

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Praca doktorska

**Klasyfikacja resztkowej wody związanej
w rehydratowanych liofilizatach fosfolipidów DPPC,
POPC i DOPC**

Agata Bogdał

Praca wykonana pod kierunkiem

prof. dr. hab. Huberta Harańczyka

Zakład Fizyki Medycznej

Instytut Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego



Kraków, 2023

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja, niżej podpisana Agata Bogdał (nr indeksu: 1082255) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „*Klasyfikacja resztkowej wody związanej w rehydratowanych liofilizatach fosfolipidów DPPC, POPC i DOPC*” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr. hab. Huberta Harańczyka. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

.....

Kraków, dnia

.....

podpis doktoranta

Pragnę serdecznie podziękować:

*Panu **prof. dr. hab. Hubertowi Harańczykowi** okazaną życzliwość,
zaangażowanie, poświęcony czas na dyskusje naukowe, pomoc i cenne
uwagi merytoryczne,*

*Panu **prof. dr. hab. Kazimierzowi Strzałce** za przeprowadzone
konsultacje naukowe,*

*Pani **dr Małgorzacie Jemiole – Rzezińskiej** za preparację oraz
liofilizację liposomów wielowarstwowych,*

Kolegom doktorantom i pracownikom Zakładu Fizyki Medycznej

Uniwersytetu Jagiellońskiego – głównie:

***dr. Karolowi Kubatowi** za pomoc w wykonaniu pomiarów, analizie
danych i za prowadzenie dodatkowych dyskusji naukowych,*

*Panu **inż. Tomaszowi Malarzowi** za pomoc w obsłudze spektroskopu
i relaksometru,*

*Mojemu **Mężowi i Rodzicom** za pomoc w organizacji czasu, wsparcie
i cierpliwość podczas powstawania niniejszej pracy.*

Streszczenie

W ramach badań wykonanych w celu analizy zachowania śladowej ilości wody w układach modelowych błon biologicznych zbadano liofilizowane wielowarstwowe liposomy DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina), POPC (1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina) i DOPC (1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina). Wykonano badania kinetyki hydratacji, relaksometrii i spektroskopii $^1\text{H-NMR}$. Metody te pozwoliły na monitorowanie dynamiki molekularnej wody związanej w celu zidentyfikowania frakcji wody występujących w badanych próbkach jednoskładnikowych modelowych błon biologicznych. Dodatkowo przeprowadzono badanie kinetyki hydratacji oraz spektroskopii $^1\text{H-NMR}$ dla DOPC inkubowanego przez 6 miesięcy w temperaturze -20°C , aby ocenić, jak procedura preparatyki wpływa na otrzymane wyniki. Na koniec użyto metody badań ATR-FTIR, aby sprawdzić poprawność wyznaczania uwodnienia badanego materiału. Na podstawie tras hydratacyjnych dla próbek modelowych błon biologicznych wyodrębniono od dwóch do trzech frakcji wody w układzie. Natomiast na podstawie analizy DOPC z inkubacją odkryto dodatkowy proces, zwany pęcznieniem, rozpoczynający się po około $(281 \pm 4)\text{h}$ uwadniania próbki. Zależność hydratacyjna sygnału $^1\text{H-NMR}$ dla większości badanych próbek opisywana była funkcjami liniowymi, co sugerowało brak rozpuszczania frakcji stałej w układach lipidowych. Szczegółowa analiza ciała stałego w próbkach w większości przypadków wykazała od jednej do dwóch zmian mobilności frakcji stałej zachodzących w niskich poziomach uwodnienia. Ponadto z wykonanych pomiarów ATR-FTIR dla POPC i DOPC otrzymano satysfakcjonującą korelację wyznaczonych wartości hydratacji układów lipidowych metodą grawimetryczną z wartością hydratacji lipidów wyznaczoną metodą ATR-FTIR.

