

Akademia im. Jana Długosza w
Częstochowie
Wydział Matematyczno - Przyrodniczy

Grzegorz Engel

Wpływ wybranych związków metali na elektryczne
właściwości błon lipidowych

Rozprawa doktorska
przygotowana w Katedrze Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego
Instytutu Fizyki Uniwersytetu Opolskiego

Promotor:
Prof. dr hab. Marian Podolak

Częstochowa 2009

*Panu prof. dr hab. **Marianowi Podolakowi**
chciałbym serdecznie podziękować
za cierpliwość i życzliwość, cenne uwagi i wskazówki
otrzymane podczas wielu dyskusji naukowych
oraz za wszelką pomoc podczas pisania tej rozprawy*

Spis treści

Spis treści	3
Wykaz skrótów	4
Streszczenie	5
Summary	6
Wprowadzenie	7
I Część ogólna	8
1 Lipidy i ich rola w strukturze błon biologicznych	8
1.1 Charakterystyka lipidów	9
1.2 Budowa i rodzaje lipidów błonowych	10
1.3 Kwasy tłuszczowe w lipidach błonowych	18
2 Błony lipidowe	23
2.1 Liposomy, BLM	24
2.2 Filtry impregnowane lipidami	25
3 Właściwości fizykochemiczne błon lipidowych	26
3.1 Dynamiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej	27
3.2 Organizacja strukturalna błon	29
3.3 Dyfuzja substancji przez błony	31
4 Właściwości elektryczne błon lipidowych	33
4.1 Rezystancja i pojemność błonowa	33
4.2 Potencjały elektryczne błon	35
5 Wpływ związków metali na organizmy żywe i właściwości fizyczne błon	40
II Badania własne	50
1 Cel pracy	50
2 Materiały	50
3 Metody badań	52
3.1 Elektryczne właściwości filtrów impregnowanych kwasami tłuszczowymi	52
3.2 Płynność błon liposomów modyfikowanych związkami metali	54
4 Omówienie wyników pomiarów	57
4.1 Wpływ nieorganicznych chlorków metali na właściwości elektryczne błon	57
4.2 Wpływ organicznych związków metali na właściwości elektryczne błon	64
4.3 Badanie wpływu alifatycznych związków metaloorganicznych z rodziny chlorobutylocyn na właściwości elektryczne błon	82
4.4 Badanie wpływu wybranych węglowodorów aromatycznych na właściwości elektryczne błon	89
5 Wnioski końcowe	97
III Literatura	100

Wykaz skrótów

BT - butylotrichlorocyna
CaCl₂ – dichlorek wapnia
CCl₄ – czterochlorek węgla
DAG - diacyloglicerol
DiBT – dichlorekdibutylocyny
DiMT – dichlorekdimetylocyny
DiPT – dichlorekdipropylocyny
DMF - dimetyloformamid
DPG - difosfatydyloglicerol
DPhL - difenylochlochlorołów
DPhT - difenylochlochlorocyna
EBKL – Ester butylowy kwasu laurynowego
KCl – chlorek potasu
MT - metylotrichlorocyna
NaCl – chlorek sodu
PC - fosfatydylocholina
PE - fosfatydyloetanolamina
PG - fosfatydyloglicerol
PhT - fenylotrichlorocyna
PI - fosfatydyloinozytol
PIP - fosfatydyloinozytol-4-fosforanu
PIP2 - fosfatydyloinozytol-4,5-difosforanu
PIP3 - trifosforanu inozytolu
PS - fosfatydyloseryna
SnCl₂ – dichlorek cyny
SnCl₄ · H₂O – czterochlorek cyny
TBT – tributylocyna
TET - tetraetylocyna
TMT - tetrametylocyna
TPhL - trifenylochlochlorołów
TPhT - trifenylochlochlorocyna
TriBL – tributylochlochlorołów
TriBT – tributylochlochlorocyna
TriET – trietylochlochlorocyna
TriML – trimetylochlochlorołów
TriMT – trimetylochlochlorocyna
TriPL – tripropylochlochlorołów
TriPT – tripropylochlochlorocyna
TTPhT – tetrafenylocyna

Streszczenie

W pracy badano wpływ wybranych nieorganicznych związków metali oraz związków metaloorganicznych na elektryczne parametry błon lipidowych w postaci filtrów impregnowanych estrem butylowym kwasu laurynowego (EBKL) a także innymi kwasami tłuszczowymi. Uzyskane wyniki pomiarów wskazują, że efektywność oddziaływania tych związków z błonami uwarunkowana jest ich hydrofobowymi i hydrofilowymi właściwościami. Zastosowana w pracy elektryczna metoda badań, okazała się czułym narzędziem w detekcji oddziaływania z błonami zarówno związków ulegających dysocjacji jak też wykazujących w kontakcie z tymi błonami stan naelektryzowania. Metoda ta może być użyteczna w badaniach związków różniących się strukturą chemiczną, a także rodzajem metalu, obecnego w ich strukturze. Z drugiej strony okazała się ona mało wrażliwa przy badaniu związków nie wykazujących cech naelektryzowania. Do badania tego typu związków bardziej przydatna okazała się metoda EPR. Wykazała ona, że w obecności takich związków jak tetrametylocyna (TMT) i tetraetylocyna (TET) rośnie płynność błon liposomów (formowanych z lecytyny syntetycznej DPPC).

Summary

The effect of selected inorganic compounds of metals and organometallic compounds on the electric parameters of model biological membranes in the form of filters impregnated with lauric acid butyl ester (EBKL) has been investigated as well other fatty acids. The results indicate that the efficiency of the interaction of the examined compounds with membranes depends of both the hydrophobic and hydrophilic properties this compounds. The method of electric tests of lipid membrane properties, applied in this work, has been proved to be a sensitive tool for detection of efficiency of interaction with membranes of both the dissociating organometallic compounds and compounds polarizing in contact with the membrane. The method can be useful for examination of interactions with membranes of organometallic compounds that differ by their chemical structure, and also of the effect of the type of metal present in the structure on these interactions. The method was not enough sensitive with investigations on the electric parameters of membranes in presence not polarizing organometallic compounds. These compounds need to be study using by EPR method. The EPR method indicate, that in presence of the compounds like TMT and TET increase fluidity of liposomes formed from synthetics lecithin DPPC.

Wprowadzenie

Człowiek, dzięki zdolności do wytwarzania i udoskonalania swoich narzędzi, od tysięcy lat starał się podporządkować sobie obszar środowiska naturalnego, w którym żył. Z czasem, jego dominacja nad globem stała się absolutna a modyfikacje zmierzające pierwotnie do poprawy jego bytu spowodowały nieodwracalne zmiany środowiska naturalnego. Obecnie zanieczyszczenie środowiska odpadami pochodzącymi z działalności człowieka, stało się nierozłącznym elementem każdego ekosystemu na Ziemi. W związku z tym, czy tego chcemy czy nie, jesteśmy narażeni na kontakt z różnego rodzaju związkami o właściwościach toksycznych. Należą do nich związki metaloorganiczne – związki, które zawierają przynajmniej jedno, bezpośrednie wiązanie metal-węgiel [1]. Substancje te gromadzone są w otaczającym nas środowisku np. w postaci produktów przemysłowych procesów technologicznych czy środków ochrony roślin. Większość metali ciężkich nie ulega rozkładowi. Dostają się one do gleby, stąd do organizmów roślin i zwierząt a następnie ludzi. Metale ciężkie są trucizną dla organizmów żywych, w których łącząc się z enzymami i innymi proteinami tworzą kompleksy blokujące procesy metaboliczne w komórkach, co w konsekwencji może prowadzić do ich obumierania.

Niezwykle ważnym elementem komórek wszystkich organizmów żywych są błony komórkowe. Chronią ona komórki przed rozpadem i stanowią selektywną barierę oddzielającą ich wnętrze od otoczenia. Poza tym błony komórkowe ułatwiają integrację funkcji pełnionych przez poszczególne zespoły komórek, dzięki czemu możliwe jest efektywne działanie całego organizmu. Pomimo obszernej literatury wiedza na temat struktury i biologicznych funkcji błon komórkowych jest nadal fragmentaryczna. Wszystko to sprawia, że badania błon a w szczególności badania prowadzone na poziomie molekularnym, znajdują się obecnie w centrum zainteresowania nauk przyrodniczych.

I Część ogólna

Komórka biologiczna stanowi przestrzeń ograniczoną błoną komórkową. Jest to najmniejsza, funkcjonalna jednostka żywych organizmów, zdolna do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych takich jak przemiana materii, wzrost czy rozmnażanie. W przypadku większości prokariotów, grzybów, roślin i niektórych protistów (w większości jednokomórkowce) komórka otoczona jest (od strony zewnętrznej) martwą strukturą zwana ścianą komórkową.

Wnętrze komórki składa się z mniejszych podjednostek, tzw. organeli takich jak np. jądro komórkowe, mitochondria, aparaty Goldiego, chloroplasty, lizosomy. Organele również stanowią przestrzeń ograniczoną błonami plazmatycznymi. Błony biologiczne zapewniają integralność i prawidłowe działanie nie tylko komórce jako całości, ale także poszczególnym organelom wewnątrzkomórkowym.

Podstawowymi składnikami błon biologicznych są lipidy i białka. Ponadto w błonach tych występują również woda, jony i węglowodany.

1 Lipidy i ich rola w strukturze błon biologicznych

Błony komórkowe zawierają ok. 100 różnych lipidów. W zależności od rodzaju błony, zawartość lipidów wynosi od 20% wszystkich składników (błony mitochondriów) do 80% (osłonka mielinowa komórek nerwowych).

Lipidy, uporządkowane w ciekłokrystaliczne struktury liotropowe, stanowią rdzeń każdej błony komórkowej. Błony oddzielają komórkę od otoczenia oraz ograniczają znajdujące się w jej wnętrzu organele. Oprócz funkcji bariery selektywnie przepuszczającej określone substancje niepolarne, błony odgrywają też ważną rolę w przenoszeniu sygnałów między komórkami. Zawierają, bowiem receptory reagujące na sygnały zewnętrzne np. chemiczne, mechaniczne lub świetlne. W błonach zachodzą podstawowe procesy energetyczne komórek: fotosynteza w chloroplastach i fosforyzacja oksydacyjna w mitochondriach. Lipidowy rdzeń błony ma postać szczelnej, dwucząsteczkowej warstwy. Warstwa ta zapewnia komórce integralność. Jest ona również miejscem lokowania się białek. Pozostałe funkcje, jakie pełnią lipidy w błonach żywych organizmów to funkcje regulacyjne fosfatydyloinozytolu i jego

pochodnych w komórkach eukariotycznych; udział niektórych lipidów w procesach biosyntezy, np. glukozy, fruktozy lub innych oligosacharydów, oraz regulacja wzrostu komórek, np. przez gangliozydy.

1.1 Charakterystyka lipidów

Lipidy stanowią szeroką grupę związków organicznych. Związki te można podzielić na trzy grupy: lipidy proste, lipidy złożone oraz pochodne lipidów [2] (Tab. 1).

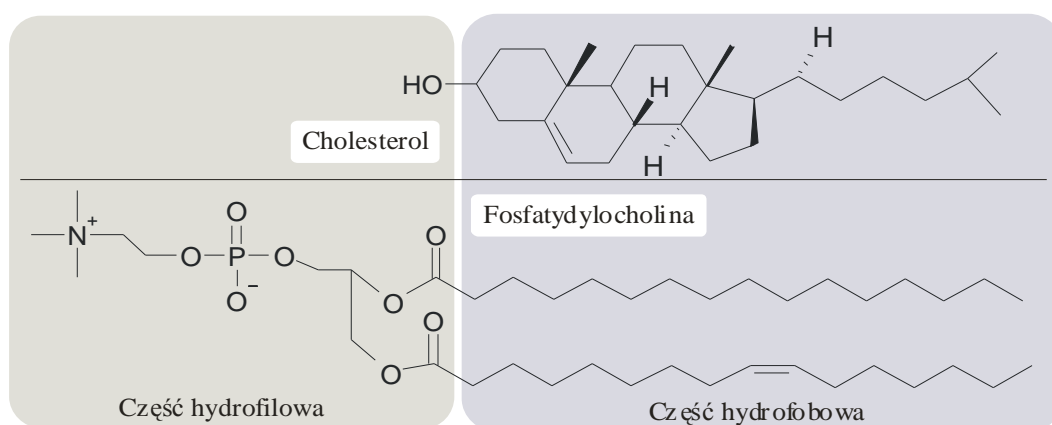
Tab. 1. Podział lipidów.

Lipidy proste	Tłuszcze	Estry glicerolu i kwasów tłuszczowych.
	Woski	Estry wyższych kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi. Wśród wosków można wyróżnić: – woski prawdziwe, – estry cholesterolu, – estry witaminy A i witaminy D.
Lipidy złożone – oprócz reszt kwasów tłuszczowych i alkoholi zawierają również reszty innych związków, np. aminokwasów, estrów kwasu fosforowego i sacharydów.	Fosfolipidy	Acylowany glicerol z resztą kwasu fosforowego oraz dwiema resztami kwasów tłuszczowych. Pośród nich wyróżnia się: – glicerofosfolipidy – pochodne glicerolu – sfingolipidy – pochodne sfingozyny.
	Glikolipidy	Pochodne zarówno glicerolu jak i sfingozyny, zawierające dodatkowo składnik cukrowy. Dzielą się na: – cerebrozydy – gangliozydy.
	Sulfolipidy	Lipidy zawierające siarkę.
Pochodne lipidów – chemicznie modyfikowane naturalne lipidy.	– kwasy tłuszczowe, – sterydy i steroidy.	

Lipidy na ogół nie rozpuszczają się w wodzie. Wyjątkiem są np. kwasy karboksylowe o krótkich łańcuchach węglowodorowych, które wykazują niewielką rozpuszczalność w wodzie. Do grupy lipidów złożonych należą lipidy błonowe.

1.2 Budowa i rodzaje lipidów błonowych

Wszystkie lipidy błonowe mają wspólną cechę; amfifilowość. Oznacza to, że wykazują powinowactwo zarówno ze środowiskiem polarnym, jak i niepolarnym. W ich budowie można wyróżnić dwie zasadnicze części: część hydrofobową, zawierającą dużą liczbę lipofilowych grup CH_2 tworzących łańcuchy alifatyczne, oraz część hydrofilową (Rys. 1) [3, 4].



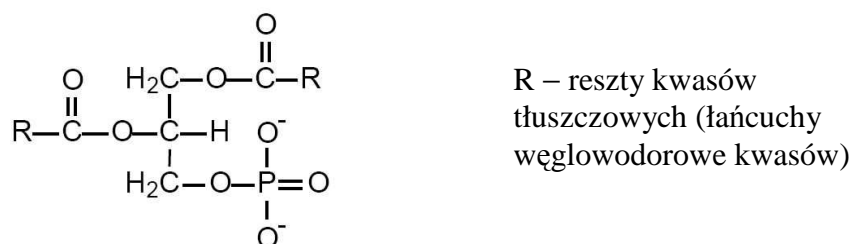
Rys. 1. Budowa amfifilowych cząsteczek cholesterolu i fosfatydylocholiny (lecytyny) – przedstawicieli lipidów błonowych.

Do lipidów błonowych należą glicerofosfolipidy (fosfoglicerydy), sfingolipidy, glikolipidy i sterole. O przynależności lipidu do danej grupy decyduje głównie budowa jego części polarnej. Ta część cząsteczki lipidu jest najbardziej rozbudowana w przypadku należących do gangliozydów. Lipidy amfifilowe wykazują dużą różnorodność pod względem polarności i ładunku części hydrofilowej. W pH obojętnym takie glicerofosfolipidy jak fosfatydyloseryna czy fosfatydyloinozytol mają wypadkowy ładunek ujemny, pochodzący od reszty fosforanowej. Lipidy błonowe różnią się również budową części hydrofobowej. Część ta może zawierać łańcuchy węglowodorowe o różnej długości, liczbie i rozmieszczeniu wiązań podwójnych.

Skład lipidowy błon warunkuje ich właściwości fizykochemiczne takie jak płynność, przepuszczalność, przemiany fazowe, potencjał powierzchniowy czy transbłonowy. Od składu lipidowego błon zależy również aktywność białek błonowych.

1.2.1 Glicerofosfolipidy

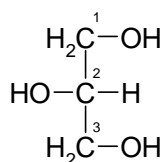
Glicerofosfolipidy (fosfoglicerydy) to najliczniejsza grupa lipidów błonowych. Najprostszym fosfoglicerydem jest kwas fosfatydowy (fosfatydylan) (Rys. 2). W stanie wolnym rzadko występuje on w organizmach żywych, natomiast jego estrami są wszystkie inne glicerofosfolipidy. W kwasie fosfatydowym jedna z grup hydroksylowych glicerolu (Rys. 3) zestryfikowana jest kwasem fosforowym, pozostałe dwie kwasami tłuszczowymi.



Rys. 2. Kwasy fosfatydowy.

Kwas fosfatydowy należy do związków sygnałowych. Uczestniczy on w takich procesach jak: stymulacja syntezy DNA i podziału komórek, regulacja poziomu wapnia a także zapobieganie apoptozie, czyli programowanej śmierci komórki.

Trzon kwasu fosfatydowego stanowi glicerol (Rys. 3).

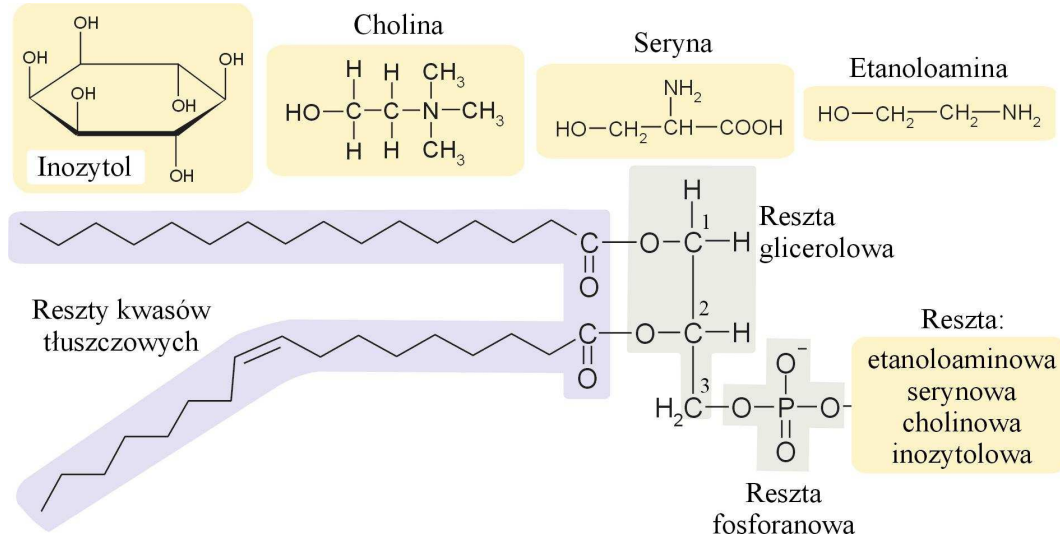


Rys. 3. Wzór strukturalny cząsteczki glicerolu wraz z numeracją atomów węgla.

Każda z grup hydroksylowych glicerolu może tworzyć wiązania estrowe z grupami karboksylowymi kwasów tłuszczowych i kwasem fosforowym [5]. W łańcuchach węglowodorowych kwasów tłuszczowych może wystąpić jedno lub więcej wiązań podwójnych. Wiązania podwójne o konformacji cis, powodują „zgięcie” i usztywnienie łańcucha (Rys 4).

Kwas fosfatydowy może być estryfikowany cząsteczkami choliny, etanoloaminy, seryny lub inozytoli, tworząc z nimi odpowiednio: fosfatydylocholinę (PC),

fosfatydyloetanolaminę (PE), fosfatydyloserynę (PS) fosfatydyloinozytol (PI), przedstawiciele glicerofosfolipidów cholinowych, etanolaminowych, serynowych i inozytowych (Rys. 4) [6].



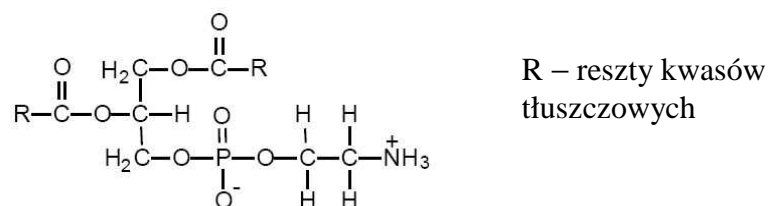
Rys. 4. Budowa fosfoglicerydu.

Glicerofosfolipidy cholinowe

Głównym lipidem należącym do tej grupy jest fosfatydylocholina (PC) (Rys. 1). Stanowi ona ok. 40-50% ogólnej liczby lipidów błonowych występujących w komórkach wyższych roślin i zwierząt. Łańcuchy alkilowe tych lipidów mogą pochodzić od takich samych lub różnych kwasów tłuszczowych. W pozycji C¹ (Rys. 4) najczęściej występuje kwas palmitynowy, w pozycji C² oleinowy lub linolowy.

Glicerofosfolipidy etanolaminowe

Głównym przedstawicielem tej grupy jest fosfatydyloetanolamina (PE) (Rys. 5), która w błonach zwierząt i roślin występuje w znacznie mniejszych ilościach aniżeli PC, natomiast jest ona głównym lipidem błon komórkowych bakterii.

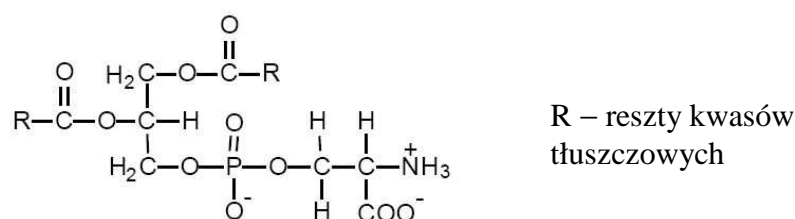


Rys. 5. Fosfatydyloetanolamina (kefalina kolaminowa) (PE).

Fosfolipid ten przy pH 2,7 jest jonem obojnym, natomiast przy pH wyższym jest anionem. Kwasy tłuszczowe tworzące PE są bardziej nienasycone aniżeli te, które tworzą PC. W pozycji C² najczęściej występuje w nich wielonienasycony kwas arachidonowy lub dokozaheksaenowy.

Glicerofosfolipidy serynowe

W tej grupie występują jedynie formy diacylowe zwane fosfatydyloserynami (PS) (Rys. 6).



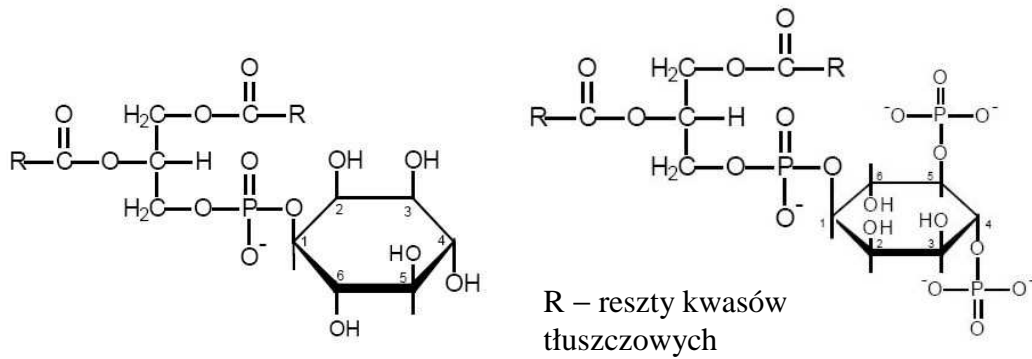
Rys. 6. Fosfatydyloseryna (PS).

Są to jedyne, zawierające aminokwas, fosfolipidy występujące w komórkach zwierzęcych [7]. PS zawierają trzy grupy ulegające jonizacji, dlatego przy pH 7 ich cząsteczki są ujemnie naładowane (lipid anionowy). PS pośrednio biorą udział w procesach sygnalizacji komórkowej, uczestnicząc w aktywacji kinaz białkowych C.

Fosfolipidy PC, PE i PS zawierają ponadto jedną zasadową grupę azotową.

Glicerofosfolipidy inozytowe

Poza funkcją budulcową błon, fosfoglicerydy inozytowe pełnią również rolę substancji macierzystych, związków biologicznie czynnych o charakterze wtórnych przekaźników. Głównym przedstawicielem tych diacylowych fosfoglicerydów jest fosfatydyloinozytol (PI) (Rys. 7), który w pozycji C¹ glicerolu najczęściej zawiera kwas stearynowy natomiast w pozycji C² kwas arachidowy. PI występuje w niewielkich ilościach we wszystkich organizmach. Oprócz formy podstawowej tych lipidów występują formy zawierające dodatkowe grupy fosforanowe: w pozycji C₄ (PIP), lub w pozycjach C₄ i C₅ (PIP₂) (Rys. 7).



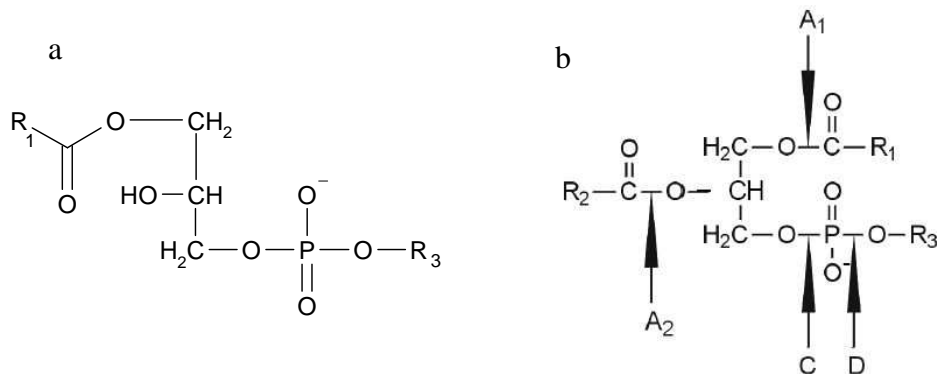
Rys. 7. Fosfatydyloinozytol (PI) oraz fosfatydyloinozytol-4,5-difosforanu (PIP₂).

PIP₂ powstaje w wyniku fosforylacji PI w obecności ATP i określonych kinaz. Forma ta jest związkiem o istotnej roli biologicznej, ponieważ jest prekursorem (hydroliza fosfolipazą C – Rys. 8b) rozpuszczalnego w wodzie trifosforanu inozytoli (PIP₃) pełniącego podstawową rolę w sygnalizacji komórkowej. PIP₃ uwolniony z błony, dostaje się m.in. do cytoplazmy i otwiera wewnątrzkomórkowe kanały wapniowe w siateczce śródplazmatycznej, uwalniając jony Ca⁺² do cytoplazmy. Pozostałą częścią cząsteczki PIP₂, uwolnioną w wyniku hydrolizy fosfolipazą C jest diacyloglicerol (DAG). Jest on dostarczycielem kwasu arachidonowego (głównego kwasu tłuszczowego) dla syntezy eikozanoidów. DAG pozostaje w błonie i pełni funkcję naturalnego aktywatora kinazy białkowej C, która fosforylując swoje białka, może np. aktywować wymianę jonów H⁺ pochodzących z wnętrza komórki na jony Na⁺ pozakomórkowe, doprowadzając do wzrostu pH cytoplazmy. DAG jest szybko metabolizowany albo z udziałem fosfolipazy A₂, albo ulega fosforylacji do kwasu fosfatydowego, z którego ostatecznie odtwarzany jest fosfatydyloinozytol [5].

Lizofosfolipidy

Glicerofosfolipidy pozbawione jednej reszty kwasowej noszą nazwę lizofosfolipidów (Rys. 8a). W organizmie powstają one w wyniku enzymatycznej hydrolizy jednego z wiązań estrowych, wywołanej przez lipazę grupy A₂ (Rys. 8b). Fosfolipaza ta hydrolizuje wiązanie eterowe przy węglu C₂ uwalniając odpowiedni lizofosfolipid (np. lizofosfatydylocholinę) i wolny kwas tłuszczowy [5]. Lizofosfolipidy powodują hemolizę erytrocytów, wywołaną między innymi ukąszeniem węża lub pszczoły, których jad zawiera fosfolipazę A₂. Występują również jako składnik

patologiczny utlenionych lipoprotein w surowicy krwi oraz pojawiają się podczas zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych.

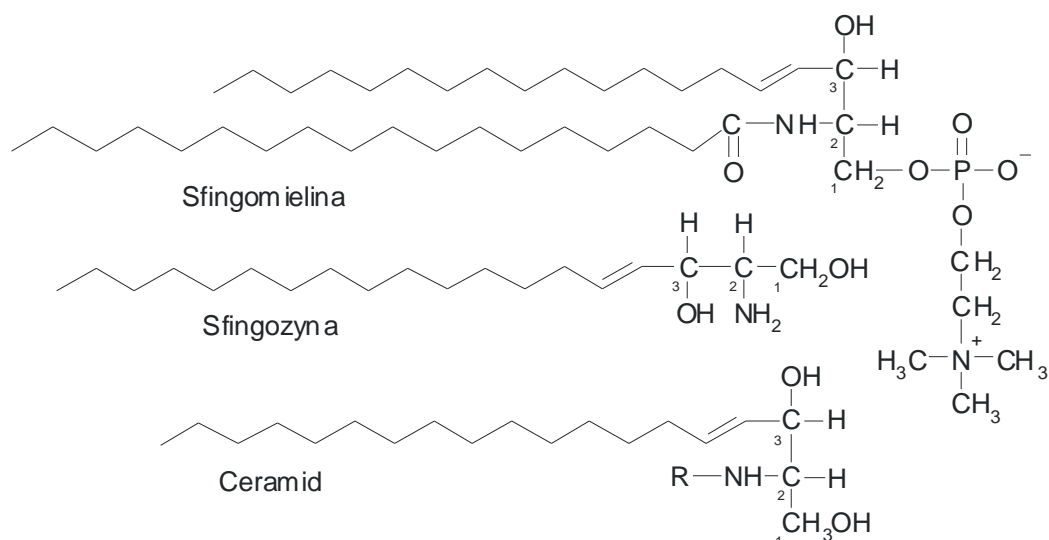


Rys. 8. Ogólny wzór lizofosfolipidów (a) oraz wiązania w fosfolipidach hydrolizowane przez fosfolipazy A₁, A₂, C i D (b). R₁, R₂ – reszty kwasów tłuszczowych, R₃ – grupa polarna: cholinowa, etanoloaminowa lub serynowa.

Fosfolipazy, poza funkcjami trawiennymi, mogą także uruchamiać powstawanie bardzo aktywnych cząsteczek sygnałowych lub ich prekursorów. Fosfolipaza A₂ może uwolnić kwas arachidonowy, który jest bezpośrednim prekursorem prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów, natomiast fosfolipaza C uwalnia dwa wtórne przekazywanie informacji hormonalnej.

1.2.2 Sfingolipidy

Drugą, najważniejszą klasę lipidów membranowych po glicerofosfolipidach stanowią sfingolipidy (Rys. 9). Ich trzon stanowi długołańcuchowy, nienasycony aminoalkohol – sfingozyna. Najprostszymi sfingolipidami są ceramidy [8]. Do drugiego atomu węgla sfingozyny, poprzez wiązanie amidowe, mogą być przyłączane długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Jeżeli dodatkowo grupa hydroksylowa przy węglu C₁ zestyfikowana jest, podobnie jak w fosfoglicerydach, poprzez grupę ortofosforanową z alkoholem (choliną) to mamy do czynienia z najczęściej występującym w błonach sfingolipidem – sfingomieliną (Rys. 9).

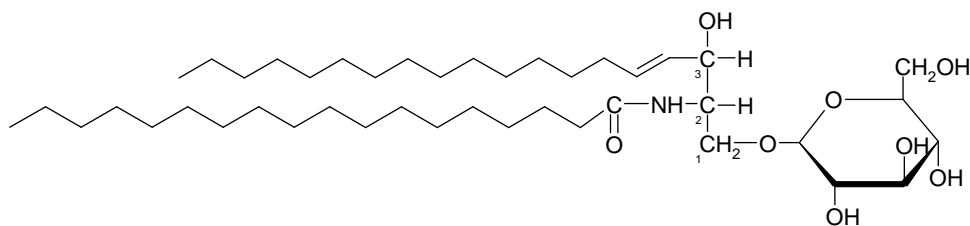


Rys. 9. Sfingozyna, jej pochodna ceramid oraz sfingomielina.

Sfingomieliny mogą różnić się między sobą rodzajem reszty acylowej kwasu tłuszczowego, przyłączonego do sfingozyny. Mogą to być reszty kwasów: stearynowego, palmitynowego, lignocerynowego i nerwowego (24 atomy węgla). Wśród sfingomielin najliczniejszą grupę stanowią te, które zawierają reszty kwasów tłuszczowych nasyconych. Np. sfingomieliny tkanki nerwowej najczęściej mają grupy acylowe pochodzące od kwasu stearynowego, natomiast – wątroby – od kwas palmitynowego. Sfingomieliny szczególnie obficie występują w osłonkach mielinowych włókien nerwowych. Stanowią one izolatory tkanki nerwowej odporne na utlenianie. Wynika to z niewielkiej zawartości kwasów jednonienasyconych i praktycznie braku kwasów wielonienasyconych w sfingomielinie.

1.2.3 Glikolipidy

Wśród glikolipidów istotne znaczenie, w funkcjonowaniu błon biologicznych, odgrywają glikosfingolipidy. Zbudowane są one z ceramidu oraz reszty cukrowej (zamiast reszty fosforanowej i alkoholu) (Rys. 10) [6]. Glikosfingolipidy zawierające grupę monocukrową (np. galaktopiranozę lub glukopiranozę) nazywane są cerebrozydami.

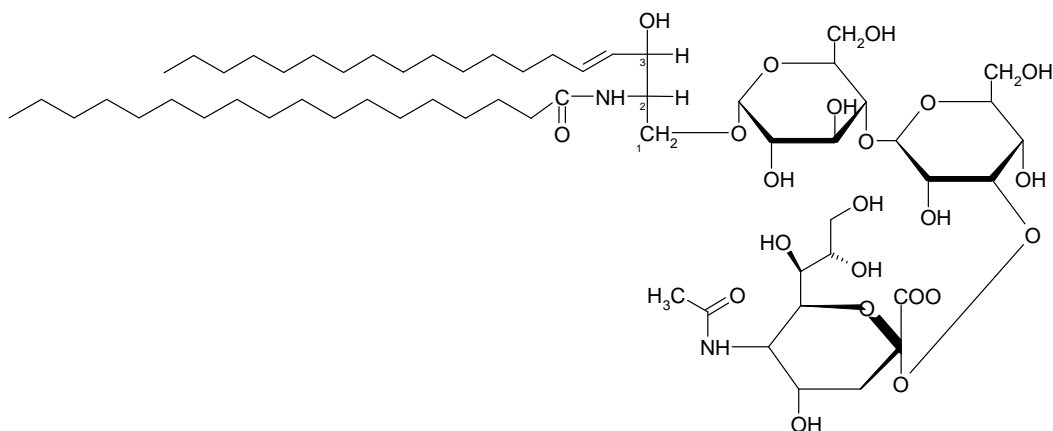


Rys. 10. Glikolipid (galaktocerebrozyd).

Poszczególne cerebrozydy różnią się rodzajem zawartego w nich kwasu tłuszczowego. Występują one przede wszystkim w tkance nerwowej mózgu.

Cerebrozydy w postaci estrów siarczanowych (np. 3-O-sulfogalaktocerebrozyd) zaliczane są do grupy sulfolipidów. Mogą one różnić się między sobą resztami kwasów tłuszczowych przyłączonych do sfingozyny. Łańcuchy alkilowe sulfolipidów zawierają od 14 do 26 atomów węgla. Najczęściej występują w nich kwasy 24-węglowe: nerwonowy i lignocerynowy.

