K. W., Tattire N. H., Smith J. C. P., *Biochim. Biophys. Acta*, 363, 351 (1974).
 - [24] Castellino F. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 189, 465 (1978).
 - [25] Caswell A. H., Pressman B. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 292 (1972).
 - [26] Chapman D., *Quart. Rev. Biophys.*, 8, 185 (1975).
 - [27] Chapman D., Byrne P., Shipley G. C., *Proc. Roy. Soc. A.*, 290, 115 (1966).
 - [28] Chapman D., Collin D. T., *Nature*, 206, 189 (1965).

- [29] Chapman D., Flusk D. J., Penkett S. A., Shipley G. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 255 (1968).
- [30] Chapman D., Piel W. E., Kingston B., Lilliey T. H., *Biochim. Biophys. Acta*, 464, 260 (1977).
- [31] Dalmark M., Wieth J. O., *Biochim. Biophys. Acta*, 219, 525 (1970).
- [32] Danieli J. E., Davson H. A., *J. Cell. Physiol.*, 5, 495 (1935).
- [33] Darke A., Finer E. G., Flook A. G., Phillips M. C., *J. Molec. Biol.*, 63, 265 (1972).
- [34] Deamer D., Bangham A. D., *Biochim. Biophys. Acta*, 443, 629 (1976).
- [35] Deamer D., *Ann. Acad. Sci.*, 308, 250 (1978).
- [36] De Gier J., *Membrane Lipids and the General Permeability Properties of the Interface, Advances in Inflammation Research*, ed. G. Weismann, Raven Press, New York 1979, p. 7.
- [37] De Gier J., Mandersloot J. G., Hupkes J. V., Mc Elhaneey R. N., van Beek W. P., *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 610 (1971).
- [38] De Gier J., Mandersloot J. G., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 666 (1968).
- [39] Demel R. A., Geurts van Kessel W. S. M., Zwaal R. F. A., Roelofs B., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 406, 97 (1975).
- [40] Dennis E. A., Owens J. M., *J. Supramol. Struct.*, 1, 165 (1973).
- [41] Deranleau D. A., Rothen M. S., Dubler D., Lüscher E. F., *Anal. Biochem.*, 102, 288 (1980).
- [42] Derovichian D. G., *The Physical Chemistry of Phospholipids, Progress in Biophysics and Molecular Biology*, ed. J. A. U. Butler, D. Noble, Pergamon Press, New York, 14, 263 (1964).
- [43] Eisenman G., Sandblom J., Neher E., *Ionic Selectivity Saturation, Binding and Block in the Gramicidin A Channel: A Preliminary Report, Metal-Ligand Interactions in Organic Chemistry and Biochemistry*, ed. B. Pullman, N. Goldblum, Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland, 2, 1 (1977).
- [44] Eisenman G., Szabo G., McLaughlin S. G., Giani S. M., *Bioenergetics*, 4, 93 (1973).
- [45] Ekwall P., *Composition, Properties and Structures of Lipid Crystalline Phases in System of Amphiphilic Compounds, Advances in Liquid Crystals Research*, ed. G. H. Brown, Academic Press, London 1975, p. 1.
- [46] Eliasz A. W., Chapman D., Ewing D. F., *Biochim. Biophys. Acta*, 448, 220 (1976).
- [47] Ferreira H. G., Lew V. L., *Passive Ca Transport and Cytoplasmic Ca Buffering, Membrane Transport in Red Cells*, ed. J. C. Ellory, V. L. Lew, Academic Press, London 1977, p. 53.
- [48] Finner E. G., Flook A. G., Hauser H. O., *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 49 (1972).
- [49] Frischleder H., Gleichmann S., *studia biophysica*, 64, 95 (1977).
- [50] Frischleder H., Uhlig H. D., Hofmann A., *studia biophysica*, 62, 45 (1977).
- [51] Gabrielska J., Grobelny D., Kuczera J., Przestalski S., Witek S., Żyłka R., *studia biophysica*, 77, 193 (1979).