Abstract

As a part of the research carried out to analyze the behavior of trace amounts of water in model systems of biological membranes, lyophilized multilayer liposomes were examined: DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). The study of hydration kinetics, relaxometry and ^1H -NMR spectroscopy was performed. These methods allowed us to monitor the molecular dynamics of bound water in order to identify water fractions present in the tested samples of single-component model biological membranes. In addition, a study of hydration kinetics and ^1H -NMR spectroscopy was carried out for DOPC incubated for 6 months at -20°C to assess how the preparation procedure affects the obtained results. Finally, the ATR-FTIR test method was used to check the correctness of the numerical determination of the hydration of the tested material. On the basis of hydration courses for samples of model biological membranes, two up to three fractions of water bound in the system were isolated. However, on the basis of DOPC analysis with incubation, an additional process, a swelling, was demonstrated, starting after about $(281 \pm 4)\text{h}$ of hydration of the sample. The hydration dependence of the ^1H -NMR signal for most of the tested samples was described by linear functions, which suggested the lack of dissolution of the solid fraction in lipid systems. Detailed analysis of the solid in the samples, in most cases, showed one to two changes in the mobility of the solid fraction occurring at low hydration levels. In addition, the ATR-FTIR measurements for POPC and DOPC showed a satisfactory correlation of the determined hydration values of lipid systems using the gravimetric method with the lipid hydration value determined using the ATR-FTIR method.

Spis treści

Wprowadzenie.....	12
1. Wstęp	14
1.1. Żywa komórka.....	14
1.2. Błony biologiczne w komórce eukariotycznej	16
1.2.1. Składniki błon	18
1.2.1.1. Lipidy.....	18
1.2.1.2. Białka.....	22
1.2.1.3. Węglowodany	24
1.2.1.4. Woda.....	24
1.2.2. Struktura błony biologicznej	26
1.2.3. Właściwości błon	30
1.2.4. Wpływ lipidów na uporządkowanie błony oraz modele błon biologicznych	33
1.3. DPPC, DOPC i POPC	37
1.4. Kinetyka hydratacji.....	38
1.5. Izoterma sorpcyjna	40
1.6. Magnetyczny rezonans jądrowy	41
1.6.1. Moment pędu i moment magnetyczny	42
1.6.2. Energia jądrowego momentu magnetycznego w polu magnetycznym	44
1.6.3. Obsadzenie poziomów energetycznych i magnetyzacja próbki.....	45
1.6.4. Precesja Larmora.....	46
1.6.5. Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego.....	47
1.6.6. Magnetyczna relaksacja jądrowa.....	49
1.6.6.1. Relaksacja spinowo-spinowa.....	51
1.6.6.2. Relaksacja termiczna spinowo-sieciowa	52
1.7. Teoretyczne podstawy pomiarów NMR w domenie czasu i w domenie częstotliwości	54

1.7.1.	Sygnał zaniku swobodnej precesji (FID – Free Induction Decay).....	54
1.7.2.	Transformacja Fouriera	56
1.7.3.	Zastosowanie funkcji Gaussa	57
1.7.4.	Funkcja Lorentza w analizie widm NMR	58
1.7.5.	Widmo absorpcyjne.....	59
1.7.6.	Próbki mikroheterogenne	60
1.7.7.	Zależność sygnału ^1H -NMR od poziomu uwodnienia układu biologicznego ...	60
1.8.	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, FTIR.....	60
2.	Materiały i metody	65
2.1.	Materiały.....	65
2.2.	Przygotowanie próbek	65
2.3.	Pomiary grawimetryczne	68
2.4.	Sucha masa próbek	68
2.5.	Określenie poziomu uwodnienia metodą grawimetryczną.....	68
2.6.	Dehydratacja próbek.....	69
2.7.	Pomiary hydratacyjne	69
2.8.	Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego	69
2.8.1.	Spektrometr ^1H -NMR	69
2.8.2.	Relaksometr.....	71
2.9.	Pomiary widm metodą ATR-FTIR.....	74
3.	Wyniki.....	75
3.1.	Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC	78
3.1.1.	Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC	78
3.1.2.	Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DPPC	82
3.2.	Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC	87
3.2.1.	Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC	87