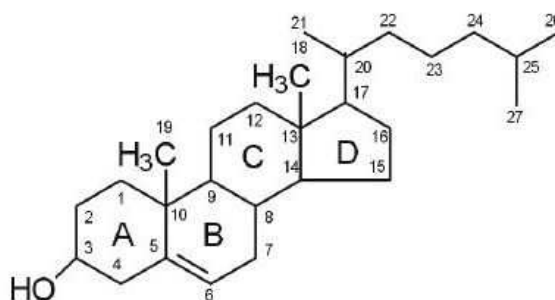
W gangliozydach bardzo często występują reszty pochodnych kwasowych cukrów, takich jak np. kwas sialowy (kwas N-acetyluuraminowy) (Rys. 11) [7].

Rys. 11. Gangliozyd GM₃.

1.2.4 Sterole

Do lipidów membranowych zaliczane są również sterole. Są one organicznymi związkami chemicznymi (alkoholami) należącymi do grupy sterydów (steroidów). Sterole, razem z kwasami żółciowymi i hormonami steroidowymi są najważniejszymi

biologicznie sterydami. Cechą wspólną steroidów (w tym steroli) jest występowanie w ich cząsteczkach szkieletu węglowego w formie czterech sprzężonych pierścieni. Sterole zawierają dodatkowo grupę hydroksylową przyłączoną w pozycji węgla C₃. Występują one w błonach roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów. Najważniejszy sterol zwierzęcy cholesterol, może mieć pochodzenie egzogenne (z pokarmu) lub endogenne (jest syntezowany w wątrobie) (Rys. 12).



Rys. 12. Cholesterol.

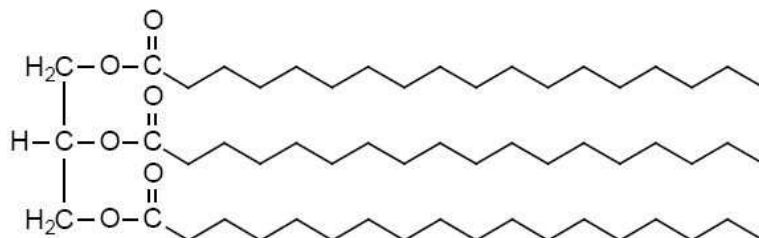
Występuje on we wszystkich komórkach zwierzęcych [9] jako składnik błon plazmatycznych, lizosomów, endosomów i aparatów Goldiego. W cytoplazmie obecny jest w postaci estrów cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Najbogatsze w cholesterol są nadnercza i mózg. Nadmiar cholesterolu jest szkodliwy dla organizmu, gdyż przyspiesza rozwój zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Jego nadmiar może też być odkładany w postaci kamieni żółciowych.

Cholesterol reguluje płynność błon, przemiany fazowe i ich przepuszczalność [10 - 14]. Obecność cholesterolu wpływa na zmniejszenie płynności błon, co stabilizuje jej strukturę. Wraz ze zmianą płynności dwuwarstwy zmienia się (maleje) również jej przepuszczalność. Obecność cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej w fazie żelowej wywołuje odwrotny efekt niż w fazie ciekłokrystalicznej: powoduje upłynnienie dwuwarstwy.

1.3 Kwasy tłuszczowe w lipidach błonowych

Słaba rozpuszczalność lipidów w wodzie jest związana z występowaniem w ich strukturze dużej liczby hydrofobowych grup CH₂ tworzących łańcuchy węglowodorowe. Łańcuchy takie występują w kwasach tłuszczowych, które są

prekursorami lipidów. Kwasami tłuszczowymi nazywane są alifatyczne kwasy monokarboksyłowe. W organizmach żywych występują one przede wszystkim w postaci tłuszczu (triacylogliceroli – Rys. 13) oraz fosfolipidów – głównych składników błon komórkowych [5].



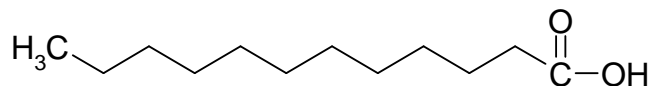
Rys. 13. Triacyloglicerol prosty (1,2,3-tristearoilo-sn-glicerol), zawierający jeden rodzaj kwasu tłuszczowego.

Błony erytrocytów ludzkich dla przykładu zawierają głównie lipidy estryfikowane kwasami o 16 i 18 węglowych nasyconych łańcuchach oraz łańcuchy 18 węglowe z jednym wiązaniem nienasyconym. Kwasy jednonienasycone (monoenowe) są najczęściej spotykanymi kwasami nienasyconymi.

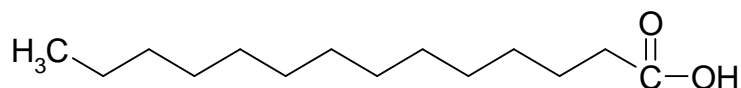
W Tab. 2. przedstawione zostały kwasy tłuszczowe najczęściej spotykane w błonach roślin i zwierząt [6, 8].

Tab. 2. Kwasy tłuszczowe najczęściej spotykane w lipidach błonowych. Oprócz nazwy zwyczajowej, w nawiasach, podane zostały długości łańcuchów i liczba wiązań podwójnych oraz w przypadku kwasów nienasyconych numer węgla n (od końca łańcucha metylowego), przy którym występuje pierwsze wiązanie podwójne. Wszystkie wiązania podwójne w kwasach nienasyconych mają konformację cis.

Kwas laurynowy (12:0)

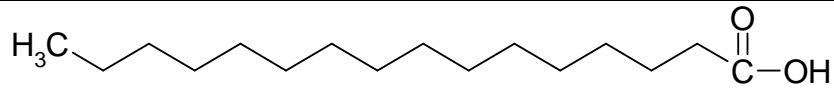


Kwas mirystynowy (14:0)

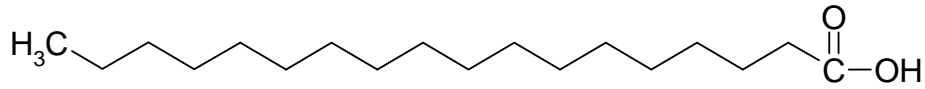


Kwas palmitynowy (16:0)

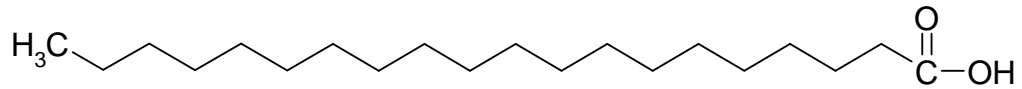
Część ogólna



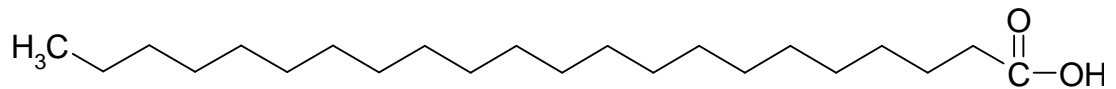
Kwas stearynowy (18:0)



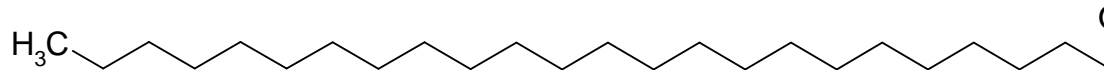
Kwas arachidowy (20:0)



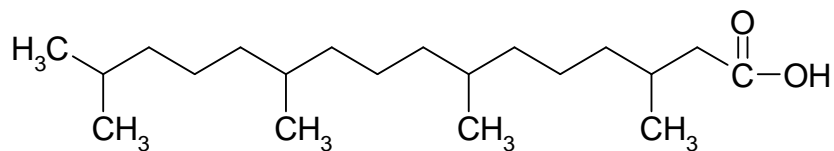
Kwas behenowy (22:0)



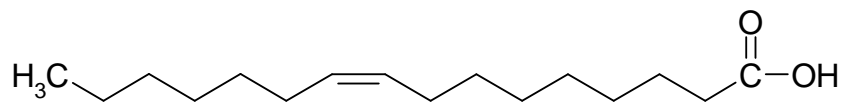
Kwas lignocerynowy (24:0)



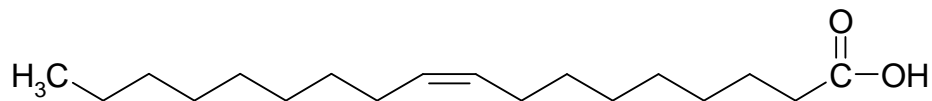
Kwas fitynowy (3,5,11,15-tetrametyloheksadekanowy)



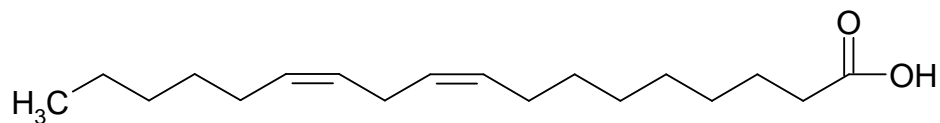
Kwas palmitooleinowy (16:1)



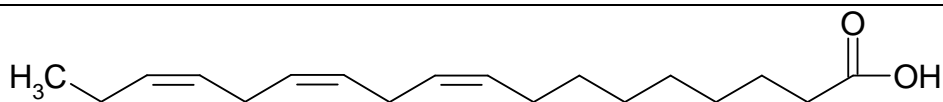
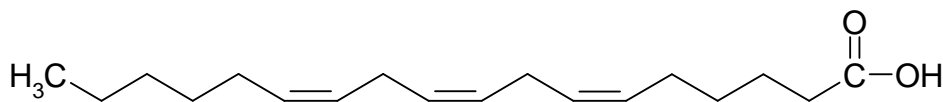
Kwa oleinowy (18:1 n-9)



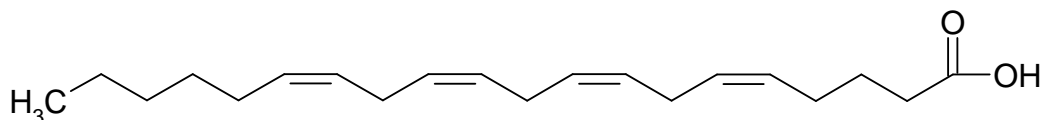
Kwas linolowy (18:2 n-6)



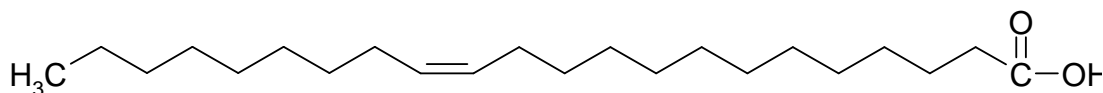
Kwas linolenowy (18:3 n-3)

Kwas γ -linolenowy (18:3 n-6)

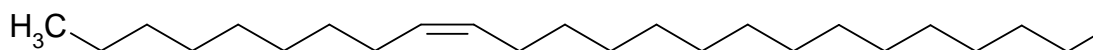
Kwas arachidonowy (20:4 n-6)



Kwas erukowy (22:1 n-9)



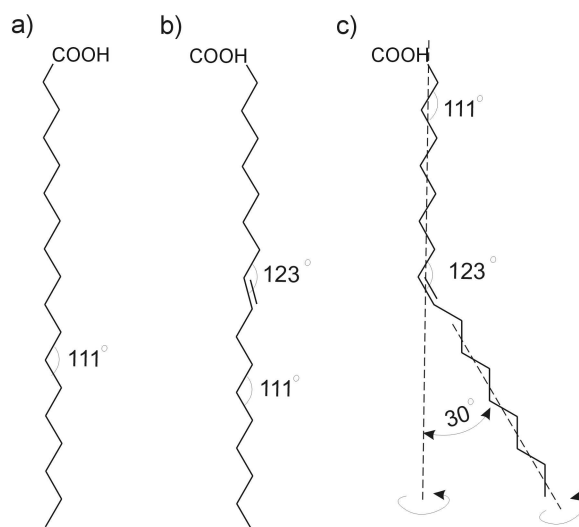
Kwas nerwonowy (24:1 n-9)



Łańcuchy kwasów tłuszczowych mogą obracać się wokół każdego wiązania C-C. Istnieje jednak optymalna konformacja łańcuchów zapewniająca im minimalną energię (Rys. 14a). Obecność wiązania podwójnego w przypadku kwasów nienasyconych modyfikuje konformację łańcuchów węglowodorowych. Wiązanie podwójne typu trans wprowadza nieznaczne zmiany konformacji (Rys. 14b), natomiast wiązanie typu cis powoduje zgięcie łańcucha węglowodorowego o kąt 30 od osi symetrii (Rys. 14c). Nomenklatura nienasyconych kwasów tłuszczowych opiera się na podawaniu pozycji pierwszego węgla od strony grupy karboksylowej (tzw. pozycja Δ) bądź też pozycji pierwszego wiązania liczonej od końca łańcucha metyloвого (tzw. pozycja n).

Nasycone kwasy tłuszczowe, o wzorze ogólnym $C_nH_{2n}O_2$, są związkami spotykanymi w przyrodzie przede wszystkim jako składniki tłuszczów, fosfolipidów, wosków i liposacharydów. Kwasy zawierające mniej niż 10 atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym (niższe kwasy tłuszczowe), są cieciami lub olejami, natomiast kwasy o większej liczbie atomów węgla w łańcuchu (wyższe kwasy tłuszczowe) są ciałami stałymi. Ich temperatura topnienia rośnie ze wzrostem długości łańcuchów

węglowodorowych. Niższe kwasy tłuszczowe charakteryzuje bardzo nieprzyjemny zapach oraz rozpuszczalność w wodzie.



Rys. 14. Łańcuchy kwasów tłuszczowych o minimalnej energii swobodnej: a) nasyconego kwasu tłuszczowego, b) nienasyconego kwasu tłuszczowego z wiązaniem podwójnym typu trans, c) nienasyconego kwasu z wiązaniem podwójnym typu cis.

W przyrodzie przeważają kwasy nienasycone. W świecie roślin ok. 70% ogólnej liczby kwasów tłuszczowych stanowią kwasy oleinowy i linolowy. Również w tłuszczach zwierzęcych najpopularniejszy jest kwas oleinowy, którego udział wynosi ok. 50%. W tłuszczach ryb przeważają kwasy nienasycone a wśród nich polinienasycone, zwane niezbędnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (NNKT).

Kwasy tłuszczowe biorą udział w ważnych procesach życiowych. Są one głównym źródłem energii dla procesów metabolicznych a ponadto stanowią substraty w syntezie tłuszczów, fosfolipidów, liposacharydów, lipoprotein jak również eikozanoidów – hormonów i międzykomórkowych związków informacyjnych.

Nasycone i niektóre nienasycone kwasy tłuszczowe mogą być syntetyzowane w organizmach zwierząt. Lipogeneza, (szlak metaboliczny w trakcie którego dochodzi do syntezy kwasów tłuszczowych), zachodzi w cytozolu komórek wielu tkanek, zwłaszcza w wątrobie, nerkach, mózgu, płucach, gruczole sutkowym i tkance tłuszczowej. Substratem do syntezy kwasów tłuszczowych jest koenzym acetylo-CoA zaś jej końcowym produktem - kwas palmitynowy, który może być wydłużany do kwasu stearynowego i dalej do kwasów zawierających od 20 do 24 atomów węgla. Acetylo-CoA to acetylokoenzym A, który jest najważniejszym acylokoenzymem A (acylo-

CoA), stanowiącym połączenie koenzymu CoA z resztą acylową kwasu tłuszczowego. Związek ten umożliwia transport grup acylowych w organizmie.


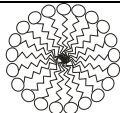
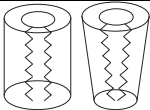
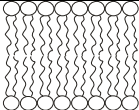
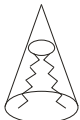
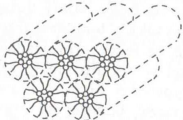
Do utrzymania odpowiedniej struktury, a co za tym idzie funkcji i płynności błon komórkowych niezbędne są również nienasycone kwasy tłuszczowe. Zarówno w tkankach roślinnych jak i zwierzęcych obecny jest enzym D9-desaturaza, który katalizuje tworzenie się podwójnego wiązania między 9 i 10 atomem węgla kwasu nasyconego. W ten sposób z kwasu palmitynowego powstaje kwas palmitooleinowy (C 16:1 n-7), zaś ze stearynowego - kwas oleinowy (C18:1 n-9). W tkankach roślinnych występują również enzymy umożliwiające wprowadzenie podwójnego wiązania pomiędzy istniejące już wiązanie podwójne n-9, a grupę metylową na końcu łańcucha. W wyniku działania D12-desaturazy z kwasu oleinowego (18:1 n-9) powstaje kwas linolowy (18:2 n-6), przekształcany dalej przez D15-desaturazę do kwasu linolenowego (18:3 n-3).

W tkankach zwierzęcych, z powodu braku odpowiednich desaturaz, podwójne wiązania mogą być wprowadzone jedynie między istniejące już wiązanie podwójne a grupę karboksylową. Nie zachodzi więc synteza kwasów linolowego i linolenowego. Muszą być one dostarczone w diecie i dlatego określa się je mianem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) [15].

2 Błony lipidowe

Lipidy polarne tworzą w środowisku wodnym różnego rodzaju struktury ciekłokrystaliczne (kryształy liotropowe). Zjawisko to nosi nazwę polimorfizmu lipidowego. Rodzaj struktury zależy od rodzaju lipidów, ich stężenia, temperatury oraz pH środowiska, ale przede wszystkim od kształtu molekularnego cząsteczek lipidów. Cząsteczki mające kształt stożka tworzą w środowisku wodnym micelle. Do grupy tej można zaliczyć lipidy, które zawierają dużą grupę polarną oraz pojedynczy łańcuch węglowodorowy np. lizofosfolipidy. W przypadku cząsteczek o małych „główkach polarnych”, w porównaniu z przekrojem łańcuchów węglowodorowych, preferowane są odwrócone micelle (struktury heksagonalne). Dla cząsteczek o kształcie przypominającym ścięty stożek, preferowaną formą strukturalną jest liposom. Gdy cząsteczki mają kształt walca (fosfatydylocholina), to w środowisku wodnym tworzą one płaskie dwuwarstwowe struktury (Tab. 3) [16].

Tab. 3. Formy strukturalne lipidów preferowane w zależności od kształtu tych cząsteczek.

Kształt cząsteczki lipidu	Preferowana struktura
 Odwrócony stożek	 Micela
 Cylinder lub ścięty stożek	 Płaska dwuwarstwa lub liposom
 Stożek	 Struktura heksagonalna

Głównymi siłami stabilizującymi struktury polimorficzne tworzone przez lipidy w środowisku wodnym są oddziaływania hydrofobowe. Środowisko wodne wymusza taką orientację cząsteczek lipidów, aby kontakt ich łańcuchów hydrofobowych z wodą był jak najmniejszy. Drugim czynnikiem stabilizującym agregaty lipidowe są słabe siły van der Waalsa. Występują one między sąsiadującymi ze sobą łańcuchami węglowodorowymi. Natomiast między grupami hydrofilowymi niektórych lipidów (np. fosfatydyloetanolamina) mogą występować również wiązania wodorowe. W obszarze hydrofilowym, stanowiącym w przypadku fosfatydylocholina (lecytyny) zbiór dipoli, występują oddziaływania elektryczne, które powodują, usztywnienie struktury lipidowej w tym obszarze.

2.1 Liposomy, BLM

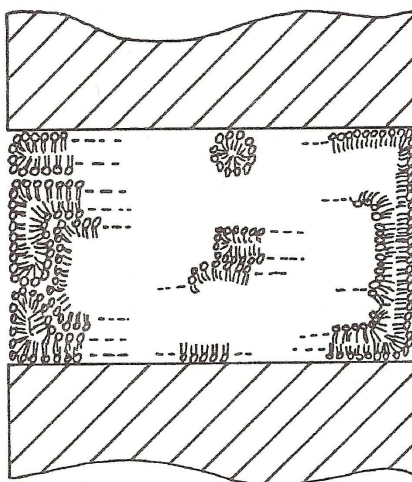
Lipidy polarne, których cząsteczki mają kształt walca lub ściętego stożka, wykazują tendencje do formowania w roztworach wodnych, liotropowych struktur lamelarnych – dwuwarstw w formie pęcherzyków zamykających w swoim wnętrzu kroplę roztworu. Tworzą one struktury o geometrii sferycznej, noszące nazwę liposomów. W roztworze wodnym mogą formować się liposomy jednowarstwowe, utworzone z jednej

dwuwarstwy lipidów, jak również liposomy wielowarstwowe (wiele dwuwarstw), w których poszczególne dwuwarstwy lipidowe rozdzielone są wodą [4]. Liposomy takie można otrzymać w stosunkowo prosty sposób, np. przez ręczne wytrząsanie lipidów w wodzie. Otrzymane w ten sposób liposomy charakteryzują się dużą niejednorodnością rozmiarów od $0,5 \mu\text{m}$ do $20 \mu\text{m}$, oraz skłonnością do agregacji. Do uzyskania jednorodnej i stabilnej dyspersji liposomów stosuje się między innymi ultradźwięki (sonikacja). Rozbijanie liposomów wielowarstwowych ultradźwiękami nie narusza ich struktury dwumolekularnej, natomiast zmniejsza rozmiary liposomów i może doprowadzić do powstania dyspersji liposomów jednowarstwowych (złożonych z jednej dwuwarstwy). Należy zwrócić uwagę, iż podczas sonikacji wzrasta temperatura próbki, co w konsekwencji może prowadzić do chemicznej degradacji i utleniania nienasyconych wiązań łańcuchów węglowodorowych w lipidach.

Liposomy jednowarstwowe są doskonałym układem modelowym do badań dynamiki i struktury dwuwarstwy lipidowej, stanowiącej rdzeń błon komórkowych. W badaniach tych stosuje się wiele technik pomiarowych, np. spektrofotometrię, fluorymetrię, EPR czy NMR.

2.2 Filtry impregnowane lipidami

Oprócz wymienionych w poprzednim rozdziale modeli, w badaniach właściwości fizykochemicznych błon biologicznych stosowane są filtry impregnowane lipidami.



Rys. 15. Widok pora impregnowanego lipidami.

W porach filtrów mogą tworzyć się struktury lipidowe, wykazujące cechy charakterystyczne dla błon dwuwarstwy lipidowej błon naturalnych (Rys. 15).

Filtry impregnuje się lipidami rozpuszczonymi w lotnych rozpuszczalnikach, które następnie są odparowane. Inny sposób polega na impregnowaniu filtrów kwasami tłuszczowymi.

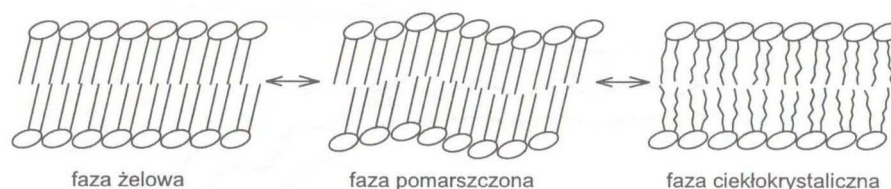
3 Właściwości fizykochemiczne błon lipidowych

Błony lipidowe są tworami o kilku szczególnych cechach, wynikających z właściwości fizykochemicznych lipidów. Jest to amfifilowość i przestrzennie walcowy kształt większości cząsteczek lipidowych, które powodują, iż uprzywilejowaną strukturą tworzoną przez lipidy w środowisku wodnym jest struktura lamelarna (najczęściej dwuwarstwa lipidowa). Budowa warstwowa tych błon jest czynnikiem decydującym o anizotropowym charakterze właściwości fizyczne błon lipidowych. W związku z tym, obserwujemy np. ścisłą orientację białek w błonach komórkowych. Cechą charakterystyczną błon lipidowych jest również ich niewielka grubość równa w przybliżeniu podwójnej długości cząsteczki lipidu (od 4 do 10 nm). Błony lipidowe cechuje także płynność, dzięki czemu mają one zdolność do samoregeneracji uszkodzeń i wykazują zadziwiającą trwałość [6]. Próba uszkodzenia takiej błony przypomina próbę przedziurawienia lustra wody – po wyjęciu z niej przedmiotu błona natychmiast się zasklepia. Błony lipidowe charakteryzuje też selektywna przepuszczalność odnosząca się szczególnie do jonów i cząsteczek polarnych. Taka selektywna bariera jest źródłem potencjału błonowego (napięcia transbłonowego), bardzo ważnego dla procesów transportu czy przenoszenia sygnałów. W przypadku błon komórkowych obserwuje się asymetrię składu lipidowego w poszczególnych monowarstwach tworzących dwuwarstwę. Stopień asymetrii zależy od rodzaju błony i komórki. Zewnętrzne monowarstwy błon zawierają przede wszystkim lipidy cholinowe (zawierające grupę cholinową), natomiast wewnętrzne, lipidy aminowe (np. w erytrocytach) [7].

3.1 Dynamiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej

Jedną z charakterystycznych cech lipidów błonowych jest ich wysoka zdolność do agregacji (m.in. do tworzenia dwuwarstw) w roztworach wodnych. Stężenie lipidów w roztworze wodnym, przy którym tworzą one agregaty nazywane jest krytycznym stężeniem micelarnym. Wartość tego stężenia dla lecytyny DPPC jest o sześć rzędów wielkości większa od krytycznego stężenia detergentów. Na podstawie wartości tego stężenia można określić energię swobodną agregacji badanego lipidu, która jest sumą oddziaływań warunkujących stabilność struktury agregatu. Są to przede wszystkim: oddziaływania hydrofobowe w układzie lipid – woda; oddziaływania van der Waalsa (występujące między lipidami), oddziaływania elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe.

Dwuwarstwa lipidowa jest strukturą dynamiczną, w której każda cząsteczka lipidu, wchodząca w skład błony, ma wiele możliwości ruchu [6]. Poniżej charakterystycznej dla każdego lipidu temperatury głównego przejścia fazowego, długie łańcuchy kwasów tłuszczowych przyjmują konfigurację o najniższej energii (Rys. 14). W przypadku kwasów tłuszczowych nienasyconych jest to konfiguracja z wiązaniem podwójnym typu trans. W konfiguracji tej łańcuchy kwasów tłuszczowych są do siebie równoległe i nachylone pod niewielkim kątem do powierzchni błony. Osiągają przy tym maksymalną długość i są praktycznie nieruchome. Poniżej temperatury głównego przejścia fazowego (Rys. 16) dwuwarstwa wykonana z lecytyny znajduje się w fazie żelu lub tzw. fazie pomarszczonej [16, 17]. Przejście z fazy żelu do fazy pomarszczonej nazywane jest przedprzejściem fazowym. Po przekroczeniu temperatury głównego przejścia fazowego dwuwarstwa przechodzi w fazę płynną, tzw. fazę ciekłego kryształu. Możliwe stają się wtedy ruchy rotacyjne łańcuchów wokół każdego z wiązań C-C (ruchy segmentalne).



Rys. 16. Przejścia fazowe w lipidach błonowych.

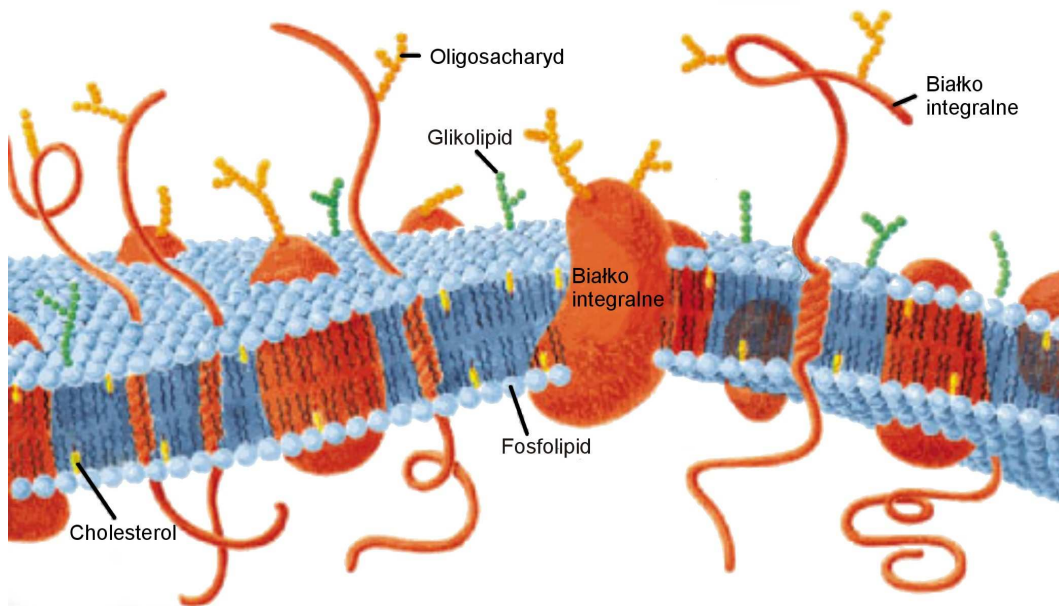
Cząsteczki lipidów mogą ponadto dyfundować zarówno w płaszczyźnie błony (dyfuzja lateralna) jak i między monowarstwami (flip-flop). W procesie dyfuzji lateralnej, częstotliwość wymiany cząsteczek jest duża i może osiągnąć wartość 10^7 s^{-1} , natomiast dyfuzja między monowarstwami zachodzi znacznie rzadziej a jej częstotliwość wynosi 10^{-4} s^{-1} .

Zdolność cząsteczek tworzących błony do wykonywania ruchów oscylacyjnych, rotacyjnych i translacyjnych, prowadząca do samoregeneracji, czyli samoczynnego zasklepienia uszkodzeń błony, rozumiana jest jako płynność błony. Jest to wypadkowa stanu dynamicznego wszystkich tworzących błonę składników. Płynność błon lipidowych jest bardzo ważną cechą warunkującą zmiany morfologii błony, pod wpływem zarówno czynników zewnętrznych jak i wewnętrznych (wynikających ze składu błon). Do czynników zewnętrznych można zaliczyć temperaturę, ciśnienie, pH. Zwiększenie temperatury prowadzi do zwiększenia ruchliwości składników błony a więc do wzrostu płynności błon. Wzrost ciśnienia natomiast zmniejsza przestrzeń zajmowaną przez cząsteczki lipidów, a to wymusza zwiększone uporządkowanie łańcuchów kwasów tłuszczowych i powoduje spadek płynności błony. Zmiana pH może zmieniać ładunek części hydrofilowej lipidów a co za tym idzie wpływać na charakter ich wzajemnych oddziaływań [18]. Zmiana ta prowadzi do zmiany stopnia upakowania części hydrofobowej błony i może powodować wzrost lub obniżenie jej płynności. W przypadku, gdy w otoczeniu błony znajdują się wielowartościowe kationy, np. Ca^{2+} , mogą one oddziaływać z ujemnie naładowanymi „główkami” lipidów niwelując ich wzajemne odpychanie zmniejszając tym samym płynność błony na skutek ściślejzego upakowania.

Obecność wielowartościowych jonów np. wapnia czy aluminium w wodnym roztworze otaczającym błony lipidowe, znacznie zmniejsza ich płynność. Podobny efekt wywołuje wprowadzenie cholesterolu do struktury błony lipidowej. Sztywna struktura pierścieni cholesterolu ogranicza ruchy sąsiednich cząsteczek lipidów, co wpływa na zmniejszenie płynności błony. W fazie żelowej działanie cholesterolu ma skutek przeciwny i powoduje upłynnianie jej struktury.

3.2 Organizacja strukturalna błon

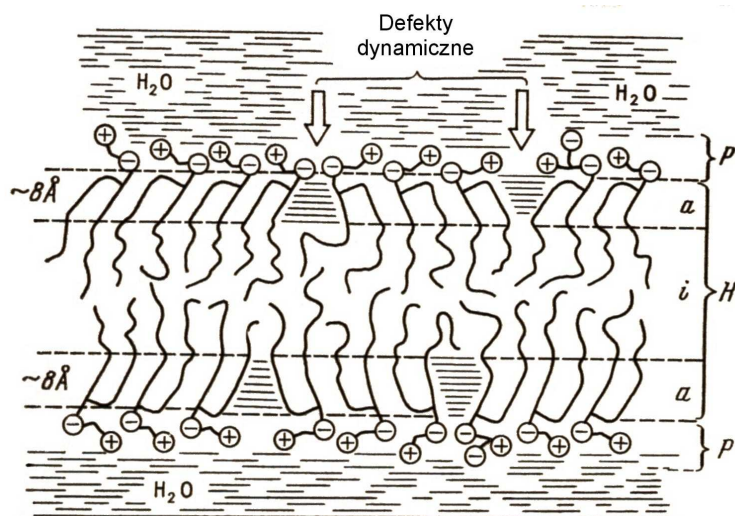
Termin „błona komórkowa” został wprowadzony przez Carla Nageliego już w 1855 roku. W 1897 roku Charles Overton stwierdził, że cząsteczki polarne znacznie wolniej przenikają do wnętrza komórki aniżeli cząsteczki niepolarne i na tej podstawie wysnuł on wniosek, że błona komórkowa zbudowana jest z lipidów. W roku 1925 Gorter i Grendel wyrazili pogląd, że błona składa się z dwuwarstwy lipidowej. W roku 1935 powstał model Davsona – Daniello – Robertsona [6], według którego błona składa się z podwójnej warstwy lipidowej pokrytej dwiema warstwami globularnych białek peryferyjnych (powierzchniowych).



Rys. 17. Model płynno – mozaikowy, Singera – Nicolsona.

W modelu Davsona – Daniello – Robertsona zakładano, iż błona tworzy szczelną strukturę. Rozwój nowych technik badawczych w tym okresie doprowadził do powstania w połowie lat sześćdziesiątych modelu mozaikowego Singera i Wallacha. W modelu tym zakładano, że białka znajdują się nie tylko na powierzchni rdzenia lipidowego błony, ale również przechodzą w poprzek niego (białka integralne). Rozwinięciem tego modelu był model płynno – mozaikowy autorstwa Singera – Nicolsona z 1972r., w którym przypominające „góry lodowe” białka dryfują w „morzu” dwuwarstwy lipidowej [19] (Rys. 17).

Na uwagę zasługuje, zaprezentowany w książce autorstwa Iwkova i Bieriestowskijego [20] model, który eksponuje oddziaływania elektrostatyczne w warstwie powierzchniowej błon lipidowych (Rys. 18).



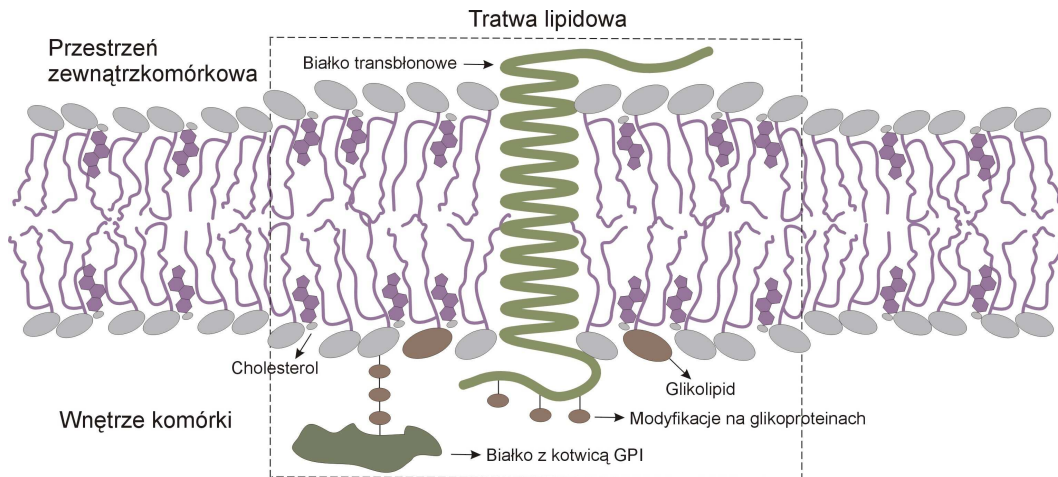
Rys. 18. Elektryczne właściwości warstwy powierzchniowej błony lipidowej, gdzie: H – obszar hydrofobowy łańcuchów węglowodorowych; P – obszar hydrofilowy grup polarnych; a – obszar anizotropowy łańcuchów alkilowych; i – obszar izotropowy łańcuchów alkilowych [20].