- [52] Gabrielska J., Kuczera J., Oświecimska M., Przestalski S., Witek S., *studies biophysica*, 82, 149 (1981).
- [53] Gaines L. G., *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, ed. J. Wiley, New York 1966, p. 2.
- [54] Gebhardt C., Gruler H., Sackmann E., *Z. Naturforsch.*, 32c, 581 (1977).
- [55] Ginsburg H., Testeson M. T., Testeson D. C., *J. Membr. Biol.*, 42, 153 (1978).
- [56] Gmaj P., Murer H., Kinne R., *Biochem. J.*, 178, 549 (1979).
- [57] Gomułkiewicz J., Przestalski S., Kuczera J., Bieliński E., *studies biophysica*, 17, 117 (1969).
- [58] Gorter E., Grendel F., *J. Exptl. Med.*, 41, 439 (1925).
- [59] Grant C. W. M., Wu S. H., McConnell H. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 363, 151 (1974).
- [60] Grasdalen H., Eriksson L. E. G., Westman J., Ehrenberg A., *Biochim. Biophys. Acta*, 469, 151 (1977).
- [61] Grupe R., Menzel G., Sternberg B., Zwanzig M., Göring H., *studies biophysica*, 69, 161 (1978).
- [62] Grupe R., Preusser E., Göring H., *studies biophysica*, 69, 81 (1978).
- [63] Grupe R., Zschätzsch U., Preusser E., Göring H., *studies biophysica*, 66, 31 (1977).
- [64] Gulik-Krzywicki T., *Order-Disorder Conformational Transition of the Lipid Hydrocarbon Chains in Biological Membranes and Their Relation to the Membrane Transport*, *Biophysics of Membrane Transport*, ed. J. Kuczera, S. Przestalski, Agr. Univ., Wrocław, I, 240 (1976).
- [65] Gunn R. B., *Transport of Anions Across Red Cell Membrane*, *Membrane Transport in Biology*, ed. D. C. Testeson, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, II, 59 (1979).
- [66] Gutknecht J., Graves J. J., Testeson D. C., *J. Gen. Physiol.*, 71, 269 (1978).
- [67] Haest C. W. M., de Gier J., OpdenKemp J. A. F., Bartels P., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 720 (1972).
- [68] Harlos K., Vaz W. L. C., Kovatchev S., *FEBS Lett.*, 77, 7 (1977).
- [69] Hartmann W., Galla H. J., Sackmann E., *FEBS Lett.*, 78, 169 (1977).
- [70] Hashimoto M., *Phys. Soc. Japan*, 27, 1598 (1969).
- [71] Hashimoto M., *Phys. Soc. Japan*, 28, 1067 (1970).
- [72] Hauser H. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 1049 (1971).
- [73] Hauser H. O., Dawson R. M. C., *Biochem. J.*, 109, 909 (1968).
- [74] Hauser H. O., Iron L., *Z. Physiol. Chem.*, 353, 1579 (1972).
- [75] Hauser H. O., Oldani D., Phillips M. C., *Biochemistry*, 12, 4507 (1973).
- [76] Haydon D. A., Hladky S. B., *Quart. Rev. Biophys.*, 5, 187 (1972).
- [77] Heithier H., Galla H. J., Möhwald H., *J. Physique*, 40, 442 (1979).

