



II rok BIOTECHNOLOGII

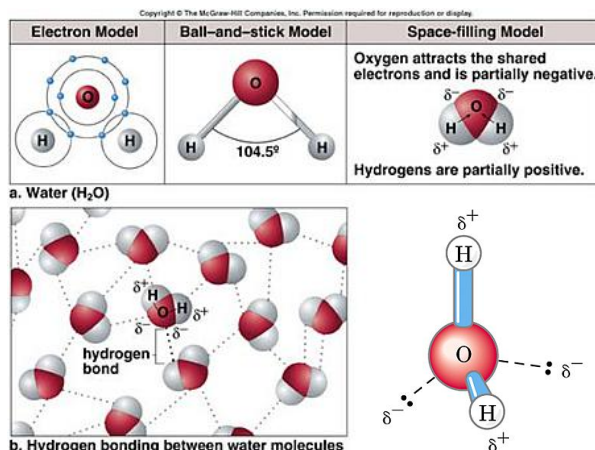
Ćwiczenia z biofizyki, część liposomowa

Rok akademicki 2013/2014

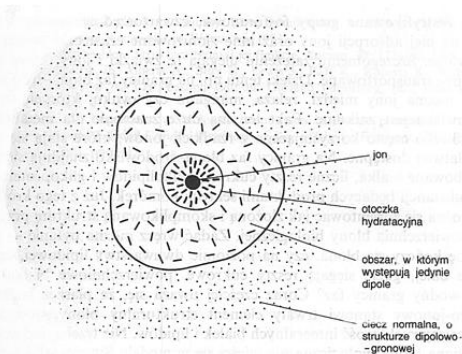
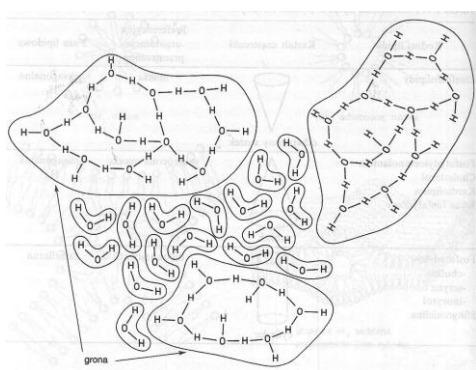
1. Budowa i właściwości wody.
2. Zachowanie się związków amfifilowych w roztworach wodnych.
3. Dwuwarstwa fosfolipidowa.
4. Ilościowe określanie polimorfizmu liotropowego związków amfifilowych.
5. Oddziaływanie związków amfifilowych z dwuwarstwą fosfolipidową.
6. Wykorzystanie fluorescencji w badaniach związków lipidowych.
8. Przykłady sond (znaczników) fluorescencyjnych najczęściej stosowanych w badaniach błon biologicznych.

1. Budowa i właściwości wody.

W cząsteczce wody wiązania O-H są silnie spolaryzowane, a kąt pomiędzy nimi wynosi 104.5° , co powoduje, że posiada ona istotny wypadkowy moment dipolowy o wartości 1.87 D. Wartości momentów dipolowych mają własności kumulatywne, po połączeniu się dwu cząsteczek wody w dimer (takie zjawisko występuje m.in. na granicach faz) wartość ich wspólnego momentu dipolowego rośnie do 10 D. Atom tlenu w cząsteczce wody znajduje się w konfiguracji sp^3 , dwa pozostałe orbitale molekularne są obsadzone przez dwie wolne pary elektronowe. Oddziaływanie między cząsteczkami wody są dwojakiego rodzaju: cząsteczki wody oddziałują ze sobą elektrostatycznie (dipol-dipol), ale główną rolę odgrywają wiązania wodorowe. Polegają one na oddziaływaniu atomu wodoru jednej cząsteczki z atomem tlenu drugiej. Istnienie wiązań wodorowych wywołuje niespotykane u innych wodorków tlenowców właściwości: wysoką temp. wrzenia, duże ciepło parowania (dużą pojemność cieplną), duże napięcie powierzchniowe, większą gęstość cieczy niż lodu. Najwyższą gęstość (1g/ml) woda osiąga w temp. 3.98°C , wynika to z faktu, że właśnie w tej temperaturze zawiera ona najwięcej asocjatów dwucząsteczkowych.



Struktura ciekłej wody ma wysoki stopień nieuporządkowania, czyli wysoką entropię. Przyjmuje się, że woda ciekła ma charakter dimorficzny, zawierający zarówno dipolowe cząstki swobodne, jak i duże agregaty (tzw. grona) połączone wiązaniami wodorowymi. Poza tym istnieje jeszcze pewna ilość agregatów dwu- i trózcząsteczkowych. Grona charakteryzują się krótkim czasem trwania (połowiczny okres rozpadu gron wynosi w temp. 30°C $10^{-10} - 10^{-11}$ s), przy czym nieustannie następuje przechodzenie od struktury cząsteczkowej do gron i odwrotnie. Tak więc w czystej chemicznie wodzie cząsteczki są w stanie równowagi dynamicznej z agregatami. W momencie pojawienia się jonu lub innej cząstki polarnej, struktura ciekłej wody ulega zaburzeniu i wzrostowi uporządkowania (spadek entropii). W bezpośrednim sąsiedztwie otaczanej cząstki gromadzą się dipole wody tworząc w ten sposób tzw. otoczkę hydratacyjną (złożoną zazwyczaj z kilku do kilkunastu warstw dipoli wody), wokół której powstaje dość duży obszar zawierający jedynie swobodne cząsteczki, niezdolne do tworzenia gron. Dopiero z dala od jonu struktura wody przyjmuje normalną postać wody ciekłej.



Struktura ciekłej wody w stanie czystym (po lewej) oraz dokola jonu (po prawej)

Oddziaływania cząsteczek wody obecnych w otoczce hydratacyjnej z otaczanym jonem czy dipolem różnią się co do swojej siły od wiązań obecnych w przestrzeni gron. Zazwyczaj są silniejsze, ale zawsze jest to zależne od budowy otaczanej struktury.

W przypadku otaczanych związków amfifilowych sytuacja dodatkowo się komplikuje.

2. Zachowanie się związków amfifilowych w roztworach wodnych.

Związek posiada właściwości amfifilowe, jeżeli w jego cząsteczce możemy wyróżnić część (lub stronę) hydrofilową i hydrofobową. Region hydrofilowy to część polarna cząsteczki (zawiera grupy polarne, ulegające lub nie ulegające dysocjacji elektrolitycznej), budowa tej części cząsteczki pozwala na powstawanie otoczki hydratacyjnej (płaszcz wodny) dookoła niej. Region hydrofobowy to część niepolarna cząsteczki, zawiera najczęściej łańcuch węglowodorowy lub/i ugrupowanie cykliczne lub policykliczne, może zawierać zmienną liczbę wiązań wielokrotnych o różnym stopniu nienasycenia, a budowa tej części cząsteczki nie pozwala na powstawanie otoczki hydratacyjnej (płaszcz wodny) dookoła niej. Surfactantem nazywamy związek chemiczny obniżający napięcie powierzchniowe wody lub roztworu wodnego (inaczej jest to tensyd). Detergent jest to produkt opracowany dla utrzymywania np. związków hydrofobowych lub innych związków amfifilowych w postaci rozpuszczonej w roztworze wodnym posiadający następujące cechy charakterystyczne: budowa amfifilowa, zdolność tworzenia miceli, zdolność do solubilizacji substancji hydrofobowych i tworzenia z nimi mniej lub bardziej stabilnych emulsji w roztworach wodnych. Związki amfifilowe wykazują tendencję do spontanicznej agregacji w roztworach wodnych, po przekroczeniu krytycznego stężenia i temperatury.

Zjawisko tworzenia przez niepolarne łańcuchy warstw adsorpcyjnych określa się terminem 'oddziaływania hydrofobowe'. Przyczyną wypierania niepolarnych części z wnętrza wody jest oddziaływanie występujące pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi obecnymi w cząsteczkach lipidów (oddziaływania van der Waalsa, **proszę doczytać, jakie składowe wchodzi w jego zakres**) oraz brak oddziaływania pomiędzy łańcuchami a cząsteczkami wody (wiązania kowalencyjne występujące pomiędzy atomami węgla i wodoru są bardzo słabo spolaryzowane). Oddziaływanie cząsteczek wody z grupami $-CH_2-$ jest niezwykle słabe w porównaniu z oddziaływaniem między cząsteczkami wody - prowadzi to do wypychania łańcuchów węglowodorowych z wnętrza fazy wodnej. Początkowo cząsteczki związków amfifilowych występują jako monomery, powyżej limitu rozpuszczalności spontanicznie grupują się w taki sposób, aby części hydrofobowe miały ograniczony kontakt z cząsteczkami wody, co wynika z dążenia układu do minimalizowania energii swobodnej. Od tego momentu (stężenia określanego jako CMC) równowagowe stężenie monomerów surfaktantu pozostaje na stałym poziomie, natomiast rośnie stężenie miceli. Mogą powstawać wówczas także inne typy agregatów fosfolipidowych (np. monowarstwy na granicy faz powietrze-woda), co jest zależne od budowy cząsteczek amfifilu. Tworzenie agregatów w roztworach wodnych jest także silnie zależne od temperatury i stężenia amfifilów.