W modelu tym wyróżnia się grupy lipidów tworzących klastery, składające się z domen ferroelektrycznych tworzących hydrofilową (polarną) część błony oraz defektów dynamicznych pomiędzy nimi. Model ten dzieli obszar łańcuchów hydrofobowych na dwa obszary anizotropowe (uporządkowane) i izotropowe (nieuporządkowane). Defekty dynamiczne występują tylko w warstwach hydrofilowej i anizotropowej obszaru hydrofobowego. Ze wzrostem długości łańcuchów węglowodorowych wzrasta grubość obszaru izotropowego błony, co wpływa na poprawę stabilności dwuwarstwy oraz zmniejszenie przepuszczalności cząsteczek polarnych. Charakter domenowy powierzchni dwuwarstwy lipidowej uzasadniają wyniki symulacji komputerowych, prowadzonych metodą deterministyczną i metodą Monte Carlo [21 - 23].

Rozwinięciem modelu błony Singera – Nicolsona jest model tratw lipidowych (ang. *lipid rafts*) (Rys. 19) z 1988 roku, zaproponowany przez Simonsa i van Meera [24 - 27].

Koncepcja tratw lipidowych, czyli wydzielonych mikrodomen w błonie, pochodzi z obserwacji nad niemieszalnością płynnej fazy uporządkowanej i nieuporządkowanej lipidów błonowych. Tratwy lipidowe odbiegają składem od pozostałej części błony i są bogate w cholesterol, glikolipidy i sfingolipidy. Wpływa to na zróżnicowanie stopienia

upakowania cząsteczek, płynności oraz temperatury głównego przejścia fazowego tratwy lipidowej w stosunku do pozostałej części błony. Na temperatury przejścia fazowego tratw duży wpływ mają dłuższe łańcuchy węglowodorowe lipidów wchodzących w ich skład. Cechą tratw jest ich duża odporność na detergenty niejonowe, spowodowana mniejszą płynnością tych obszarów w stosunku do pozostałych fragmentów błony.



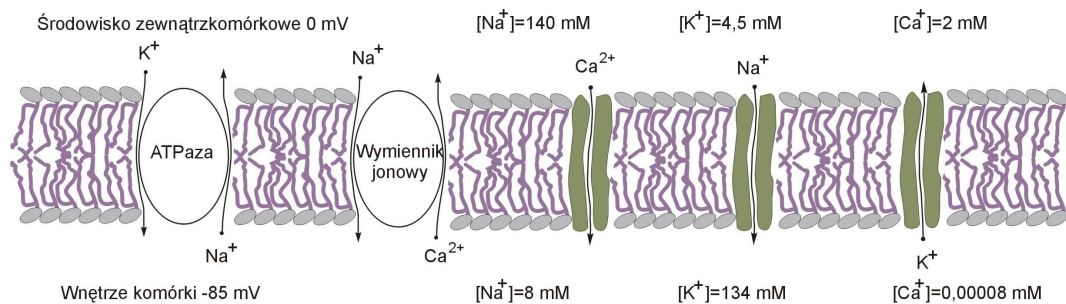
Rys. 19. Schemat organizacji tratwy lipidowej w błonie.

3.3 Dyfuzja substancji przez błony

Błony komórkowe, zarówno zewnętrzne jak i błony organeli wewnątrzkomórkowych, oddzielają środowisko zewnętrzne od wewnętrznego zapewniając tym samym stałe i odpowiednie warunki dla poprawnego przebiegu zachodzących w nich procesów życiowych. Dlatego też poszczególne organele mogą między innymi zachować stałe i właściwe im np. pH lub odpowiednie stężenia różnych jonów. Dzięki właściwościom hydrofobowym dwuwarstwy lipidowej jest ona niemal nieprzepuszczalną barierą dla substancji polarnych. Jednak komórka nie może być całkowicie odizolowana od środowiska zewnętrznego. W rzeczywistości, poprzez błonę zachodzi transport substancji obojętnej elektrycznie i jonów zarówno do wewnątrz jak i na zewnątrz komórki, mimo iż dyfuzja większości substancji przez błonę jest bardzo ograniczona. Dzieje się tak między innymi dzięki białkowym strukturom błon pośredniczącym w transporcie. W zależności od mechanizmu działania struktury te

można podzielić na enzymy transportujące, wymienniki jonowe oraz kanały jonowe [7, 28].

Enzymy transportujące są to białka o charakterze nośnika, które wiążą się z transportowaną substancją a następnie dyfundują przez błonę i uwalniają przenoszony związek po przeciwnej stronie błony. Enzymami transportującymi jony są między innymi adenozynotrójfosfatazy (ATPazy), czerpiące energię z hydrolizy wiązań fosforanowych adenozynotrójfosforanu (ATP) – głównego komórkowego magazynu i nośnika energii uzyskanego z metabolizmu glukozy lub kwasów tłuszczowych. Energia uzyskana z ATP jest wykorzystana przez enzym do transportu jonów, nawet wbrew gradientowi stężeń. Do najważniejszych enzymów transportujących jony należy ATPaza sodowo – potasowa (Rys. 20).



Rys. 20. Transport substancji przez błonę przy udziale struktur białkowych: od lewej ATPazy, wymiennika jonowego (sodowego) i kanałów jonowych (Ca^{2+} , Na^+ , K^+).

ATPaza ta transportuje jony sodu Na^+ odkomórkowo a jony potasu K^+ dokomórkowo. Dzięki temu stężenie jonów Na^+ w środowisku zewnątrzkomórkowym jest większe aniżeli wewnątrz komórki, natomiast w przypadku jonów K^+ odwrotnie. Gradienty stężeń jonów sodu i potasu odgrywają bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu komórki. Energia potencjalna gradientu Na^+ może być wykorzystana między innymi do transportu innych jonów przez nieenzymatyczne wymienniki jonowe (układy białkowe). Gradient K^+ powoduje z kolei powstawanie ujemnego potencjału elektrycznego wewnątrz komórki.

Kanały jonowe są strukturami białkowymi kontrolującymi przepływ jonów przez błonę zgodnie z gradientami stężeń wytwarzanymi przez enzymy transportujące i wymienniki jonowe. Ściany kanałów jonowych zbudowane są z łańcuchów polipeptydowych o takim składzie aminokwasowym i ułożeniu przestrzennym, który

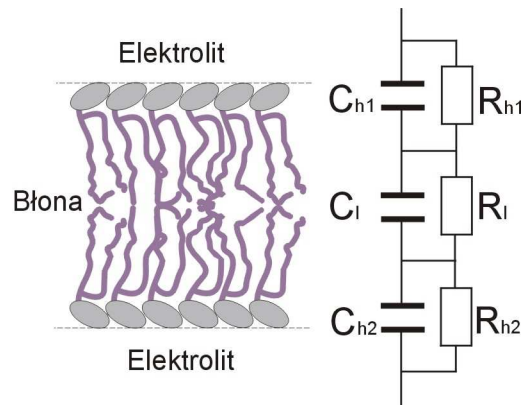
zapewnia wybiórczość kanału dla danego, jednego typu jonu. Najważniejszymi kanałami jonowymi w błonach są kanały potasowe. Kanały te są otwarte w stanie spoczynku komórki, co zapewnia dużą bierną przepuszczalność błony dla tych jonów. Kationy te, zgodnie z gradientem stężeń dążą do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, przy czym ewentualny ich ruch do obszaru zewnątrzkomórkowego nie może być kompensowany przepływem innych jonów przez błonę. W ten sposób napędzane siłami dyfuzji kationy K^+ powodują powstanie różnicy potencjałów elektrycznych z ujemnym potencjałem wnętrza komórki. Ujemny potencjał wnętrza przyciąga jony dodatnie K^+ równoważąc siłę dyfuzji. Pomiędzy siłami dyfuzji i przyciągania elektrycznego ustala się równowaga dynamiczna. Oznacza to, że w jednostce czasu, tyle samo kationów potasu dyfunduje z komórki na zewnątrz ile z nich powraca do wnętrza dzięki siłom elektrostatycznym.

4 Właściwości elektryczne błon lipidowych

4.1 Rezystancja i pojemność błonowa

Właściwości elektryczne błon lipidowych mogą być opisywane przez takie parametry jak rezystancję czy pojemność. Błony lipidowe nie zawierające substancji modyfikujących są dobrymi izolatorami elektrycznymi, o rezystancjach z przedziału wartości $10^8 - 10^{10} \Omega/cm^2$ [29]. Substancje modyfikujące skład chemiczny błon mogą w znacznym stopniu zmieniać ich rezystancję. Obecność w roztworze jonów o właściwościach hydrofobowych może w dużym stopniu zmniejszać rezystancję błon [30]. Podobny efekt można uzyskać przez wprowadzenie do struktury błony białek ułatwiających przenikanie jonów (Rys. 20).

Dwuwarstwa lipidowa błony, tworzy kondensator, w którym błona jest dielektrykiem a otaczające ją elektrolity są jego okładkami.



Rys. 21. Dwuwarstwa lipidowa przedstawiona jako trzy szeregowo połączone kondensatory oraz model elektryczny dwuwarstwy; C_l – pojemność warstwy lipofilowej, C_{h1} i C_{h2} – pojemność warstw hydrofilowych, R_l – rezystancja warstwy lipofilowej, R_{h1} i R_{h2} – rezystancja warstw hydrofilowych.

Błona nie jest strukturą jednorodną, lecz składa się ona z dwóch warstwy hydrofilowych i jednej hydrofobowej. Z tego względu dwuwarstwy lipidowe traktuje się w badaniach jako jeden, trzy (Rys. 21) a nawet pięć połączonych szeregowo kondensatorów [31, 32].

Do opisu pojemności błon, ze względu na niejednorodność, stosuje się pojęcie pojemności specyficznej C_B , oznaczającej pojemność przypadającą na jednostkę powierzchni błony. Pojemność ta jest równa $C_B = C/S = \epsilon_0 \epsilon / d$, gdzie d – efektywna grubość błony, S – powierzchnia błony, C – całkowita pojemność błony, ϵ_0 – bezwzględna przenikalność dielektryczna próżni, ϵ – efektywna względna przenikalność elektryczna błony. Przy rozważaniach właściwości elektrycznych należy uwzględnić rezystancję poszczególnych warstw (Rys. 21).

Rezystancja oraz pojemność błon może być określona na podstawie pomiaru impedancji. Metoda ta polega na pomiarze natężenia prądu płynącego przez błonę przy różnych jego częstotliwościach i ustalonym napięciu elektrycznym.

Pomiary impedancji błon wykazały, iż pojemność warstw hydrofilowych jest kilkadziesiąt razy większa niż lipofilowej, oraz że rezystancja tych warstw jest o kilka rzędów wielkości mniejsza od rezystancji warstwy lipofilowej [8].

4.2 Potencjały elektryczne błon

4.2.1 Potencjał powierzchniowy

Od 10% do 20% lipidów zawartych w błonach biologicznych występuje w postaci zjonizowanej jako jony ujemne. Z tego względu większość błon lipidowych ma ujemny ładunek powierzchniowy. Również inne składniki błon, takie jak białka, mają wpływ na ładunek powierzchniowy błon. Ładunek ten jest częściowo neutralizowany przez niezwiązane z błoną kationy pochodzące z otoczenia błony. Ujemnie naładowana powierzchnia błon jest podatna na adsorpcję kationów obecnych w otaczającym ją środowisku [8].

Ze względu na duże powinowactwo z błoną, jony te cechuje ułatwione wnikanie do jej wnętrza. Prowadzi to do podziału jonów pomiędzy fazą wodną i błoną oraz powoduje powstawanie różnicy potencjałów elektrycznych (napięcia) pomiędzy wnętrzem błony i roztworem wodnym. Wartość tego napięcia zależy od rodzaju jonów oraz od składu lipidowego błony.

Rozkład potencjału w warstwie hydrofilowej błony jest uzależniony od kąta nachylenia osi symetrii grup polarnych lipidów do jej powierzchni. Zmiana kąta nachylenia powoduje zmianę grubości błony oraz zmianę rozkładu ładunków elektrycznych [33]. Na wartość kąta nachylenia wpływają między innymi siła jonowa i temperatura [8].

Potencjał powierzchniowy poszczególnych monowarstw tworzących błonę jest zróżnicowany ze względu na asymetrię ich składu lipidowego. Błony erytrocytów ludzkich dla przykładu, w zewnętrznej monowarstwie zawierają głównie lipidy obojętne, natomiast w warstwie wewnętrznej, anionową fosfatydyloserynę.

Potencjały powierzchniowe wpływają na potencjał wnętrza błony, co powoduje, że potencjał transbłonowy nie musi być prostą sumą potencjałów powierzchniowych.

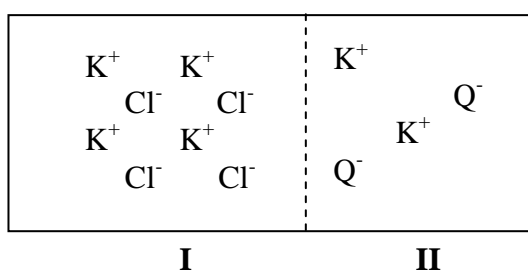
4.2.2 Potencjał dipolowy

Badania transportu jonów przez błony wykazały istnienie dodatniego potencjału wewnątrz błony (mierzonego względem otoczenia) o wartościach nawet kilkuset miliwoltów. Potencjał ten został nazwany potencjałem dipolowym [34]. Potencjał ten powstaje nawet wtedy, gdy błony składają się z obojętnych lipidów. Na potencjał

dipolowy wpływa orientacja cząsteczek wody przylegających do błony, orientacja grup polarnych lipidów oraz obecność w błonie wiązań estrowych pomiędzy szkieletem glicerolu i łańcuchami węglowodorowymi [35]. Bezpośredni pomiar tego potencjału jest niemożliwy. Mierzony jest on pośrednio – za pomocą lipofilowych anionów i kationów o podobnej budowie, np. aniony tetrafenyloboranowe i kationy tetrafenylofosfoniowe. Jony tego typu, ze względu na duże powinowactwo z rdzeniem lipidowym błon biologicznych, są zdolne do dyfuzji przez błony znacznie łatwiej aniżeli jony o małych rozmiarach czy cząsteczki zawierające wiele grup polarnych. Okazuje się również, iż współczynniki przepuszczalności przez błony lipidowe obu tych lipofilowych jonów są różne. Dla przykładu współczynnik przepuszczalności błon uformowanych z fosfatydylocholiny, jest o 5 rzędów wielkości większy dla anionu niż dla kationu tego samego typu [36]. Jest to spowodowane istnieniem dodatniego potencjału dipolowego błony. Zmiana współczynnika przepuszczalności błony dla danego typu jonów lipofilowych ma swoje odbicie w zmianie przewodnictwa elektrycznego błony. Na podstawie pomiaru zmian przewodnictwa elektrycznego błon, dla lipofilowych anionów i kationów, można określić potencjał dipolowy [37].

4.2.3 Potencjał Donnana i potencjał dyfuzyjny

Równowaga Donnana powstaje wtedy, gdy dwa roztwory elektrolitów są rozdzielone błoną nieprzepuszczalną dla pewnych jonów (np. bardzo dużych) a przepuszczalną dla pozostałych jonów i dla wody (Rys. 20).



Rys. 22. Roztwory elektrolitów przedzielone są błoną nieprzepuszczalną dla jonów Q^- .

Rozważmy układ zawierający dwa przedziały (Rys. 22). W przedziale I, w chwili początkowej znajduje się wodny roztwór KCl, a w przedziale II roztwór soli KQ. Związki te dysocjują do postaci K^+ i Cl^- oraz K^+ i Q^- . Z przedziału I do II zaczną

przenikać jony Cl^- a za nimi K^+ (zmierzają one do wyrównania stężeń przy równoczesnym zachowaniu zasady elektroobojętności). Przepływ ten prowadzi do wyrównania potencjałów elektrochemicznych jonów w obydwu przedziałach. W stanie równowagi stężenie jonów Cl^- w przedziale I (X'_{Cl}) będzie większe aniżeli w przedziale II (X''_{Cl}),

$$X'_{\text{Cl}} > X''_{\text{Cl}} \quad (1)$$

gdzie X – stężenie jonów wyrażone w postaci ułamka molowego.

W stanie równowagi iloczyn stężenia jonów Cl^- i K^+ w przedziale II jest równy iloczynowi stężenia tychże jonów w przedziale I,

$$X''_{\text{Cl}} \cdot X''_{\text{K}} = X'_{\text{Cl}} \cdot X'_{\text{K}} \quad (2)$$

Zgodnie z warunkiem elektroneutralności, ładunki dodatnie i ujemne w każdym z przedziałów oddzielnie muszą się kompensować. Wobec tego, można zapisać :

$$X'_{\text{Cl}} = X'_{\text{K}}, \quad (3)$$

$$X''_{\text{Q}} + X''_{\text{Cl}} = X''_{\text{K}} \quad (4)$$

Rozwiązując układ trzech ostatnich równań otrzymuje się :

$$(X'_{\text{Cl}})^2 = (X''_{\text{Cl}})^2 + X''_{\text{Cl}} \cdot X''_{\text{Q}}, \quad (5)$$

$$(X'_{\text{K}})^2 = (X''_{\text{K}})^2 - X''_{\text{K}} \cdot X''_{\text{Q}} \quad (6)$$

Z równań (5) i (6) wynika, iż w stanie równowagi Donnana, stężenie jonów K i Cl w przedziałach I i II są różne ze względu na obecność nieprzenikliwego jonu Q.

$$\text{Dla } Q = 0 \Rightarrow X'_{\text{Cl}} = X''_{\text{Cl}} \text{ i } X'_{\text{K}} = X''_{\text{K}}$$

W stanie równowagi Donnana przez błonę przestają przenikać zarówno jony jak i woda. W procesie ustalania się tej równowagi wytwarza się różnica ciśnień hydrostatycznych hamująca przepływ wody. Różnica ta, równa ciśnieniu osmotycznemu, nazywana jest w tym przypadku ciśnieniem koloidoosmotycznym.

W stanie równowagi Donnana, pomiędzy przedziałami I i II, powstaje różnica potencjałów elektrycznych $\Delta\phi$ zwana napięciem lub potencjałem Donnana [38]. Potencjał ten opisuje równanie:

$$\Delta\phi = \phi' - \phi'' = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a'}{a''} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{f' X'}{f'' X''} \quad (7)$$

gdzie:

ϕ' – potencjał ośrodka I; ϕ'' – potencjał ośrodka II; R – stała gazowa; T – temperatura bezwzględna; z – wartościowość jonów; F – stała Faradaya; a' , a'' – aktywności jonów ośrodków I i II; f' , f'' – współczynniki aktywności jonów; X' , X'' – stężenia molowe jonów ośrodków I i II.

W przypadku małych stężeń (poniżej 0,01 M elektrolitu w roztworze) współczynniki aktywności przyjmują wartość 1 i aktywności w równaniu (7) można zastąpić ułamkami molowymi (X).

W przypadku, gdy układ pomiarowy znajduje się w temperaturze pokojowej (ok. 25°C), równanie (7) ma postać:

$$\Delta\phi = \frac{0,059}{z} \log \frac{a_1}{a_2} \quad (8)$$

Z ostatniego równania wynika, że przy każdej dziesiękrotnej różnicy aktywności jonów jednowartościowych, potencjał Donnana zmienia się o 59 mV.

W przypadku gdy błona jest przepuszczalna dla co najmniej dwóch jonów znajdujących się w elektrolitach otaczających błonę, oraz jony dyfundujące przez błonę różnią się współczynnikiem dyfuzji, pomiędzy elektrolitami może powstać różnica potencjałów dyfuzyjnych [38]. Jednym z przykładów układu, w którym generowany jest potencjał dyfuzyjny jest układ zawierający po obu stronach błony roztwory tego samego elektrolitu, lecz o różnych jego stężeniach. Kationy i aniony dyfundują z roztworu o większym stężeniu do roztworu o mniejszym stężeniu, przy czym jony o większym współczynnikiem dyfuzji będą dyfundować z większą prędkością. Rezultatem tego jest nierównomierny, zmieniający się w czasie rozkład ujemnego i dodatniego ładunku, który prowadzi do pojawienia się rosnącej w czasie różnicy potencjałów pomiędzy roztworami. Różnica potencjałów powoduje z kolei zmniejszenie szybkości strumieni dyfundujących jonów. Różnica potencjałów ustala się w chwili, gdy

szybkości dyfundujących jonów się wyrównują. Wartość tej różnicy potencjałów, nazywanej potencjałem dyfuzyjnym można obliczyć korzystając z równania:

$$\Delta\phi_D = -\frac{RT}{F} \frac{\sum_i z_i v_i (c_{i1} - c_{i2})}{\sum_i z_i^2 v_i (c_{i1} - c_{i2})} \ln \frac{\sum_i z_i^2 v_i c_{i1}}{\sum_i z_i^2 v_i c_{i2}} \quad (9)$$

gdzie: z_i – ładunek jonu; v_i – ruchliwość jonu; c_{i1}, c_{i2} – stężenia elektrolitów, R – stała gazowa; T – temperatura bezwzględna; F – stała Faradaya.

4.2.4 Potencjał błonowy

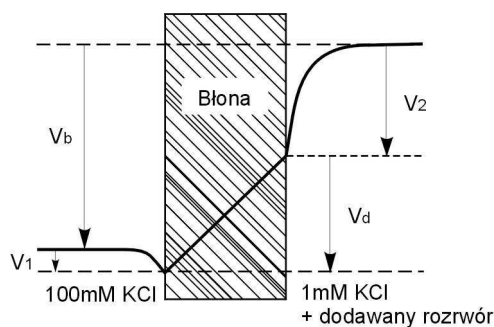
Pomiędzy wnętrzem komórek organizmów żywych, oddzielonym od środowiska zewnątrzkomórkowego przez błony plazmatyczne istnieje różnica potencjałów elektrycznych zwana potencjałem lub napięciem transbłonowym (błonowym). Potencjał ten w przypadku większości komórek (poza nerwowymi i mięśniowymi) ma wartość stałą i nosi nazwę potencjału spoczynkowego. Zdolność komórki do utrzymywania stałej wartości potencjału spoczynkowego związana jest z istnieniem stałej różnicy stężeń jonów Na^+ , K^+ oraz organicznych anionów X^- (np. ujemnie naładowanych białek i aminokwasów), pomiędzy wnętrzem i otoczeniem komórki. Rozkład stężeń tychże jonów jest prezentowany na Rys. 20. Na zewnątrz komórki stężenie jonów Na^+ i Ca^+ jest większe aniżeli wewnątrz komórki. Natomiast stężenie jonów K^+ i anionów organicznych X^- jest większe wewnątrz komórki. Stała wartość potencjału błonowego może być utrzymana wtedy, gdy całkowity ładunek przepływający przez błonę jest równy zero, a to oznacza, że suma prądów jonowych jest równa zero. Tak więc w stanie spoczynku, każdy z prądów jonowych może mieć stałą (różną od zera) wartość.

W zależności od rodzaju komórek wartość potencjału spoczynkowego może zmieniać się od 40 do 100 mV. Dla większości komórek nerwowych potencjał spoczynkowy wynosi ok. 70 mV, przy czym wewnątrz komórki jest naładowane ujemnie względem obszaru zewnątrzkomórkowego.

Bodźce elektryczne, chemiczne oraz mechaniczne mogą prowadzić do zaburzeń potencjału spoczynkowego, zwiększając przepuszczalność błony komórkowej dla wybranych jonów. Powstaje wtedy tzw. potencjał czynnościowy (np. impuls nerwowy). W przenoszeniu impulsów zasadniczą rolę odgrywają białkowe kanały jonowe o specyficznej przepuszczalności w stosunku do określonych jonów. Kanały te otwierają się w momencie, gdy następuje zmiana potencjału błony. W chwili, gdy napięcie na

blonie zbliża się do wartości progowej, kanały otwierają się i umożliwiają wędrówkę swoistej dla siebie grupy jonów.

Schemat zmian potencjału elektrycznego w otoczeniu błony modelowej przedstawia Rys. 23 [39].



Rys. 23. Schemat zmian napięcia elektrycznego w otoczeniu błony modelowej [39].

Autorzy pracy [39] zajmowali się badaniem i modelowaniem potencjału powierzchniowego oraz dyfuzyjnego błon modelowych. Uzyskali oni dużą zgodność przewidywanych teoretycznie zmian napięcia transbłonowego (w funkcji stężenia KCl, NaCl oraz chininy), z wynikami doświadczalnymi, otrzymanymi na błonach polimerowych zawierających lipidy. Zakładali oni, iż napięcie błonowe V_b jest kombinacją potencjałów powierzchniowych oraz potencjału dyfuzyjnego V_d , którą opisuje relacja $V_b = -V_{s2} - V_{s1} + V_d$.

Według innych autorów [8, 40], potencjał transbłonowy jest nie tylko sumą potencjałów powierzchniowych błony i potencjału dyfuzyjnego (ewentualnie potencjału Donnana). W rozważaniach teoretycznych należy według nich uwzględnić również istnienie potencjału dipolowego błony.

5 Wpływ związków metali na organizmy żywe i właściwości fizyczne błon

Wpływ związków metali na błony biologiczne i modelowe jest przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w zakresie fizyki, chemii i biologii. Związki te są bardzo interesujące ze względu na ich rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych (żelazo w hemoglobinie, magnez w chlorofilu, jony potasu, sodu,

czy wapnia w ustrojowych roztworach fizjologicznych) jak również jako substancje antropogeniczne o właściwościach toksycznych, odpowiedzialne za sporą liczbę patologicznych następstw ich obecności w żywych organizmach [41 - 45]. Do tej grupy należą związki metaloorganiczne (między innymi metaloorganiczne związki cyny i ołowiu). Toksyczność tych związków jest szeroko wykorzystywana przez człowieka. W zależności od indywidualnych szacunków różnych autorów, od dziesięciu do trzydziestu procent organicznych związków cyny produkowanych i wprowadzanych do środowiska naturalnego to biocydy, stosowane powszechnie w medycynie, rolnictwie, leśnictwie i przemyśle [46 - 51]. Występowanie metaloorganicznych związków ołowiu w środowisku naturalnym człowieka jest związane między innymi z długoletnim stosowaniem (od lat 30 do lat 80 XX wieku) tetraetylołowiu (czteroetylek ołowiu) jako dodatku przeciwstukowego w etylinie, poprawiającego właściwości benzyny jako paliwa. Spalanie benzyny zawierającej czteroetylek ołowiu powoduje emisję do atmosfery silnie toksycznych i rakotwórczych tlenków ołowiu, które razem z innymi ich pochodnymi są źródłem co najmniej 60 % zanieczyszczenia środowiska naturalnego metaloorganicznymi związkami ołowiu. Pozostała część zanieczyszczeń gromadzonych w otaczającym nas środowisku naturalnym występuje również w postaci produktów przemysłowych procesów technologicznych [52]. Ich koncentracja w środowisku naturalnym jest niewielka i nie przekracza stężenia rzędu wielkości mikromola [53, 54]. Przyjmuje się, iż toksyczność związków metaloorganicznych może dotyczyć dwóch aspektów ich działania. Jednym z nich jest wymiar molekularny, gdy skutki toksyczne występują przy bardzo małych stężeniach tych związków (rzędu wielkości 10^{-6} M a nawet 10^{-7} M) i dotyczą zaburzenia lub przerywania procesów metabolicznych obiektów plazmatycznych komórki. Drugi wymiar to wymiar komórkowy, gdy stężenia są zazwyczaj dużo większe (o około dwa rzędy wielkości), a ich działanie wpływa na fizykochemiczne i mechaniczne właściwości błon oraz ścian komórkowych [55 – 57]. Jednak czasami, przy podobnych wartościach koncentracji związków metaloorganicznych, obserwowano toksyczne skutki ich działania także na poziomie molekularnym [58]. Wydaje się, że odporność błon komórkowych na zaburzanie struktury i funkcji, wywołane obecnością związków metaloorganicznych, zależy między innymi od ich hydrofobowości [54, 59-61]. Zakłada się, że aktywność toksyczna związków metaloorganicznych cyny i ołowiu zależy od rodzaju i liczby przyłączonych do metalu części organicznych [62, 63] i jest znacznie większa od aktywności toksycznej ich form nieorganicznych [64, 65], która z kolei zależy od

stopnia rozpuszczalności tych związków w wodzie oraz od współczynnika dysocjacji [66].

Publikowane przez różnych autorów wyniki badań, związanych z występowaniem i oddziaływaniem związków metaloorganicznych w różnych ekosystemach, można najogólniej podzielić na badania wpływu tych związków na błony biologiczne, organizmy żywe, (populacje organizmów jednokomórkowych lub komórek organizmów wielokomórkowych) [61, 67-70] i lipidowe modele błon biologicznych [71 - 73]. Badania prowadzone nad modelami lipidowymi, ze względu na prostą budowę dają jedynie przybliżony obraz wpływu wybranego związku metaloorganicznego na właściwości błon biologicznych. Jednocześnie z tych samych powodów wyniki badań uzyskanych na błonach lipidowych pozwalają na jednoznaczną interpretację wyników, dzięki zawężeniu obszaru badań np. do jednego rodzaju lipidu, z którego zbudowana jest błona. Badania modelowe nie mogą jednak zastąpić badań prowadzonych na obiektach biologicznych.

Alkilowe metaloorganiczne związki cyny wykorzystywane są jako środki antyporostowe, szczególnie w przemyśle stoczniowym. Podczas procesu technologicznego przedostają się one do środowiska wodnego a następnie są akumulowane w łańcuchu pokarmowym różnych zwierząt morskich. Ich biokoncentracja obserwowana była w przypadku krabów, ostryg i łososi [41]. Według autorów pracy [41], w organizmach ssaków, związki z rodziny tributyllocyn mogą metabolizować do pochodnych dibutyllocyn i pokrewnych produktów przemiany materii. Zarówno dibutyllocyny jak i tributyllocyny powodowały uszkodzenie kanałów żółciowych u szczurów, myszy i chomików. Są one również potencjalnymi czynnikami powodującymi uszkodzenie tkanki grasicy i czynnikami immunotoksycznymi dla szczurów. Tlenek tributyllocyny o stężeniu 5 ppm w diecie szczurów wywoływał efekty immunotoksyczne po 2 lata karmienia, a przy stężeniu 50ppm zwiększał przypadki ich zapadania na nowotwory pochodzenia endokrynologicznego. Wyniki wstępne wskazują, iż stężenie 5 ppm tego związku nie powodowało wzrostu liczby przypadków nowotworowych, natomiast stężenie 0,5 ppm nie powodowało wzrostu efektów immunotoksycznych w badaniach długoterminowych [41].

W pracy [45], przy wykorzystaniu skaningowego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego, badano proces morfologicznego zapłodnienia komórek wybranego gatunku prostych zwierząt morskich (*Styela plicata*), poddanych działaniu chloreku tributyllocyny (TriBT). Obserwowano zmiany zarówno żeńskich jak i męskich komórek

płciowych. Zarówno sperma, otoczki jaj tych komórek jak i mitochondria z zewnętrznej warstwy cytoplazmy jaj ulegały modyfikacjom, które zależały głównie od czasu inkubacji tych komórek. Uszkodzenia mitochondriów obserwowano po 2 godzinach inkubacji komórek w roztworze zawierającym 10^{-5} M TriBT. Z pracy [74] wynika również, że TriBT zaburza aktywność mitochondriów. Wbudowywanie się bowiem tego związku do komponentów syntezy ATP, powoduje jej hamowanie. Zarówno stężenie 10^{-5} M jak i 10^{-7} M TriBT uniemożliwiało zapłonienie komórek *Styela plicata*, co było konsekwencją modyfikacji i uszkodzeń komórek obu płci tych zwierząt [45].

W pracy [75] badano hemolizę erytrocytów na podstawie absorpcji promieniowania o długości 540 nm [76]. W przypadku pomiaru efektywności hemolitycznej badanej rodziny związków fenylocyn, najbardziej efektywny był trichlorekfenylocyny (TPhT). Tetrufenylocyna (TTPhT) powodowała niewielkie uszkodzenia erytrocytów prowadzące do ich hemolizy. Uszkodzenia błon erytrocytów wywołane przez fenylocyny szły w parze z ich zdolnością do penetracji dwuwarstw lipidowych. TTPhT nie wykazuje dużego powinowactwa z frakcją lipidową błon, dlatego jego destrukcyjny wpływ był nieznaczny. Natomiast dichlorekdifenylocyny (DPhT) i TPhT dzielą się pomiędzy fazę wodną oraz fazę lipidową. Ta część fenylocyn, która przeniknęła do wnętrza fazy lipidowej nie jest na tyle liczna, aby mogła zmienić strukturę dwuwarstwy lipidowej w stopniu biologicznie istotnym. Działanie hemolityczne wydaje się zależeć od lokalizacji tych związków w błonie. TPhT, który był adsorbowany na powierzchni błon powodował wyższy poziom hemolizy, podczas gdy DPhT penetrujący głębsze obszary miał ograniczone działanie hemolityczne. Podobne wyniki badań toksyczności związków metaloorganicznych dotyczące ich aktywności hemolitycznej można również znaleźć w pracach [77 – 79].

Przedmiotem badań pracy [80] był wpływ DPhT i TPhT na kinetykę hemolizy erytrocytów. W badaniach stosowano technikę stopped-flow. Prezentowane wyniki wskazują na zróżnicowany wpływ badanych związków w zakresie tzw. stężeń nielitycznych (nie powodujących uszkodzeń błon erytrocytów), na właściwości mechaniczne erytrocytów. DPhT wykazywał ograniczony wpływ na hemolizę erytrocytów, podczas gdy TPhT wpływał na wszystkie mierzone parametry (stopień wstępnej i końcowej hemolizy oraz mechaniczną wytrzymałość błon). Wyniki te mogą oznaczać, że TPhT redukuje wytrzymałość mechaniczną błon erytrocytów i powoduje wzrost stopnia hemolizy erytrocytów pod wpływem naprężeń osmotycznych.

W pracy [40] metodą elektryczną badano wpływ tributyllocyny (TBT) na przewodnictwo elektryczne płaskich dwuwarstw lipidowych (BLM) formowanych z fosfatydyloetanolaminy (PE), oraz na przenikania nieorganicznych anionów przez BLMy. Badanie przenikania anionów przez BLMy prowadzono za pomocą radioaktywnego izotopu chloru ^{36}Cl . Błona rozdzielała dwa wodne roztwory KCl lub NaCl wypełniające komory pomiarową i odniesienia. Domieszki TBT oraz ^{36}Cl dodawane były głównie do komory pomiarowej. Z badań tych wynika, iż obecność TBT zarówno w roztworze jednej jak i obydwu komorach, powodowała wzrost strumienia jonów chloru od wartości $10^{-12}\text{mol/cm}^2\text{s}$ do wartości $10^{-8}\text{mol/cm}^2\text{s}$. Jednocześnie obecność TBT nie powodowała znaczących zmian przewodności elektrycznej, na podstawie której wykonywana była również kalkulacja strumienia chloru przez błonę. Niezgodność pomiędzy wartościami strumieni chloru przenikającego przez błonę wyznaczonymi przy zastosowaniu obu metod według autorów pozwala przypuszczać, iż Cl przechodził przez błonę w formie elektrycznie neutralnej, prawdopodobnie złożonej z kompleksu TBT-Cl. Interpretację taką potwierdzały pomiary strumienia chloru przy ustalonych napięciach elektrolitów pomiędzy komorami pomiarową i odniesienia o wartościach $\pm 60\text{mV}$. Napięcia te nie powodowały zmian strumienia chloru przez błonę. W przypadku, gdy wodny roztwór KCl w komorze odniesienia zastępowany był przez elektrolit soli o identycznym stężeniu, lecz zawierających jednowartościowe aniony nieorganiczne takich pierwiastków jak jod I, brom Br, fluor F oraz pochodzący z azotanu potasu (saletra potasowa) NO_3 , strumień chloru przez błonę malał w zależności od zastosowanych w elektrolicie anionów w następującej kolejności: $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F} > \text{NO}_3$. Zastąpienie KCl w komorze odniesienia solą KNO_3 powodowało znaczną redukcję strumienia Cl natomiast obecność KNO_3 w komorze pomiarowej (razem z KCl), nie powodowała zmiany wartości strumienia Cl przez błonę, która kształtowała się wokół takiej samej wartości jak w przypadku, gdy obie komory wypełnione było wodnym roztworem KCl. Zatem NO_3 najwyraźniej nie mógł zastąpić Cl w kompleksach TBT-Cl i tym samym zmienić przenikalności błony dla tych kompleksów. Zdaniem autorów pracy [40], redukcja strumienia chloru przez błonę spowodowana była nieobecnością partnera do wymiany Cl w komorze odniesienia, a to skutkowało pogorszeniem warunków dogodnych dla przenikania samego TBT przez błonę. Pomiar potencjału powierzchniowego wskazywał, iż TBT obniżał wewnętrzny dodatni potencjał dipolowy błony

preparowanej z PE o około 70 mV (przy 0,03 mM TBT) bez istotnych zmian innych parametrów błony.