- [78] H e l e n i u s A., S i m o n s K., Biochim. Biophys. Acta, 415, 29 (1975).
- [79] H e r t z R., B a r e n h o l t z Y., J. Colloid Interface Sci., 60, 188 (1977).
- [80] H i l l M. W., Biochem. Soc. Trans., 3/1, 149 (1975).
- [81] H i l l M. W., The Passive Permeability of Lipid Bilayers (Liposomes), Biophysics of Membrane Transport, ed. S. Przewstalski, J. Kuczera, J. Idzior, Agr. Univ., Wrocław, III, 139 (1977).
- [82] H i l l M. W., Ann. Acad. Sci., 308, 101 (1978).
- [83] H u a n g C., Biochemistry, 8, 344 (1969).
- [84] H u a n g C., T h o m p s o n T. E., J. Mol. Biol., 13, 183 (1965).
- [85] H u a n g C., T h o m p s o n T. E., Permeation of Homogeneous Single-walled Phosphatidylcholine Vesicles, Methods in Enzymology, ed. S. Fleicher, L. Packer, R. Estabrook, Academic Press, New York, 32, 485 (1974).
- [86] I n o u e K., K i t a g a w a T., Biochim. Biophys. Acta, 426, 1 (1976).
- [87] I s r a e l a c h w i l l i J. N., M i t c h e l l D. J., N i n h a m B. W., Biochim. Biophys. Acta, 470, 185 (1977).
- [88] I t o T., O h n i s h i S. I., Biochim. Biophys. Acta, 352, 29 (1974).
- [89] J a i n M. K., The bimolecular lipid membrane, Van Nostrand Reinhold Company, New York 1972.
- [90] J a i n M. K., G l e e s o n J., U p r e t i A., U p r e t i G. C., Biochim. Biophys. Acta, 509, 1 (1978).
- [91] J a i n M. K., W h i t e H. B., Adv. Lipid Res., 15, 1 (1977).
- [92] J a i n M. K., W u N. M., W r a y L. V., Nature, 255, 494 (1975).
- [93] J ä h n i g F., Ann. Phys., 2, 291 (1978).
- [94] J ä h n i g F., J. Chem. Phys., 70, 3279 (1979).
- [95] J o h n s o n S. M., B a n g h a m A. D., Biochim. Biophys. Acta, 193, 82 (1969).
- [96] J o h n s o n S. M., B a n g h a m A. D., H i l l M. W., K o r n E. D., Biochim. Biophys. Acta, 233, 820 (1971).
- [97] K a r n o v s k y M. J., Am. J. Pathol., 97, 157 (1979).
- [98] K a s u m o v Kh. M., B o r i s o v a M. P., E r m i s h k i n L. N., P o t s e l u y e v V. M., S i l b e r s t e i n A. Ya., V a i n s h t e i n V. A., Biochim. Biophys. Acta, 551, 229 (1979).
- [99] K i m e l b e r g H. K., P a p a h a d j o p o u l o s D., J. Biol. Chem., 246, 1142 (1971).
- [100] K i m e l b e r g H. K., P a p a h a d j o p o u l o s D., Biochim. Biophys. Acta, 282, 277 (1972).
- [101] K l e i n R. A., E l l o r y J. C., J. Membrane Biol., 55, 123 (1980).
- [102] K l e i n R. A., M o o r e M. J., S m i t h M. W., Biochim. Biophys. Acta, 233, 420 (1971).
- [103] K l e s z c z y Ń s k a H., M a t y j a s i k S., S a r a p u k J., G r o b e l n y D., W i t e k S., studia biophysica, 84, 173 (1981).
- [104] K o r n b e r g R. D., M c C o n n e l l H. M., Biochemistry, 10, 1111 (1971).
- [105] K o r n b e r g R. D., M c N a m e e M. G., M c C o n n e l l H. M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 1508 (1972).