Poczynając od temperatury określonej wartością tzw. punktu Kraffa (punkt potrójny, czyli punkt na wykresie fazowym obrazujący współistnienie trzech faz danej substancji jednoskładnikowej, w przypadku polimorfizmu liotropowego obrazuje on współistnienie trzech różnych form strukturalnych danej substancji bądź mieszaniny) rozpuszczalność amfifilu silnie wzrasta. Jest to związane z tworzeniem agregatów micelarnych. Dla niektórych amfifilów (głównie niejonowych) dalsze zwiększanie temperatury prowadzi do osiągnięcia tzw. punktu zmętnienia (ang. *cloud point*), powyżej którego oprócz miceli w układzie powstają fazy ciekłokrystaliczne (wyższego rzędu agregaty). Następuje rozdzielenie faz.

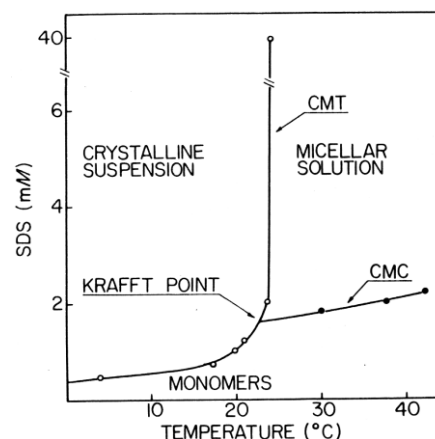
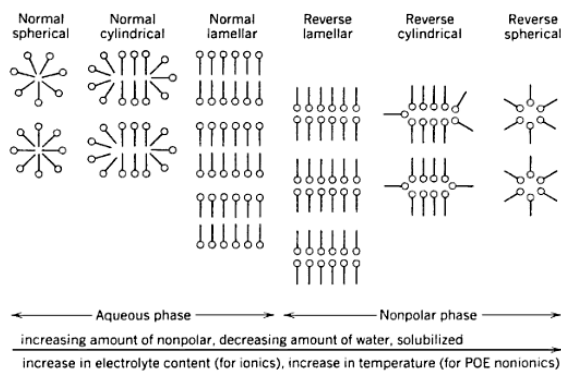


Diagram fazowy obrazujący polimorfizm liotropowy siarczianu dodecylu sodu w zależności od stężenia i temperatury



Rodzaje struktur agregacyjnych tworzonych przez amfifile w środowisku polarnym i niepolarnym

O preferencji faz agregacyjnych amfifilów decyduje generalnie kształt ich cząsteczek (**proszę doczytać o hipotezie/koncepcji kształtu**), który nazywany jest przez niektórych parametrem uporządkowania lipidu (nie mylić z parametrem uporządkowania błony, ang. *order parameter*) i jest określany wzorem:

$$S = \frac{v}{a \cdot l}$$

gdzie v = objętość cząsteczki, a = powierzchnia części polarnej cząsteczki, l = długość łańcucha (łańcuchów) hydrofobowych

Amfifile o relatywnie większej części polarnej ($S < 1/2$) tworzą formy agregacyjne zwane micelami (z łacińskiego – małe kulki). Zależnie od struktury cząsteczek i środowiska micle mogą być wielkości od 5 nm do kilkuset nm i być tworzone przez 2 – 2250 monomerów (liczba agregacji). Micle mogą posiadać różny kształt determinowany przez:

So – powierzchnię zajmowaną przez cząsteczkę na interfacie węglowodorowej; zależy w dużej części od właściwości roztworu, szczególnie siły jonowej,

l – maksymalną długość części hydrofobowej; determinującą maksymalny rozmiar miceli. Promień miceli kulistej nie może być większy od l .

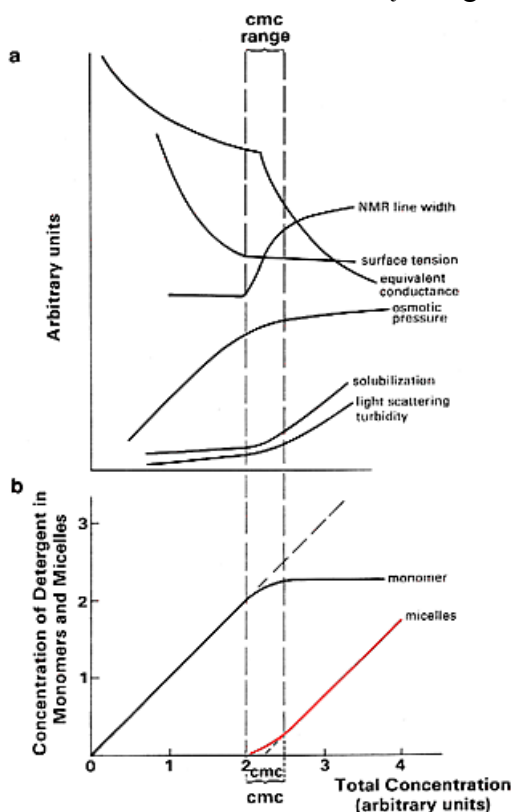
v – objętość części węglowodorowej amfifilu.

Najpowszechniej spotykanym kształtem miceli jest kula. Średnica takiej miceli najczęściej jest równa podwojonej długości monomeru. Jednak zależy to w dużej mierze od budowy cząsteczki amfifilu i warunków środowiska zewnętrznego. Dlatego uważa się, że w stałej temperaturze (przyjmuje się, że wraz

ze wzrostem temperatury wartość CMC rośnie, a liczba agregacji maleje) i dla porównywalnych stężeń rozpatrywanych związków amfifilowych (powyżej CMC) średnica i liczba agregacji miceli zależą od 1. dla detergentów niejonowych: długości części hydrofobowej cząsteczki, stopnia jej nienasycenia i obecności rozgałęzień łańcucha węglowodorowego, a także siły jonowej i osmolarności roztworu.

2. dla detergentów jonowych (mono- i zwitterjonowych) od długości części hydrofobowej cząsteczki, stopnia jej nienasycenia i obecności rozgałęzień łańcucha węglowodorowego, ale dodatkowo też osmolarności, pH i siły jonowej roztworu oraz obecności w niej jonów o przeciwnym znaku do ładunku amfifilu oraz tego, czy będą to jony mono- czy poliwalentne.

Kształt sferyczny nie jest jedynym, jaki mogą przybrać micle, stosunkowo często spotyka się także micle cylindryczne (np. SDS) dyskoidalne (o przekroju elipsy o różnym stopniu spłaszczenia) lub tzw. dyski micelarne (podobne z budowie do izolowanych, niewielkich fragmentów dwuwarstwy fosfolipidowej). Micle takie spotykane są raczej w układach binarnych (dwuskładnikowych) lub w przypadku cząsteczek detergentu, które nie posiadają typowej budowy: hydrofilowa 'główka' i hydrofobowy 'ogonek', ale posiadają hydrofilową



a. Zmiany przykładowych parametrów podczas wyznaczania wartości CMC; b. zmiany stężenia formy monomerycznej i micelarnej.

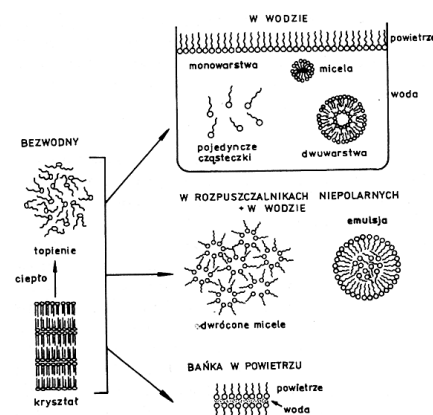
i hydrofobową 'stronę', jak w przypadku kwasów żółciowych i ich soli. Dla surfaktantów jonowych obserwuje się, że wzrost ich stężenia w roztworach wodnych może prowadzić do zmiany morfologii miceli w kierunku struktur o wyższym uporządkowaniu: micle sferyczne → cylindryczne → heksagonalne → lamelarne. Zjawisko to jest wynikiem spadku średniej odległości pomiędzy agregatami i tym samym wzrostem siły międzycząsteczkowego odpychania.

Do wyznaczania wartości CMC powszechnie stosowanych jest kilkanaście metod. Żadna z nich nie wyznacza tak naprawdę CMC, lecz zakres stężeń, w którym obserwowane są zmiany badanego parametru, mamy bowiem do czynienia z pewnego rodzaju nieciągłością właściwości fizycznych roztworu. Zmiany te są pochodną pojawienia się w roztworze agregatów micelarnych. Mierzyć możemy fluorescencję (wykorzystywana sonda nie powinna emitować światła w roztworze wodnym, natomiast powinna fluoryzować w środowisku hydrofobowym), rozpraszanie światła (przez tworzące się micle), napięcie i ciśnienie powierzchniowe (tworzenie miceli w roztworze jest procesem równoczesnym z powstawaniem monowarstwy na granicy faz woda-powietrze), przewodnictwo elektryczne roztworu i inne. Z reguły zakresy stężeń CMC uzyskane przy użyciu różnych metod pokrywają się ze sobą, jednak prawie nigdy idealnie.