W pracy [81] badano wpływ wybranej grupy alifatycznych, metaloorganicznych i nieorganicznych związków cyny i ołowiu, na płaskie dwuwarstwy lipidowe (BLM) jak i liposomy domieszkowane jonami prazeodymu (Pr^{3+}). Miarą oddziaływania badanych związków z dwuwarstwami lipidowymi była zmiana stabilności BLMów oraz stopień uwalniania prazeodymu z błon. Badania były prowadzone techniką $^1\text{H-NMR}$. Dodatkowo, dla ułatwienia interpretacji wyników przeprowadzonych z udziałem liposomów, do środowiska wodnego dyspersji liposomów podawane były detergenty kationowy i anionowy, które modyfikowały ich powierzchnie zmieniając potencjał powierzchniowy, dzięki czemu powierzchnie te stawały się mniej lub bardziej przepuszczalne dla badanych związków. Wyniki badań prowadzonych na liposomach wskazują na desorpcję Pr^{3+} z liposomów w obecności wszystkich badanych związków cyny i ołowiu, za wyjątkiem TriML (trimetylochlorołów) oraz nieorganicznego $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, w przypadku których, obserwowano sorpcję prazeodymu. Spośród badanych związków, silniej oddziaływały z błonami związki cyny niż ołowiu. Desorpcja prazeodymu malała w zależności od rodzaju substancji dodawanej do otoczenia liposomów, zaczynając od TriBT (tributylochlorocyna), TriPT (tripropylochlorocyna), TriET (trietylochlorocyna), a kończąc na TriMT (trimetylochlorocyna), co oznacza, że efekt ten był silniejszy dla związków o dłuższych łańcuchów węglowodorowych. Obecność detergentu kationowego w dyspersji liposomów powodowała obniżenie desorpcji jonów Pr^{3+} z liposomów, natomiast obecność detergentu anionowego zwiększenie procesu uwalniania Pr^{3+} . Wypychanie prazeodymu z liposomów, według autorów wiąże się przede wszystkim z dużą lipofilowością badanych metaloorganicznych związków cyny i ołowiu, które zachowują się jednocześnie jak dodatnie jony konkurujące ze związanymi jonami Pr^{3+} . Modyfikacje błon detergentami skutkowały zmianą ładunku powierzchniowego dwuwarstw i odgrywały istotną rolę w prowadzonych eksperymentach. Potwierdziły to badania ze związkami nieorganicznymi, które mimo że nie mają właściwości lipofilowych, w wyniku oddziaływań (wyłącznie elektrycznych) uwalniały jony Pr^{3+} . W pracy [59] sugeruje się, że przy fizjologicznym pH, rodzina triorganocyn (TriAT) występuje w fazie wodnej w postaci produktów hydrolizy Alk_3SnOH (Alk_3 – łańcuchy alkilowe) a przy pH 5 jako dwu-wodne formy $(\text{Alk}_3\text{Sn}(\text{H}_2\text{O})_2)^+$ [53]. Związki te mogą oddziaływać z grupami

fosforanowymi lipidów słabymi siłami kulombowskimi, i uwalniać jony Pr^{3+} z liposomów [82].

Takie same sekwencje efektywności oddziaływania pomiędzy związkami metaloorganicznymi cyny i błonami liposomów (uwalnianie praeodymu) obserwowano również w innych pracach, które były prowadzone na błonach biologicznych komórek [83-85] oraz na organizmach żywych [86]. Stwierdzono, iż właściwości powierzchniowej warstwy polarnej błon, zależą od efektywności adsorpcji na tej warstwie molekuł o właściwościach amfifilowych [87 - 92].

W przypadku badań prowadzonych na BLMach najaktywniej z błonami oddziaływał TriBL (tributylochloorołów). Związek z najkrótszymi łańcuchami alkilowymi rodziny TriAL czyli TriML, powodował uszkodzenie błon przy stężeniu krytycznym około 5 razy większym aniżeli TriBL. Wyniki te wskazują, iż związki organometaliczne ołowiu oddziałują z fazą lipidową błon biologicznych, co potwierdzają również autorzy innych prac [93, 94]. W rodzinie związków z cyną (TriAT), oprócz DiBT (dichlorekdibutylocyny) żaden ze związków nie powodował uszkodzenia błon BLMów.

Analizując wyniki pomiarów omawianych badań można przypuszczać, że mechanizm oddziaływania związków organometalicznych ołowiu z BLMami jest podobny do mechanizmu oddziaływania detergentów z tymi błonami. W pracach [84, 95] postuluje się, iż oddziaływanie detergentów z błonami jest kombinacją hydrofilowych, polarnych oddziaływań pomiędzy molekułami lipidów i molekułami substancji wchłoniętych do wnętrza błony. Dla detergentów o długich łańcuchach węglowodorowych dominujące okazały się siły hydrofobowe, natomiast w przypadku detergentów o krótkich łańcuchach właściwości elektryczne części polarnych.

Według autorów pracy [81] najważniejszymi czynnikami warunkującymi efektywność oddziaływania badanych związków metali z błonami lipidowymi były z jednej strony ich lipofilowość, efekty steryczne oraz polarność. Z drugiej natomiast znaczącą rolę przy wnikaniu związków cyny i ołowiu do wnętrza błony odgrywały potencjał powierzchniowy oraz fizyczne właściwości środowiska lipidowego badanych błon.

Inną grupą badanych związków metaloorganicznych były węglowodory aromatyczne, takie jak fenylocyny (tetrafenylocyna – TPhT, tripropylochloorocyna – TPhT, difenyłodichlorocyna – DPhT). Wyniki badań prowadzonych na tej grupie związków przedstawione zostały między innymi w pracach [75, 95] jak również innych

autorów [54, 96 - 98]. W badaniach liposomów formowanych z lecytyny jajecznej [75] oraz syntetycznej DPPC [99], stosowano technikę $^1\text{H-NMR}$ oraz metodę fluorescencji. Odpowiedni dobór sond fluorescencyjnych pozwalał na określenie względnych zmian ładunku powierzchniowego warstwy polarnej [100] jak również właściwości fizycznych hydrofobowego wnętrza [101] dwuwarstwy lipidowej. Obecność TPhT w dyspersji liposomów nie skutkowała znaczącymi zmianami mierzonych parametrów spektroskopowych z czego może wynikać, że TPhT w niewielkim stopniu wpływał na liposomy. Natomiast w przypadku DiPhT stwierdzono wyraźne zmiany parametrów spektroskopowych informujących o zmianach w organizacji rejonów hydrofobowych (początkowej części łańcuchów węglowodorowych) błon liposomów. DiPhT lokował się prawdopodobnie w hydrofobowych rejonach błony, podczas gdy TPhT był adsorbowany w rejonie głów polarnych dwuwarstwy lipidowej. Wnioski takie popierają wyniki prac [102 - 105].

Obecność cholesterolu w błonach redukowała adsorpcję difenylocyn (DPhT). Było to spowodowane jak można sądzić tym, iż obecny w błonie cholesterol obniżał ilość wolnej przestrzeni w błonie, przez co redukował zdolność do lokowania się badanych związków w rejonie łańcuchów węglowodorowych błony [106 - 114]. Cholesterol lokując się w tym rejonie modyfikował obszar, w którym zachodzi wiele procesów błonowych [62, 115 - 119]. Natomiast oddziaływanie TPhT z dwuwarstwą z fosfatydylocholiną, zawierającą dodatkowo cholesterol, było zdecydowanie mniej efektywne od oddziaływania DPhT [102]. Według autorów było to spowodowane głównie tym, iż TPhT adsorbowany był na powierzchni dwuwarstwy lipidowej.

Według autorów pracy [95] związki o strukturze podobnej do badanych fenylocyn bądź oddziałujące z błonami w sposób podobny do nich, mogą potencjalnie zakłócać liczne procesy błonowe, z którymi wiąże się dynamiczna zmiana morfologii warstwy powierzchniowej błon. W warunkach naturalnych zmiana morfologii warstwy powierzchniowej spowodowana może być np. przez przyłączenie białek, tymczasowo połączonych z błonami słabymi siłami hydrofobowymi lub elektrostatycznymi. TPhT może przeszkadzać w procesach sygnałowych komórki, np. wpływając na asocjację powierzchniowo aktywnych protein z błonami biologicznymi. [120 - 123].

Związki metaloorganiczne mogą dysocjować w wodzie, tworząc organiczne kationy zawierające np. cynę lub ołów oraz aniony np. chlor. Ze względu na to, że błona komórkowa ma ujemny ładunek powierzchniowy, kationy zawierające cynę lub ołów będą przyciągane przez powierzchnię błon. Zatem aby zmniejszyć efektywność

oddziaływania tego typu związków z błonami komórek żywych organizmów wystarczy błony zmodyfikować, wprowadzając do ich objętości bądź na ich powierzchnię zewnętrzną jony dodatnie związków nietoksycznych (nie zaburzających ich funkcji metabolicznych). Jony te mogą wpływać na siły wzajemnego przyciągania elektrostatycznego pomiędzy zmodyfikowaną nimi błoną a kationami metaloorganicznymi środowiska zewnątrzkomórkowego. Siły te ulegając osłabieniu mogą przełożyć się na zmniejszenie efektywności oddziaływania, związków metaloorganicznych dysocjujących w wodzie z błonami. Taka koncepcja została potwierdzona eksperymentalnie na erytrocytach i błonach modelowych [124 - 127].

W pracy [105] badano wpływ oddziaływań sterycznych fenylocyn na ich adsorpcję na dwuwarstwach formowanych z dipalmitydylocholiną. Wskaźnikiem ilości adsorbowanego związku były odpowiednio dobrane sondy fluorescencyjne wbudowywane w błonę. Ilość adsorbującego związku zależała od geometrii adsorbowanych molekuł oraz od wywołanej zmianami temperatury (z przedziału od 0 do 45°C) zmiany organizacji dwuwarstwy lipidowej. Pomiar fluorescencji był wspomagany technikami obliczeniowymi. W technikach tych lokalizacja cząsteczek penetrujących błonę była skorelowana ze, względną pozycją ich polarnych i hydrofobowych części, do określenia przyjmowanej przez nie struktury wymaganej przez lokalne środowisko błony. Wyniki uzyskane metodami obliczeniowymi wskazują, iż molekuly fenylocyn są deformowane przez siły modelowe, symulujące oddziaływania wewnątrz międzyfazowego rejonu błony. Deformacja ta w przypadku DPhT polegała na zgięciu wiązań pomiędzy cyną a dwoma najbliższymi węglami od konformacji o najniższej energii (C-Sn-C), jak również na obracaniu się pierścieni fenylowych. Obliczenia pokazywały, iż deformacji mógł ulegać rozmiar DPhT, dzięki czemu związek ten mógł uzyskać właściwości amfifilowe. Inaczej było w przypadku TPhT, który do deformacji wymaga większej energii. Uzyskane wyniki przemawiają za tezą, iż fenylocyny wbudowują się w warstwę międzyfazową błon lipidowych, przy czym DPhT integruje się z błoną w warstwach głębszych aniżeli TPhT, który adsorbuje się na powierzchni błony. Powodem takiego stanu może być to, iż w rozważanym przypadku, główną rolę odgrywają oddziaływania steryczne a nie elektrostatyczne.

Autorzy pracy [128] badali wpływ cholesterolu na adsorpcję DPhT i TPhT na powierzchni dwuwarstw formowanych z mieszaniny fosfatydylocholiną i cholesterolu oraz sfingomieliny i cholesterolu. Uzyskane techniką fluorescencji wyniki eksperymentów wskazują, iż adsorpcja TPhT i DPhT na błonach zawierających

fosfatydylocholinę jakościowo różni się od adsorpcji tych związków na błonach zawierających sfingomielinę. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na to, iż fenylocyny mają skłonność do gromadzenia się w obszarach błon komórkowych zawierających fosfatydylocholinę, poza obszarami tratw lipidowych [128].

W pracy [129] przedstawiono wyniki eksperymentów wskazujących na przenikanie DPhT i TPhT przez dwuwarstwę lipidową błon liposomów, wykonanych z lecytyny jajecznej oraz liposomów zawierających domieszki cholesterolu. Uzyskane w pracy wyniki wskazują na to, iż w początkowej fazie (po upływie 0,5 s), obydwie związki są adsorbowane na powierzchni dwuwarst lipidowych. Natomiast czas, po którym przenikają one przez błony jest rzędu wielkości jednej minuty. Obecność cholesterolu w błonach liposomów powodowała zmniejszenie ich przepuszczalności dla badanych związków.

Omówione wyżej wyniki badań wpływu różnych związków metali na błony biologiczne jak i modelowe prezentują zarys problemów, jakimi zajmowali się m. in. autorzy cytowanych prac. Jednak ze względu na złożoność tematu badawczego, mimo wielu bardzo istotnych wniosków wynikających z dotychczas opublikowanych prac, mechanizmy oddziaływania związków metali z błonami biologicznymi a tym bardziej z organizmami żywymi nie zostały jeszcze wyjaśnione. Istnieje zatem potrzeba prowadzenia dalszych badań w tym zakresie i to zarówno na obiektach naturalnych jak i sztucznych.

II Badania własne

1 Cel pracy

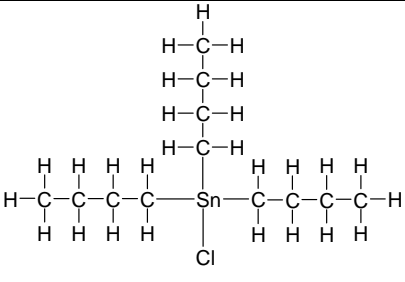
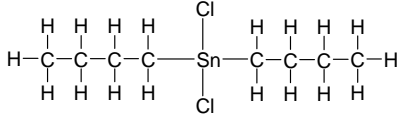
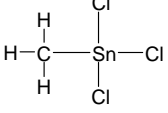
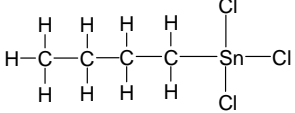
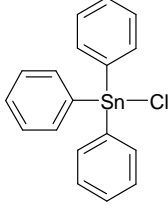
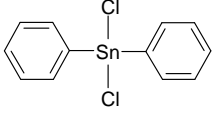
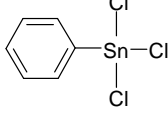
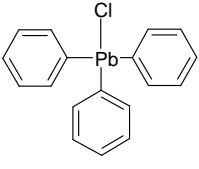
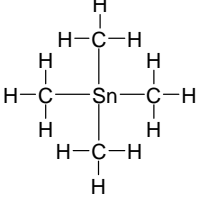
Celem mojej pracy było zbadanie wpływu wybranych związków metali (nieorganicznych i organicznych) na właściwości elektryczne błon modelowych w postaci filtrów impregnowanych kwasami tłuszczowymi. Ponadto metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) przeprowadzono (dla porównania) serię badań wpływu jednej grupy tych związków na dynamiczne właściwości błon liposomów formowanych z lecytyny syntetycznej DPPC.

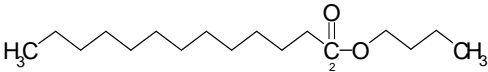
2 Materiały

Tab. 4 zawiera stosowane w badaniach związki chemiczne. Związki te zostały zakupione w Sigma –Aldrich Polska. Rozpuszczalniki (DMF, metanol i czterochlorek węgla) zakupione były w POCH. Lecytyna jajeczna preparowana była z jaj kurzych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego,

Tab. 4. Związki metali oraz inne materiały stosowane w badaniach.

Skrót i nazwa związku	Wzór strukturalny
TriMT – trimetylochlorocyna	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{Sn}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{Cl} \quad \text{H} \end{array} $
TriPT – tripropylochlorocyna	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{Sn}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{Cl} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array} $

Skrót i nazwa związku	Wzór strukturalny
TriBT – tributylochlorocyna	
DiBT – dibutylochlorocyna	
MT – metylotrichlorocyna	
BT – butylotrichlorocyna	
TPhT – trifenylochlorocyna	
DPhT – difenylochlorocyna	
PhT – fenylotrichlorocyna	
TPhL – trifenylochloroołów	
TMT – tetrametylocyna	

Skrót i nazwa związku	Wzór strukturalny
TET – tetraetylocyna	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{Sn}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} $
KCl – chlorek potasu	K – Cl
NaCl – chlorek sodu	Na – Cl
CaCl ₂ – dichlorek wapnia	Cl—Ca—Cl
SnCl ₂ – dichlorek cyny	Cl—Sn—Cl
SnCl ₄ – czterochlorek cyny	$ \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{Cl}-\text{Sn}-\text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array} $
DMF – dimetyloformamid	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{O} \\ \quad \quad // \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{H} \end{array} $
CCl ₄ – czterochlorek węgla	$ \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array} $
Ester butylowy kwasu laurynowego	
Kwas palmitynowy, arachidowy i oleinowy	Tab. 2.

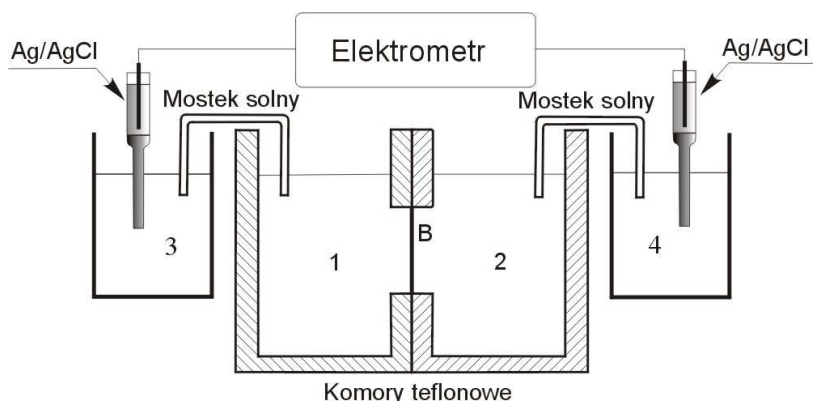
3 Metody badań

3.1 Elektryczne właściwości filtrów impregnowanych kwasami tłuszczowymi

Do pomiaru napięcia transbłonowego stosowano dwie odwracalne elektrody (chlorosrebrowe) oraz miernik napięcia o wysokim oporze wewnętrznym.

Układ doświadczalny, wzorowany na układzie pomiarowym prezentowanym w pracy [130], składał się z dwóch komór (pomiarowej 1 i odniesienia 2) przedzielonych błoną B w postaci hydrofilowych filtrów firmy Synpor (Czechy) o różnych grubościach

i średnicach por (Rys. 24). Filtry te były impregnowane różnymi kwasami tłuszczowymi.



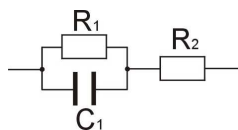
Rys. 24. Układ pomiarowy: 1 – komora pomiarowa; 2 – komora odniesienia; 3 i 4 – komory pośrednie; B – błona, Ag/AgCl – elektrody chlorosrebrowe.

Komory 1 i 2 połączone były mostkami solnymi z komorami pośrednimi 3 i 4. W komorach 3 i 4 zanurzone były elektrody chlorosrebrowe (Ag/AgCl) poprzez które, za pomocą elektrometru firmy Keithley 6517, mierzono napięcie błonowe. Elektrometr, dzięki kompensacyjnej metodzie pomiaru pozwalał na pomiar napięcia niemal bez przepływu prądu w obwodzie elektrycznym. Pomiar rozpoczynał się od napełnienia wszystkich komór wodnym roztworem KCl o stężeniu 10 mM oraz włączenia mieszadeł zapewniających jednorodny rozkład stężeń w komorach 1 i 2. Po ustaleniu się jednakowych poziomów elektrolitu w połączonych mostkami solnymi komorach, do komory pomiarowej wprowadzano domieszki badanych związków rozpuszczonych w metanolu lub dimetyloformamidzie (DMF) a następnie dokonywano pomiaru napięcia między komorami 1 i 2. Napięcie rejestrowane było w jednosekundowych odstępach czasu przez współpracujący z elektrometrem komputer.

Pomiar impedancji

Rezystancja oraz pojemność elektryczna błon określona była na podstawie pomiaru impedancji. Metoda ta polega na pomiarze natężenia prądu płynącego przez błonę przy częstotliwości 1 kHz i wartości skutecznej napięcia elektrycznego 50 mV. Uzyskane wyniki dopasowywano do przyjętego modelu elektrycznego i obliczano jego parametry. Na Rys. 25 przedstawiony został trójelementowy model elektryczny błony lipidowej

zawierający rezystancję błony (R_1), rezystancję układu elektrolitów i elektrod (R_2), oraz pojemność błony (C_1) [131-135].



Rys. 25. Elektryczny model błony lipidowej, gdzie: R_1 – rezystancja błony, R_2 – rezystancja układu elektrolitów i elektrod, C_1 – pojemność błony.

Pomiary impedancji wykonywane były standardowo przed każdym pomiarem napięcia błonowego (w celu oceny stopnia impregnacji filtru), oraz po wykonaniu pomiaru napięcia. Dodatkowo wykonywano pomiary impedancji w funkcji czasu dla różnych stężeń badanych związków metali.

Pomiary impedancji wykonywano za pomocą zmiennoprądowego mostka firmy Motech MT 4090, przy częstotliwości sygnału 1kHz i wartości skutecznej napięcia sygnału testującego równej 50mV.

3.2 Płynność błon liposomów modyfikowanych związkami metali

W badaniach parametrów dynamicznych błon liposomów (współczynnik podziału F), stosowano technikę sond spinowych EPR. Technika ta polega na wprowadzaniu sond spinowych do roztworu lipidów, z których następnie formowane były błony liposomów. Sondy spinowe są to cząsteczki zawierające niesparowany elektron, co oznacza, że mają one, różny od zera moment magnetyczny. Zgodnie z mechaniką kwantową, moment magnetyczny tego elektronu może w przestrzeni ustawiać się w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego tylko na dwa sposoby. W jednym z tych ustawień rzut momentu pędu i momentu magnetycznego na kierunek pola magnetycznego ma określoną dodatnią wartość, a w drugim ustawieniu taką samą wartość lecz ujemną. Mówi się wtedy o zgodnym lub przeciwnym ustawieniu się momentu magnetycznego spinu elektronowego względem zewnętrznego pola magnetycznego [136].

Zgodne i przeciwne ustawienie się momentów magnetycznych elektronowych związane jest z różnicą energii pomiędzy powstałymi w polu magnetycznym poziomami, którą można wyrazić wzorem: $\Delta E = g\beta H$, gdzie g – spektroskopowy

współczynnik rozszczepienia, zwany czynnikiem Landego; β – magneton Bohra; H – natężenie pola magnetycznego [137]. Większość elektronów zajmuje niższy poziom energetyczny, przy czym różnica obsadzeń poziomów energetycznych jest tym większa, im niższa jest temperatura. Równowagę obsadzeń niższego i wyższego poziomu energetycznego opisuje prawo Boltzmanna:

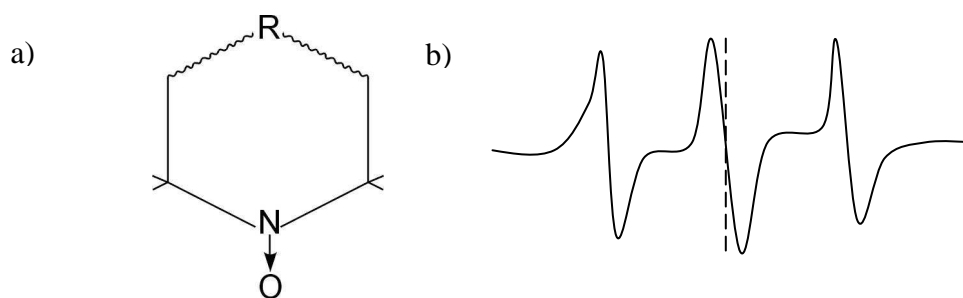
$$\frac{n_+}{n_-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

gdzie: n_+ – liczba elektronów w wyższym stanie energetycznym; n_- – liczba elektronów w niższym stanie energetycznym; ΔE – różnica energii tych dwóch stanów; k – stała Boltzmanna; T – temperatura w K.

Pole magnetyczne o indukcji na poziomie ok. 0,33 T generuje różnicę energii stanów energetycznych odpowiadających różnemu ustawieniu się w tym polu elektronów równą energii kwantów promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości ok. 9,6 GHz. Kwanty o tej częstotliwości są rezonansowo pochłaniane przez elektrony cząsteczek paramagnetyka umieszczonego w tym polu magnetycznym, podczas ich przenoszenia do wyższego stanu energetycznego. Metoda wykorzystująca opisany efekt do wytworzenia i rejestracji absorpcji takiego promieniowania elektromagnetycznego, nosi nazwę elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR.

W technice sond spinowych jako znacznik spinowy stosuje się bardzo często cząsteczki zawierające stabilne rodniki z grupą nitroksylową, z niesparowanym elektronem zlokalizowanym głównie na atomie azotu (Rys. 26a) [138].

Podstawienie odpowiedniej grupy R do znacznika nitroksylowego umożliwia uzyskanie sondy łączącej się kowalencyjnie lub hydrofobowo ze specyficznymi grupami białek lub wyłącznie do frakcji lipidowej. Po umieszczeniu takiej paramagnetycznej sondy w polu magnetycznym następuje rozszczepienie poziomów energetycznych niesparowanego elektronu na dwa podpoziomy (efekt Zeemana) odpowiadające dwom wartościom rzutu spinowego momentu pędu na kierunek pola. W wyniku oddziaływania tego elektronu z jądrem atomowym azotu o liczbie spinowej 1 następuje rozszczepienie widma na trzy linie odpowiadające (zgodnie z warunkami kwantowymi $I_z = \pm 1, 0$) trzem wartościami rzutu spinowego momentu pędu jądra azotu I_z na kierunek zewnętrznego pola magnetycznego [138]. Na Rys. 26b) przedstawiono pierwszą pochodną typowego widma EPR nitroksylowego znacznika spinowego.



Rys. 26. Postać ogólna spinowego znacznika nitroksylowego a), widmo EPR (pierwsza pochodna widma) typowego nitroksylowego znacznika spinowego b).

W tej pracy w badaniach błon liposomów stosowano sondę TEMPO (Rys. 27a). Sonda ta wbudowuje się w warstwę powierzchniową dwuwarstwy lipidowej, ale również chętnie lokuje się w środowisku wodnym otaczającym błonę. Dlatego też sonda ta występuje zarówno w fazie wodnej jak i lipidowej a stopień jej podziału pomiędzy oba środowiska jest uzależniony głównie od płynności powierzchni dwuwarstwy lipidowej. Do oceny płynności tego obszaru, stosuje się współczynnik podziału F sondy pomiędzy fazę lipidową a wodną wyznaczony na podstawie widma EPR (Rys. 27b) z zależności:

$$F = H/H+P$$

gdzie: H - amplituda linii w środowisku lipidowym; D - amplituda w środowisku wodnym; P – amplituda linii będącej sumą środowiska lipidowego i wodnego.

Wzrost wartości parametru F oznacza wzrost płynności warstwy powierzchniowej liposomów.

Pomiary EPR prowadzone były za pomocą spektrometru MX – 201R, (wykonanego przez Politechnikę Wrocławską), pracującego w paśmie X, co odpowiada częstotliwości 9,5 GHz. Sonda TEMPO wprowadzana była do 40 mM dyspersji jednorodnych liposomów preparowanych z lecytyny jajecznej lub syntetycznej DPPC, w procesie sonikacji za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego Techpan UD-20. Następnie dyspersja liposomów wraz z sondą oraz badanymi związkami metali była wytrząsana przez 5 min. mikrowytrząsarką Micro-Shaker 326m, po czym wykonywana była rejestracja widma EPR.



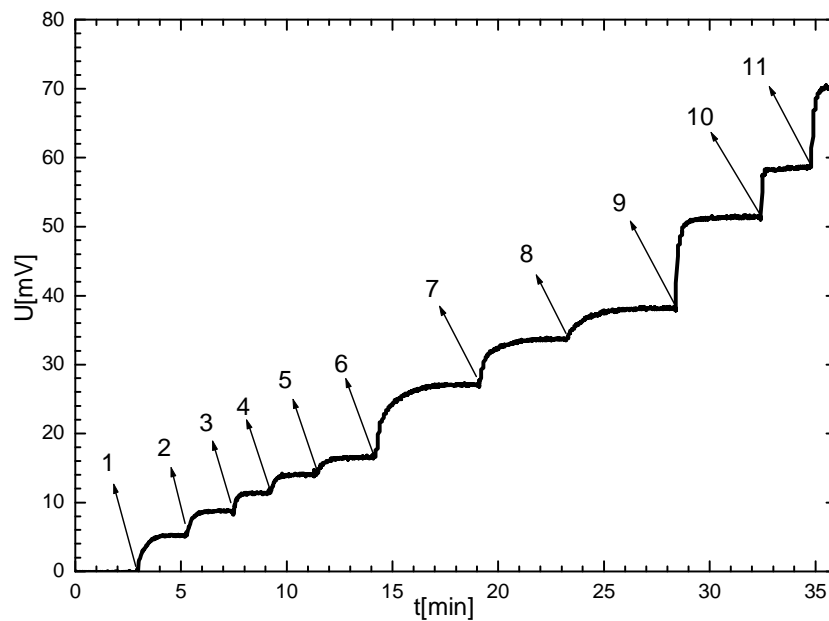
Rys. 27. Wzór strukturalny sondy TEMPO a), oraz widmo EPR uzyskane przy zastosowaniu tej sondy rozpuszczonej w lecytynie jajecznej, z której wykonana została następnie dyspersja liposomów b).

4 Omówienie wyników pomiarów

4.1 Wpływ nieorganicznych chlorków metali na właściwości elektryczne błon

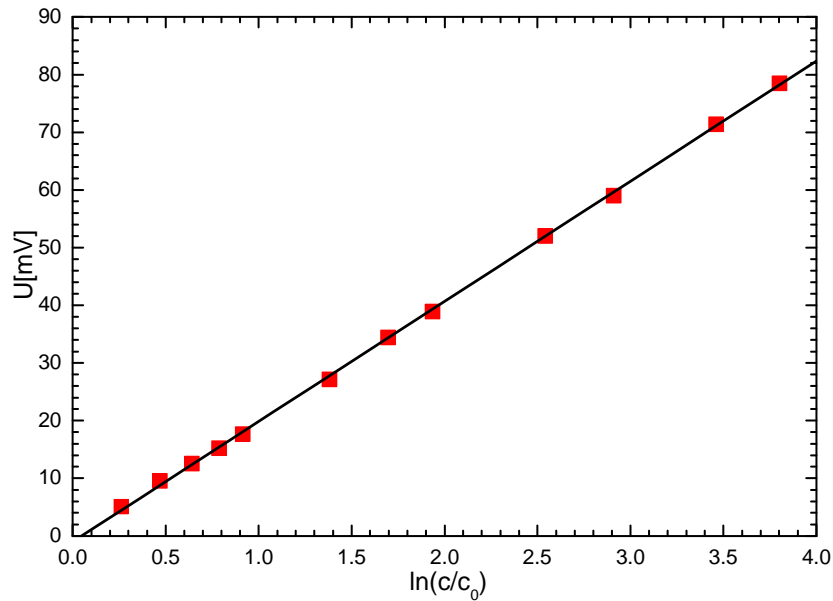
Potas jest jednym z pierwiastków o fundamentalnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Kationy potasu są podstawowymi jonami wewnątrzkomórkowymi, koniecznymi do podtrzymania potencjału czynnościowego błon komórkowych. Biorą także udział w utrzymaniu prawidłowej pobudliwości komórek mięśniowych i nerwowych oraz regulują przepuszczalność błon komórkowych. Potas wchodzi ponadto w skład licznych enzymów i w dużym stopniu kontroluje syntezę białek i glikogenu. Dlatego prezentowane tutaj wyniki badań wpływu związków metali na właściwości elektryczne błon lipidowych, rozpoczynają się od omówienia oddziaływania kationów potasu z tymi błonami. Kationy te wprowadzane były do układu pomiarowego wraz z dobrze rozpuszczającą się w wodzie solą KCl. Badania prowadzone były przy zastosowaniu techniki pomiarowej i układu doświadczalnego opisanego w punkcie 3.1 (Rys. 24). W badaniach stosowano nitrocelulozowe filtry firmy SYNPOR o grubości 150 μm i średnicy por 0,4 μm , impregnowane estrem butylowym kwasu laurynowego (EBKL). Rys. 28 przedstawia, zależność napięcia błonowego od czasu i stężenia roztworu KCl w komorze pomiarowej (1) (Rys. 24).

Stężenie KCl w komorze pomiarowej zmieniano przez wprowadzenie odpowiednio dobranych objętości roztworu tej soli o stężeniu 3 M. Wzrost stężenia KCl w komorze pomiarowej, przy stałym jego stężeniu w komorze odniesienia (2), powodował wytworzenie napięcia błonowego z potencjałem ujemnym roztworu komory (1). Wartość napięcia rosła skokowo ze wzrostem stężenia i stabilizowała się na stałym poziomie (Rys. 28).



Rys. 28. Zależność napięcia błonowego U od czasu t i stężenia KCl w komorze pomiarowej. Stężenia KCl: 1-12 mM; 2-14 mM; 3-16 mM; 4-18 mM; 5-20 mM; 6-30 mM; 7-40 mM; 8-50 mM; 9-60 mM; 10-80 mM; 11-180 mM (potencjał elektryczny roztworu w komorze pomiarowej był ujemny) [139]. Dokładność pomiaru napięcia wynosiła 0,1%. Odchylenie standardowe od wartości średnich napięć stabilizacji nie przekraczało $\Delta U=0,07$ mV. Stężenia w komorze pomiarowej określono z dokładnością do 5%.

Na Rys. 29 przedstawiono zależność wartości ustabilizowanego napięcia transbłonowego U od logarytmu naturalnego ze stosunku stężeń KCl w komorze pomiarowej c i komorze odniesienia c_0 .



Rys. 29. Zależność napięcia błonowego od logarytmu ze stosunku stężeń roztworu KCl w komorze pomiarowej c do stężenia roztworu w komorze odniesienia c_0 ($c_0=10\text{ mM}$ i było stałe). Odchylenie standardowe od wartości średnich napięć stabilizacji nie przekraczało $\Delta U=0,07\text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Do analizy wyników prezentowanych na Rys. 29 można zastosować wzór Nernsta o ogólnej postaci:

$$U = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a}{a_0} \quad (10)$$

gdzie: U – napięcie błonowe

R – stała gazowa;

T – temperaturę bezwzględna;

F – stałą Faradaya;

z – wartościowość jonów potasu;

c i c_0 – stężenia KCl odpowiednio w komorach pomiarowej i odniesienia;

a i a_0 aktywności jonów.