- [106] K o r y t a J., Chemical and Electrochemical Properties of Macrocyclic Ion Carriers, Biophysics of Membrane Transport, ed. S. Przestalski, J. Kuczera, J. Idzior, Agr. Univ., Wrocław, I, 157 (1977).
- [107] K o t y k A., J a n a c z e k K., Membrane Transport, Academia Praha, p. 37 (1977).
- [108] K s e n z h e k O. S., B o g a c h P. G., O m e l c z e n k o A. M., J a v o r s k i j J. Z., R y b a l c z e n k o W. K., DOP-UKR. B., 3, 259 (1977).
- [109] K u c z e r a J., Effect of Some Detergents on Phospholipid Membranes, Biophysics of Membrane Transport, ed. J. Kuczera, J. Gabrielska, S. Przestalski, Agr. Univ., Wrocław, I, 313 (1979).
- [110] K u c z e r a J., Ż y ł k a R., studia biophysica, 75, 25 (1979).
- [111] L a n d b r o o k e B. D., C h a p m a n D., Chem. Phys. Lipids, 3, 304 (1969).
- [112] L e e A. G., Biochim. Biophys. Acta, 472, 237 (1977).
- [113] L e e A. G., B i r d s a l l N. S. M., L e v i n e Y. K., M e t c a l f e J. C., Biochim. Biophys. Acta, 255, 43 (1972).
- [114] L i s L. J., R a n d R. P., P a r s e g i a n V. A., Am. Chem. Soc., (1980) p. 41.
- [115] L o n d o n E., F e i g e n s o n G. W., J. Lip. Res., 20, 408 (1979).
- [116] L o n g m u i r K. J., D a h l q u i s t F. M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73, 2716 (1976).
- [117] M a r c e l j a S., W o l f e J., Biochim. Biophys. Acta, 557, 24 (1979).
- [118] M a s o n T. J., H u a n g C., Ann. Acad. Sci., 308, 29 (1978).
- [119] M a s s e r i S., P a s c o l i n i D., G r a d e n i g o G., Biochemistry, 17, 4465 (1978).
- [120] M a z g i s B., K u c z e r a J., studia biophysica, 82, 35 (1981).
- [121] M c C o n n e l H. M., Spin Labeling, ed. L. J. Berliner, Academic Press, New York 1976.
- [122] M i l s m a n n M. H. W., S c h w e n d e n e r R. A., W e d e r H. G., Biochim. Biophys. Acta, 512, 147 (1978).
- [123] M u e l l e r P., R u d i n D. O., T i e n H. T., W e s t c o t t W. C., Nature, 194, 979 (1962).
- [124] M u k e r j e e P., M y s e l s K. J., Critical Micelle Concentration in Aqueous Surfactant Systems, National Bureau of Standards, NSRDS-NBS 36, Washington 1971.
- [125] N a g l e J. F., S c o t t H. L., Physics Today, 31, 38 (1978).
- [126] N e w m a n G. C., H u a n g C., Biochemistry, 14, 3363 (1975).
- [127] N e w t o n C., P a n g b o r n W., N i r S., P a p a h a d j o p o u l o s D., Biochim. Biophys. Acta, 506, 281 (1978).
- [128] N i r S., N e w t o n C., P a p a h a d j o p o u l o s D., Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 5, 116 (1978).
- [129] O h k i S., A o n o O., J. Colloid Interface Sci., 32, 270 (1970).
- [130] P a n g K., C z a n g T., M i l l e r K. W., Mol. Pharmacology, 15, 729 (1979).
- [131] P a p a h a d j o p o u l o s D., Biochim. Biophys. Acta, 242, 254 (1971).