3. Dwuwarstwa fosfolipidowa.

Amfifile o najmniejszym stosunku powierzchnia/objętość, np. lipidy dwułańcuchowe, tworzą agregaty typu dwuwarstwy. Dwuwarstwa nie jest strukturą sztywną, nie występują w niej bowiem wiązania kowalencyjne. Pomiędzy cząsteczkami budującymi dwuwarstwę dochodzi za to do dwojakiego rodzaju oddziaływań, które są wyznacznikiem podziału dwuwarstwy na dwie strefy: wewnętrzną (hydrofobową) i powierzchniową (polarną).

1. Strefa hydrofobowa charakteryzuje się występowaniem głównie oddziaływań dyspersyjnych. W cząsteczce nieposiadającej stałego momentu dipolowego następuje przypadkowa fluktuacja rozkładu gęstości elektronowej, co oznacza pojawienie się chwilowego momentu dipolowego (mimo braku wiązań o wyraźnej polaryzacji). W ten sposób dokoła cząsteczki wytwarzane jest pole elektryczne, które wywołuje polaryzację sąsiedniej cząsteczki i powstanie kolejnego momentu dipolowego. Ten drugi wyindukowany moment dipolowy jest tak zorientowany, że przyciąga się do pierwszego momentu dipolowego. Zjawisko takie może zajść w obrębie całej dwuwarstwy, w dowolnej z oddziałujących cząsteczek, w wielu miejscach błony równocześnie. Uważa się, że oddziaływanie dyspersyjne polega na obniżeniu energii układu, dzięki skorelowanym fluktuacjom rozkładu ładunku w sąsiednich cząsteczkach. Energia oddziaływań dyspersyjnych będzie największa, gdy cząsteczki będą ustawione równolegle, dlatego też można powiedzieć, że siły Van der Waalsa dążą do równoległego ustawienia łańcuchów węglowodorowych w jak najmniejszej odległości od siebie, ponieważ energia oddziaływań dyspersyjnych jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy cząsteczkami. Upakowanie lipidów zależy od proporcji pomiędzy wielkością główki i reszty hydrofobowej cząsteczki.



Rodzaje struktur agregacyjnych tworzonych przez amfifile w środowisku wodnym

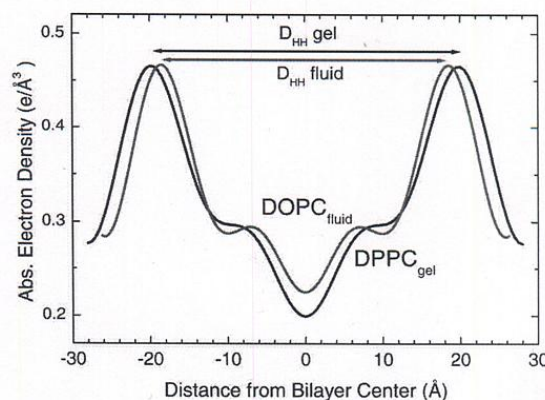


Fig. 2. Electron density profiles (EDPs) of gel phase (DPPC) and fluid phase (DOPC) bilayers (Tristram-Nagle et al., 1998).

Bowiem nawet w lipidach o kształcie cylindrycznym obie te wielkości nie muszą być identyczne.

Upakowanie lipidów zależy od stopnia nasycenia reszt kwasów tłuszczowych oraz od ilości atomów węgla je budujących. Obecność podwójnego wiązania w łańcuchu węglowodorowym kwasu tłuszczowego powoduje jego zakrzywienie, a więc gorsze dopasowanie do siebie sąsiadujących cząsteczek, co powoduje z kolei rozluźnienie struktury i wzrost płynności błony, zmienia także jej grubość.

2. Część powierzchniowa- polarne części lipidów mogą wchodzić w interakcje typu jon-jon, jon-dipol, dipol-dipol lub mogą tworzyć wiązania wodorowe. Dzieje się tak tylko pomiędzy częściami polarnymi, nigdy pomiędzy częścią polarną jednej cząsteczki a hydrofobową innej. Ważnym elementem dwuwarstwy fosfolipidowej jest granica faz z zaadsorbowanymi cząsteczkami wody (tzw. woda strukturalna), zwłaszcza na glikolipidach (glikokaliks), która stanowi barierę energetyczną dla transportu cząsteczek hydrofobowych. Ze względu na silne zjonizowanie powierzchni błony, ulegają na niej adsorpcji jony oraz inne zjonizowane cząsteczki występujące w roztworze. Szczególnemu zatężeniu ulegają te związki i jony, które nie są przez błonę transportowane. Należą do nich jony miedzi, manganu czy cynku, których stężenie w środowisku jest znikome. Silne właściwości adsorpcyjne dla jonów wielowartościowych odgrywają pewną rolę w uporządkowaniu polarnych (a szczególnie zjonizowanych) części fosfolipidów na granicy faz (tzw. sieciowanie 'główek' fosfolipidowych).

Faza lamellarna może występować w kilku stanach. Stan dwuwarstwy w fizjologicznym zakresie temperatur określa się jako stan ciekłego kryształu (tak zwana faza płynna L_α). Struktura taka charakteryzuje się dość dużą płynnością, dodatkowo zależną od sposobu upakowania lipidów, geometrii przestrzennej cząsteczki, składu środowiska i od temperatury.

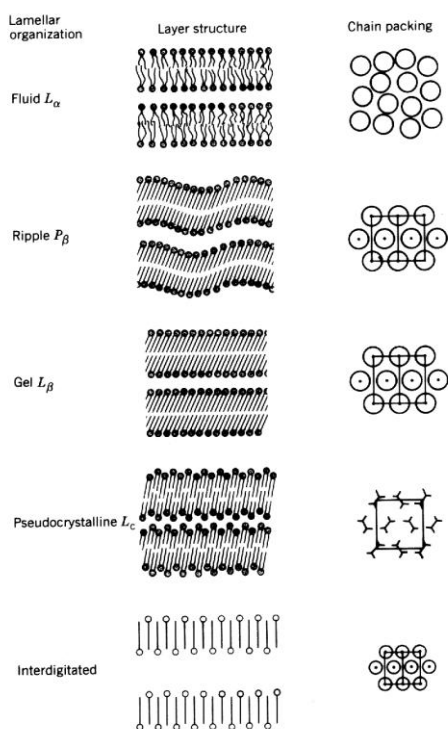


Fig. 3-14. Organization of the lamellar bilayer phase in the fluid, ripple, gel, pseudo-crystalline, and interdigitated states (top to bottom). The top view is shown in the last column.

(zachodzące na siebie), grubość struktury jest znacząco mniejsza niż w przypadku błony dwuwarstwowej.

Termotropowe przejście fazowe dwuwarstwy fosfolipidowej polega na zmianie jej parametrów fizykochemicznych podczas dostarczania do układu energii w postaci ciepła. Najistotniejszą zmianą dostrzegalną podczas przejścia fazowego jest zmiana uporządkowania cząsteczek fosfolipidów zarówno w części hydrofobowej, jak i powierzchniowej.

Faza ciekła L_α charakteryzuje się małym stopniem upakowania łańcuchów acylowych, małą lepkością (dużą płynnością) oraz dużym współczynnikiem dyfuzji. Powierzchnia dwuwarstwy nie jest płaska. Cząsteczki są zdolne do wykonywania szybkich ruchów postępowych i rotacyjnych.

Faza P_β - obydwie monowarstwy są regularnie pofałdowane, a przesunięcie względem siebie łańcuchów acylowych powoduje obniżenie energii oddziaływań Van der Waalsa.

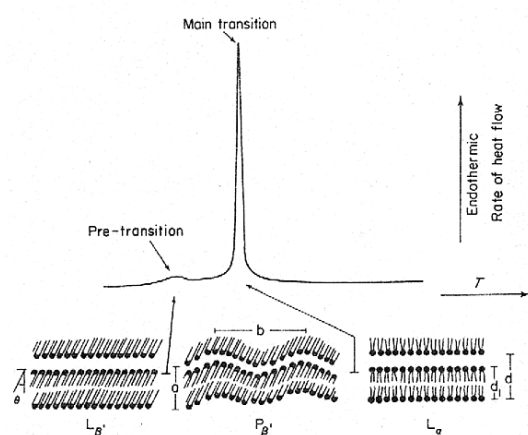
Faza L_β - łańcuchy acylowe są proste, w pełni rozciągnięte i bardzo ściśle upakowane względem siebie. Powierzchnia dwuwarstwy jest płaska, ale łańcuchy są ułożone pod kątem względem niej. Cząsteczki fosfolipidów są uporządkowane w *quasi* heksagonalne formy.

Faza L_c , czyli pseudokrystaliczna charakteryzuje się prostopadłym ułożeniem łańcuchów względem powierzchni dwuwarstwy, jednak ta ostatnia nie jest całkowicie płaska.