Wzór Nernsta można przekształcić do bardziej praktycznej postaci, w której aktywności w wyrażeniach logarytmowanych zastąpione są stężeniami. Przekształcenie to powoduje wprowadzenie stałej r tak dobranej aby

$$U = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a}{a_0} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{f c}{f_0 c_0} = \frac{RT}{zF} r \ln \frac{c}{c_0} \quad (11)$$

gdzie f i f_0 – współczynniki aktywności jonów.

$$\text{Stąd} \quad \frac{f c}{f_0 c_0} = \left(\frac{c}{c_0} \right)^r, \quad (12)$$

$$\text{a} \quad \frac{f}{f_0} = \left(\frac{c}{c_0} \right)^{r-1} \quad (13)$$

Równanie (11) można zapisać w postaci

$$U = \frac{RT}{z F} \ln \frac{c}{c_0} \quad (14)$$

gdzie $\frac{z}{r} = z_{ef}$ jest efektywną wartościowością jonów

$$\text{stąd} \quad r = \frac{z}{z_{ef}} \quad (15)$$

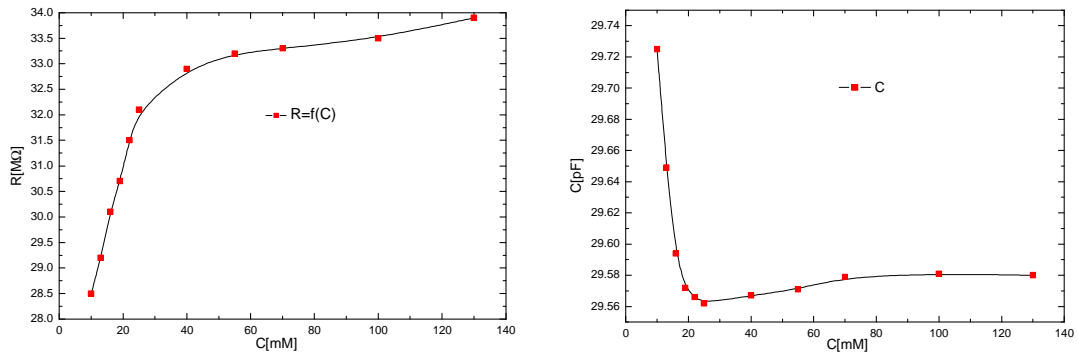
Równanie (15) określa sens fizyczny stałej r . Stała ta jest współczynnikiem wartościowości; jest współczynnikiem proporcjonalności pomiędzy teoretyczną wartościowością z i wartościowością efektywną z_{ef} [140].

Współczynnik r ma ścisły związek z nachyleniem prostej reprezentującej zależność $U=f(\ln c/c_0)$ i dla danej prostej ma wartość stałą. Stała r może między innymi, być miarą skuteczności oddziaływań elektrycznych pomiędzy roztworem i zanurzoną w nim błoną.

W przypadku roztworu KCl (Rys. 30) współczynnik wartościowości jest równy $r=0,8$ a wartościowość efektywna $1,230 \pm 0,001$.

Ujemny znak potencjału elektrycznego w komorze pomiarowej jest jak można sądzić wynikiem ujemnego ładunku zawartego wewnątrz filtru SYNPOR. Z pracy [141] wynika, że gęstość ujemnego ładunku powierzchniowego tego filtru wynosi około $2 \cdot 10^{-7} \text{ C/cm}^2$. Ujemnie naładowana błona może przyciągać dodatnie jony K^+ pozostawiając w roztworze ujemne jony Cl^- , które decydują o znaku potencjału elektrycznego roztworu w komorze pomiarowej.

Rezystancja oraz pojemność błon określona była na podstawie pomiaru ich impedancji (rozdział 3.1). Uzyskane wyniki zostały dopasowane do przyjętego wcześniej trójelementowego modelu elektrycznego (Rys. 25) błony. Na Rys. 30 przedstawiono wykresy uzyskanych wartości oporów R i pojemności C w funkcji stężenia KCl w komorze pomiarowej.



Rys. 30. Zależność oporu błony R oraz pojemności błonowej C od stężenia c KCl w komorze pomiarowej. Błędy względne oporu i pojemności nie przekraczały 1% ich wartości.

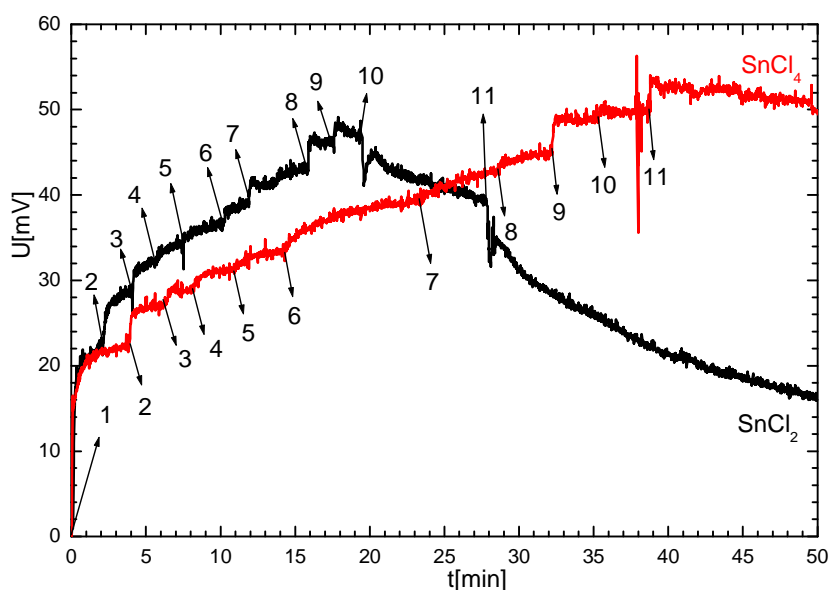
Z Rys. 30 wynika, że opór R błony rośnie ze wzrostem stężenia KCl w komorze pomiarowej, a po przekroczeniu stężenia 25 mM stabilizuje się na wartości około $33,5\text{ M}\Omega$. W całym zakresie stosowanych stężeń zmiany oporu stanowią najwyżej ok. 20% wartości oporu początkowego błony (oporu błony przy stężeniu KCl równym 10 mM). Jednocześnie pojemność błony C maleje wraz ze wzrostem stężenia KCl i stabilizuje się na poziomie około $29,58\text{ pF}$ również po przekroczeniu stężenia o wartości 25 mM . Zmiany pojemności stanowią zaledwie 0,5% wartości pojemności początkowej (pojemności błony przy stężeniu KCl równym 10 mM). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze wnioski sugerujące adsorpcję jonów potasu na powierzchni błony. Na powierzchni błony tworzy się jak można sądzić warstwa utrudniająca przepływ jonów, czego odbiciem jest wzrost oporu elektrycznego błony i spadek pojemności spowodowany niewielkim wzrostem grubości błony, lub zmniejszeniem stałej dielektrycznej.

Wyniki uzyskane przy zastosowaniu filtrów o innej geometrii (średnica por $1,5\ \mu\text{m}$, grubości $50\ \mu\text{m}$ impregnowanych również przez EBKL dały zbliżone wartości współczynnika wartościowości r oraz wartościowości efektywnej z_{ef} które wyniosły odpowiednio $r=0,79$ i $z_{ef}=1,27$.

W pracy badano również napięcie omawianych wyżej błon wywołane obecnością NaCl w otoczeniu takiej błony. Wzrost stężenia NaCl w komorze pomiarowej powodował skokowy wzrost napięcia z ujemnym potencjałem w tej komorze a następnie jego stabilizację na określonym poziomie. Wartości ustabilizowanych napięć, odczytane dla różnych stężeń układają się wzdłuż linii prostej na wykresie zależności

napięcia transbłonowego U od logarytmu naturalnego ze stosunku stężeń NaCl w komorze pomiarowej c i komorze odniesienia c_0 . Wyznaczony na podstawie wzoru Nernsta współczynnik wartościowości r oraz wartościowości efektywnej z_{ef} wyniosły odpowiednio $r = 0,68$ i $z_{ef} = 1,47$. Oznacza to, że efektywna wartościowość kationów sodu w oddziaływaniu z badanymi błonami jest większa niżeli wartościowość efektywna jonów potasu.

Następną grupę badanych chlorków metali stanowiły SnCl_2 i SnCl_4 . Na Rys. 31 przedstawiono wykresy zależności napięcia transbłonowego od czasu i stężenia tych związków w komorze pomiarowej.

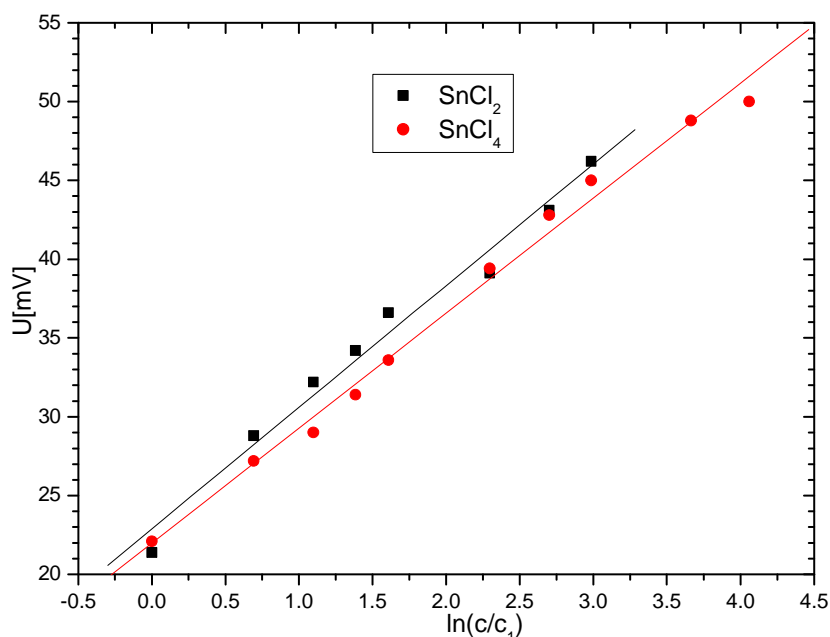


Rys. 31. Zależność napięcia błonowego od czasu (t) i stężenia SnCl_2 i SnCl_4 w komorze pomiarowej. Stężenia domieszek miały wartość: Stężenia związków cyny wynosiły: 1-12 mM ; 2-14 mM ; 3-16 mM ; 4-18 mM ; 5-20 mM ; 6-30 mM ; 7-40 mM ; 8-50 mM ; 9-60 mM ; 10-80 mM ; 11-180 mM (potencjał elektryczny roztworu w komorze pomiarowej był ujemny). Pomiar napięcia został wykonany z dokładnością do 0,1%. Odchylenie standardowe od wartości średnich napięć stabilizacji nie przekraczało $\Delta U = 0,5 mV$ dla obu chlorków cyny. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Pomiar napięcia przeprowadzony był w sposób identycznie jak w przypadku KCl. Wzrost stężenia chlorków cyny powodował skokowy wzrost napięcia błonowego a następnie jego stabilizację. Po ustabilizowaniu napięcia zwiększano stężenie badanych chlorków cyny w komorze pomiarowej i powtarzano procedurę pomiarową. W przypadku SnCl_2 po przekroczeniu stężenia 50 mM w komorze pomiarowej, dalsze

zwiększanie stężenia tego związku powodowało początkowo skokowy wzrost napięcia, następnie spadek jego wartości. Efekt ten może oznaczać, że po przekroczeniu stężenia o wartości 50 mM błona traciła właściwości izolatora elektrycznego. W przypadku SnCl_4 sytuacja taka miała miejsce dopiero przy stężeniu 180 mM. Trzykrotnie mniejsze stężenie SnCl_2 indukowało podobne zmiany krzywej napięcia transbłonowego a tym samym powodowało podobne zmiany jak obecność 180 mM SnCl_4 w komorze pomiarowej. Napięcie generowane w obecności SnCl_2 w komorze pomiarowej szybciej uzyskiwało wartość stabilną aniżeli w przypadku SnCl_4 .

Na Rys. 32 przedstawiona została zależność ustabilizowanych napięć elektrycznych odczytanych z wykresów na Rys. 31, od logarytmu naturalnego ze stosunku stężeń: c związków SnCl_2 i SnCl_4 w komorze pomiarowej do najmniejszego (początkowego) stężenia c_1 tych związków.



Rys. 32. Zależność napięcia błonowego od logarytmu ze stosunku stężeń roztworów SnCl_2 i SnCl_4 w komorze pomiarowej c do najmniejszego stężenia tych roztworów c_1 . Odchylenie standardowe od wartości średnich napięć stabilizacji nie przekraczało $\Delta U = 0,5 \text{ mV}$ dla obu chlorków cyny. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Zależność $U=f(\ln(c/c_1))$ (Rys. 32) zarówno dla SnCl_2 jak i SnCl_4 ma charakter liniowy. Współczynniki kierunkowe tych prostych oraz wartościowości efektywne wynoszą: dla SnCl_2 $z_{ef}=3,27\pm 0,18$; $r=0,61$ az dla SnCl_4 $z_{ef}=3,46\pm 0,11$; $r=1,16$. Większą efektywność oddziaływania z błoną wykazał związek SnCl_2 aniżeli SnCl_4 .

Wartościowość efektywna poniżej oczekiwanej wartości równej 4 dla chlorku czterowartościowego, może wynikać stąd, że związek ten w roztworze wodnym ulega hydrolizie tworząc krystalohydraty $\text{SnCl}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, które są elektrycznie obojętne. Natomiast chlorek SnCl_2 dysocjuje tworząc jony Sn^{2+} i 2Cl^- . Dwuwartościowe jony cyny mogą następnie utleniać się do jonów czterowartościowych [142]. Z tych względów jak można sądzić wartościowości efektywne mają zbliżone wartości dla obu chlorków cyny.

4.2 Wpływ organicznych związków metali na właściwości elektryczne błon

4.2.1 Alifatyczne związki metaloorganiczne nie zawierające chloru

Jedną z podgrup badanych alifatycznych związków metaloorganicznych nie zawierających w swojej strukturze chloru były tetrametylocyna $(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$ (TMT) i tetraetylocyna $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Sn}$ (TET) (Tab. 4). Są to związki o symetrycznej budowie cząsteczki, różniące się jedynie długością łańcuchów alkilowych przyłączanych do cyny. Badano wpływ tych związków na napięcie elektryczne generowane w układzie pomiarowym przedstawionym na Rys. 24 z błoną, w postaci filtru firmy SYNPOR o grubości $150 \mu\text{m}$ i średnicy por $0,4 \mu\text{m}$ impregnowaną związkiem EBKL.

Procedura pomiarowa w przypadku tych związków odbiegała od stosowanej w badaniach związków nieorganicznych. W przypadku związków nieorganicznych cała seria pomiarowa, tzn. pomiar zmian napięcia błonowego dla narastającego stężenia w komorze pomiarowej, wykonywana była na jednym, zaimpregnowanym wcześniej filtrze. W przypadku związków metaloorganicznych każdy pomiar wykonywany był na innym filtrze dla jednego, określonego stężenia badanego związku. Oba badane związki są silnie hydrofobowe i nie rozpuszczają się w wodzie. Dlatego też, w celu jednorodnego rozprowadzenia ich w komorze pomiarowej, za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego sporządzana była wodna emulsja o stężeniu 3 M każdego z badanych związków – tzw. roztwór bazowy. Następnie wkrapiano do komory pomiarowej odpowiednie objętości tego roztworu.

Obecność TMT w komorze pomiarowej, pomimo względnie dużego stężenia wynoszącego 3 mM , nie powodowała powstania napięcia błonowego wykraczającego poza wartość 2 mV . TET zawierający więcej grup CH_2 w łańcuchach

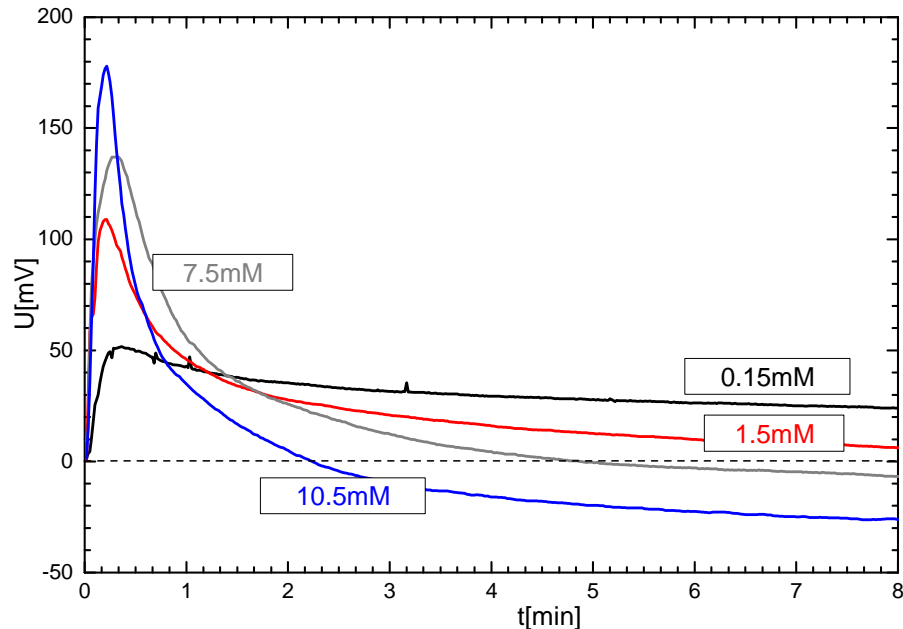
węglowodorowych otaczających atomy cyny (w porównaniu za związkiem TMT) wykazał większą aktywność w wytwarzaniu napięcia transbłonowego. Stężenie 0,3 mM tego związku w komorze pomiarowej powodowało pojawienie się napięcia, którego wartość zmieniała się w czasie uzyskując dwa niewielkie maksima. Pierwsze wystąpiło po czasie 1 min. od wprowadzenia domieszki i wynosiło ok. 6 mV, drugie natomiast po uzyskaniu wartości 5 mV stabilizowało się (w badanym przedziale czasu) na tym poziomie.

Stosunkowo słaby wpływ wymienionych wyżej związków cyny na elektryczne właściwości badanych błon jest prawdopodobnie związany z tym, że występują one w roztworach wodnych w postaci niezjonizowanej. Dlatego też jak można sądzić ich ewentualne oddziaływanie z błoną indukuje jedynie niewielkie napięcia błonowe lub w ogóle takiego napięcia nie indukują.

4.2.2 Alifatyczne związki metaloorganiczne z chlorem

Do podgrupy badanych w pracy, alifatycznych związków metaloorganicznych zawierających chlor należy również tripropylochlorocyna (C_3H_7)₃SnCl (TriPT) (Tab. 4). Jest to związek różniący się tym przede wszystkim od prezentowanych wyżej związków TMT i TET że struktura jego cząsteczki jest asymetryczna – jeden z łańcuchów alkilowych zastąpiony jest chlorem. Badano wpływ tego związku na napięcie elektryczne generowane w układzie pomiarowym (Rys. 24) z błoną, w postaci filtru firmy SYNPOR o grubości 150 μm i średnicy por 0,4 μm impregnowanego związkiem EBKL. Procedura pomiarowa była identyczna jak przy dwóch wcześniej omówionych związków (punkt 4.2.1). Na Rys. 33 przedstawiono zależność napięcia błonowego od czasu, po wprowadzeniu do komory pomiarowej odpowiednich stężeń związku TriPT wynoszących odpowiednio: 1 – 0,15 mM; 2 – 1,5 mM; 3 – 7,5 mM; 4 – 10,5 mM. Małe stężenia TriPT (1 i 2) powodowały szybki wzrost napięcia błonowego do wartości maksymalnej (tym większej im większe było stężenie TriPT) a następnie monotoniczny jego spadek. W przypadku większych stężeń TriPT (3 i 4) napięcia, po uzyskaniu wartości maksymalnej, malały do zera a następnie zmieniały kierunek (potencjał roztworu w komorze pomiarowej z ujemnego stawał się dodatni) uzyskując (w przypadku domieszki o stężeniu 10,5 mM) wartość 30 mV. Po upływie 18 godzin napięcie to malało do zera.

Opór elektryczny błon w obecności związku TriPT malał ze wzrostem jego stężenia. W przypadku stężeń 1,5mM; 7,5mM; 10,5mM osiągał on odpowiednio 70%, 40% i 5 % wartości oporu początkowego błony (przed wprowadzeniem TriPT do komory pomiarowej).



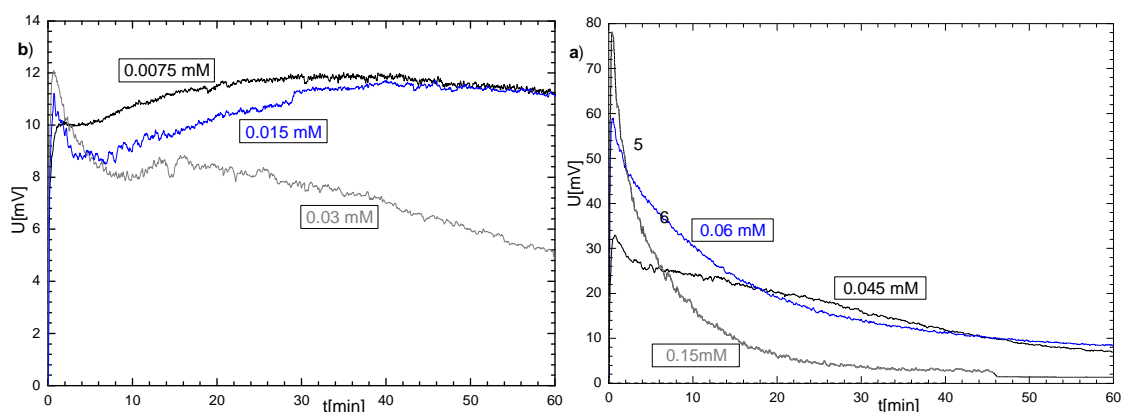
Rys. 33. Zależność napięcia błonowego U od czasu t , dla czterech wybranych stężeń domieszki TriPT w komorze pomiarowej. Pomiar napięcia został wykonany z dokładnością do 0,1%. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U=0,3 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej sporządzane były z dokładnością do 5%.

Ze względu na zastosowaną w badaniach technikę pomiarową związaną z wykorzystaniem ultradźwięków do wykonania wodnego roztworu bazowego TriPT o stężeniu 0,3 M, wkrapianego następnie do komory pomiarowej w określonych porcjach dla uzyskaniażądanego stężenia, nie wiadomo było, czy dobrany czas ekspozycji próbki na działanie ultradźwięków zapewnił dostatecznie dobre wymieszanie się TriPT z wodą. Z drugiej strony nie było wiadomo, czy dobrana moc ultradźwięków nie jest zbyt duża, przez co nie wpływa aktywnie na taki proces jak np. dysocjacja TriPT w wodzie. Aby rozwiązać te wątpliwości wcześniej zostały przeprowadzone pomiary wpływu TriPT na parametry elektryczne badanych błon, z wykorzystaniem roztworów bazowych TriPT rozpuszczonych w metanolu. Roztwory te miały różne stężenia, tak

dobrane aby przy każdym pomiarze do komory pomiarowej wkrapiana była taka sama objętość metanolu zawierająca zaplanowane stężenie TriPT. Opisana wyżej procedura uwarunkowana była tym, że obecność metanolu w otoczeniu błony indukuje określone, stałe napięcie błonowe i tym samym może wpływać na fałszowanie wyniku pomiarów.

Dodatkowym czynnikiem motywującym zmianę sposobu wykonania roztworów bazowych TriPT był niewielki stopień zróżnicowania napięć generowanych przez niskie stężenia TriPT w otoczeniu błony. Najniższym stężeniem, dla którego udało się uzyskać wiarygodny wynik pomiarowy było stężenie $0,15 \text{ mM}$ TriPT w komorze pomiarowej.

Na Rys. 34 przedstawiono zależność napięcia błonowego od czasu, po wprowadzeniu do komory pomiarowej określonych stężeń związku TriPT w metanolu. Funkcję błon pełniły filtry firmy Synpor (Czechy) o średnicy por $0,4 \mu\text{m}$ i grubości $150 \mu\text{m}$, impregnowane związkiem EBKL.

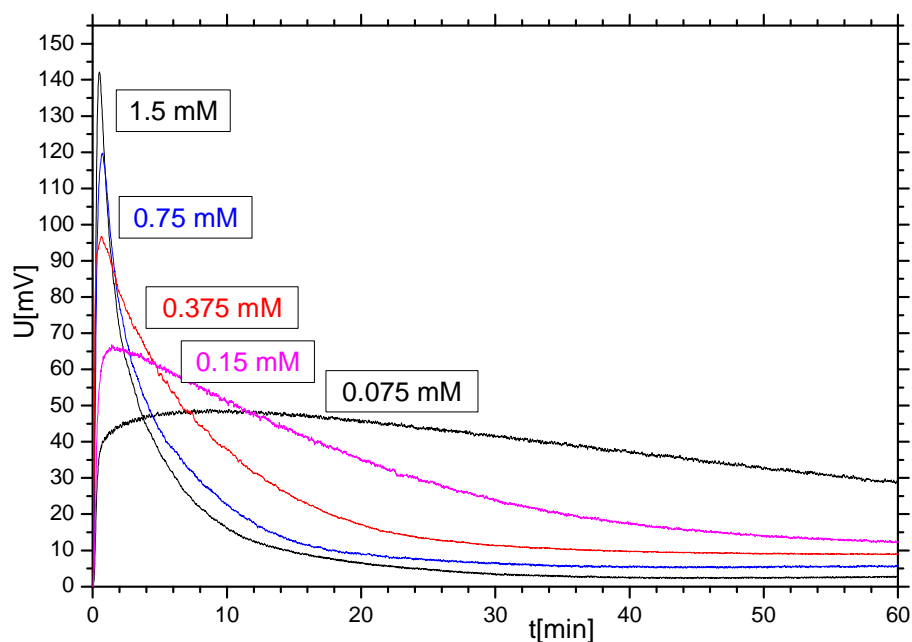


Rys. 34. Zależność napięcia błonowego od czasu t , dla wybranych stężeń TriPT w komorze pomiarowej. Pomiar napięcia został wykonany z dokładnością do $0,1\%$. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10% . Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,1 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5% .

Każdej krzywej na tym rysunku odpowiada stałe stężenie TriPT. Badania wykazały, że przy wszystkich stężeniach tego związku napięcie transbłonowe na początku rosło a następnie, po uzyskaniu wartości maksymalnej, malało do zera. Ponadto ze wzrostem stężenia badanego związku rosła wartość maksymalnego napięcia błonowego i szybkość z jaką napięcie to malało do zera. W przypadku najmniejszych, stosowanych w badaniach stężeń (Rys. 34a), obserwowano dwa niewielkie maksima napięciowe,

pierwsze krótkotrwałe (podobnie jak przy stężeniach wyższych) i drugie rozmyte w czasie.

Aby sprawdzić, czy obserwowane efekty napięciowe indukowane obecnością TriPT w otoczeniu błony zależą od stosowanego rozpuszczalnika, wykonane zostały pomiary analogiczne do prezentowanych powyżej (Rys. 34), różniące się jedynie rodzajem zastosowanego rozpuszczalnika, którym był dimetyloformamid (DMF). Wcześniej wykonane pomiary wpływu DMF - u na napięcie elektryczne błon impregnowanych EBKL wskazywały, iż nawet przy względnie dużych stężeniach, związek ten nie powodował powstawania napięcia błonowego (w przeciwieństwie do stosowanego wcześniej metanolu). Rys. 35 przedstawia zależność napięcia błonowego od czasu, jaki upłynął od wprowadzenia do komory pomiarowej TriPT. Pomiary prowadzone były dla 5 różnych stężeń tego związku. Funkcję błon pełniły filtry firmy Synpor (Czechy) o średnicy por $1,5 \mu\text{m}$ i grubości $50 \mu\text{m}$ impregnowane związkiem EBKL.



Rys. 35. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń TriPT w komorze pomiarowej. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U=0,1 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Wprowadzenie TriPT do komory pomiarowej powodowało szybki wzrost napięcia błonowego aż do osiągnięcia maksimum, po czym napięcie to już znacznie wolniej malało i po upływie ok. 60 *min.* ulegało stabilizacji. Wartości maksymalne napięć U_m i napięć stabilizacji U_s zamieszczone są w Tab. 5.

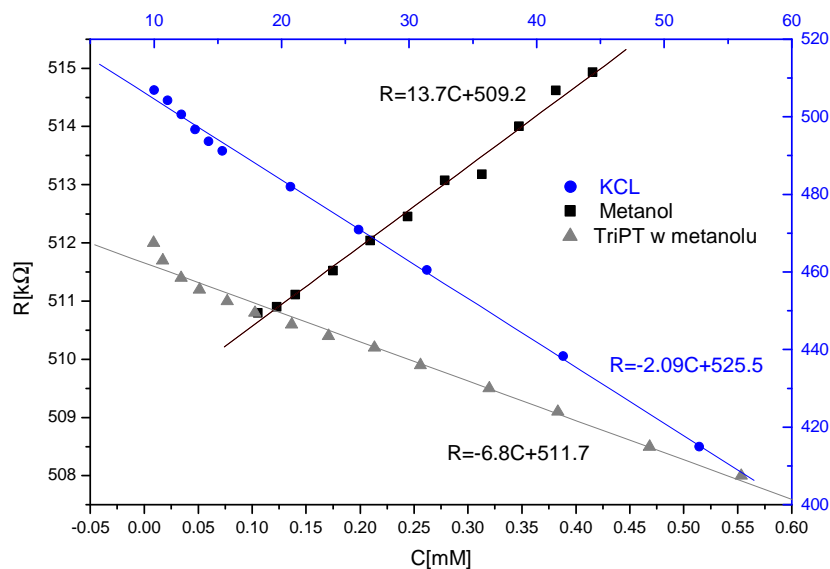
Tab. 5. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 60 *min.* od wprowadzenia domieszki TriPT do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

Stężenie w komorze pomiarowej C [mM]	Napięcie maksymalne U_m [mV]	Napięcie stabilizacji U_s [mV]
0,075	49,1	28,7
0,15	66,8	12,2
0,375	96,8	8,9
0,75	119,8	5,6
1,5	142,2	2,7

Z Tab. 5 wynika, że ze wzrostem stężenia TriPT rosło napięcie U_m a malało U_s . Ponadto położenie maksimum napięciowych przesunęło się stronę krótszych czasów t i szybciej dochodziło do stabilizacji napięcia. Podobny efekt obserwowano w wyżej omówionych badaniach prowadzonych dla TriPT rozpuszczonego w metanolu.

Zakładając, że TriPT dysocjuje w roztworze wodnym można przypuszczać, że dodatkowo, organiczne jony zawierające cynę łatwo przenikają do wnętrza badanej błony, ze względu na oddziaływania elektrostatyczne (ujemny ładunek filtra), a także ze względu na właściwości hydrofobowe kationu jak i EBKL wypełniającego pory filtra. Obydwa wymienione czynniki mogą kształtować zarówno wartość jak i polaryzację napięcia transbłonowego, w obecności tego związku w komorze pomiarowej. Pojawienie się maksimum napięciowych jest, jak można sądzić, wynikiem dwóch przesuniętych w czasie procesów; wnikania do wnętrza błony hydrofobowych kationów TriPT, co powoduje wzrost napięcia, a następnie ujemnych (hydrofilowych) jonów Cl^- . W rezultacie tego drugiego procesu maleje ujemny potencjał roztworu w komorze pomiarowej a także wartość napięcia błonowego. Kationy TriPT wnikają do wnętrza błony. Proces ten, w miarę upływu czasu obejmują coraz głębsze obszary błony. Dwa maksima napięciowe, obserwowane przy małych stężeniach domieszki, mogą oznaczać, że omówiony wyżej proces zachodzi wolniej w czasie i rozłożony jest na dwa etapy. Po wejściu do błony pewnej porcji jonów dodatnich (a następnie neutralizujących ich ładunek jonów chloru) następuje etap następny, w którym do błony dostaje się druga

porcja jonów dodatnich a za nimi druga porcja jonów ujemnych. Drugie maksimum jest rozciągnięte w czasie gdyż kationy muszą przeniknąć przez obszar błony zmodyfikowany obecnością kationów TriPT, utrudniających wnikanie następnym jonom dodatnim. W przypadku dużych stężeń obserwuje się tylko jedno maksimum napięciowe o znacznie większej wartości. Duża wartość tego maksimum może nakładać się na kolejne mniejsze maksima, w rezultacie na wykresie niezauważalne. Zmiana znaku napięcia transbłonowego, w przypadku największego stężenia TriPT w komorze pomiarowej (Rys. 33) może oznaczać, że w tym przypadku stężenie jonów chloru w błonie (podążających za jonami dodatnimi) jest tak duże, że w wyniku różnicy stężeń (pomiędzy wnętrzem błony i komorą odniesienia) zaczynają one dyfundować do komory odniesienia zmieniając znak potencjału tej komory z dodatniego na ujemny. Obecność kationów organicznych TriPT jest czynnikiem sprzyjającym transportowi anionów przez błonę i hamującym transport kationów. Proces ten w skrócie można skomentować następująco. Przy dużych stężeniach TriPT organiczne kationy przenikają do wnętrza błony i wytwarzają w niej struktury przypominające działaniem kanały jonowe, przez które mogą dyfundować, na drugą stronę błony, hydrofilowe jony chloru.



Rys. 36. Zależność oporu elektrolitu, od stężenia KCl (punkty i skala niebieska), TriPT i metanolu (skala czarna). Początkowe stężenie elektrolitu, tzn. wodnego roztworu KCl było identyczne dla każdego z pomiarów i wynosiło 0,01 M. Opory zostały wyznaczone z dokładnością do 1%, natomiast stężenie z dokładnością 5%.

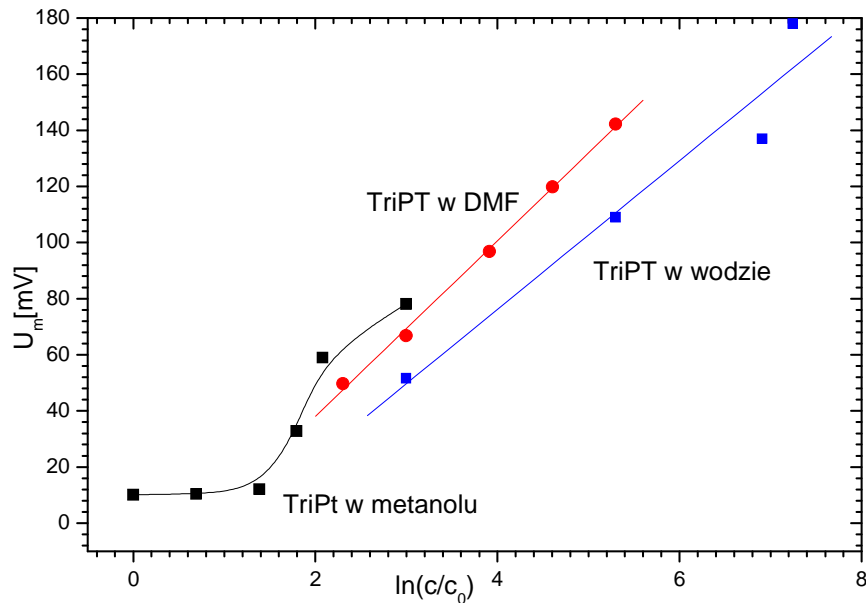
Przedstawiona powyżej koncepcja opiera się na założeniu, że TriPT dysocjuje w wodzie. Aby sprawdzić słuszność tego założenia przeprowadzone zostały badania mające na celu potwierdzić, że związek ten dysocjuje w wodzie. W tym celu zmierzony został opór elektrolitu, wypełniającego układ pomiarowy pozbawiony błony, dla różnych stężeń domieszek TriPT rozpuszczonego w metanolu. Dodatkowo, dla porównania zmierzono również opór elektrolitu w tym samym układzie pomiarowym dla różnych stężeń domieszek KCl oraz domieszek metanolu. Funkcję elektrolitu spełniał wodny roztwór KCl o stężeniu 0,01 M, który stosowany był jako roztwór wyjściowy dla każdego z kontrolnych pomiarów oporu.

Na Rys. 36 przedstawione zostały wyniki kontrolnych pomiarów zmian oporu elektrolitu, do którego wkrapiano żądane stężenia domieszek TriPT, KCl oraz metanolu. Na wykresie tym zamieszczone zostały również wartości współczynników kierunkowych prostych dopasowanych metodą regresji liniowej do zestawów danych pomiarowych pochodzących od wymienionych wyżej związków. Pomiarów zostały wykonane przy wykorzystaniu mostka RLC, techniką opisaną w rozdziale 3.2.

Z wykresów na Rys. 36 wynika, iż wzrost stężenia TriPT (rozpuszczonego w metanolu) powodował spadek rezystancji elektrolitu wypełniającego komory. Na podstawie współczynników kierunkowych prostych dopasowanych do punktów doświadczalnych, można stwierdzić, iż TriPT powodował większy spadek rezystancji elektrolitu przy zmianie stężenia o 1 mM/dm³ aniżeli KCl. Tymczasem metanol, w którym rozpuszczany był TriPT, zwiększał rezystancję elektrolitu. Stąd wniosek, że TriPT dysocjuje w pewnym stopniu w środowisku wodnym.