3.2.2.	Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów POPC	91
3.3.	Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC	97
3.3.1.	Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów z DOPC	97
3.3.2.	Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC	100
3.3.3.	Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy	105
3.4.	Kinetyka hydratacji liposomów DPPC, POPC i DOPC	111
3.5.	FTIR-ATR dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów POPC oraz DOPC	115
4.	Dyskusja wyników	119
5.	Wnioski	124
	Tabele wartości dopasowanych parametrów sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR .	126
	Bibliografia.....	129
	Dorobek naukowy Autora	145
	Spis publikacji	145
	Lista prezentacji konferencyjnych	145

Wprowadzenie

Każda żywa komórka wyodrębniona z otoczenia jest błoną komórkową, która z kolei składa się z istotnego elementu, jakim są fosfolipidy. Odgrywają one znaczącą rolę w zapewnianiu ochrony komórce oraz prawidłowej przemianie materii zachodzącej w jej wnętrzu. Natomiast woda jest podstawowym składnikiem chemicznym komórki. Stanowi około 70% masy pojedynczej komórki. Szczególne właściwości wody sprawiają, iż jest substancją warunkującą istnienie życia. Przez błony komórkowe przenikają swobodnie, zgodnie z gradientem stężeń, substancje o niskiej masie cząsteczkowej jak woda. Dlatego warto zrozumieć podstawowe mechanizmy, jakie zachodzą w tak małym, ale jakże ważnym obiekcie, jakim jest komórka.

Celem mojej pracy było zbadanie wpływu procesu rehydratacji na zachowanie się liofilizatów wielowarstwowych liposomów utworzonych z trzech różnych fosfolipidów – DPPC, POPC oraz DOPC, czyli zbadanie dynamiki molekularnej prostych modelowych błon biologicznych i sprawdzenie, jak zachowuje się woda związana w takich systemach.

Woda jest kluczowym elementem biorącym udział w różnych procesach zachodzących w błonach żywych komórek, co ma znaczenie, gdy komórki cierpią na stres wodny, termiczny lub solny [1]. Zjawiska między membranami takie, jak adhezja, stapianie i układanie w stosy zależą od sił hydratacji pochodzących z restrukturyzacji wody [2]. Jak i jakie poziomy uwodnienia są zaangażowane w każdy z tych procesów nie jest nadal zupełnie wyjaśnione. Dyskusje na temat stabilności różnych frakcji wody, układów w powłoce hydratacyjnej, ich właściwości termodynamiczne, które mogłyby umożliwić interakcje, są cały czas prowadzone. Z tego powodu w poszukiwaniu ogólnego wzorca zachowania zrozumienie strukturalnej roli wody w błonach lipidowych zyskało znaczną uwagę od czasu, gdy Luzzatti [3] określił grubość dwuwarstw lipidowych za pomocą SAXS. Po tym odkryciu podjęto starania, by określić lokalizację wody i określić odpowiednie wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę lipidu [4]. Uwzględnienie wody jako składnika strukturalnego błon biologicznych, a zwłaszcza jej właściwości termodynamicznych w obszarze międzyfazowym, jest istotne nie tylko dla określenia parametrów strukturalnych dwuwarstw w stanach w pełni uwodnionych, ale przede wszystkim dlatego, że w wielu procesach fizjologicznych etapy hydratacji, odwadniania odgrywają kluczową rolę. Wyjaśnia to współzależność stopnia uwodnienia i dynamiki różnych ugrupowań różnych fosfolipidów

podczas stresu osmotycznego i wodorowego, starzenia się komórek i interakcji biologicznych efektorów z błoną [5].

W moich badaniach nie jest jasne, czy rehydratacja z liofilizatu odtwarza strukturę liposomów wielowarstwowych, a także jak wiązana jest woda do rehydratowanego liofilizatu.

W pracy przedstawiono wyniki badań procesu rehydratacji liofilizatów wielowarstwowych liposomów utworzonych z trzech fosfolipidów: DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina), POPC (1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina) i DOPC (1,2-dioleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina). Badano kinetykę hydratacji w wilgotności względnej 100%, następnie wykonano pomiary $^1\text{H-NMR}$ widm w funkcji uwodnienia w zakresie częstości oraz czasu dla liofilizatów DPPC, POPC oraz DOPC. Sprawdzone także, jak procedura preparatyki wpływa na otrzymane wyniki. Na koniec użyto metody FTIR, aby sprawdzić poprawność numerycznego wyznaczania poziomu uwodnienia badanego układu.