Faza zachodząca (ang. *interdigitated*) posiada łańcuchy ułożone przestrzennie w bardzo charakterystyczny sposób

Przejście fazowe jest zjawiskiem skorelowanym i, dla czystego lipidu, zachodzi w zakresie temperatury mniejszym niż kilka stopni (dla mieszanin obserwujemy poszerzenie piku przejścia). Jego bezpośrednim wynikiem, oprócz zmiany uporządkowania cząsteczek fosfolipidów jest zmniejszenie grubości dwuwarstwy i rozszerzenie jej powierzchni, ponieważ obszar zajmowany przez cząsteczkę zwiększa się z ok. 0.48 do ok. 0.7 nm². Jest to proces wysoce endotermiczny, dostarczana energia jest przez układ pożytkowana na zmianę konformacji kwasów łańcuchów tłuszczowych i na rozzerwania sił Van der Waalsa.

Warto jeszcze dodać, że chociaż przejście fazowe jest zjawiskiem skorelowanym, to jednak nie zachodzi na zasadzie „wszystko albo nic”, to znaczy, w zakresie temperatur przejścia w dwuwarstwie współistnieją domeny o różnym stopniu uporządkowania: stało- i ciekłokrystaliczne. Stąd wynika najwyższa bierna przepuszczalność dwuwarstwy w zakresie temperatur przejścia dla cząsteczek normalnie nieprzechodzących przez błonę. Jest to równocześnie fizyczne wytłumaczenie, dlaczego błony biologiczne zbudowane są różnego typu fosfolipidów i innych lipidów. Błony biologiczne, dzięki swojej kompozycji lipidowej, nie wykazują przejścia fazowego, uważa się, że znajdują się w temperaturach fizjologicznych w stanie ciekłokrystalicznym. Stąd bierze się ich selektywna przepuszczalność.



Proces przejścia fazowego jest zjawiskiem endotermicznym. Jego temperatura i entalpia może być określana za pomocą wielu metod fizycznych, z których najczęściej używaną jest DSC (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, rysunek obok). Jako regułę podaje się, że im dłuższy łańcuch (łańcuchy) są obecne z cząsteczce, tym wyższa temperatura i entalpia przejścia. I odwrotnie, im więcej wiązań nienasyconych, tym te parametry mają mniejsze wartości. Temperatura, w której zachodzi proces przejścia oraz jego rozpiętość zależy od indywidualnych cech fosfolipidów. Znaczenie ma nie tylko skład acylowy cząsteczki, ale też miejsce przyłączenia konkretnych kwasów tłuszczowych do glicerolu (C1 lub C2).

Piki odzwierciedlają ilość ciepła pobranego przez układ potrzebnego do dokonania przejścia fazowego. Ponieważ parametry przejścia fazowego są zależne od składu błony, kształt i wielkość pików obrazuje nie tylko entalpię przejścia, ale też inne zjawiska występujące w dwuwarstwie podczas tego procesu. Jeżeli pik jest pojedynczy, ostry i symetryczny, mamy do czynienia z przejściem fazowym mieszaniny jednorodnej (podręcznikowy, wzorcowy przykład) jeżeli składniki mieszaniny mają podobne właściwości fizykochemiczne, obserwujemy szerokie pojedyncze przejście ze szczytem pomiędzy temperaturą przejścia fazowego charakterystyczną dla poszczególnych składników. Jeżeli w mieszaninie występują składniki o różnych właściwościach fizykochemicznych, pik różni się od modelowego, może być asymetryczny lub pojawić się może pik podwójny (rysunek obok). Na temperaturę oraz szerokość przejścia wpływają również czynniki środowiskowe, np. pH lub obecność kationów dwuwartościowych, ciśnienie wywierane na błonę.

Przedprzejście- jest definiowane jako drobne endotermiczne zdarzenie poprzedzające główne przejście fazowe. Jest występowanie wykazano tylko w dwuwarstwach budowanych przez niektóre fosfolipidy.

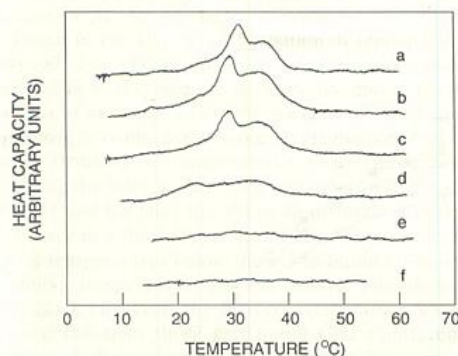


Fig. 1. Differential scanning calorimetry of hydrated egg sphingomyelin (SPM) containing the following concentrations (mol%) of cholesterol sulphate (CS): (a) 0, (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 40, and (f) 50. Lipids were hydrated in excess buffer (150 mM NaCl, 100 mM Hepes, 4 mM EDTA, pH 7.0) to a concentration of about 20 mg/ml. A broad multi-component endothermic transition is observed for SPM alone between 20 and 40°C. This peak becomes progressively broader with increasing concentration of CS, and is no longer apparent at 50 mol% additive.

Metodą XRD wykazano, że podczas przedprzejścia zmianie ulega uporządkowanie powierzchni dwuwarstwy z całkowicie płaskiej na pofałdowaną. Uporządkowanie łańcuchów pozostaje bez zmian.

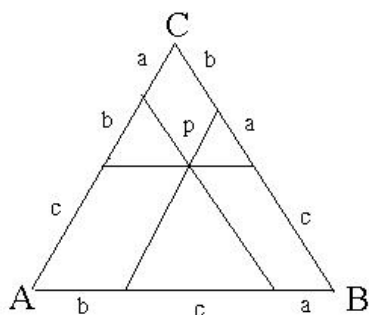
4. Ilościowe określanie polimorfizmu liotropowego związków amfifilowych.

Zależności pomiędzy typami faz/agregatów tworzonych przez amfifile od temperatury oraz ilości rozpuszczalnika określają tzw. wykresy (diagramy) fazowe.

Wykres fazowy (diagram fazowy, wykres równowagi fazowej) jest to graficzne przedstawienie stanów równowagi układu termodynamicznego w zależności od wartości parametrów określających ten stan. Mogą nimi być: temperatura, ciśnienie, stężenia. Wykres fazowy przedstawia zakres trwałości różnych faz oraz warunki, w których zachodzą przemiany fazowe (przejścia fazowe). Punkt na wykresie fazowym, w którym kończy się krzywa współistnienia faz (co oznacza zanik różnicy między współistniejącymi fazami) to punkt krytyczny (wykresy fazowe lipidów w najczęściej badanych warunkach go nie mają). Charakteryzują go określone wartości temperatury, ciśnienia i gęstości (stężenia), nazywane wartościami krytycznymi.

Punkt potrójny to punkt na wykresie fazowym obrazujący współistnienie trzech faz danej substancji jednoskładnikowej. W przypadku polimorfizmu liotropowego obrazuje on współistnienie trzech różnych form strukturalnych danej substancji bądź mieszaniny.

Przejścia fazowe (a dokładniej mezofazowe) układu dwuskładnikowego przedstawiane są w zwykłym układzie współrzędnych (rysunek obok) i ich interpretacja nie stanowi problemu. Na osi 0X znajduje się najczęściej skład rozważanej mieszaniny (w postaci procenta molowego lub ułamka molowego), na osi 0Y parametr powodujący zmianę mezofazy (np. temperatura lub ciśnienie).



to punkty leżące na bokach określają bezpośrednio ułamki molowe lub wagowe dwóch z trzech składników w danym układzie. W celu określenia składu układu trójskładnikowego, reprezentowanego np. punktem P, prowadzimy przez punkt P proste równoległe do każdego z boków trójkąta. Odcinki wyznaczone przez przecięcie tych prostych z bokami trójkąta określają zawartość składników. Odcinek środkowy leżący naprzeciw danego wierzchołka np. C określa zawartość składnika C. Odcinki przylegające do wierzchołków

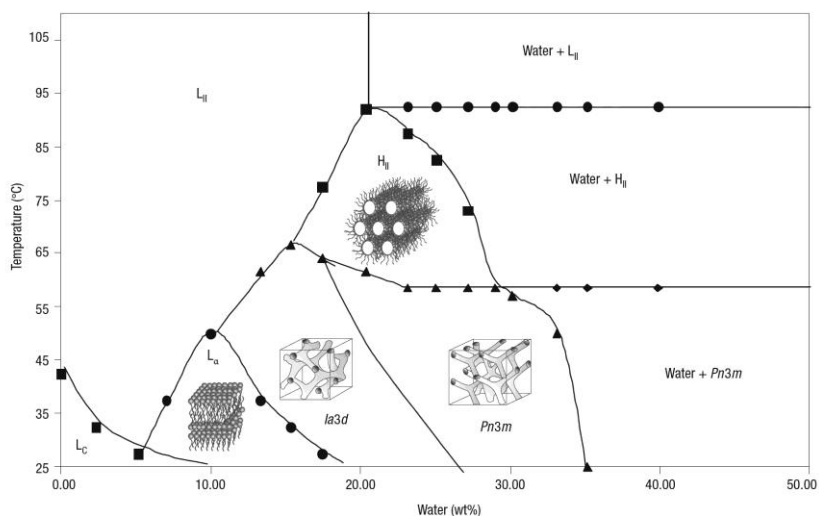


FIG. 1. Phase diagram of monolinolein-water system, illustrating the structures of the main mesophases encountered: L_c is the crystalline lamellar phase; L_a is the amorphous lamellar phase; H_h is the reversed hexagonal phase; $Ia3d$ and $Pn3m$ are the double gyroid and double diamond bicontinuous reversed cubic phases, respectively. Reprinted with permission from Reference 2.