Na Rys. 37 przedstawiono zależność maksymalnych wartości napięć błonowych U_m od logarytmu naturalnego ze stosunku stężenia TriPT w komorze pomiarowej c do najmniejszego stężenia tego związku w komorze pomiarowej równego $c_0=0,0075 \text{ mM}$. Wartości napięć maksymalnych odczytane z Rys. 33, Rys. 34 i Rys. 35 pochodzą z pomiarów uzyskanych przy wykorzystaniu roztworu bazowego TriPT, wykonanego odpowiednio w wodzie (techniką sonikacji), metanolu i w DMF - ie.

Maksymalne wartości napięć uzyskane dla różnych stężeń TriPT rozpuszczonego w metanolu (Rys. 37) układają się wzdłuż krzywej, składającej się z trzech prostych odcinków, o różnych nachyleniach. W zakresie najmniejszych stężeń: 0,0075 mM; 0,015 mM, 0,03 mM nachylenie odcinka jest najmniejsze, w zakresie średnich stężeń: 0,03 mM, 0,045 mM, 0,06 mM – największe a w zakresie stężeń największych: 0,06 mM, 0,15 mM – pośrednie.



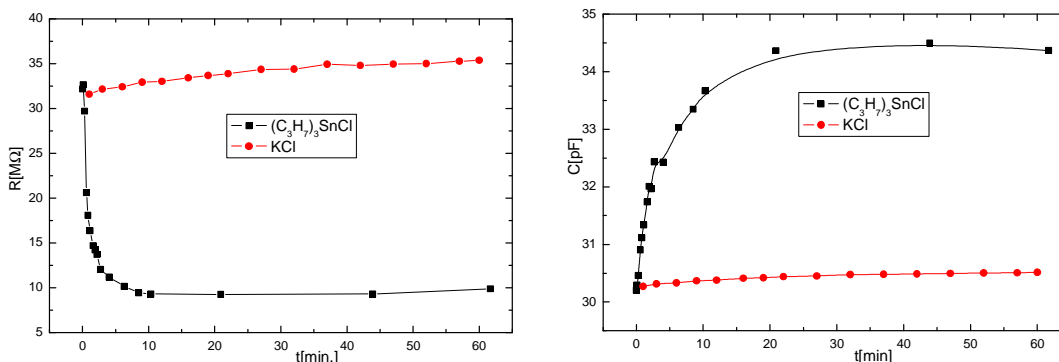
Rys. 37. Zależność maksymalnych wartości napięć U_m od logarytmu naturalnego ze stosunku stężenia c TriPT w komorze pomiarowej do najmniejszego stężenia tego związku $c_0=0,0075 \text{ mM}$. W przypadku TriPT rozpuszczonego w metanolu, stężenia domieszek w komorze pomiarowej miały wartość: $0,0075 \text{ mM}$; $0,015 \text{ mM}$; $0,03 \text{ mM}$; $0,045 \text{ mM}$; $0,06 \text{ mM}$; $0,15 \text{ mM}$. W przypadku TriPT rozpuszczonego w DMF - ie stężenia w komorze pomiarowej wynosiły: $0,075 \text{ mM}$; $0,15 \text{ mM}$; $0,375 \text{ mM}$; $0,75 \text{ mM}$; $1,5 \text{ mM}$. W przypadku TriPT rozpuszczonego w wodzie (przy pomocy ultradźwięków): $0,15 \text{ mM}$; $1,5 \text{ mM}$; $7,5 \text{ mM}$; $10,5 \text{ mM}$. Na rysunku zaprezentowano wartości napięć będących uśrednieniem napięć maksymalnych z co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej prezentowanych na wykresie napięć maksymalnych nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U=0,5 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Trzy różne nachylenia tych odcinków mogą oznaczać, że oddziaływanie TriPT z błoną jest procesem złożonym. Różni się ono zasadniczo od oddziaływania chlorku potasu z tą błoną. W przypadku KCl oddziaływanie ma, jak można sądzić, charakter powierzchniowy a proces formowania się napięcia transbłonowego jest podobny do procesu ładowania kondensatora. Natomiast w przypadku TriPT oddziaływanie ma charakter objętościowy a formowanie się napięcia transbłonowego przypomina złożenie dwóch procesów; ładowania i rozładowania kondensatora. W obszarze stężeń największych, obserwuje się mniej więcej takie samo nachylenie krzywej $U_m=f(\ln(c/c_0))$ uzyskanej przy zastosowaniu metanolu jako rozpuszczalnika TriPT jak w przypadku DMF. Jednocześnie można stwierdzić, że wpływ rodzaju rozpuszczalnika na

indukowane efekty napięciowe jest niewielki, przy czym TriPT rozpuszczony w metanolu indukował nieco większe napięcia elektryczne aniżeli w DMF - ie.

W przypadku napięć maksymalnych uzyskanych podczas pomiaru z wykorzystaniem TriPT rozpuszczonego (techniką ultradźwiękową) w wodzie jak i w DMF – ie, ich wartości układają się wzdłuż linii prostych o podobnym nachyleniu (Rys. 37). Proste przesunięte są względem siebie o stałą wartość napięcia. Przesunięcie to może świadczyć o tym, iż TriPT, sonikowany w roztworze wodnym, nie jest tak dobrze rozprowadzany w objętości komory pomiarowej jak TriPT rozpuszczony w DMF –ie i tym samym wywołuje mniejsze efekty napięciowe.

Rys. 38 przedstawia czasową zależność oporu i pojemności błon, indukowanych obecnością TriPT w ich otoczeniu. Dla porównania, wyniki te zestawione zostały z zależnościami czasowymi oporu i pojemności błon, indukowanych obecnością KCl w komorze pomiarowej. Stężenie obu tych związków w komorze było takie same i wynosiło $0,06\text{ mM}$. Pomiaru rozpoczynane były od momentu wkropienia badanych związków. Funkcję błon pełniły filtry o średnicy por $1,5\ \mu\text{m}$ i grubości $50\ \mu\text{m}$ impregnowane EBKL.



Rys. 38. Zależność oporu błony R oraz pojemności błonowej C od czasu t w komorze pomiarowej. Stężenie TriPT oraz KCl w komorze pomiarowej wynosiło $0,06\text{ mM}$. Błąd pomiaru oporu jak i pojemności nie przekraczał 1%.

Krzywa zależności $R=f(t)$ (Rys. 38) w początkowej fazie pomiaru (do ok. 10 min.) charakteryzuje się dużymi zmianami oporu w czasie, który maleje od wartości ok. $32,5\text{ M}\Omega$ do ok. $10\text{ M}\Omega$, na której stabilizuje się. Wynik ten potwierdza wcześniejszy wniosek, z którego wynika, że amfifilowe kationy TriPT wnikają do wnętrza błony, umożliwiając następnie wnikanie ujemnym jonom chloru, co skutkuje spadkiem oporu.

Natomiast w obecności KCl obserwuje się wzrost oporu błony, co może być spowodowane tym, iż jony potasu i chloru oddziałują jedynie z powierzchniową warstwą błony, a na granicy faz błona – woda tworzy się elektryczna warstwa podwójna utrudniająca przenikanie jonów do wnętrza błony.

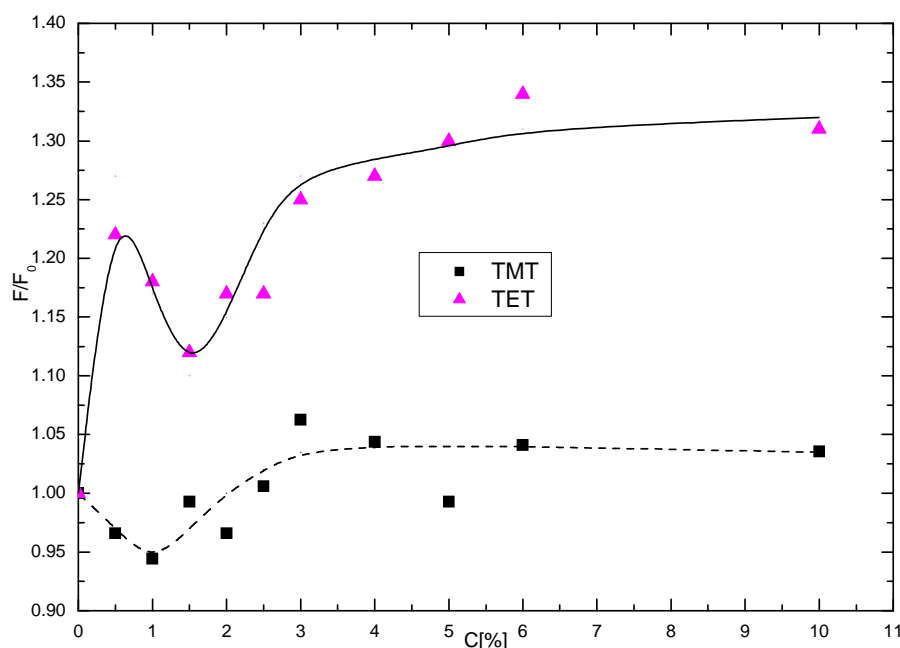
Wzrost pojemności błony w czasie (Rys. 38) indukowany obecnością TriPT w jej otoczeniu, przy stałej grubości $d = 5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ i przekroju $S = 6,25 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$, związany jest jak można sądzić ze wzrostem względnej przenikalności elektrycznej błony ϵ od wartości ok. 27 do 32. Wynik ten może również świadczyć o wnikaniu do wnętrza błony kationów TriPT, które następnie wiążą się z ujemnym ładunkiem filtra. Wzrost względnej przenikalności elektrycznej może być wywołany wzrostem ilości ładunku związanego z błoną (głównie dodatniego). Wkropienie roztworu KCl do komory pomiarowej powodowało niewielki wzrost pojemności błony. Obecność KCl nie modyfikuje wnętrza błony, i prawdopodobnie dlatego jej przenikalność elektryczna nie ulegała zmianie.

4.2.3 Wpływ związków cyny na dynamiczne właściwości błon liposomów – badania EPR

W pracy, metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR, prowadzono badania błon liposomów formowanych z lecytyny syntetycznej DPPC. Rys. 39 przedstawia zależność względnej wartości współczynnika podziału (F/F_0) sondy TEMPO pomiędzy błonami liposomów i środowiskiem wodnym od stężenia organicznych związków cyny (tetrametylocyny $(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$ – TMT, tetraetylocyny $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Sn}$ – TET), rozpuszczonych (razem z sondą) w wodnej zawieszynie liposomów formowanych z lecytyny syntetycznej DPPC. F_0 oznacza bezwzględny współczynnik podziału sondy TEMPO wyznaczony dla dyspersji liposomów w roztworze wodnym, bez domieszek badanych związków. Zastosowana do badań sonda TEMPO przekazuje informację o dynamice warstwy powierzchniowej błon liposomów. Gdy wartość F/F_0 rośnie powyżej 1 to może znaczyć, że pod wpływem badanego związku błony liposomów (a szczególnie ich zewnętrzne warstwy) upłynniają się, gdy natomiast F/F_0 jest mniejsze od 1 to błony liposomów mogą ulegać usztywnieniu.

Z Rys. 39 wynika, iż oba stosowane w badaniach związki organiczne cyny (nie zawierające chloru) powodowały upłynnianie błon liposomów (wartość parametru $F/F_0 > 1$), przy czym związek TET, powodował większe upłynnienie błon aniżeli TMT

[143]. Oba związki powodowały powstanie lokalnych minimów płynności w okolicach stężenia 1 – 1,5%, przy czym w przypadku TMT minimum to oznaczało usztywnienie błon (wartość parametru $F/F_0 < 1$). W przypadku TET wartość F/F_0 stabilizowała się na poziomie 1,3. Dla TMT wartość F/F_0 stabilizowała się na poziomie ok. 1, co może oznaczać brak wpływu tego związku na płynność błon w zakresie wyższych stężeń. Oba związki, przy względnie dużych ich stężeniach w komorze pomiarowej, nie indukowały wyraźnych efektów napięciowych na błonach impregnowanych przez EBKL, przy czym TET indukował niewielkie, zmieniające się w czasie, napięcia błonowe a TMT wywoływał powstanie niewielkiego, stałego napięcia. Zatem można stwierdzić, iż TET prawdopodobnie wnikał częściowo do wnętrza błon liposomów lub też lokował się w ich warstwie powierzchniowej. Natomiast TMT indukował niewielkie upłynnienie monowarstwy zewnętrznej liposomów, co pozwala sądzić, że prawdopodobnie nie wnika on do jej wnętrza.

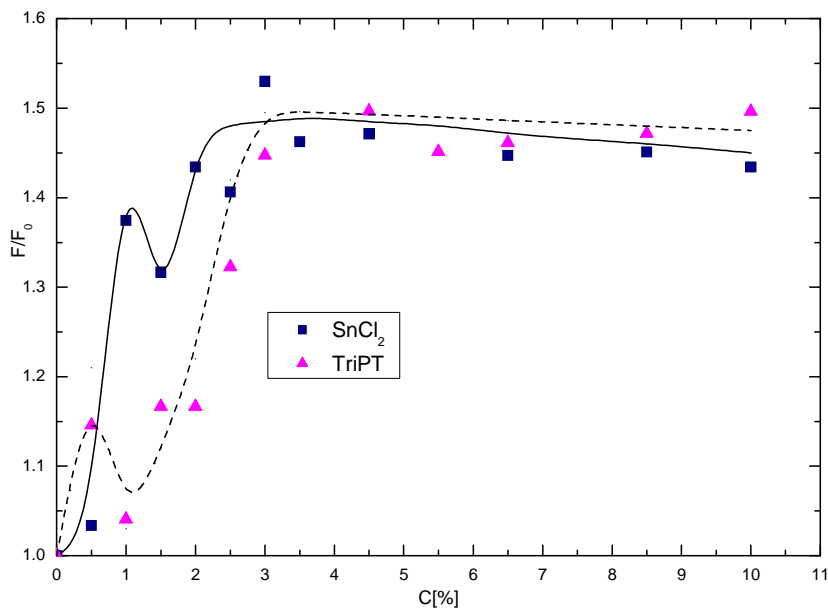


Rys. 39. Zależność względnej wartości współczynnika podziału (F/F_0) sondy TEMPO od stężenia organicznych związków cyny nie zawierających chloru, rozpuszczonych (razem z sondą) w wodnej zawieszynie liposomów DPPC. F_0 jest bezwzględnym współczynnikiem podziału sondy TEMPO określonym dla dyspersji liposomów w roztworze wodnym, nie zawierającym domieszek badanych związków.

Analizując otrzymane wyniki można sądzić, że oddziaływanie TMT i TET z błonami liposomów determinują przede wszystkim siły hydrofobowe. TET zawierający

więcej grup węglowodorowych CH_2 aniżeli TMT (związek bardziej hydrofobowy), oddziaływał efektywniej z badaną błoną.

Rys. 40 przedstawia zależność względnej wartości współczynnika podziału (F/F_0) sondy TEMPO od stężenia związków cyny zawierających chlor (chlorek cyny SnCl_2 oraz chlorek tripropylochyny $(\text{C}_3\text{H}_7)_3\text{SnCl}$ – TriPT), rozpuszczonych (razem z sondą) w wodnej zawieszynie liposomów DPPC.



Rys. 40. Zależność względnej wartości współczynnika podziału (F/F_0) sondy TEMPO od stężenia związków cyny zawierających chlor, rozpuszczonych (razem z sondą) w wodnej zawieszynie liposomów DPPC. F_0 jest bezwzględnym współczynnikiem podziału sondy TEMPO określonym dla dyspersji liposomów w roztworze wodnym, bez domieszek badanych związków.

Z zależności przedstawionej na Rys. 40 wynika, iż oba badane chlorki powodują upłynnianie warstw powierzchniowych błon liposomów ($F/F_0 > 0$). Dla obu chlorków obserwowano lokalne minimum płynności w okolicach stężenia 1 – 1.5%. Wraz ze wzrostem stężenia obu związków (organicznego i nieorganicznego) współczynnik F/F_0 stabilizował się na poziomie wartości 1,5. Zatem oddziaływanie nieorganicznego SnCl_2 z błonami liposomów prowadziło jak można sądzić do takiego samego ich upłynniania jak oddziaływanie organicznego TriPT.

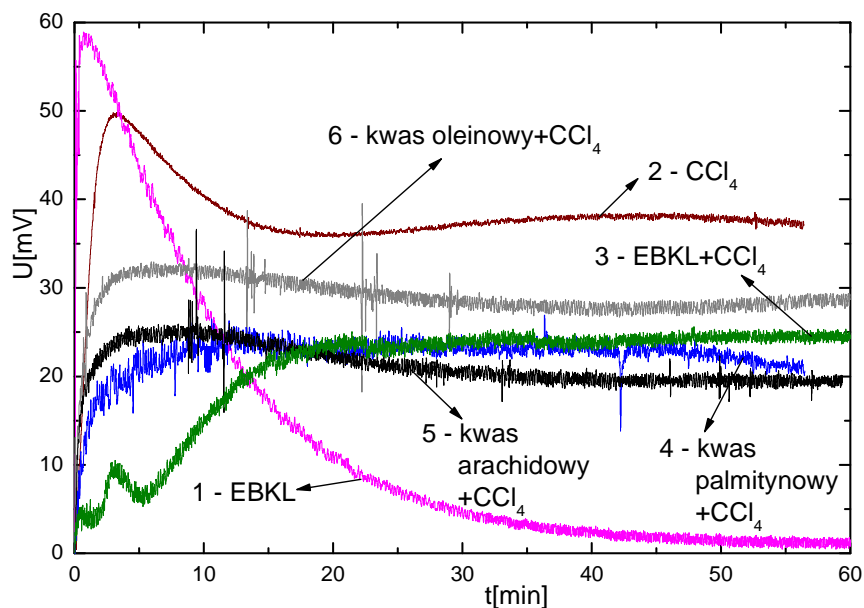
Sonda TEMPO jak wspomniano wyżej przekazuje informację o dynamice warstwy powierzchniowej błon liposomów. Warstwę tą tworzą główki polarne lipidów stanowiące, w przypadku lecytyny DPPC dipole elektryczne. Z tego też względu oddziaływanie z domieszkami jonowymi, lokującymi się w tym rejonie błon, mogą

decydować o wynikach pomiarów współczynnika F/F_0 . Na podstawie prezentowanych w tej pracy wyników badań (Rys. 40) można wnioskować, iż za charakter oddziaływania obu chlorków z błonami liposomów odpowiadają siły elektrostatyczne a wpływ obu związków na błony liposomów w przedziale stężeń powyżej 2,5% jest bardzo podobny.

Badania przeprowadzone techniką sond spinowych EPR z wykorzystaniem sondy TEMPO, wykazały podobieństwa w charakterze oddziaływania różnych związków cyny zawierających chlor z błonami liposomów. Technika ta okazała się czułym narzędziem do badań związków organicznych cyny, nie zawierających chloru. Na podstawie uzyskanych wyników (Rys. 39), popartych badaniami elektrycznymi filtrów impregnowanych EBKL (punkt 4.2.1) można stwierdzić, że TET prawdopodobnie wnikał do wnętrza błon liposomów lub lokował się na ich powierzchni, natomiast TMT nie oddziaływał z badanymi błonami.

4.2.4 Wpływ TriPT na właściwości elektryczne błon w postaci filtrów impregnowanych wybranymi lipidami

Wyniki badań oddziaływania związków metaloorganicznych z filtrami impregnowanymi przez EBKL sugerują, że najefektywniej z takimi błonami oddziałuje chlorek tripropylcyny (TriPT). W celu dokładniejszego poznania charakteru oddziaływania tego związku z błonami lipidowymi w dalszych badaniach, jako impregnat filtru Synpor, zastosowano inne związki lipidowe. Filtry o średnicy por $1,5 \mu m$ i grubości $50 \mu m$, impregnowane były kwasami tłuszczowymi, rozpuszczonymi w czterochlorku węgla (CCl_4). W badaniach stosowano trzy kwasy karboksylowe: palmitynowy (16:0), arachidowy (20:0), oleinowy (18:1 n-9) i rozpuszczalnik tych kwasów (CCl_4) oraz ester butylowy kwasu laurynowego (EBKT). Rys 41 przedstawia zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych substancji impregnujących błony, przy stężeniu $0,15 \text{ mM}$ TriPT w komorze pomiarowej [144].



Rys. 41. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych substancji impregnujących błony, przy stężeniu $0,15 \text{ mM}$ TriPT w komorze pomiarowej. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,65 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

W przypadku gdy filtr był zaimpregnowany związkiem EBKL (krzywa 1 na Rys. 41) napięcie błonowe rośnie (po wprowadzeniu TriPT do komory pomiarowej), uzyskiwało maksimum o wartości ok. 60 mV a następnie maleje do zera po czasie ok. 60 min . Pojawienie się maksimum napięciowego może być wynikiem dwóch przesuniętych w czasie procesów; wnikania do wnętrza błony dodatnich (hydrofobowych) jonów TriPT (wzrost napięcia elektrycznego) a następnie ujemnych (hydrofilowych) jonów Cl^- (spadek napięcia). Dokładniejszy opis wpływu TriPT na filtry impregnowane EBKL na parametry elektryczne (napięcie, opór) znajduje się w rozdziale 4.2.2 tej pracy.

W przypadku CCl_4 (krzywa 2 Rys. 41), napięcie błonowe (po wprowadzeniu TriPT) uzyskiwało wartość maksymalną wynoszącą około 50 mV a następnie maleje stabilizując się na poziomie około 40 mV . Niewielki spadek napięcia a następnie jego stabilizacja na stosunkowo wysokim poziomie 40 mV może oznaczać, że w obecności CCl_4 dodatnie jony TriPT penetrują tylko powierzchnię warstwę błony.

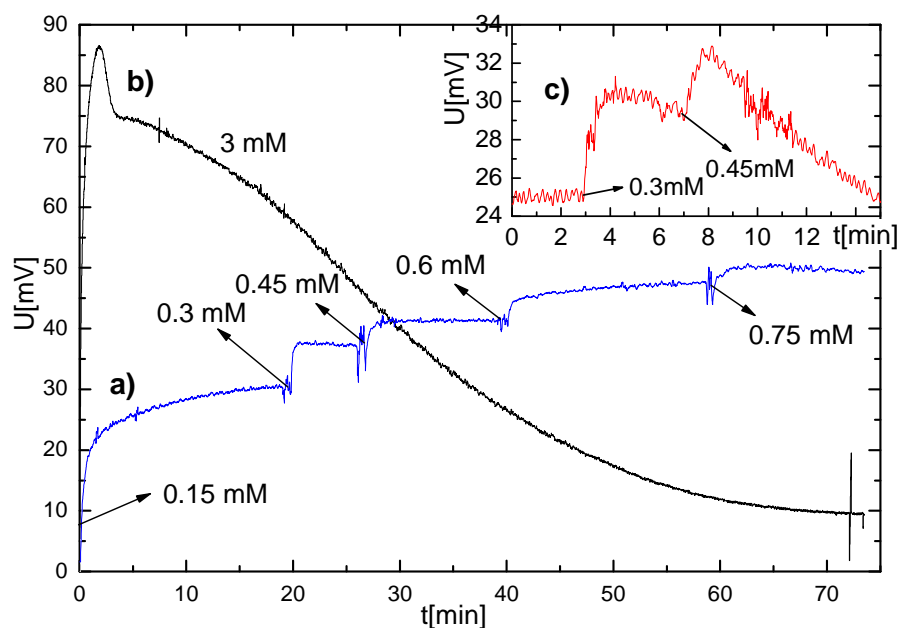
W przypadku kwasów karboksylowych uzyskano podobne przebiegi zależności $U=f(t)$ wywołane obecnością TriPT w otoczeniu błony (krzywe 4,5,6 na Rys. 40). Wartość napięcia błonowego dla tych kwasów, od momentu wkropienia domieszki, rosła a po upływie ok. 30 min. stabilizowała się na poziomie ok. 25 mV. Nie obserwowano natomiast ekstremum napięciowego. Wynik ten może oznaczać, iż oddziaływanie TriPT z błoną miało, w przypadku tych kwasów, również charakter powierzchniowy.

Krzywą $U=f(t)$ uzyskaną dla EBKL rozpuszczonego w CCl_4 (krzywa 3 na Rys. 40) wyróżniały dwa blisko położone maksima napięciowe, o wartościach odpowiednio ok. 5 mV i 10 mV, po uzyskaniu których napięcie błonowe rosło i stabilizowało się na poziomie ok. 25 mV. Położenie maksimów na krzywej 3 odpowiada położeniu maksimów napięciowych uzyskanych odpowiednio dla EBKL (krzywa 1) i CCl_4 (krzywa 2). Podwójne ekstremum napięciowe może być wynikiem różnych oddziaływań TriPT z estrem kwasu laurynowego i z czterochlorkiem węgla stanowiącymi mieszaninę impregnującą błonę. Zarówno kwasy karboksylowe jak i kwas laurynowy obniżają wartość napięcia stabilizacji w porównaniu z napięciem stabilizacji otrzymanym dla CCl_4 , co mogło być spowodowane prawdopodobnie zmniejszoną liczbą adsorbowanych na powierzchni tych błon kationów związku TriPT.

Rys. 42 a) przedstawia zależność napięcia błonowego U dla filtru impregnowanego kwasem palmitynowym rozpuszczonym w CCl_4 , od czasu t , po wprowadzeniu do komory pomiarowej TriPT o różnym stężeniu. Stężenie tego związku zmieniane było w zakresie wartości od 0,15 mM do 0,75 mM.

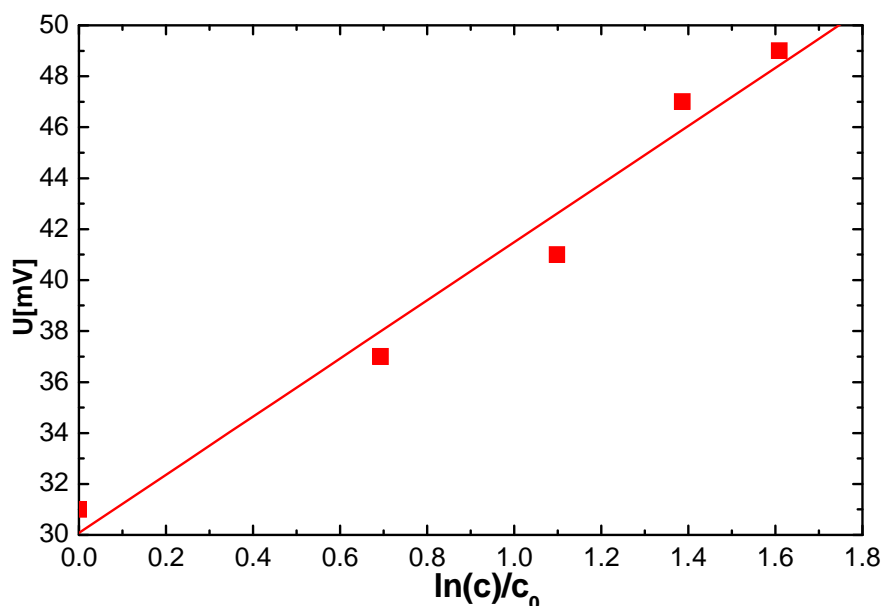
Po każdym wkropieniu domieszki napięcie błonowe rosło a następnie stabilizowało się na wyższym poziomie. Uzyskano w ten sposób krzywą kształtem przypominającą „schodki”. Napięcia stabilizacji dla poszczególnych stężeń przedstawiono na wykresie (Rys. 43) w postaci zależności $U=f(\ln(c))$, która ma kształt linii prostej (podobny kształt zależności $U=f(\ln(c))$ uzyskano w punkcie 4.1, gdzie badano wpływ stężenia KCl na napięcie błonowe filtrów impregnowanych kwasem laurynowym).

Następnie stężenie TriPT zwiększono skokowo do wartości 3 mM. Przy tym stężeniu napięcie błonowe, po uzyskaniu wartości maksymalnej wynoszącej około 90 mV, zaczęło spadać i ustabilizowało się na poziomie około 10 mV (Rys. 42 b). Podobny przebieg zmian napięcia w zależności od czasu obserwowano dla błony impregnowanej estrem kwasu laurynowego (Rys. 41) i mieszaniną tego estru z czterochlorkiem węgla (Rys. 42 c).



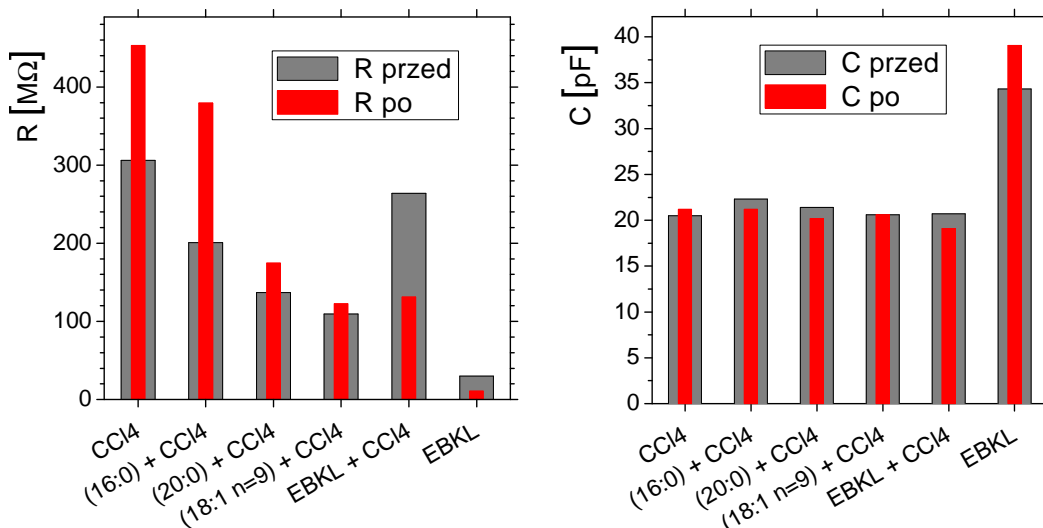
Rys. 42. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń TriPT w komorze pomiarowej; a) i b) dla filtrów impregnowanych kwasem palmitynowym rozpuszczonym w czterochlorku węgla (CCl_4), c) dla filtrów impregnowanych EBKL rozpuszczonym w CCl_4 . Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,6 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Efekt spadku wartości napięcia, w wymienionych wyżej trzech przypadkach, pojawiał się przy różnej wartości stężenia TriPT. Dla błony impregnowanej estrem EBKL wystąpił on przy najmniejszym ze stosowanych w tej pracy stężeniu wynoszącym $0,15 \text{ mM}$. Dla błony impregnowanej mieszaniną tego estru i CCl_4 przy stężeniu $0,45 \text{ mM}$ (Rys. 42 c) a dla błony impregnowanej mieszaniną kwasu palmitynowego i CCl_4 przy stężeniu 3 mM . Uzyskane wyniki wskazują na to, że badany w pracy związek organiczny cyny jest najbardziej aktywny w oddziaływaniu z błoną impregnowaną estrem kwasu laurynowego, mniej aktywny w przypadku mieszaniny tego estru z CCl_4 i najmniej aktywny w przypadku mieszaniny kwasu palmitynowego i CCl_4 . Przyczyną różnych aktywności mogą być różne stopnie hydrofobowości impregnatu błony.



Rys. 43. Zależność napięcia błonowego U filtru impregnowanego kwasem palmitynowym rozpuszczonym w CCl_4 od logarytmu ze stosunku stężenia TriPT c w komorze pomiarowej do najmniejszego, stosowanego w badaniach stężenia $c_0 = 0,15 \text{ mM}$. Odchylenie standardowe od wartości średnich napięć stabilizacji nie przekraczało $\Delta U = 0,6 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Na Rys. 44 zestawiono wartości oporów i pojemności filtrów impregnowanych kwasami tłuszczowymi.



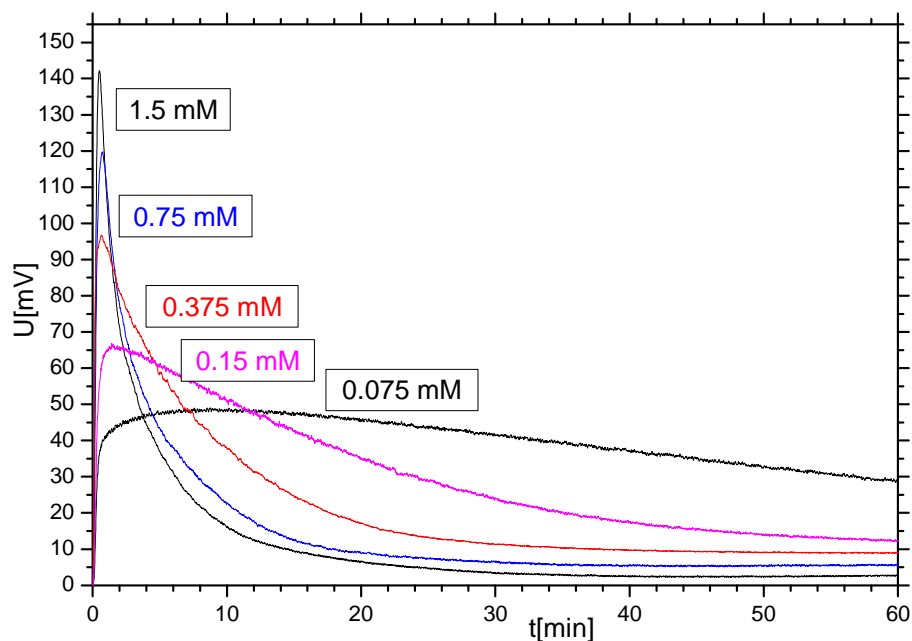
Rys. 44. Zestawienie oporów i pojemności filtrów impregnowanych wybranymi kwasami tłuszczowymi, mierzonych przed wprowadzeniem do komory pomiarowej TriPT (jasne słupki) oraz po wprowadzeniu TriPT i uzyskaniu stabilizacji napięcia błonowego (ciemne słupki). Zmiany pojemności i oporu indukowane były przez stężenie $0,15 \text{ mM}$ TriPT w otoczeniu błony. Błąd pomiaru oporu jak i pojemności nie przekraczał 1%.

Wartości te mierzone były przed wprowadzeniem do komory pomiarowej TriPT (jasne słupki) oraz po wprowadzeniu domieszki i uzyskaniu stabilizacji napięcia (ciemne słupki). Z rysunku wynika, że w obecności TriPT opory badanych błon ulegały zmianie. W przypadku błon impregnowanych kwasami karboksylowymi i CCl_4 opory rosły a w przypadku EBKL malały. Pojemności badanych błon, zawierających rozpuszczone w CCl_4 kwasy karboksylowe oraz EBKL, w niewielkim stopniu malały od chwili wprowadzenia do roztworu komory pomiarowej badanego związku cyny do momentu uzyskania stabilizacji napięcia. Natomiast w przypadku EBKL jak i CCl_4 pojemności rosły. Wzrost pojemności błonowej (obserwowany również na Rys. 38 dla EBKL), jest jak można sądzić związany ze wzrostem względnej przenikalności elektrycznej błony ϵ . Ze wzrostem ilości ładunku związanego z błoną (głównie dodatniego) rośnie jej względna przenikalność elektryczna a maleje ilość ładunku swobodnego, wytwarzającego napięcie błonowe. Wynik ten może być związany z wnikiem do wnętrza błony (filtru impregnowanego EBKL lub CCl_4) kationów TriPT wiążących się następnie z ujemnym ładunkiem filtra. W przypadku, gdy błonę tworzyły filtry impregnowane kwasami karboksylowymi, wkropienie TriPT do komory pomiarowej powodowało zmiany pojemności podobne do obserwowanych podczas wkrapiania KCl do otoczenia błony impregnowanej EBKL. Jony TriPT nie modyfikowały wnętrza błony impregnowanej kwasami karboksylowymi, zatem względna przenikalność elektryczna błony nie ulegała zmianie.