- [132] Papahadjopoulos D., Jacobson K., Nir S., Isaac T., *Biochim. Biophys. Acta*, 311, 330 (1973).
- [133] Papahadjopoulos D., Kimmelfberg H. K., *Phospholipids Vesicles (Liposomes) as Models for Biological Membrane: Their Properties and Interactions with Cholesterol and Proteins*, *Progress in Surface Sciences*, ed. S. G. Davison, Pergamon Press, Oxford 1973, p. 141.
- [134] Papahadjopoulos D., Miller N., *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 624 (1967).
- [135] Papahadjopoulos D., Nir S., Ohki S., *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 561 (1972).
- [136] Papahadjopoulos D., Portis A., Pangborn W., *Ann. Ac. Sci.*, 308, 50 (1978).
- [137] Papahadjopoulos D., Poste G., Schaeffer B. E., Vail W. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 352, 10 (1974).
- [138] Papahadjopoulos D., Watkins J. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 639 (1967).
- [139] Passow H., *European Red Cell Club Symp.*, abstracts, (1982).
- [140] Passow H., Fasold H., Lepke S., Pring M., Schahmann H., *Chemical and Enzymatic Modification of Membrane Proteins and Anion Transport in Human Red Cells Blood Cells, Membrane Toxicity*, ed. M. W. Miller, A. E. Shamoo, Plenum Press, New York, (1977) p. 353.
- [141] Petrov A. G., *The problem of Self-Assembly of Lipids and Proteins into Liquid-Crystalline Membrane Structure*, *Biophysics of Membrane Transport*, ed. J. Kuczera, C. Grygorczyk, S. Przestalski, Agr. Univ. Wrocław, I, 115 (1981).
- [142] Petrov A. G., Seleznev S. A., Dorzanski A., *Acta Phys. Pol.*, A55, 385 (1979).
- [143] Przestalski S., *The Influence of Some Modifiers on Passive Phosphate Ion Transport Across the Red Blood Cell Membrane*, *Biophysics of Membrane Transport*, ed. J. Kuczera, J. Gabrielska, S. Przestalski, Agr. Univ. Wrocław, II, 253 (1979).
- [144] Przestalski S., Borońska E., Broda T., Grygorczyk C., *studia biophysica*, 77, 25 (1979).
- [145] Przestalski S., Kuczera J., Grygorczyk C., Mazgisi B., Sarapuk J., Idziór J., *studia biophysica*, 69, 77 (1978).
- [146] Puskas J. S., Martin Z., *Biochim. Biophys. Acta*, 552, 53 (1979).
- [147] Racker E., *Membranes of Mitochondria and Chloroplast*, Van Nostrand Reinhold Company, New York 1970, p. 29.
- [148] Reed P. W., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.*, 247, 6970 (1972).
- [149] Ribeiro A. A., Dennis E. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 332, 26 (1973).
- [150] Ribeiro A. A., Dennis E. A., *Biochemistry*, 14, 3746 (1975).
- [151] Rothman J. E., Dawidowicz E. A., *Biochemistry*, 14, 2809 (1975).
- [152] Rothstein A., Cabantchik Z. J., Knau P., *Feder. Proc.*, 35, 3 (1976).