Skład układu trójskładnikowego przedstawia się zazwyczaj posługując się trójkątnym układem współrzędnych, zaproponowanym przez Gibbsa. Wykres ma postać trójkąta równobocznego. Wierzchołki trójkąta równobocznego (A, B, C) odpowiadają czystym składnikom (rysunek obok). Punkty leżące na bokach trójkąta odpowiadają układom dwuskładnikowym, a punkty leżące wewnątrz trójkąta – układom trójskładnikowym.

Jak odczytujemy wartości z trójkątnego diagramu fazowego? Jeżeli długość boku trójkąta równobocznego przyjmuje się za jednostkę,

odpowiadają zawartości tego składnika, który jest wypisany na przeciwległym wierzchołku, na tym samym boku trójkąta.

5. Oddziaływanie związków amfifilowych z dwuwarstwą fosfolipidową.

Istnieje cały szereg błon modelowych wykorzystywanych do badania oddziaływania związków amfifilowych z dwuwarstwą fosfolipidową. Należą do nich tzw. czarne błonki, „supported bilayers”, monowarstwy, cienie erytrocytarne oraz liposomy. Należy pamiętać, że wybór modelu do badań jest zależny w dużej mierze od rodzaju doświadczeń, jakie chcemy przeprowadzić. Modelem błony wykorzystywanym najpowszechniej są liposomy. Liposomy (z gr. ciała lipidowe) są to struktury powstające samoistnie z fosfolipidów. Mają postać pęcherzyków zbudowanych z kilku lub kilkunastu przestrzeni wodnych oddzielonych od siebie zamkniętymi koncentrycznie dwuwarstwami fosfolipidowymi. Jest wiele typów klasyfikacji liposomów. Najczęściej dzielimy je na:

1. Wielowarstwowe pęcherzyki (MLV) o wielkości od 200 nm do kilku mikronów.
2. Duże jednowarstwowe pęcherzyki (LUV) o wielkości od 100 nm do 1000 nm.
3. Małe jednowarstwowe pęcherzyki (SUV) o wielkości od 25 nm do 100 nm.

Inne podziały biorą pod uwagę ładunek powierzchniowy (liposomy obojętne, kationowe lub anionowe), ewentualne modyfikacje powierzchni (konwencjonalne, stabilne sferycznie, modyfikowane przeciwciałami i in.), czy też parametry dwuwarstwy fosfolipidowej (termowrażliwe, pH-wrażliwe i in.).

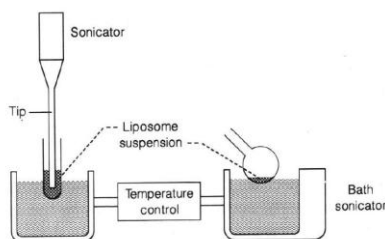
Sposoby otrzymywania liposomów:



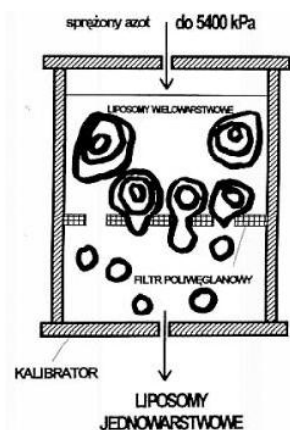
1. Metoda cienkiego filmu fosfolipidowego.

Suchy film lipidowy, powstały na powierzchni szklanej po odparowaniu roztworu fosfolipidu w chloroformie (metanolu), uwadniamy roztworem zawierającym substancję, którą chcemy w liposomach zamknąć. Otrzymujemy w rezultacie liposomy MLV o bardzo dużej dyspersji (bardzo heterogenne). Liposomy takie można poddać cyklom zamrażania (ciekły azot) i rozmrażania (powyżej temperatury głównego przejścia fazowego). Otrzymujemy wówczas liposomy FAT-MLV o zmniejszonej ilości dwuwarstw fosfolipidowych i większej objętości zamkniętej.

Liposomy MLV możemy poddać kolejnym zabiegom. Najczęstsze z nich to:

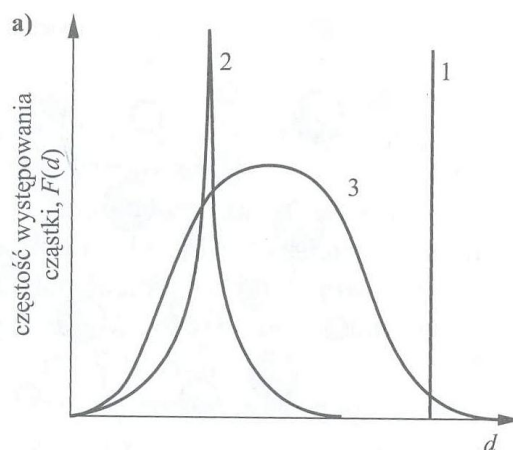


2. Sonikacja - wykorzystywana jest zarówno metoda ciągła (kilkanaście minut przy stałej mocy sonikatora), jak przerywana (np. 2 minuty sonikacji, 1 minuta przerwy, 5 powtórzeń). Metoda pozwala na otrzymanie homogennych liposomów SUV. Niestety, mały promień krzywizny tak otrzymanych liposomów powoduje, że bardzo często mają tendencję do fuzjowania i agregacji.

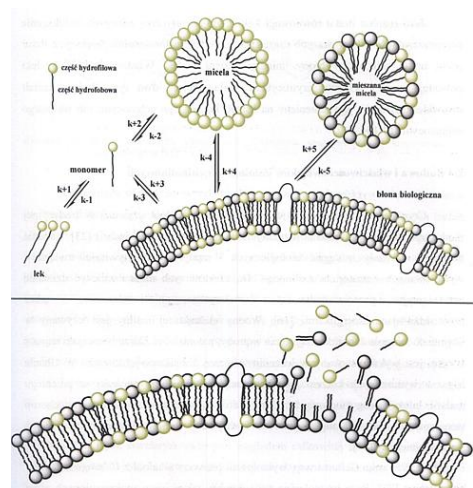


3. Kalibracja przez filtry poliwęglanowe o ściśle określonej wielkości porów - Otrzymujemy homogenne liposomy LUV lub SUV o dobrych parametrach fizykochemicznych.

Liposomy tworzą w rozpuszczalnikach wodnych układ koloidalny (**proszę doczytać o rodzajach układów dyspersyjnych**). Jedną z zasadniczych cech takiego układu, wykorzystywaną w doświadczeniach, jest rozkład rozmiarów cząstek (rysunek obok, d - średnica cząstek fazy rozproszonej, 1- układ doskonale monodispersyjny, 2- układ monodispersyjny w rzeczywistości, 3-układ polidispersyjny). Układ nazywamy monodispersyjnym, jeżeli wszystkie cząstki fazy zdyspergowanej mają takie same wymiary ($x=y=z$), w przeciwnym razie mówimy o układzie polidispersyjnym. Należy pamiętać, że w tym ostatnim przypadku cząstki mogą być izometryczne ($x=y=z$), ale różnić się wielkością lub też wykazywać istotne różnice zarówno w rozmiarach, jak i kształcie (cząstki anizometryczne, $x \neq y \neq z$). Układy mono- i polidispersyjne różnią się znacząco stopniem rozpraszania światła, czyli zmianą kierunku rozchodzenia się promieniowania bez zmiany długości fali. Jest to związane głównie z odbiciem i załamaniem fali na niejednorodnościach fazy zdyspergowanej. Układy monodispersyjne rozpraszają światło dużo słabiej, niż polidispersyjne. Właściwość ta jest wykorzystywana przy pomiarach zmiany wielkości cząstek podczas wbudowywania amfifili do dwuwarstwy liposomowej.



Cząsteczki związków amfifilowych, dzięki swojej szczególnej budowie, łatwo wbudowują się do dwuwarstwy fosfolipidowej. Etapy wbudowywania się cząsteczki amfifilowej do dwuwarstwy:



Procesy zachodzące podczas wbudowywania cząsteczek amfifilu do błony biologicznej.

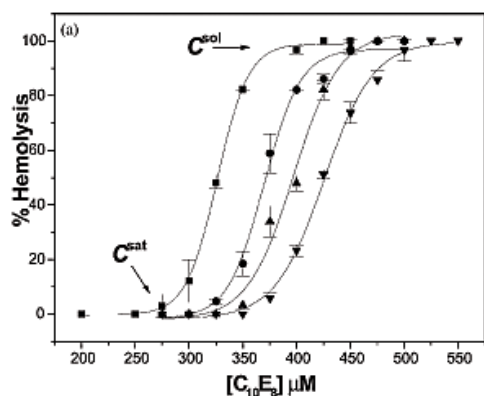
1. Dyfuzja cząsteczki amfifilowej w bezpośrednie otoczenie dwuwarstwy: szybkość procesu jest wprost proporcjonalna do temperatury (często tylko w zakresie temperatur fizjologicznych) oraz od współczynnika dyfuzji, proces ten jest nieswoisty.