4.3 Badanie wpływu alifatycznych związków metaloorganicznych z rodziny chlorobutylocyn na właściwości elektryczne błon

Prezentowane w rozdziale 4.2.2 wyniki badań wpływu TriPT na parametry fizyczne błon lipidowych wskazują na dużą efektywność oddziaływania tego związku z tymi błonami. W celu dokładniejszego poznania charakteru oddziaływania tego związku z błonami, zbadany został również wpływ innych związków (o podobnej strukturze cząsteczki do TriPT) na parametry elektryczne błon lipidowych. Do grupy takich związków należy rodzina chlorobutylocyn – związków alifatycznych o trzech grupach CH_2 w łańcuchach węglowodorowych (oraz grupie metylowej) a więc o jedną grupę CH_2 w łańcuchu więcej od wcześniej omawianego TriPT. W rodzinie tej można wyróżnić związki zawierające od jednego do trzech takich łańcuchów

węglowodorowych połączonych z cyną na czwartym stopniu utleniania. Pozostałe stopnie uzupełniane są chlorem. Jednym z badanych związków tej rodziny był chlorek tributyllocyny (C_4H_9)₃Cl (TriBT) (Tab. 4). Związek ten zawiera trzy łańcuchy alkilowe i jeden chlor połączone z cyną. Rys. 45 przedstawia zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń TriBT w komorze pomiarowej.



Rys. 45. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń TriBT w komorze pomiarowej (rysunki a i b przedstawiają zależności napięciowe w różnych skalach czasowych). Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie standardowe (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,31 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Na Rys. 45 b) wyeksponowany został obszar maksimum napięciowych. Pomiarów prowadzone były dla pięciu różnych stężeń tego związku. Funkcję błon pełniły filtry o średnicy por $1,5 \mu\text{m}$ i grubości $50 \mu\text{m}$ impregnowane związkiem EBKL. Technika pomiarowa stosowana w tych badaniach była identyczna jak w przypadku badań omawianych w rozdziale 4.2.2 (Rys. 35). TriBT rozpuszczany był w DMF – ie a następnie, z tym rozpuszczalnikiem wkrapiany do komory pomiarowej. Badania prowadzone były przy zastosowaniu układu doświadczalnego opisanego w rozdziale 3.1.

Wartości maksymalne napięć U_m i napięć stabilizacji U_s zamieszczone są w Tab. 6.

Tab. 6. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 120 *min.* od wprowadzenia domieszki TriBT do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

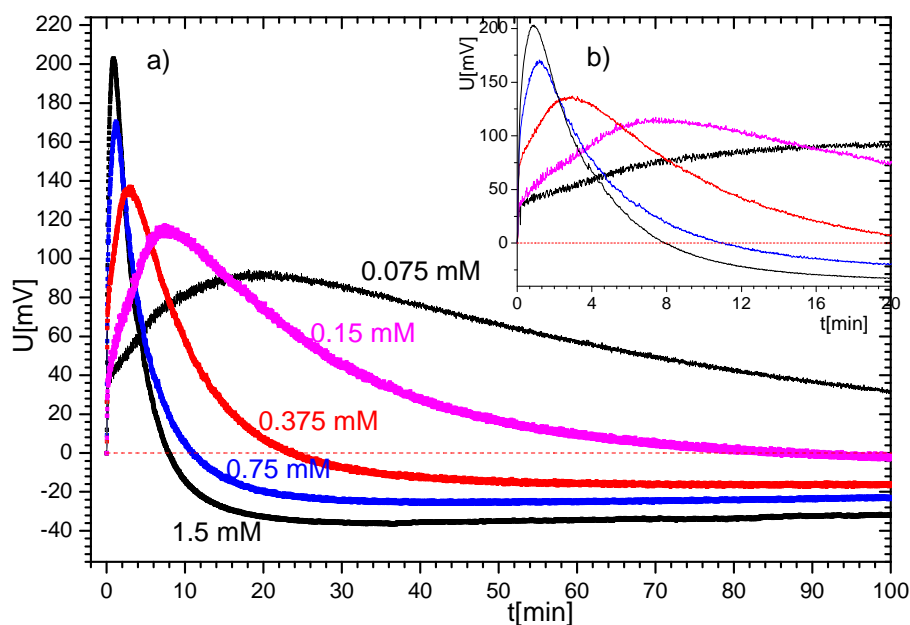
Stężenie w komorze pomiarowej C [mM]	Napięcie maksymalne U_m [mV]	Napięcie stabilizacji U_s [mV]
0,075	38,8	6
0,15	57,1	4
0,375	70,2	-1
0,75	106,6	-4
1,5	109,8	-9,6

Z tabeli tej wynika, że ze wzrostem stężenia TriPT rosło napięcie U_m a malało U_s . Ponadto położenie maksimum napięciowych przesunęło się stronę krótszych czasów t i szybciej dochodziło do stabilizacji napięcia. Podobny efekt obserwowano dla TriPT rozpuszczonego w metanolu i DMF – ie (rozdział 4.2.2). Przebiegi czasowych zależności napięć błonowych generowanych obecnością TriBT w komorze pomiarowej, są bardzo podobne do takich zależności indukowanych obecnością TriPT w otoczeniu błon, prezentowanych w rozdziale 4.2.2. W związku z tym mechanizm oddziaływania tego związku z błonami jest jak można sądzić podobny. Istnieje jednak kilka różnic pomiędzy oddziaływaniem obu związków z błonami, na które należy zwrócić uwagę. Wprowadzenie TriBT do komory pomiarowej powoduje szybki wzrost napięcia błonowego aż do osiągnięcia maksimum, po czym napięcie to maleje i po upływie ok. 120 *min.* ulega stabilizacji, Czas ten jest około dwukrotnie dłuższy od obserwowanego w przypadku TriPT (Rys. 33, 34 i 35).

Dla trzech największych stężeń TriBT napięcia, po uzyskaniu wartości maksymalnej, malały do zera a następnie zmieniały kierunek (potencjał roztworu w komorze pomiarowej z ujemnego stawał się dodatni) uzyskując po upływie ok. 160 *min.* (w przypadku domieszki o stężeniu 1,5 *mM*) wartość 9,6 *mV*. Wartość ta jest większa (bezwzględnie biorąc) od napięcia stabilizacji indukowanego w obecności TriPT (rozprowadzonego w wodnym otoczeniu błony przy wykorzystaniu ultradźwięków) (Rys. 33), które wynosiło 0,4 *mV* (mieści się w granicach błędu) po 60 *min.* od wkropienia 1,5 *mM* tego związku do komory pomiarowej. Natomiast TriPT o tym stężeniu rozpuszczony w DMF – ie (analogiczna procedura pomiarowa jak w przypadku TriBT) nie powodował zmiany znaku napięcia błonowego (Rys. 35). Napięcia maksymalne generowane obecnością różnych stężeń TriBT w komorze pomiarowej (Tab. 6) były mniejsze od napięć maksymalnych generowanych przez analogiczne

stężenia TriPT (Tab. 5). Zatem wzrost długości łańcuchów alkilowych (Alk) w cząsteczkach TriAlk wpływa na zmniejszenie maksymalnych wartości napięć błonowych generowanych przez różne stężenia tych związków. Natomiast wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego rośnie jak można sądzić, efektywność wnikania TriBT do błony, czego odbiciem są wyraźne zmiany polaryzacji napięcia błony, wskazujące na przepływ anionów chloru przez błonę, co jest możliwe dzięki wysyceniu jej kationami TriBT.

Kolejnym badanym związkiem z rodziny chlorobutylocyn był dichlorek dibutylocyny (DiBT) o wzorze $(C_4H_9)_2Cl_2$ (Tab. 4). Związek ten zawiera dwa łańcuchy węglowodorowe połączone z cyną, a więc jest substancją mniej hydrofobową od TriBT. Ze względu na dwa chlory połączone z cyną, DiBT jest jednocześnie bardziej hydrofilowy od TriBT. Rys. 46 przedstawia zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń DiBT (Tab. 4) w komorze pomiarowej.



Rys. 46. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń DiBT w komorze pomiarowej (rysunki a i b przedstawiają zależności napięciowe w różnych skalach czasowych). Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta_U = 0,62 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Na Rys. 46 b) wyeksponowany został obszar maksimów napięciowych. W pomiarach zastosowano technikę i układ pomiarowy identyczne jak w przypadku badań dotyczących TriPT (rozdział 4.2.2). Przebiegi zmian krzywych napięć błonowych

generowanych obecnością DiBT w komorze pomiarowej, są (podobnie jak w przypadku TriBT) również bardzo podobne do krzywych napięć indukowanych obecnością TriPT w otoczeniu błon, prezentowanych w rozdziale 4.2.2. Ze względu na te podobieństwa interpretacja wyników pomiarów uzyskanych dla związku DiBT, jest bardzo podobna do interpretacji wyników przedstawionej w rozdziale 4.2.2. Inne podobieństwa dotyczą położenia maksimów napięciowych. W Tab. 7 zamieszczono wartości maksymalne napięć U_m i napięć stabilizacji U_s .

Tab. 7. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 100 min. od wprowadzenia domieszki DiBT do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

Stężenie w komorze pomiarowej C [mM]	Napięcie maksymalne U_m [mV]	Napięcie stabilizacji U_s [mV]
0,075	94,3	–
0,15	117,3	-2,4
0,375	137,1	-16,3
0,75	170,6	-23,2
1,5	203,1	-31,9

Z tabeli tej wynika, że ze wzrostem stężenia DiBT rośnie napięcie U_m a maleje U_s . Ponadto położenie maksimów napięciowych przesunęło się stronę krótszych czasów t i szybciej dochodziło do stabilizacji napięcia, co było również obserwowane w przypadku wcześniej omawianego TriBT. Natomiast różnice pomiędzy wynikami pomiarów napięć błonowych wcześniej badanych grup związków a DiBT są następujące. Napięcia stabilizacji U_s odczytane dla wszystkich badanych stężeń DiBT (Rys. 46 i Tab. 7) mają znak ujemny, co oznacza, że potencjał roztworu w komorze pomiarowej zmienił polaryzację względem roztworu w komorze odniesienia. Ponadto na Rys. 46 a) a szczególnie na Rys. 47 b) można zauważyć, że maksima uzyskanych krzywych składają się z dwóch, przesuniętych w czasie, pików napięciowych. Efekt ten jest słabo widoczny przy stężeniu 1,5 mM i 0,75 mM i nie był obserwowany w przypadku pozostałych, związków alifatycznych.

Napięcia maksymalne generowane obecnością DiBT w komorze pomiarowej (Tab. 7) były większe od napięć maksymalnych generowanych przez analogiczne stężenia TriPT (Tab. 5) i TriBT (Tab. 6). Przyczyną tych różnic może być brak jednego łańcucha alkilowego oraz obecność jednego dodatkowego chloru w cząsteczkach DiBT (w stosunku do TriBT). Z tych samych powodów, jak można sądzić na podstawie zmian

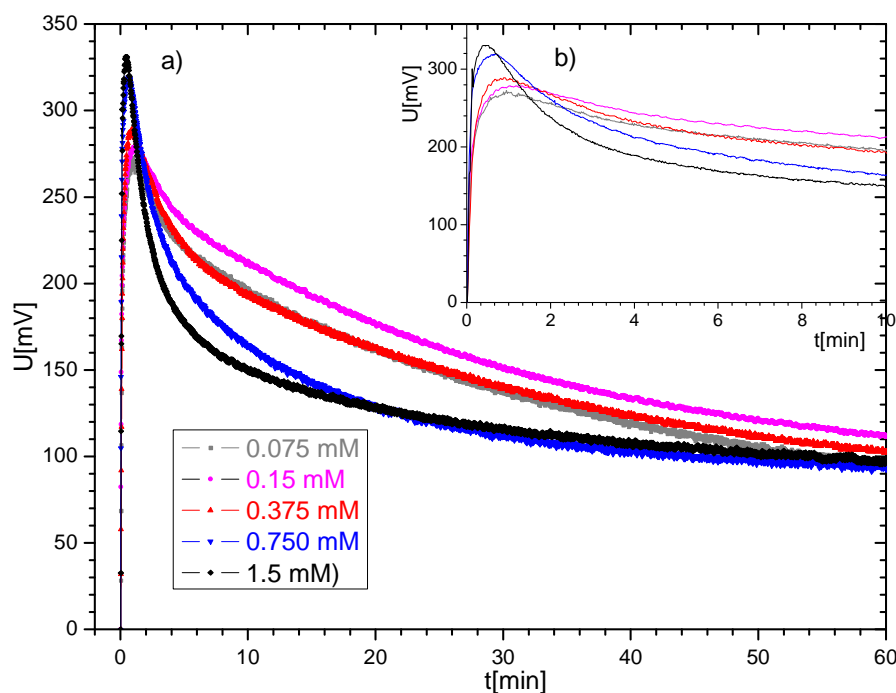
polaryzacji napięcia błonowego generowanych obecnością DiBT, rośnie efektywność wnikania tego związku do błony i jest ona największa spośród omawianych wyżej związków metaloorganicznych.

Mechanizm oddziaływania DiBT z błonami jest bardzo podobny do opisanego wcześniej mechanizmu oddziaływania TriPT o małych stężeniach (Rys. 34), z tą różnicą, że niewielkie stężenia TriPT nie powodowały zmian polaryzacji napięcia. Ze względu na dwa atomy chloru w cząsteczce DiBT związek ten prawdopodobnie tworzy w środowisku wodnym (lub w kontakcie z błoną) kationy jedno jak dwu – dodatnie. Te ostatnie charakteryzuje zwiększona hydrofilowość jak i obniżona hydrofobowość (dwa zamiast trzech łańcuchów alkilowych) w stosunku do jedno-dodatnich jonów TriPT (jak również TriBT), co jest powodem zwiększonej efektywności przenikania tych związków przez błony lipidowe.

Następne badania dotyczyły związku metaloorganicznego z rodziny chlorobutylocyn – trichlorku butylocyny $C_4H_9Cl_3$ (BT) (Tab. 4). Związek ten w swojej strukturze zawiera jeden łańcuch alkilowy i trzy chlory. Jest więc najbardziej hydrofilowy i najmniej hydrofobowy z dotychczas prezentowanych związków tej rodziny. Rys. 47 przedstawia zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń BT w komorze pomiarowej. Na Rys. 47 b) wyeksponowany został obszar maksimum napięciowych. W badaniach zastosowano technikę i układ pomiarowy identyczne jak w przypadku badań prowadzonych dla TriBT oraz DiBT.

Wprowadzenie BT do komory pomiarowej powodowało szybki wzrost napięcia błonowego aż do osiągnięcia maksimum, po czym napięcie to malało i po upływie ok. 60 min. ulegało stabilizacji. Nie obserwowano tak wyraźnego zróżnicowania wartości napięć maksymalnych U_m i napięć stabilizacji U_s jak w przypadku TriBT czy DiBT. Napięcia maksymalne dla badanych stężeń przyjmowały wartości z przedziału 260 – 330 mV, natomiast napięcia stabilizacji 90 – 110 mV. Wraz ze wzrostem stężenia BT w komorze pomiarowej nieznacznie rosło napięcie U_m a malało U_s . Natomiast położenie maksimum napięciowych przesunęło się stronę krótszych czasów t .

Pojawienie się maksimum napięciowych jest, jak można sądzić, wynikiem wnikania do wnętrza błony hydrofobowych kationów BT (powstałych w wyniku dysocjacji BT), co powoduje wzrost napięcia a następnie ujemnych (hydrofilowych) jonów Cl^- (spadek napięcia). Nie obserwuje się natomiast zmiany znaku napięcia transbłonowego, co może oznaczać, że w tym przypadku jony chloru w błonie (podążającego za jonami dodatnimi) nie dyfundują do komory odniesienia.



Rys. 47. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń BT w komorze pomiarowej (rysunki a i b przedstawiają zależności napięciowe w różnych skalach czasowych). Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,87 \text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Maksymalne napięcia błonowe wyniosły dla stężenia $1,5 \text{ mM}$ poszczególnych związków odpowiednio TriBT, DiBT i BT ok. 110 mV , 200 mV i 330 mV . Oznacza to, że efektywność generowania napięcia błonowego przez związki z rodziny butylocyn jest największa dla BT i zależy prawdopodobnie od liczby chlorów przyłączonych do cyny, dzięki czemu efektywny ładunek elektryczny związku BT, uzyskany w wyniku dysocjacji, może być trzy razy większy niż w przypadku TriBT. Należy jednak zwrócić uwagę, iż wraz ze wzrostem liczby chlorów maleje liczba łańcuchów alkilowych, nadających cząsteczkom butylocyn właściwości hydrofobowe. Dlatego też, jak można sądzić, obniżona efektywność wnikania do wnętrza błon przez BT w stosunku do DiBT oraz TriBT spowodowana była tym, że związek ten był najmniej hydrofobowy spośród badanych chlorobutylocyn.

Zmiana polaryzacji napięcia na przeciwną jest interpretowana w tej pracy jako zjawisko wywołane przepływem anionów chloru przez błonę. Ujemne napięcie stabilizacji było największe (bezwzględnie biorąc) dla DiBT, a nie dla najbardziej

hydrofobowego z rodziny chlorobutylocyn TriBT. Efektywność tego procesu zależy prawdopodobnie od stopnia zarówno hydrofobowości jak i hydrofilowości cząsteczek badanych chlorobutylocyn w stosunku do hydrofilowych właściwości ujemnie naładowanego filtru jak i właściwości hydrofobowych, pełniącego funkcję jego impregnatu EBKL. Uzyskane wyniki wskazują, iż efektywność oddziaływania z błoną prezentowanych wyżej związków metaloorganicznych maleje w następującej kolejności: DiBT, TriBT, TriPT oraz BT.

4.4 Badanie wpływu wybranych węglowodorów aromatycznych na właściwości elektryczne błon

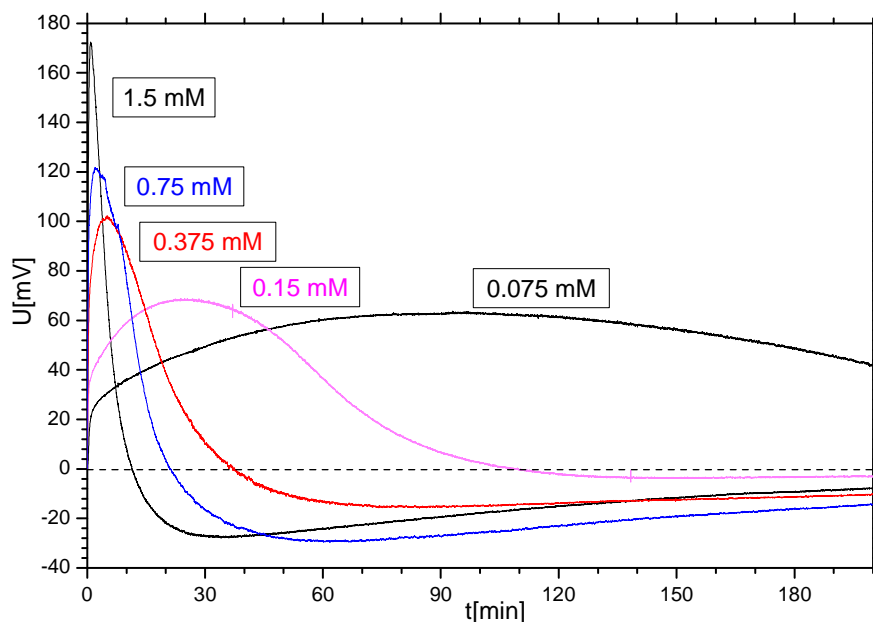
Kolejną grupę badanych związków stanowiły pochodne węglowodorów aromatycznych. Związki te, zamiast łańcuchów węglowodorowych zawierają pierścienie fenyłowe połączone z cyną. Badania prowadzone były dla następujących związków tej grupy: chlorku trifenylocyny ($(C_6H_5)_3SnCl$ (TPhT), chlorku trifenylołowiu ($(C_6H_5)_3PbCl$ (TPhL), dichlorku difenylocyny ($(C_6H_5)_2SnCl_2$ (DPhT), trichlorku fenylocyny ($(C_6H_5)SnCl_3$ (PhT) (Tab. 4). Badano wpływ tych związków na parametry elektryczne filtrów o średnicy por $1,5 \mu m$ i grubości $50 \mu m$, impregnowanych EBKL. Technika i układ pomiarowy były identyczne jak w rozdziale 4.2.2 oraz 4.3.

Pierwszym z badanych związków z grupy węglowodorów aromatycznych był TPhT. Związek ten zawiera trzy grupy fenyłowe i jeden atom chloru połączone z cyną, co wskazuje na niesymetryczną budowę cząsteczki podobnie jak w przypadku TriPT i TriBT.

Tab. 8. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 200 min. od wprowadzenia domieszki TPhT do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

Stężenie w komorze pomiarowej C [mM]	Napięcie maksymalne U_m [mV]	Napięcie stabilizacji U_s [mV]
0,075	63,6	41,9
0,15	68,7	-3,0
0,375	102,2	-10,3
0,75	121,7	-14,5
1,5	172,4	-7,9

Rys. 48 ilustruje zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń tego związku [145]. Obecność TPhT w komorze pomiarowej powodowała pojawienie się napięcia błonowego, które rosło w miarę upływu czasu aż do osiągnięcia wartości maksymalnej U_m . Podobnie jak w przypadku omawianych wcześniej alifatycznych związków metaloorganicznych, ze wzrostem stężenia tego związku rosły wartości U_m (Tab. 8) a ich położenie przesuwało się w stronę krótszych czasów.

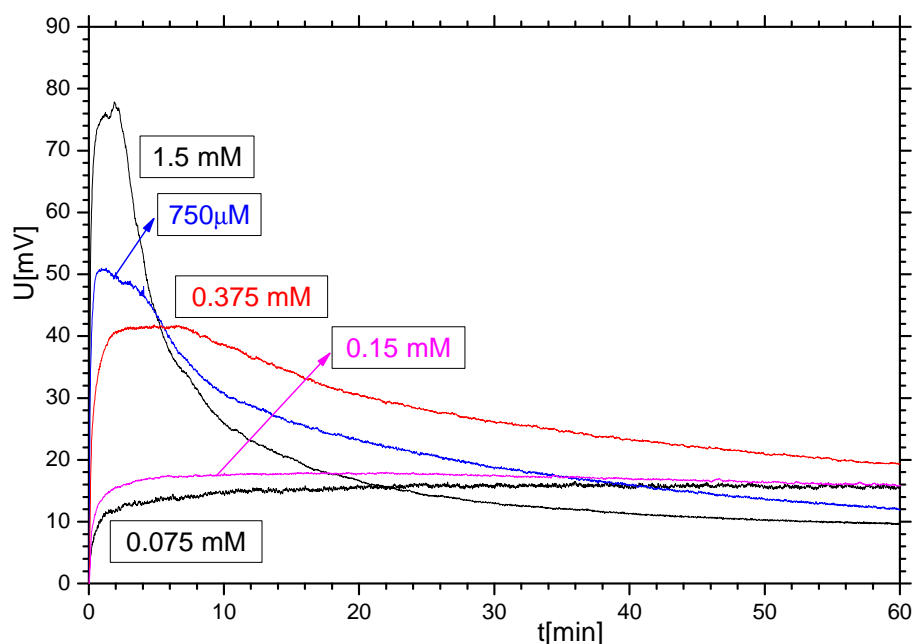


Rys. 48. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń domieszki TPhT w komorze pomiarowej. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U=0,16\text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Z Rys. 48 wynika, że napięcia błonowe, indukowane obecnością TPhT wykazują cechy podobne do związków TriPT, TriBT i DiBT. Wszystkie te związki charakteryzują maksima napięciowe oraz zmiana znaku napięcia elektrycznego na przeciwny przy stężeniach wyższych od $0,075\text{ mM}$. W przypadku $0,075\text{ mM}$ stężenia napięcie stabilizacji zbliżało się do zera. Uzyskane wyniki mogą oznaczać, że powyżej pewnego stężenia, kationy cząsteczki związku TPhT, wnikając do wnętrza błony modyfikują jej strukturę tak, że staje się ona w pewnym stopniu przepuszczalna dla hydrofilowych anionów Cl^- , podobnie jak to było w przypadku omawianych w rozdziale 4.3

alifatycznych związkach metaloorganicznych. Ze względu na te podobieństwa, mechanizm oddziaływania pierścieniowego TPhT z błonami jest jak można sądzić podobny do prezentowanego w rozdziale 4.2.2 dla TriPT oraz 4.3 dla związków z rodziny chlorobutylocyn. Wyniki przedstawione na Rys. 48 potwierdzają również prezentowaną w rozdziale 4.3 koncepcję, według której czynnikiem decydującym o efektywności oddziaływania badanego związku z błoną jest zarówno stopień jego hydrofobowości jak i hydrofilowości.

Kolejnym badanym związkiem z grupy węglowodorów aromatycznych był TPhL. Wybrano ten związek, ponieważ tworzy on identyczną strukturę cząsteczki jak TPhT, z tą różnicą, że miejsce cyny zajmuje ołów, dzięki czemu można było zbadać wpływ innego rodzaju metalu ulokowanego w części centralnej cząsteczek węglowodorów aromatycznych na właściwości elektryczne filtrów impregnowanych związkiem EBKL. Rys. 49 przedstawia zależność napięcia błonowego od czasu dla różnych stężeń związku TPhL (Tab. 4).



Rys. 49. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń domieszki TPhL w komorze pomiarowej. Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U=0,2\text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

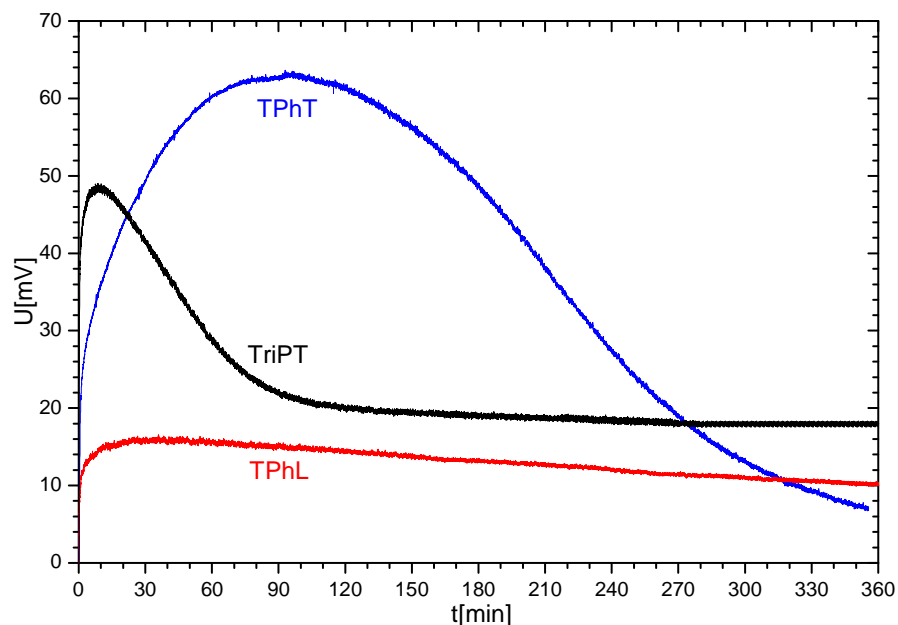
Przy dwóch najniższych stężeniach TPhL (0,075 mM i 0,015 mM) napięcia błonowe stabilizowały się na poziomie kilkunastu miliwolt nie uzyskując ekstremum. Brak ekstremum napięciowego może oznaczać, że przy tych stężeniach związek TPhL oddziaływał tylko z warstwą powierzchniową błony, nie wnikając do jej wnętrza. Podobny efekt obserwowano w przypadku nieorganicznego chlorku potasu w pracy [139, 140]. Przy wyższych stężeniach TPhL napięcia błonowe uzyskiwały wartości ekstremalne (ponad dwukrotnie niższe aniżeli w przypadku TPhT) i stabilizowały się po około 60 min. nie zmieniając polaryzacji (Tab. 9).

Tab. 9. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 360 min. od wprowadzenia domieszki TPhL do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

Stężenie w komorze pomiarowej C [mM]	Napięcie maksymalne U_m [mV]	Napięcie stabilizacji U_s [mV]
0,075	16,5	15,6
0,15	18,0	15,8
0,375	41,5	19,4
0,75	50,8	12,0
1,5	77,4	9,7

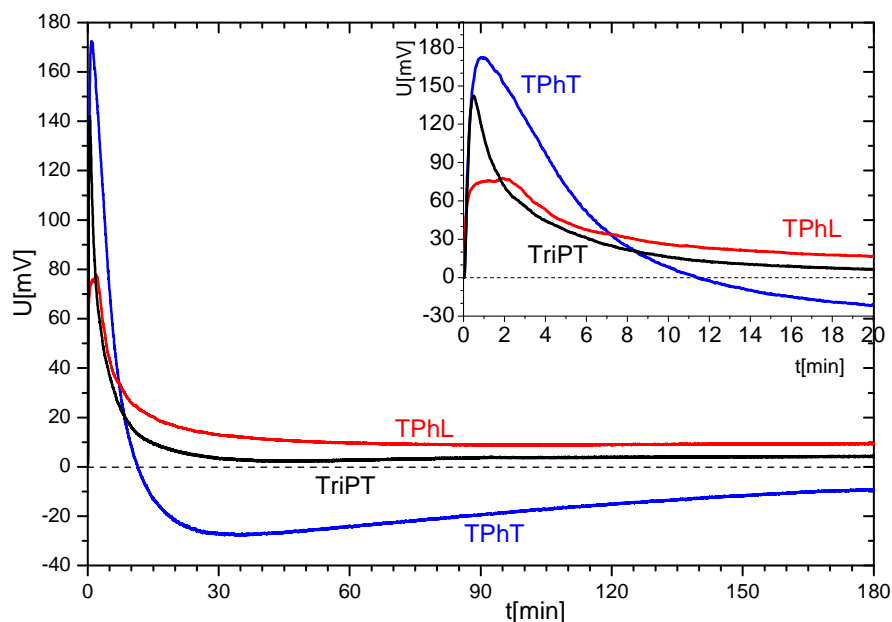
Uzyskane wyniki wskazują na znacznie mniejszą efektywność oddziaływania związku ołowiu z błoną w porównaniu ze związkiem cyny (TPhT) o analogicznej strukturze.

Rys. 50 przedstawia zestawienie zależności napięć błonowych od czasu, indukowanych w obecności TPhT oraz TPhL (w komorze pomiarowej) o stężeniu tych związków wynoszącym 0,075 mM. Dla porównania na rysunku tym zamieszczono wykres zależności napięcia błonowego indukowanego obecnością TriPT w komorze pomiarowej o identycznym stężeniu równym 0,075 mM. Rysunek pokazuje zróżnicowanie dynamiki i wielkości zmian napięć błonowych indukowanych obecnością poszczególnych związków. Czas, po którym występowały maksima napięciowe w obecności TriPT oraz TPhL wynosił odpowiednio ok. 10 i 30 min., natomiast w przypadku TPhT ok. 95 min. Z pośród badanych związków, o stężeniu 0,075 mM. TPhT wykazywał największą efektywność w wytwarzaniu napięć błonowych, mniej efektywny był TriPT, natomiast najmniej efektywny – TPhL.



Rys. 50. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla związków TriPT, TPhT i TPhL o stężeniu $0,075 \text{ mM}$.

Rys. 51 przedstawia zestawienie zależności napięć błonowych od czasu dla badanych węglowodorów aromatycznych, których stężenie było najwyższe i wynosiło $1,5 \text{ mM}$. Dla porównania na rysunku zamieszczono wykres zależności napięcia błonowego od czasu, indukowanego obecnością TriPT o takim samym stężeniu.



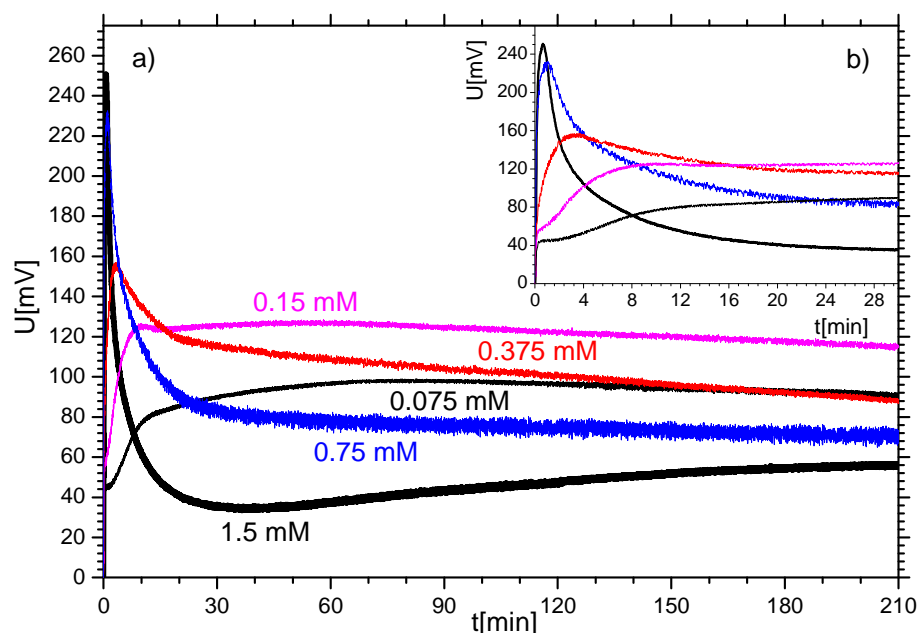
Rys. 51. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla badanych w pracy związków o stężeniu $1,5 \text{ mM}$ (rysunki a i b przedstawiają zależności $U=f(t)$ w różnych skalach czasowych).

Przy stężeniu $1,5\text{ mM}$, wszystkie badane związki wytwarzały ostre maksima napięcia błonowego. Napięcia te, po uzyskaniu maksimum, bardzo szybko malały do zera, ale tylko w przypadku związku TPhT, zmieniały polaryzację. TPhT najefektywniej jak można sądzić wnikał do wnętrza błony i umożliwiał transport anionów.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż efektywność oddziaływania węglowodorów aromatycznych z błonami lipidowymi jest największa w przypadku związku cyny (TPhT) a w szczególności jest ona większa aniżeli efektywność oddziaływania związku ołowiu (TPhL), pomimo identycznej struktury ich cząsteczek. Podobne wnioski wynikają z pracy [146] dotyczącej oddziaływań TPhT i TPhL z dwuwarstwami lipidowymi, w której metodą H-NMR prowadzone były badania wpływu tych związków na strukturalne i dynamiczne parametry błon liposomów preparowanych z lecytyny pochodzącej z żółtek jaj kurzych.

Kolejnym badanym węglowodorem aromatycznym był DPhT (Tab. 4). Struktura tego związku różni się od TPhT przede wszystkim tym, że jest symetryczna: cząsteczka tego związku zawiera po 2 grupy fenylowe i 2 chlory połączone z cyną. Związek ten jest więc bardziej hydrofilowy i jednocześnie mniej hydrofobowy od TPhT. Na Rys. 52 przedstawiona została zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń DPhT w komorze pomiarowej. Na Rys. 52 b) wyeksponowany został obszar maksimumów napięciowych. W badaniach zastosowano technikę i układ pomiarowy identyczne jak w przypadku związków TPhT i TPhL.

Przebiegi zmian krzywych napięć błonowych, generowanych obecnością DPhT w komorze pomiarowej, są bardzo podobne do krzywych napięć indukowanych przez DiBT prezentowanych w rozdziale 4.3. Interpretacja wyników pomiarów uzyskanych przy zastosowaniu DPhT, jest również taka sama jak w przypadku związku DiBT. Podobieństwa dotyczą również położenia maksimumów napięciowych. Napięcia błonowe, po osiągnięciu maksimum malały i za wyjątkiem stężenia równego $0,075\text{ mM}$, ulegało stabilizacji po upływie ok. 210 min .



Rys. 52. Zależność napięcia błonowego U od czasu t dla różnych stężeń domieszki DPhT w komorze pomiarowej (rysunki a i b przedstawiają zależności $U=f(t)$ w różnych skalach czasowych). Na rysunku zaprezentowano zależności $U=f(t)$ będące uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta_U=2,1\text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Wartości maksymalne napięć U_m i napięć stabilizacji U_s zamieszczone są w Tab. 10. Z tabeli tej wynika, że ze wzrostem stężenia DPhT rosło napięcie U_m , a poza najmniejszym stężeniem, wynoszącym $0,075\text{ mM}$, mało U_s .