- [153] Sackmann E., Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 82, 891 (1978).
- [154] Sackmann E., Trauble H., J. Am. Chem. Soc., 101, 391 (1976).
- [155] Sarapuk J., Oświecimska M., Witek S., studia biophysica, 84, 167 (1981).
- [156] Scarpa A., de Gier J., Biochim. Biophys. Acta, 241, 789 (1971).
- [157] Schieren H., Rudolf S., Finkelstein M., Coleman P., Weissmann G., Biochim. Biophys. Acta, 542, 137 (1978).
- [158] Schlieper P., de Robertis E., Arch. Biochem. Biophys., 184, 204 (1977).
- [159] Schulman J. H., Hughes A. H., Biochem. J., 29, 1243 (1935).
- [160] Seelig A., Seelig J., Biochemistry, 16, 45 (1977).
- [161] Seimiya T., Ashida M., Heki Y., Muramatsu T., Hara I., Hayashi M., J. Colloid Interface Sci., 55, 388 (1976).
- [162] Seimiya T., Ohki S., Biochim. Biophys. Acta, 298, 546 (1973).
- [163] Serebrowskaja K. B., Kuczera J., Sztejn-Margolina W. A., Doklady A.N., 204, 1263 (1972).
- [164] Seufert W. D., Nature, 207, 174 (1965).
- [165] Seufert W. D., Biophysik., 10, 281 (1973).
- [166] Singer S. J., Nicolson G. L., Science, 175, 720 (1972).
- [167] Small D. M., Nature, 211, 816 (1966).
- [168] Small D. M., J. Lipid Res., 8, 551 (1967).
- [169] Small D. M., J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 108 (1968).
- [170] Small D. M., Fed. Proc., 29, 1320 (1970).
- [171] Sunamoto J., Kondo H., Yoshimatsu A., Biochim. Biophys. Acta, 510, 52 (1978).
- [172] Szoka F., Papahadjopoulos D., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 4194 (1978).
- [173] Tanford C., The Hydrophobic Effect, A Wiley-Interscience Publication, New York 1973, p. 4.
- [174] Tanford C., Science, 200, 1012 (1978).
- [175] Thompson T. E., Huang C., Litman B. J., Bilayers and Biomembranes: Compositional Asymetries Induced by Surface Curvature. The Cell Surface in Development, ed. A. A. Moscona, J. Wiley and Sons, New York 1974, p. 1.
- [176] Tien H. T., Diana A. L., J. Chem. Phys. Lipids, 2, 55 (1968).
- [177] Trudell J. R., Anesthesiology, 46, 46 (1977).
- [178] Vanderkooi G., Green D. E., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 66, 615 (1970).
- [179] Van Zutphen H., Merola A. J., Brierley G. P., Cornwell D. G., Arch. Biophys. Biochim., 152, 755 (1972).
- [180] Wallach D. F. H., The Plasma Membrane, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin 1972.
- [181] Weissmann G., Sessa G., Weissmann S., Biochem. Pharm., 15, 1537 (1966).
- [182] Wiedmer T., Brodbeck U., Zahler P., Fulpins B. W., Biochim. Biophys. Acta, 506, 161 (1978).

- [183] Wilkins M. H. F., Blaurock A. E., Engelman D. M., *Nature*, **230**, 72 (1971).
- [184] Williams R. M., Chapman D., *Phospholipids, Liquid Crystal and Cell membranes, Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, ed. R. T. Holman, Pergamon Press, New York 1970, p. 1.
- [185] Witek S., Grobelny D., *Materiały IV International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC)*, Zürich, II, 319 (1978).
- [186] Witek S., Grobelny D., Ptaszkowska J., Bielecki A., Bakuniak E., Fulde S., Górską-Poczopko J., Belg. Patent No 864782 (1978).
- [187] Witek S., Oświecimska M., Ptaszkowska J., Bakuniak E., Górską-Poczopko J., Łaszczyk E., Belg. Patent No 864781 (1978).
- [188] Wood S. G., Symons A. M., Bridges J. W., *Biochem. Pharm.*, **28**, 393 (1979).
- [189] Wright E. M., Diamond J. M., *Phys. Rev.*, **57**, 109 (1977).
- [190] Yeagle P. L., *Acc. Chem. Res.*, **11**, 321 (1978).
- [191] Yedgar S., Barenholz Y., Cooper V. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 98 (1974).

Janina Kuczera

INFLUENCE OF AMPHIPHILE DETERGENTS
ON LIPOSOME MEMBRANES

Summary

The article contains a short review of knowledge about biological model membranes, systems containing amphiphile compounds and about the influence of some amphiphile detergents on liposome membranes and on ion transport across the membranes. Results are analysed of studies of divalent ion permeation across lecithin liposome membranes in the presence of amphiphile ammonium salts. The compounds were so chosen as to differentiate the influence of electric field distribution, size of the polar head and length of the alkyl chain of the compounds on ion transport processes and membrane structure. A molecular mechanism of the action of the compounds on the membrane is discussed and a possibility has been indicated of application of the studies for testing biological activity of substances and for purposeful synthesis of this type of compounds.

dr JANINA KUCZERA
Instytut Biologii Roślin i Biofizyki
Zakład Fizyki i Biofizyki
Akademii Rolniczej we Wrocławiu
ul. Norwida 25
50-375 Wrocław