2. Adsorpcja cząsteczki na granicy faz dwuwarstwa-woda: proces może być swoisty. Za adsorpcję odpowiadają najczęściej oddziaływania elektrostatyczne, rzadziej hydrofobowe. Dla niektórych cząsteczek amfifilowych jest to ostatni etap oddziaływania z dwuwarstwą. Oddziaływanie powierzchniowe jest przedstawiane matematycznie w postaci stałej wiązania. Oddziaływanie powierzchniowe może być realizowane jako interakcje zarówno z fosfolipidami, jak i białkami błony biologicznej.

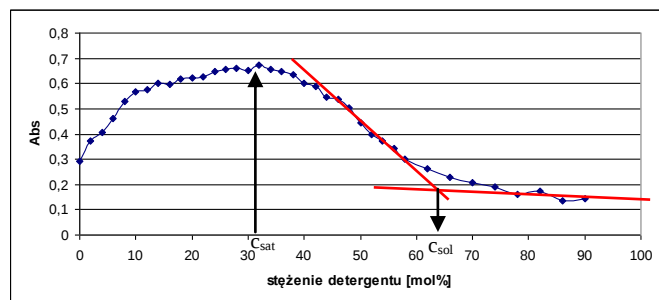
3. Penetracja dwuwarstwy przez amfifil:

A. Wbudowywanie się cząsteczek bez wywoływania nieodwracalnych zmian w dwuwarstwie i naruszania jej integralności strukturalnej (amfifil jest w stężeniu sublitycznym): cząsteczki amfifilu wbudowują się do dwuwarstwy i dopasowują kształtem do jej organizacji. Pewna ilość tych cząsteczek może przebywać w dwuwarstwie bez naruszenia jej integralności, zmianie ulegają wtedy tylko jej właściwości fizykochemiczne, w tym powiększeniu ulega powierzchnia dwuwarstwy. Zmiana powierzchni pociąga za sobą zmianę potencjalnej objętości komórki (pęcherzyka), dlatego też obserwujemy efekt ochronny detergentów w stężeniu sublitycznym przed lizą hipotoniczną. Przekroczenie stężenia krytycznego amfifilu w dwuwarstwie powoduje jej solubilizację. Często dochodzi do samorzutnego uwalniania pęcherzyków lipidowych na zewnątrz lub do wewnątrz komórki.

B. Dezintegracja dwuwarstwy i powstanie mieszanych miceli detergentowo-fosfolipidowych (amfifil występuje w stężeniu litycznym). Zmiany zachodzące podczas tego procesu są mierzalne i zależne od wielu czynników (**obowiązkowa literatura dodatkowa-pdf'y**).



Oddziaływanie amfifilu z błoną w stężeniu sublitycznym i litycznym doskonale obrazuje rysunek obok. Przedstawia on wpływ różnych stężeń detergentu niejonowego ($C_{10}E_8$) na hemolizę erytrocytów. W stężeniu sublitycznym detergent wbudowuje się w błonę bez powodowania wycieku hemoglobiny z komórek (nie narusza ciągłości błony), aż do osiągnięcia c_{sat} (*concentration of saturation*). Wtedy to ilość detergentu osiąga maksymalne stężenie w błonie (następuje wysycenie błony). Po jego przekroczeniu zaczyna się solubilizacja błony (wzrasta ilość uwalnianej z komórek hemoglobiny). Stężenie, w którym następuje całkowita solubilizacja błony (uwolniona zostaje cała hemoglobina) nosi nazwę c_{sol} (*concentration of solubilization*).

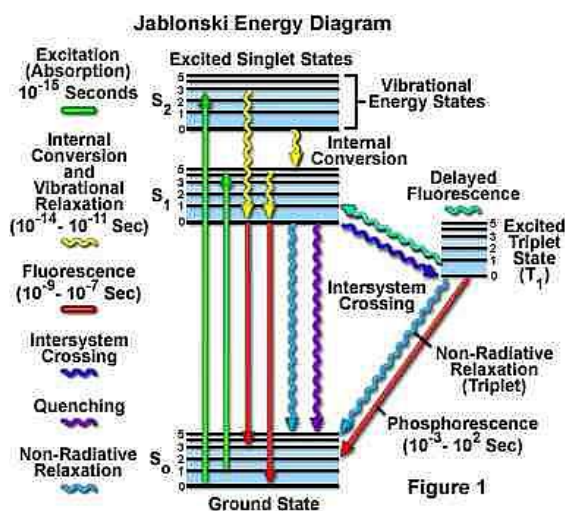
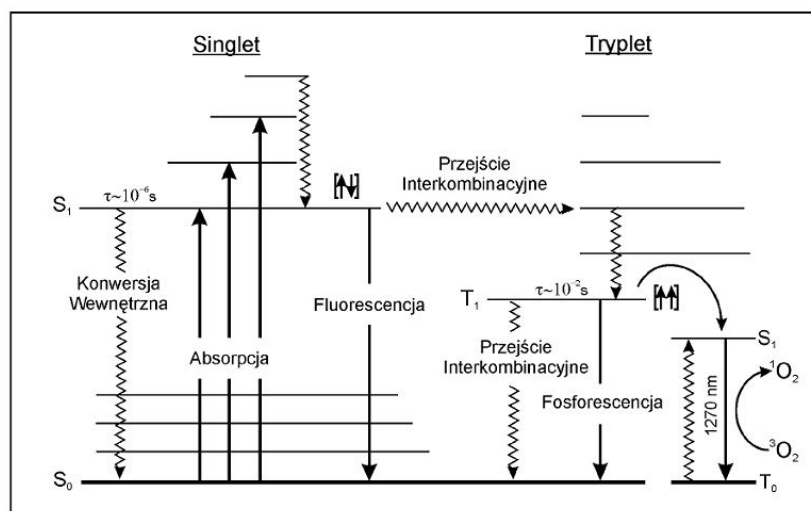


Oddziaływanie detergentu z dwuwarstwą fosfolipidową (liposomową) najczęściej badamy wykorzystując rozpraszanie światła. Początkowe rozpraszanie światła pochodzi od polidispersyjnego układu zawiesiny liposomów. Podczas wbudowywania się cząsteczek detergentu do dwuwarstwy obserwujemy pęcznienie liposomów (początkowy wzrost rozpraszania światła)- detergent jest w stężeniu sublitycznym. Po przekroczeniu c_{sat} obserwujemy stopniową solubilizację dwuwarstw liposomowych aż do powstania monodispersyjnego

układu mieszanych miceli detergentowo-fosfolipidowych. Na wykresie przedstawiono, w jaki sposób należy wyznaczyć wartość C_{sol} .

6. Wykorzystanie fluorescencji w badaniach związków lipidowych.

Fluorescencja, fluorescencja opóźniona i fosforescencja- mechanizm kwantowy i warunki zachodzenia- *proszę przypomnieć sobie z poprzednich wykładów (Metody fizyczne z biologii i Chemia biofizyczna).*



Parametry mierzalne fluorescencji i ich modyfikacje.

Wydajność kwantowa ϕ jest to stosunek liczby kwantów światła wyemitowanych do zaabsorbowanych przez cząsteczki, opisuje prawdopodobieństwo zajścia fluorescencji, a zatem można ją uznać za stosunek liczby molekuł, które wyemitowały foton, do ogólnej puli molekuł wzbudzonych. Nie zależy od długości fali światła wzbudzającego (reguła Wawiłowa).

Czas życia fluorescencji (τ) jest to jako średni czas pomiędzy chwilami wzbudzenia i powrotu do stanu podstawowego, inaczej naturalny czas życia cząsteczki, jeżeli powrót do stanu podstawowego następuje jedynie na drodze fluorescencji. Jego wartość jest rzędu 10^{-9} s.

Polaryzacja fluorescencji (P). Po wzbudzeniu molekuly światłem spolaryzowanym następuje emisja fotonu o niezmięnionej płaszczyźnie polaryzacji. Jest to stwierdzenie prawdziwe tylko wtedy, kiedy cząsteczka jest nieruchoma przez czas życia swojego stanu wzbudzonego. W przeciwnej sytuacji następuje zmiana tej płaszczyzny o dany kąt α . Jeżeli na cząsteczki skierujemy wiązkę światła spolaryzowanego, to największe prawdopodobieństwo wzbudzenia będą miały te molekuly, których moment dipolowy jest równoległy do kierunku drgań wektora pola elektrycznego światła padającego. Stopień polaryzacji przyjmuje różne wartości, w zależności od wartości kąta α oraz ruchliwości wzbudzonych cząsteczek:

- jeżeli wspomniany wyżej kąt $\alpha = 0$ i nie zmienia się podczas wzbudzenia, to stopień polaryzacji przyjmuje wartość największą: $P = 0,4$

- kąt ten może być różny od 0, ale pozostać niezmienny w trakcie życia stanu wzbudzonego. Stopień polaryzacji przyjmuje wtedy wartości z przedziału: $-\frac{1}{3} < P < 0,5$.

- podczas istnienia we wzbudzonym stanie cząsteczki (4 ns dla fluoresceiny) mogą być w ruchu. Jest to przyczyna istnienia różnicy pomiędzy absorpcyjnym i emisyjnym momentem dipolowym (zmiana kąta α), czyli tzw. rotacyjnej depolaryzacji fluorescencji.