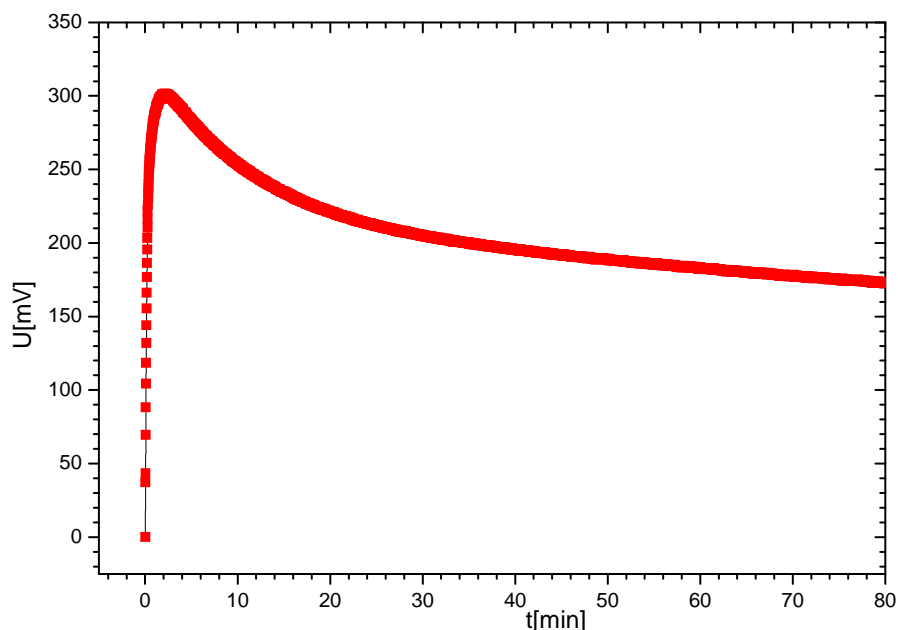
Tab. 10. Napięcia maksymalne U_m oraz napięcia stabilizacji U_s odczytane po 210 min . od wprowadzenia domieszki TriPT do komory pomiarowej (dla różnych stężeń tego związku).

Stężenie w komorze pomiarowej $C\text{ [mM]}$	Napięcie maksymalne $U_m\text{ [mV]}$	Napięcie stabilizacji $U_s\text{ [mV]}$
0,075	98,9	91,3
0,15	128,4	115,7
0,375	157,2	88,2
0,75	232,5	72,2
1,5	250,8	56,1

Ponadto nie obserwowano zmiany polaryzacji napięcia błonowego, co było charakterystyczne dla większości badanych związków alifatycznych a szczególnie dla DiBT i TPhT. Na Rys. 52 b) można zauważyć, że maksima prezentowanych krzywych pochodzą ze złożenia dwóch, przesuniętych w czasie pików napięciowych. Podobny efekt obserwowany był w przypadku alifatycznego związku DiBT (rozdział 4.3).

DPhT prawdopodobnie wnika do wnętrza błon, ale nie modyfikuje ich struktur tak, aby możliwy był transport anionów. Napięcie elektryczne stabilizuje się na poziomie z przedziału wartości od ok. 56 mV do 116 mV , co wskazuje, iż związek ten prawdopodobnie nie penetruje całej błony a jedynie pewną jej warstwę, pozostawiając pozostałą część błony niezmodyfikowaną. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest prawdopodobnie obniżona (w stosunku do TPhT) hydrofobowość tego związku.

Kolejnym badany związek był PhT, który zawiera w swojej strukturze tylko jedną grupę fenylową i 3 chlory połączone z cyną. Do wykonania badań zastosowano technikę i układ pomiarowy identyczne jak w przypadku badań prowadzonych z TPhT, TPhL i DPhT. Na Rys. 53 zaprezentowana została krzywa uzyskana dla jednego stężenia PhT.



Rys. 53. Zależność napięcia błonowego U od czasu t indukowana obecnością PhT w komorze pomiarowej. Wykres ten zawiera krzywą pomiarową dla jednego ze stężeń, ponieważ pozostałe stężenia PhT w komorze pomiarowej generowały krzywe identyczne. Na rysunku zaprezentowano zależność $U=f(t)$ będącą uśrednieniem co najmniej dwóch pomiarów (przeprowadzonych dla tego samego stężenia). Odchylenie od wartości średniej (krzywej prezentowanej na wykresie) nie przekraczało 10%. Natomiast odchylenie (szum generowany przez układ) nie przekraczało $\Delta U = 0,3\text{ mV}$. Stężenia w komorze pomiarowej określone zostały z dokładnością do 5%.

Pozostałe stężenia tego związku w komorze pomiarowej generowały identyczne krzywe zmian napięcia błonowego. Wprowadzenie PhT do komory pomiarowej powodowało szybki wzrost napięcia błonowego aż do osiągnięcia maksimum ok. 300 mV, po czym napięcie spadało i po upływie ok. 80 min. ulegało stabilizacji na poziomie ok. 170 mV. Niewielki spadek napięcia od wartości maksymalnej a następnie jego stabilizacja na stosunkowo wysokim poziomie może oznaczać, że zachowujące się jak dodatnie jony cząsteczki PhT penetrują tylko warstwę powierzchniową błony. Związek ten ze względu na jedną grupę fenyłową ma najsłabsze właściwości hydrofobowe i przez to ograniczone możliwości penetrowania filtrów impregnowanych hydrofobowym EBKL. Efektywność oddziaływania PhT z badanymi błonami była najmniejsza z pośród badanych węglowodorów aromatycznych.

5 Wnioski końcowe

Na podstawie uzyskanych w pracy wyników badań można sformułować następujące wnioski:

1. Zarówno nieorganiczne jak i organiczne związki metali w kontakcie z błonami w postaci filtrów (zawierających w swojej strukturze nieskompensowany ładunek ujemny) impregnowanych kwasami tłuszczowymi, generują napięcia elektryczne o ujemnej polaryzacji w komorze pomiarowej (do której były one wprowadzane).
2. W przypadku związków nieorganicznych wartość napięcia szybko rośnie w miarę upływu czasu a następnie stabilizuje się na określonym poziomie. Napięcie stabilizacji z kolei rośnie proporcjonalnie ze wzrostem logarytmu stężenia badanych związków. Oddziaływanie tych związków z tymi błonami ma jak można sądzić charakter powierzchniowy.
3. Związki metaloorganiczne takie jak TriPT, TriBT, TPhT oraz DiBT, w odróżnieniu od nieorganicznych, generują napięcia, których wartości po uzyskaniu maksimum szybko maleją i stabilizują się na poziomie bliskim zera. Przy odpowiednio dużym stężeniu tych związków napięcie zmienia polaryzację i stabilizuje się na wartościach ujemnych. Efekt ten jest najsilniejszy dla DiBT, słabszy dla TPhT i TriBT a najsłabszy dla TriPT. Wymienione wyżej związki wnikają, jak można sądzić, w postaci organicznych kationów do wnętrza błony,

zostawiając w komorze pomiarowej nadmiar jonów chloru. Te z kolei, ze względu na hydrofobowe właściwości błony, podążają za kationami z pewnym opóźnieniem. W wyniku tych dwóch procesów napięcie błonowe uzyskuje wartość maksymalną a następnie szybko maleje. Zmiana polaryzacji napięcia błonowego, jest jak można sądzić wywołana przepływem jonów chloru przez błonę, której struktura uległa modyfikacji spowodowanej zaabsorbowanymi kationami. Efektywność tego procesu zależy zarówno od stężenia jak też hydrofobowych i hydrofilowych właściwości badanych związków, a ich oddziaływanie z błonami ma jak można sądzić charakter objętościowy.

4. Związki zawierające w swojej strukturze więcej niż jeden chlor (poza DiBT) takie jak BT, DPhT, PhT indukują napięcia błonowe, które po uzyskaniu wartości maksymalnej szybko maleją i stabilizują się na określonym, stosunkowo wysokim poziomie. Jednak w odróżnieniu od związków omawianych w punkcie 3 nie powodują zmiany polaryzacji napięcia. Brak zmiany polaryzacji w przypadku tych związków może być spowodowany mniejszym stopniem hydrofobowości w porównaniu ze związkami wymienionymi w punkcie 2.
5. Efektywność oddziaływania TPhT i TPhL z błonami jest większa w przypadku związku cyny (TPhT) aniżeli związku ołowiu (TPhL), pomimo identycznej struktury ich cząsteczek.
6. Wyniki pomiarów prowadzonych techniką sond spinowych EPR wykazały, iż nie zawierający chloru metaloorganiczny związek tetraetylocyny (TET) oddziałuje z powierzchniową warstwą błon liposomów, formowanych z lecytyny syntetycznej DPPC, powodując upłynnienie tej warstwy (przy stężeniach powyżej 2,5%). Natomiast obecność związku tetrametylocyny (TMT) w wodnej dyspersji liposomów nie powodowała zauważalnych zmian płynności tej warstwy liposomów. Z drugiej strony obydwie te związki, badane metodą elektryczną, nie indukowały mierzalnych wartości napięć błonowych.

Zastosowana w pracy metoda elektryczna, okazała się czułym narzędziem w detekcji efektywności oddziaływania związków metaloorganicznych z błonami modelowymi w postaci filtrów (zawierających nieskompensowany ujemny ładunek elektryczny) impregnowanych związkami lipidowymi. Metoda ta jest szczególnie wrażliwa na obecność związków ulegających dysocjacji (np. chlorków) bądź też

wykazujących w kontakcie z błoną obecność nieskompensowanego ładunku elektrycznego. Ponadto badania prowadzone tą metodą pozwalają na rozróżnienie efektywności oddziaływania z błonami związków w zależności od rodzaju metalu, obecnego w ich strukturze. Metoda ta była mało wrażliwa przy badaniu związków nie wykazujących cech naelektryzowania. Do badania tego typu związków bardziej przydatna jak się wydaje jest metoda EPR.

III Literatura

- [1] R. Thoruton Morrison, R. Nelson Boyd, *Chemia organiczna tom 1*, PWN W-wa, 1998, 124.
- [2] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, PWN W-wa, 2003, 297-359.
- [3] D. B. Hames, N. M. Hooper, *Biochemia, krótkie wykłady*, PWN W-wa, 2007, 133 - 140.
- [4] S. Przestalski, *Błony biologiczne*, Wiedza Powszechna W-wa, 1983.
- [5] I. Żak, *Chemia medyczna*, Śląska Akademia Medyczna, 2001, 192-220.
- [6] R. Harrison, G. G. Lunt, *Błony biologiczne*, PWN W-wa 1980, 54-89.
- [7] W Leśniak, Z. Poremska, *Budowa i funkcja błony komórkowej*. Polskie Towarzystwo biochemiczne, W-wa, 1993, 1-28.
- [8] S. Kalinowski, *Elektrochemia membran lipidowych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego, Olsztyn, 2004, 20-25.
- [9] G. van Meer, *Plasma membrane cholesterol pools*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1987, 12, 375-376.
- [10] M. A. Singer, L. Finegold, *Cholesterol interacts with all of the lipid in bilayer membranes. Implications for models*. *Biophys. J.* 1990, 57, 153-156.
- [11] H. L. Scott, *Lipid-cholesterol interactions. Monte Carlo simulations and theory*. *Biophys. J.* 1991, 59, 445-455.
- [12] A. J. Robinson, W. G. Richards, P. J. Thomas, M. M. Hann, *Behavior of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: A molecular dynamics study*. *Biophys. J.* 1995, 68, 164-170.
- [13] T. Parasassi, A. M. Giusti, M. Raimondi, E. Gratton, *Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations*. *Biophys. J.* 1995, 68, 1895-1902.
- [14] T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton, *Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence*. *Biophys. J.* 1994, 66, 120-132.
- [15] J. Jelińska, *Kwasy tłuszczowe – czynniki modyfikujące procesy nowotworowe*. *Biul. Wydz. Farm. AMW*, 2005, 1, <http://www.farm.amwaw.edu.pl/~axzimni/biuletyn/>.
- [16] R. Cotterill, *Biophysic*, Jon Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2006, 161-186.
- [17] D. Marsh, *CRC Handbook of lipid bilayers*. CRC Press: Boca Raton, 1990.
- [18] K. Kubica, M Langner, J Gabrielska, *The dependence of Fluorescein-PE fluorescence intensity on lipid bilayer state. Evaluating the interaction between the probe and lipid molecules*. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003, 8, 943-954.
- [19] S.J. Singer, G.L. Nicolson *The fluid mosaic model of the structure of cell membrane*. *Science*, 1972, 175, 720-731.
- [20] W. G. Iwkov, G. N. Bieriestowskij, *Lipidnyj bistoj biologiczieskich miembran*. Izdatielstwo „Nauka” Moskwa, 1982.
- [21] D. Man, R. Olchawa and M. Podolak, *Examining Equilibrium States of a System of Dipoles Simulating the Surface Layer of Lipid Membranes*. *Molecular Physics Reports*, 2004, 39, 175-178.
- [22] D. Man, R. Olchawa, M. Podolak and G. Engel, *Effect of temperature on the electric domains forming in dipole system of the lipid membranes layers simulating - a computer model*. *Visnyk of Lviv Univ. Ser. Physic.* 2005, 38, 304-309.

- [23] D. Man, M. Podolak and R. Olchawa. The influence of an ion admixture on the binding energy of an electric dipoles system simulating the surface layer of a lipid membrane: a computer model. *Visnyk of Lviv Univ . Ser. Physic.* 2007, 40, 280-286.
- [24] K. Simons, G. van Meer, Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 1988, 27, 197-202.
- [25] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387, 569-572.
- [26] D. A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1998, 14, 111-136.
- [27] K. Simons, D. Toomre Lipids rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000, 1 31-39.
- [28] Miesięcznik popularnonaukowy *Problemy*, ISSN 0032 – 9487, 1992, (1) 545.
- [29] H. T Tien, *Bilayer lipid membranes: theory and practice.* Marcel Deccer Inc., New York, 1974.
- [30] C. J. Bender, H. T. Tien, Electrical properties of bilayer lipid membranes containing iodine and iodide, investigated by cyclic voltammetry., *Anal. Chim Acta*, 1987, 201, 51-58.
- [31] R. G. Ashcrodt, K. R. Thulborn, J. R. Smith, H. G. L. Coster, W. H. Sawyer, Perturbations to lipid bilayers by spectroscopic probes as determined by dielectric measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 602, 299-308.
- [32] D. R Laver, J. R. Smith, H. G. L Coster, The thickness of the hydrophobic and polar regions spholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 772, 1-9.
- [33] M. M. Kozlov, V. S. Markin, Effects of discreteness of change on the potential distribution in bilayer lipid membranes. *Biophysics*, 1982, 27, 652-658.
- [34] R. J. Clarke, Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1327, 269-278.
- [35] U. J. Krull, M. Thompson, H. E. Wong, Chemical modification of the bilayer lipid membrane biosensor dipolar potential. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1986, 15, 371-382.
- [36] J. de Gier, Permeability barriers formed by membrane lipids. *Biochim Biophys. Acta*, 1992, 27, 1-10.
- [37] R. J. Clarke, The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2001, 89-90, 263-281.
- [38] J. Koryta, J. Dworak, V Bohackova, *Elektrochemia.* PWN W-wa, 1980, 212-238.
- [39] K. Oohira, K. Toko, Theory of electric characteristics of the lipid/PVC/DOPP membrane and PVC/DOPP membrane in response to taste stimuli. *Biophysical Chemistry*, 1996, 61 (1), 29-35.
- [40] M. T. Tosteson, J. O. Wieth, Tributyltin-mediated exchange diffusion of halides in lipid bilayers. *J. of General Physiology*, 1979, 73 (6), 789-800.
- [41] I. T. Boyer, Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, 1989, 55, 253-298.
- [42] M. Strmac, T Braunbeck, Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1999, 44, 25-39.
- [43] G. Huang, Z. Song, G Liu, W Zhang, Toxic effect of triphenyltin chloride on the alga *Spirulina subsalsa*. *Appl. Organometal. Chem.* 2002, 16, 117-122.
- [44] F. Cima, P. J. Craig, C. Harrington, *Organometallic compounds in the environment*, Wiley, Chichester, 2003, 101-149.

- [45] C. Mansueto, L. Villa, P. D'Agati, V. Marcianò, C. Pellerito, T. Fiore, M. Scopelliti, L. Nagy, L. Pellerito, Effects of tributyltin(IV) chloride on fertilization of *Styela plicata* (Ascidiacea: Tunicata): II. Scanning and transmission electron microscopy studies. *Appl. Organometal. Chem.* 2003, 17, 553-560.
- [46] J. K. Piotrkowski, *Podstawy toksykologii*, PWN W-wa, 2006, 222-331.
- [47] J. A. Crowe, Organotin compounds in agriculture since 1980 Part 1. Fungicidal, bactericidal and herbicidal properties. *Appl. Organomet. Chem.* 1987, 1, 143-155.
- [48] K. M. Attar, Analytical methods for speciation of organotin in the environment. *Appl. Organomet. Chem.* 1996, 10, 317-337.
- [49] K. Fent, Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 1996, 26(1), 1-117.
- [50] M. Hoch, Organotin compounds in the environment – an overview. *Appl. Geochem.* 2001, 16, 719-743.
- [51] G. J. Laughlin, J. A. Todd, Evidence for early bronze age tin ore processing. *Materials Characterization*, 2000, 45, 269-273.
- [52] P. J. Craig, G. Eng, R. O. Jenkins, *Organometallic compounds in the environment*, Willey, Chichester, 2003, 1-55.
- [53] G. Davis, P. J. Smith, Tin. In *Comprehensive Organometallic Chemistry* (G. Wilkinson, F. G. A. Stone ed.). Pergamon Press, Oxford, 1982, 519-626.
- [54] P. J. Craig, Environmental aspects of organometallic chemistry. In *Comprehensive organometallic chemistry*, D. Wilkinson, F. Gordon, A. Stone and E. W. Abel (eds.), Pergamon Press, Oxford, 1982, 979-1020.
- [55] B. H. Gray, M. Porvaznik, C. Flemming, H. L. Lanfong, Organotin-induced hemolysis, shape transformation and intramembranous aggregates in human erythrocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 1987, 3, 23-38.
- [56] T. Hamasaki, H. Masumoto, T. Sato, H. Kito, Y. Yoshioka, Estimation of the hemolytic effects of various organotin compounds by structure activity relationships. *Appl. Organomet. Chem.* 1995, 9, 95-104.
- [57] H. G. Heumann, Effect of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma*, 1987, 136, 37-48.
- [58] J. M. Tsangaris, D. R. Williams, Tin in pharmacy and nutrition. *Appl. Organomet. Chem.* 1992, 6, 3-18.
- [59] M. T. Musmeci, G. Madonia, M. T. Lo Giudice, A. Silvestri, G. Ruisi, R. Barbieri, Interactions of organotins with biological systems. *Appl. Organomet. Chem.* 1992, 6, 127-138.
- [60] J. Radecki, Chemical structure of lead and tin compounds and their antimitotic activity accessibility for maize roots. *Acta Acad. Agricult. Techn. Olszt.* 1993, 55a, 1-41, In Polish.
- [61] A. Ambrosini, E. Bertoli, G. Zolese, Effect of organotin compounds on membrane lipids: fluorescence spectroscopy studies. *Appl. Organomet. Chem.* 1996, 10, 53-59.
- [62] H. Nagase, T. Hamasaki, T. Sato, H. Kito, Y. Yoshioka, Y. Ose, Structure – activity relationships for organotin compounds on the red kullifish *Oryzias latipes*. *Appl. Organomet. Chem.* 1991, 5, 91-97.
- [63] G. Eng, E. J. Tierney, G. J. Olson, F. E. Brinckman, J. M. Bellama, Total surface areas of group IVA organometallic compounds: predictors of toxicity to algae and bacteria. *Appl. Organomet. Chem.* 1991, 5, 33-37.

- [64] G. Roderer, On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the Chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. IV. Influence of lead antidotes and related agents. *Chem.-Biol. Interactions*, 1983, 46, 247-254.
- [65] G. Roderer, On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the Chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. VI. Effects on lorica formation, mitosis, and cytokinesis. *Environ. Res.* 1986, 39, 205-231.
- [66] S. D. Sharma, R. N. Chopra, Effect of lead nitrate and lead acetate on growth of the moss *Semibarbula orientalis* (Web.) Wijk.et Marg.Grown in vitro. *J. Plant Physiol.* 1987, 129, 243-249.
- [67] R. M. Wu, Y. C. Chyuan, H. C. Chiu, Acute triphenyltin intoxication: A case report, *J. Neurol. Neurosurgery Psychiatry*, 1990, 53, 356-357.
- [68] S. Ohhira, H. Matsui, Comparative study of the metabolism of triphenyltin in hamsters and rats after a single oral treatment with triphenyltin chloride, *Toxicol. Lett.* 1996, 85(1), 3-8.
- [69] O. Oyama, L. Chikahisa, A. Hayashi, T. Ueha, M. Sata, H. Matoba, Triphenyltin-induced increase in the intracellular Ca^{2+} of dissociated mammalian CNS neuron: its independence from voltage-dependent Ca^{2+} channels. *J. Pharm. Sci.* 1992, 58, 467-471.
- [70] M. Nath, S. Pokharia, R. Yadav, Organotin(IV) complexes of amino acids and peptides. *Coord. Chem. Rev.* 2001, 215, 99-149.
- [71] B. Różycka-Roszak, H. Pruchnik, E. Kamiński, The effect of some phenyltin compounds on the thermotropic phase behaviour and the structure of model membranes. *Appl. Organometal. Chem.* 2000, 14 (9), 465-472.
- [72] J. J. Chicano, A. Ortiz, J. A. Teruel, F. J. Aranda, Organotin compounds alter the physical organization of phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1510, 330-341.
- [73] J. A. Teruel, A. Ortiz, F. J. Aranda, Influence of organotin compounds on phosphatidylserine membranes. *Appl. Organometal. Chem.* 2004, 18, 111-116.
- [74] M. Marinovich, B. Viviani, C. L. Galli, Reversibility of tributyltin-chloride-induced protein synthesis inhibition after ATP recovery in HEL-30 cells. *Toxicol. Lett.* 1990; 52, 311-317.
- [75] M. Langner, J. Gabrielska, H. Kleszczyńska, H. Pruchnik, Effect of phenyltin compounds on lipid bilayer organization. *Appl. Organomet. Chem.* 1999, 12, 99-107.
- [76] M. J. Boyer, I. Horn, R. A. Firestone, D. Steele-Norwood, I. F. Tannock, pH dependent cytotoxicity of N-dodecylimidazole: A compound that acquires detergent properties under acidic conditions. *British Journal of Cancer*, 1993, 67(1), 81-87.
- [77] A. M. Santroni, D. Fedeli, R. Gabbianelli, G. Zolese, G. Falcioni, Effect of organotin compounds on trout hemoglobins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 238, 301-304.
- [78] S. Przystalski, H. Kleszczyska, Z. Trela, Z. Spiak, M. Zamarajeva, N. Glazyrina, A. Gagelgans, Direct or indirect influence of triphenyl-lead on activity of Na/K-ATPase. *Appl. Organometal. Chem.* 2000, 14, 432-437.
- [79] K. Burda, J. Lekki, J. Cielak, J. Kruk, M. Lekka, S. Dubiel, J. Stanek, Z. Stachura, Molecular mechanism of haemolysis induced by triphenyltin chloride. *Appl. Organometal. Chem.* 2002, 16, 148-154.
- [80] A. Miszta, J. Gabrielska, S. Przystalski, M. Langner, The effect of phenyltin chlorides on osmotically induced erythrocyte hemolysis. *Appl. Organometal. Chem.* 2005, 19, 736-741.

- [81] J. Gabrielska, J. Sarapuk, S. Przystalski, Role of hydrophobic and hydrophilic interactions of organotin and organolead compounds with model lipid membranes. *Z. Naturforsch.* 1997, 52c, 209-216.
- [82] B. R. Heywood, K. C. Molloy, P. C. Waterfield, Organotin biocides XV: Modelling the interactions of triorganotins with cell membranes. *Appl. Organomet. Chem.* 1989, 3, 443-450.
- [83] H. Kleszczyńska, J. Sarapuk, S. Przystalski, M. Kilian, Mechanical properties of red cell and BLM in the presence of some mono- and bis-quaternary ammonium salts. *Stud. Biophys.* 1990, 135, 191-199.
- [84] J. Sarapuk, J. Gabrielska, S. Przystalski, Effect of some biologically active quaternary ammonium salts on planar phospholipid membranes. *Polish J. Environ. Studies*, 1992, 1, 27-29.
- [85] S. Przystalski, J. Hładyszowski, J. Kuczera, B. Różycka-Roszak, Z. Trela, H. Chojnacki, S. Witek, E. Fiscaro, Interaction between model membranes and a new class of surfactants with antioxidant functions. *Biophys. J.* 1996, 70, 2203-2211.
- [86] M. Vighi, D. Calamari, QSARs for organotin compounds on *Daphnia Magna*. *Chemosphere*, 1985, 14, 1925-1932.
- [87] D. P. Tieleman, S. J. Marrink, H. J. C. Berendsen, A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997, 1331:235-270.
- [88] M. C. Wiener, S. H. White, Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data: III. Complete structure. *Biophys. J.* 1992, 61, 434-447.
- [89] W. Hübner, A. Blume, Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 96, 99-123.
- [90] S. Mazeres, V. Schram, S. Fery-Forgues, J. F. Tocanne, A. Lopez, Fluorescence properties of NBD-labeled phospholipids in membranes. *Biophys. J.* 1995, 68, A303.
- [91] S. Mazeres, V. Schram, J. F. Tocanne, A. Lopez, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labeled phospholipids in lipid membranes: Differences in fluorescence behavior. *Biophys. J.* 1996, 71, 327-335.
- [92] W. M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 1998, 37, 14713-14718.
- [93] H. F. Krug, H. Kulig, Directed shift of fatty acids from phospholipids to triacetylgllycerols in HL-60 cells induced by nanomolar concentrations of triethyllead chloride: involvement of a pertussis toxin-sensitive pathway. *Mol. Pharm.* 1991, 39, 511-516.
- [94] W. E. Donaldson, S. O. Knowles, Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes. *Comp. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 104, 377-379.
- [95] J. Gabrielska, J. Sarapuk, S. Przystalski, Investigations of new bis-ammonium salts with potential biological application. *Tenside Surf. Det.* 1994, 31, 296-298.
- [96] G. Eng, D. Whalen, Y. Z. Zhang, A. Kirksey, M. Otieno, L. E. Khoot, B. D. James, Fungicidal activity of some organotin compounds against *Ceratocystis ulmi*. *Appl. Organomet. Chem.* 1996, 10, 501-503.
- [97] G. Huang, Z. Bai, S. Dai, O. Xie, Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. *Appl. Organomet. Chem.* 1993, 7, 373-380.

- [98] G. Huang, S. Dai, H. Sun, Toxic effects of organotin species on algae. *Appl. Organomet. Chem.* 1996, 10, 377-387.
- [99] M. Langner, J. Gabrielska, S. Przystalski, The effect of the dipalmitoylphosphatidylcholine lipid bilayer state on the adsorption of phenyltins. *Appl. Organomet. Chem.* 2000, 14, 152-159.
- [100] M. Langner, S. W. Hui, Interaction of free fatty acids with phospholipid bilayers. *Biophys. Acta*, 1995, 1236, 73-80.
- [101] J. L. Dote, D. Kivelson, R. N. Schwartz, A molecular quasi-hydrodynamic free-space model for molecular rotational relaxation in liquids. *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 2169-2180.
- [102] W. Wu, S. W. Leu, C. H. Hsieh, L. M. Chi, The order of phosphatidylcholine headgroup in sonicated cholesterol/phospholipid vesicles as revealed by H-NMR. *Chi. Chem. Phys. Lipids.* 1991, 58, 241-248.
- [103] M. Kaszuba, G. R. A. Hunt, P- and H-NMR investigations of the effect of n-alcohols on the hydrolysis by phospholipase A of phospholipid vesicular membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1030, 88-93.
- [104] J. Gabrielska, T. Kral, M. Langner, S. Przystalski, Different effects of di- and triphenyltin compounds on lipid bilayer dithionite permeabilization. *Z. Naturforsch.* 2000, 55c, 758-763.
- [105] J. Hładyszowski, J. Gabrielska, P. Ordon, S. Przystalski, M. Langner, The effect of steric constraints on the adsorption of phenyltin onto the dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *J. Mol. Biol.* 2002, 189, 213-223.
- [106] S. Mukherjee, A. Chattopadhyay, Membrane organization at low cholesterol concentrations: A study using 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled cholesterol. *Biochemistry*, 1996, 35, 1311-1322.
- [107] P. L. Yeagle, *Cholesterol in Membrane Models*, CRC Press: Boca Raton, 1993, 1-12.
- [108] P. L. Yeagle, *Biologi of cholesterol*, CRC Press: Boca Raton, 1988, 1-12.
- [109] Gennis, R. B *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York, 1989.
- [110] F. M. Linseisen, J. L. Thewalt, M. Bloom, T. M. Bayerl, H-NMR and DSC study of SEPC-cholesterol mixtures. *Chem. Phys. Lipids*, 1993, 65, 141-149.
- [111] M. Pasenkiewicz-Gierula, W. K. Subczynski, A. Kusumi, Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine-cholesterol membranes: Fluid-phase microimmiscibility in unsaturated phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Biochemistry*, 1990, 29, 4059-4069.
- [112] H. Reinl, T. Brumm, T. M. Bayerl, Changes of the physical properties of the liquid-ordered phase with temperature in binary mixtures of DPPC with cholesterol. A H-NMR, FT-IR, DSC, and neutron scattering study. *Biophys. J.* 1992, 61, 1025-1035.
- [113] D. C. Mitchell, M. Straume, B. J. Litman, Role of sn-1-saturated,sn-2-polyunsaturated phospholipids in control of membrane receptor conformational equilibrium: Effects of cholesterol and acyl chain unsaturation on the metarhodopsin I \leftrightarrow metarhodopsin II equilibrium. *Biochemistry*, 1992, 31, 662-670.
- [114] C. R. Mateo, A. U. Acuna, J. C. Brochon, Liquid-crystalline phases of cholesterol/lipid bilayers as revealed by the fluorescence of trans-parinaric acid. *Biophys. J.* 1995, 68, 978-987.
- [115] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 8686-8690.

- [116] T. Pott, J. Dufourcq, E. J. Dufourc, Fluid or gel phase lipid bilayers to study peptide-membrane interactions. *Eur. Biophys. J.* 1996, 25, 55-59.
- [117] J. Ren, S. Lew, Z. Wang, E. London, Transmembrane orientation of hydrophobic α -helices is regulated both by the relationship of helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration. *Biochemistry*, 1997, 36, 10213-10220.
- [118] J. M. Smaby, M. M. Momsen, H. L. Brockman, R. E. Brown, Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys. J.* 1997, 73, 1492-14505.
- [119] M. Langner, J. Gabrielska, S. Przystalski, Adsorption of phenyltin compounds onto phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Appl. Organomet. Chem.* 2000, 14, 25-33.
- [120] P. Moreau, J. J. Bessoule, S. Mongrand, E. Testet, P. Vincent, C. Cassagne, Lipid trafficking in plant cells. *Prog. Lipid. Res.* 1998, 37, 371-391.
- [121] A. E. Oliver, E. Fisk, L. M. Crowe, P. S. De Araujo, J. H. Crowe, Phospholipase A activity in dehydrated systems: Effect of the physical state of the substrate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1267, 92-100.
- [122] A. Arbuzova, J. Wang, D. Murray, J. Jacob, D. S. Cafiso, S. McLaughlin, Kinetics of interaction of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate, membranes, and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 27167-27177.
- [123] S. McLaughlin, D. Murray, A. Arbuzova, Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes. *Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk.* 1998, 49, 121-125.
- [124] H. Kleszczyńska, J. Sarapuk, Influence of inorganic ions on organolead-induced hemolysis of erythrocytes. *Z. Naturforsch.* 2001, 56c, 853-856.
- [125] H. Kleszczyńska, D. Bonarska, J. Sarapuk, S. Przystalski, Protection of erythrocytes against organometals-induced hemolysis. *J. Fluorescence*, 2004, 14, 5-10.
- [126] A. Ortiz, J. A. Teurel, J. Aranda, Effect of triorganic compounds on membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1720, 137-142.
- [127] M. Suvalski, F. Villena, B. Norris, F. Cuevas, C. P. Sotomayor, P. Zetta, Effect of lead on human erythrocyte membrane and molecular models. *J. Inorganic Biochem.* 2003, 93, 308-313.
- [128] J. Gabrielska, S. Przystalski, A. Miszta, M. Soczyńska-Kordala, M. Langner, The effect of cholesterol on the adsorption of phenyltin compounds onto phosphatidylcholine and sphingomyelin liposome membranes. *Appl. Organometal. Chem.* 2004, 18 (1), 9-14.
- [129] A. Olżyńska, M. Przybyło, J. Gabrielska, Z. Trela, Di and tri-phenyltin chlorides transfer cross a model lipid bilayer. *Appl. Organometal. Chem.* 2005, 19, 1073-1078.
- [130] M. Podolak, N. M. Kocherginsky, L. S. Osak, S. Przystalski and S. Witek, , Fluctuations of biomimetic membranes potential and membrane lysis, induced by surface-active glycine esters. *J. Memb. Sci.* 1992, 66, 143 – 147.
- [131] M. Naumowicz, Z. A. Figaszewski, Impedance Analysis of phosphatidylcholine/a-tocopherol system in bilayer lipid membranes. *J. Membrane Biol.* 2005, 205, 29–36.
- [132] M. Naumowicz, Z. A. Figaszewski, Impedance analysis of lipid domains in phosphatidylcholine bilayer membranes containing ergosterol. *Biophysical Journal*, 2005, 89, 3174–3182.

- [133] M. Naumowicz, A. D. Petelska, Z. A. Figaszewski, Impedance analysis of phosphatidylcholine–cholesterol system in bilayer lipid membranes. *Electrochimica Acta*, 2005, 50 (10), 2155-2161.
- [134] A. D. Petelska, M. Naumowicz, Z. A Figaszewski, The interfacial tension of the lipid bilayer formed from lipid – cholesterol and lipid – lipid systems. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2006, 44 (2), 205-211.
- [135] A. D. Petelska, M. Naumowicz, Z. A Figaszewski, Interfacial tension of the lipid membrane formed from lipid-fatty acid and lipid-amine systems. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70 (1), 28-32.
- [136] Z. Józwiak (ed.), G, Bartosz (ed.), *Biofizyka. Wybrane zagadnienia z ćwiczeniami*. PWN W-wa 2005, 173-209.
- [137] L. Stolarczyk, U Stolarczyk, *Wolne rodniki*. Wiedza współczesna, W-wa 1973.
- [138] W. Leyko, *Zagadnienia biofizyki współczesnej*, PWN W-wa – Łódź, 1978, 21-44.
- [139] M. Podolak, G. Engel, D.Man, Effect of tin chlorides on the electric properties of filters impregnated with lauric acid. *Visnyk of Lviv Univ. Ser. Physic.* 2005, 38, 409-416.
- [140] M. Podolak, G. Engel and D. Man, Effect of organic compounds of tin on the electric properties of model membranes. *Z. Naturforsch.* 2006, 61c, 453 - 457.
- [141] M. Podolak, *Praca doktorska*, Wrocław 1971.
- [142] A. Bielański, *Podstawy chemii nieorganicznej*. PWN W-wa 2002, 771 – 772.
- [143] D. Man, M. Podolak and G. Engel, The influence of tin compounds on the dynamic properties of liposome membranes: a study using the ESR method. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2006, 11, 56-61.
- [144] M. Podolak, G. Engel and D. Man, Interaction of the organic tin chloride with the liquid model membranes. *Journal of Physics: Conference Series*, 2007, 79 012038.
- [145] G. Engel, M. Podolak and D. Man, The effect of selected organometallic compounds on the membrane voltage. *Polish J. Environ. Studies*, 2009, 18 (2), 207-211.
- [146] J. Gabrielska, R. Żyłka, S. Przystalski, Interaction of triphenyltin and triphenyllead chlorides whit lipid bilayer membranes: ¹H-NMR stidies. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, 2005, 351-354.