Anizotropia fluorescencji. Światło emisji i absorpcji jest zazwyczaj liniowo spolaryzowane. Cząsteczki są w roztworze ułożone izotropowo. Selektywne wzbudzenie powoduje przejście układu w stan anizotropowy. Anizotropię (r) można powiązać z polaryzacją fluorescencji (P) za pomocą wzoru:

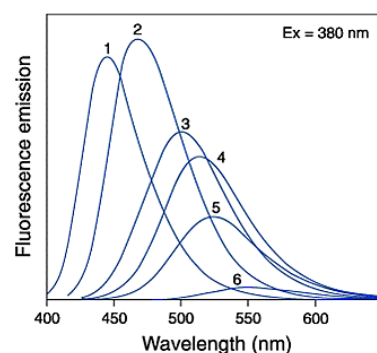
$$r = \frac{2P}{3 - P}$$

Podobnie jak parametr P , anizotropia przyjmuje również charakterystyczne wartości w zależności od ustawienia względem siebie absorpcyjnych i emisyjnych momentów dipolowych podczas życia stanu wzbudzonego (kąt α).

Mierząc wartość P oraz r możemy zatem określić mikrolepkość środowiska, w którym znajduje się dany znacznik, a więc w przypadku błon biologicznych stopień uporządkowania cząsteczek fosfolipidów otaczających cząsteczkę fluoroforu.

Wygaszanie stężeniowe i kolizyjne fluorescencji. W roztworach rozcieńczonych intensywność fluorescencji jest liniową funkcją stężenia luminoforu. Gdy stężenie substancji przekroczy pewną granicę, fluorescencja zaczyna maleć. Jest to zjawisko zwane wygaszaniem stężeniowym i jest efektem bezpromienistego transferu energii Förstera. Zazwyczaj w ten sposób opisywane są pary fluoroforów typu donor – akceptor, gdzie obie cząsteczki są od siebie różne. Jednak zajście tego procesu jest także możliwe w przypadku jednakowych molekuł. Wygaszanie kolizyjne- dochodzi do zderzenia dwóch molekuł podczas trwania wzbudzonego czasu życia jednej z nich. Fluorofor wraca do podstawowego stanu energetycznego bez emisji fotonu. Jest to zatem proces dynamiczny, a energia stanu wzbudzonego zostaje rozproszona w postaci ciepła.

Wpływ polarności rozpuszczalnika na maksimum emisji i wydajność kwantową. Ze wzrostem polarności środowiska długości fal maksimum absorpcji i emisji przesuwają się w kierunku fal dłuższych. Fala wyemitowana o niższej energii niż w rozpuszczalniku niepolarnym (o większej długości lub mniejszej intensywności) świadczy o obniżeniu energii wzbudzenia na skutek oddziaływań elektrostatycznych. Prowadząc pomiary fluorescencyjne w roztworach należy więc pamiętać o odpowiednim dobraniu rozpuszczalnika.



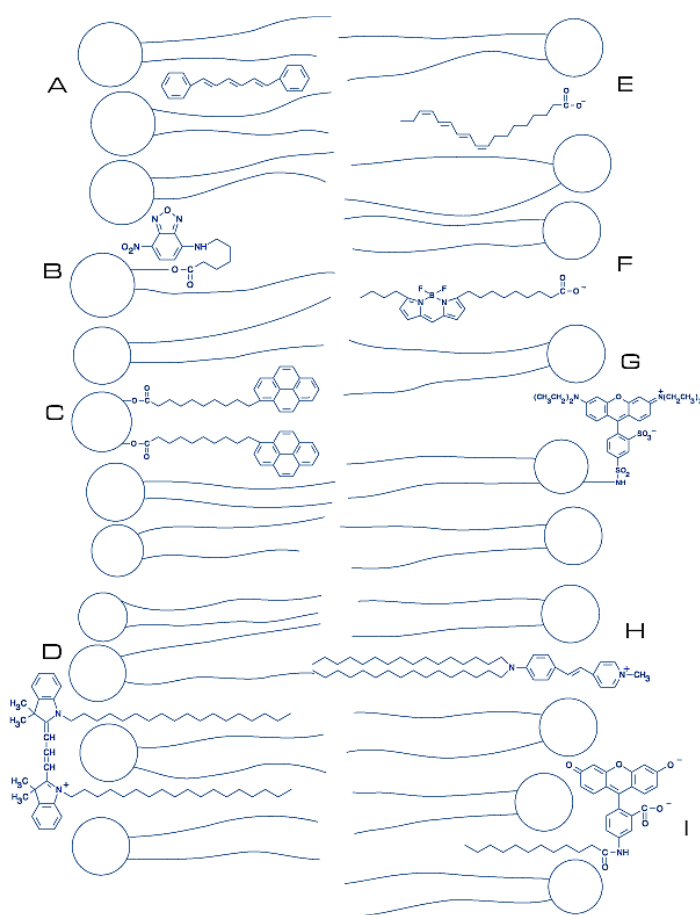
Zależność $\lambda_{\max}$ i intensywności fluorescencji od polarności rozpuszczalnika: 1- toluen, 2- chloroform, 3- acetonitryl, 4- etanol, 5- metanol, 6- woda.

Nie powinien on absorbować w danej długości fali ani wpływać na parametry spektralne badanej substancji (np. wodę stosujemy przy wzbudzeniu powyżej 190 nm, etanol 96% -205 nm, a tetrachlorek węgla – 265 nm).

Również wydajność kwantowa fluorescencji może zależeć od charakteru rozpuszczalnika. Największe jej wartości odnotowano dla rozpuszczalników niepolarnych. Dla rozpuszczalników polarnych wartość wydajności kwantowych jest mniejsza. Oznacza to, że w tym przypadku wygaszanie energii wzbudzenia ma miejsce głównie na sposób bezpromienisty. Czas życia fluorescencji również zależy od właściwości rozpuszczalnika. Najwyższy jest dla roztworów niepolarnych, najmniejszy dla polarnych.

Zależność fluorescencji od pH. Stężenie protonów w roztworze ma duży wpływ na parametry spektralne cząsteczki, czyli absorbancję i fluorescencję. Spowodowane jest to zmianą ładunku elektrostatycznego cząsteczki w zależności od pK grup kwasowych czy zasadowych. Wraz ze zmianą pH, w zależności od związku chemicznego, może się zmieniać np. wydajność kwantowa fluorescencji lub maksimum emisji.

7. Przykłady sond (zinczników) fluorescencyjnych najczęściej stosowanych w badaniach błony biologicznej.



A. DPH – difenylloheksatrien

znacznik hydrofobowy, lokalizuje się całkowicie wewnątrz dwuwarstwy, może być dodawany do komórek lub liposomów z zewnątrz (jest bardzo hydrofobowy, samorzutnie wbudowuje się w błony) występuje w dwu subpopulacjach: tak jak na rysunku obok oraz wewnątrz błony, długą osią równoległą do powierzchni błony. Nie wykazuje preferencji wbudowywania się w konkretną fazę termotropową. Służy do wyznaczania CMC związków amfifilowych, ponieważ jego fluorescencja w roztworach wodnych jest znacznie słabsza, niż w roztworach niepolarnych oraz do badania pewnych własności dwuwarstwy. Należą do nich przejście fazowe (temperatura głównego przejścia fazowego, entalpii przejścia tą metodą nie można wyznaczyć) oraz solubilizacja dwuwarstwy przez detergenty, aczkolwiek to ostatnie zjawisko nie jest zbyt dobrze mierzalne, ponieważ wewnątrz miceli powstałych po solubilizacji DPH również fluoryzuje. Parametrem badanym w obu tych przypadkach jest zazwyczaj polaryzacja fluorescencji DPH.

B. NBD-PC – lub NBD- PE

znakowany fluorescencyjnie fosfolipid. Fluorofor ulokowany jest na „głowie cząsteczki”, na zdefiniowanej głębokości względem powierzchni dwuwarstwy;

1. Fluorofor jest fotolabilny, wykorzystywany do badania dyfuzji lateralnej fosfolipidów metodą FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*).
2. Fluorofor jest wrażliwy na redukcję, np. tiosiarczanem lub nadjodanem, zredukowany traci zdolność fluoryzowania, dlatego też po całkowitym zredukowaniu puli związku dostępnej w zewnętrznej

monowarstwie (pula obecna w wewnętrznej monowarstwie cały czas fluoryzuje), możemy badać przejście fazowe dwuwarstwy. Podczas przejścia reduktor dyfunduje poprzez dwuwarstwę i wygasza wewnętrzną pulę sondy.

3. NBD-PE/PC jest wrażliwy na upakowanie lipidów w bezpośrednim otoczeniu. Polaryzacja fluorescencji tego związku rośnie ze stopniem uporządkowania lipidów dookoła sondy. Służy to np. pomiarom głębokości wbudowywania się związków amfifilowych do dwuwarstwy.

4. Razem z N-Rh-PE (lizaminą) służy jako para donorowo-akceptorowa w eksperymentach FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Eksperyment polega na naświetlaniu próbki falą wzbudzenia donora (NBD) oraz analizie intensywności fluorescencji akceptora (lizaminy). Przekazywanie energii (czyli natężenie fluorescencji akceptora) jest zależne od odległości pomiędzy cząsteczkami donora i akceptora. Pozwala to na badania odległości błon w liposomach MVV (ang. *MultiVesicular Vesicles*), badania fuzji błon, badanie przejścia fazowego dwuwarstwy oraz występowania domen o różnym stanie płynności w dwuwarstwie.

4. Badania przejścia L_{β} - H_{II} - w fazie niewarstwowej intensywność fluorescencji NBD znacząco rośnie.

C. Bis-piren –PC

fosfolipid znakowany cząsteczką pirenu na końcach łańcuchów węglowodorowych (atom C_{60}). Piren, jako fluorofor, posiada bardzo ciekawą właściwość: może tworzyć dimery, zwane ekscymerami (ang. *excimers*), które wykazują się identyczną długością fali wzbudzenia i dłuższą falą emisji w porównaniu z monomerami. Tworzenie ekscymerów jest zależne m. in. od płynności błony i temperatury, czyli głównie od współczynnika dyfuzji lateralnej. Mierzonym parametrem jest I_e/I_m , to znaczy stosunek intensywności fluorescencji ekscymerów do monomerów. Jeżeli fosfolipid znakowany jest tylko na jednym łańcuchu (mono-piren-PC), ekscymery powstają międzycząsteczkowo i służy to do pomiaru procesu fuzji, przejścia fazowego, stopnia płynności błon, występowania domen lipidowych w błonie oraz oddziaływania białek peryferyjnych z dwuwarstwą. Natomiast, jeżeli fosfolipid znakowany jest na dwu łańcuchach, ekscymery powstają wewnątrz cząsteczki i sonda jest wówczas np. substratem dla PLA_2 i służy do spektrofлуorymetrycznego pomiaru aktywności tego enzymu.

D. DiI

przykład dialkilokarbocyjaniny, znacznika fotostabilnego, o krótkim czasie życia, co powoduje, że jest przydatny do badań cytometrii przepływowej (można go wielokrotnie wzbudzać w krótkim okresie czasu), ponadto sonda wykorzystywana jest do pomiaru zmian potencjałów błonowych, a także do badania fuzji (FRET, donorem jest fosfolipid znakowany dansylem lub NBD na „głowie”), badania powstawania domen w monowarstwach (mikroskopia fluorescencyjna), badania dyfuzji lateralnej (FRAP), a ponieważ poszczególne homologe tych związków wykazują preferencyjne wbudowywanie w fazę stałą– i ciekłokrystaliczną, wykorzystuje się je do obrazowania domen błonowych (mikroskopia).

E. Kwas cis- parinarowy

znacznik niefluoryzujący w wodzie, jednak do wyznaczania CMC wykorzystywany bardzo rzadko (długość cząsteczki!), czas życia fluorescencji tej sondy jest dość długi i zależny od stopnia upakowania fosfolipidów w otoczeniu, co wykorzystywane jest w badaniach dynamiki błony. Wykorzystywane jest także do pomiarów peroksydacji lipidów, przybliżania stężenia antyoksydantów w błonie, detekcji oddziaływania typu lipid-lipid i lipid-białko.

F. C4 –bodipy C9

fluorescencyjny analog kwasu tłuszczowego, fluorofor może być zlokalizowany w różnej odległości od grupy karboksylowej (na rysunku jest tylko przykład), sonda raczej hydrofobowa, tworzą ekscymery na podobnej zasadzie jak piren, używane są do detekcji reaktywnych form tlenu (czyli w reakcji peroksydacji lipidów błonowych), wykorzystywane są także do badania współczynnika dyfuzji lateralnej

lipidów w błonie (metodą FRAP) oraz w badaniach stopnia hydratacji dwuwarstwy na różnej głębokości metodą *solvent relaxation*.

G. N-Rhodamine-PE – lizamina – patrz opis do NBD-PE.

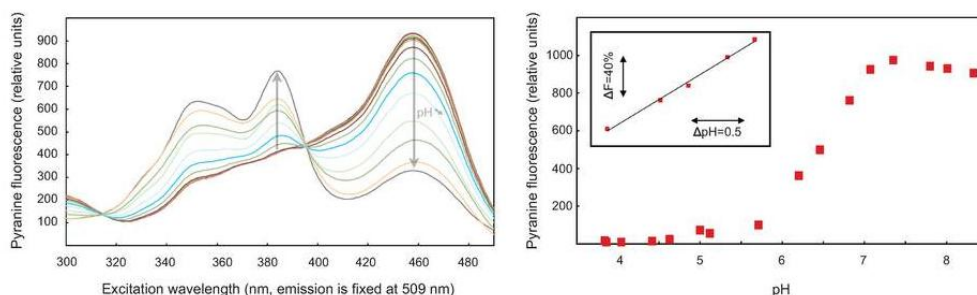
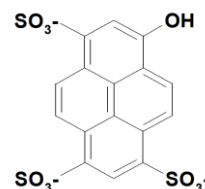
H. DiA

pochodne dialkylstyrylowe, fluorofor jest zawsze ułożony równolegle do osi cząsteczek fosfolipidów, przy wbudowywaniu do błony wykazuje znaczne wzmocnienie fluorescencji (w wodzie jest ona minimalna), wbudowuje się samorzutnie ze środowiska, używany jest do znakowania błony neuronów.

Piranina

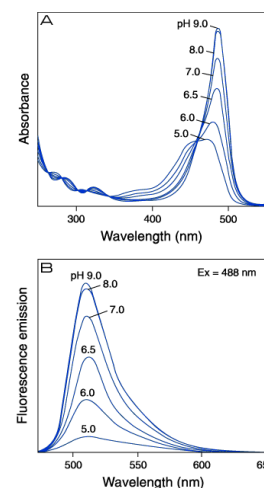
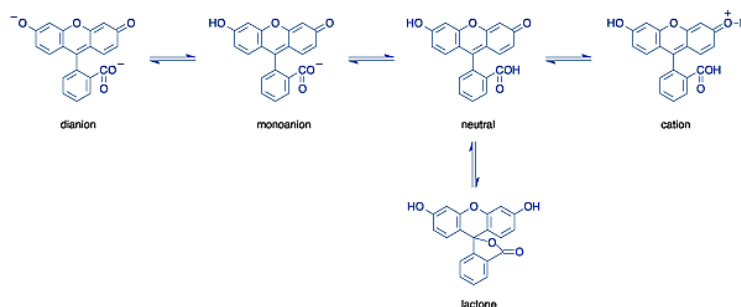
nie jest wykorzystywana do badania właściwości błon, lecz zmian pH. Intensywność fluorescencji piraniny jest silnie zależna od jonizacji grupy 8-hydroksylowej (rysunek obok). pKa tej grupy wynosi ok. 7,2. Z tego powodu piranina wykazuje duży skok emisji fluorescencji przy długości fali 510 nm w zakresie pH ok. 6-10 (rysunek poniżej). W tym zakresie będzie ona najlepszym indykatorem - małe zmiany pH wywołają widoczne zmiany w emisji fluorescencji piraniny. Zależność emisji fluorescencji piraniny jest bardzo korzystna z punktu widzenia badań, ponieważ jest to zakres wartości pH najczęściej występujący w warunkach fizjologicznych.

Piranina wykazuje jeszcze jedną ważną właściwość- jej absorbancja zależy od pH środowiska (rysunek poniżej). Charakterystyczna długość fali, przy której różne formy spektralne związku chemicznego, występujące przy różnym pH, wykazują taką samą absorpcję nazywana jest punktem izozbestycznym.



Karboksyfluoresceina

w wersji wolnej (cząsteczkowej) jest to barwnik fluorescencyjny powszechnie stosowany jako środek znakujący. Nie przechodzi przez błonę komórkową (i modelową), do komórek jest dostarczany w postaci mikroiniekcji lub zamknięty w liposomach (wówczas wymagana jest ich fuzja z komórką). Jako znacznik w liposomach wykorzystywany jest do śledzenia ich wędrówki w krwioobiegu i miejsca akumulacji w organizmie. Jest powszechnie stosowanym indykatorem pH (rysunek obok), ponieważ podobnie jak w przypadku piraniny, jej fluorescencja silnie zależy od stopnia uprotonowania cząsteczki (rysunek poniżej). Związana kowalencyjnie do cząsteczki PE (fluoresceina-PE) jest stosowana do określania zmian lokalnego, przybliżonego pH.



Podczas przygotowywania niniejszego opracowania korzystano m. in. z następujących źródeł:

1. Pigoń K, Ruziewicz Z „Chemia fizyczna t. 1”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
2. Jóźwiak Z, Bartosz G (red.) „Biofizyka”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
3. Konarska L. (red.) „Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów przez błonę”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
4. Tomasz Radaszkiewicz, „Zastosowanie fluorescencji w badaniach budowy i funkcji białek”, praca licencjacka, opiekun pracy dr Maria Stasiuk, Wrocław 2011.
5. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products by Molecular Probes®, USA.
6. S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, *Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions*. Chemistry and Physics of Lipids 127 (2004) 3–14.
7. A. Kozubek, Wstęp do technologii liposomowej, Wrocław 2004
8. A. Helenius, K. Simons, *Solubilization of membranes by detergents*. Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 29-79
9. A. Helenius, D.R. McCaslin, E. Fries, C. Tanford, *Properties of detergents*. in: Methods in Enzymology, vol. LVI: *Biomembranes part G*