Praca podzielona została na pięć głównych części: 1) wstępna charakterystyka badanych układów i podstawy teoretyczne używanych metod badawczych, 2) materiały i metody, 3) opis wyników, 4) dyskusja wyników, 5) wnioski wynikające z pracy. W pierwszych rozdziałach opisano przedmiot badań, czyli komórkę, błonę komórkową i jej składniki oraz zaprezentowano badane materiały wchodzące w skład układów lipidowych. Przedstawiono podstawowe właściwości fizykochemiczne wody, które stanowią podstawę procesów sorpcji. W kolejnych rozdziałach opisano kinetykę hydratacji, teorię zjawiska MRJ oraz podstawy teorii FTIR. Przedstawiono procesy relaksacyjne możliwe do zaobserwowania przy pomocy spektroskopii i relaksometrii rezonansu $^1\text{H-NMR}$. W następnej części opisano materiały i metody wykorzystane w przeprowadzonych badaniach, w tym preparatykę i przygotowanie próbek, opis pomiarów grawimetrycznych oraz użytą aparaturę do poszczególnych badań. Część trzecia przedstawia uzyskane wyniki doświadczalne, kolejno analizując rezultaty pomiarów MRJ, kinetykę sorpcji oraz ATR-FTIR. Ostatnie dwie części pracy zawierają dyskusję wyników oraz wnioski płynące z niniejszej pracy.

1. Wstęp

Komórka to podstawowa jednostka strukturalna i czynnościowa organizmów żywych [6]. Jest układem biologicznym zdolnym do życia, który przeprowadza podstawowe procesy, między innymi: przemiany materii, wzrostu, rozmnażania. Każda komórka ma określone granice, otoczona jest błoną komórkową, która oddziela wnętrze komórki od ośrodka zewnętrznego [7].

Funkcje błony są niezwykle zróżnicowane. Błony to selektywne bariery przepuszczalności, które koncentrują składniki odżywcze w komórce, usuwają komórkowe produkty przemiany materii, utrzymują gradienty jonów i przekształcają je w energię chemiczną. Błona uczestniczy w procesach sygnalizacyjnych, zmieniając bodźce zewnętrzne na sygnały komórkowe w odpowiedzi komórki na otoczenie [8]. Wszystkie błony biologiczne zawierają lipidy, białka, a także węglowodany, najczęściej związane do białek i do lipidów błony. Nadzwyczajną cechą lipidów jest amfifilność cząsteczek. Własność ta ma wpływ na formowanie przez te związki takich struktur, jak micelle, liposomy i warstwy podwójne. Spośród lipidów w błonie biologicznej zwierząt najwięcej jest fosfolipidów. Jednym z wielu rodzajów glicerofosfolipidów występujących w błonach zwierząt są DOPC i POPC. Natomiast DPPC jest powszechnie znajdującym się fosfolipidem w krwinkach.

Wybrane cechy błony biologicznej wygodniej badać na układzie modelowym, czyli w układzie podobnym, ale prostszym od błony rzeczywistej. Jednym ze stosowanych układów modelowych błony biologicznej są błony liposomów. Liposomy to zamknięte pęcherzyki złożone z koncentrycznych dwuwarstw fosfolipidowych [9].

1.1. Żywa komórka

Budowa komórki została zaobserwowana w 1665 roku przez Roberta Hooke'a, który, posługując się mikroskopem świetlnym, obserwował budowę korka. Kawałek korka był zbudowany z ogromnej liczby maleńkich przedziałów, które nazwał komórkami. Nazwa „komórka” przyjęła się w środowisku pomimo, że struktury oglądane przez Hooke'a były tylko ścianami komórkowymi pozostawionymi przez żyjące uprzednio w ich obrębie komórki. Jednakże teoria komórkowa budowy organizmów żywych ugruntowała się dopiero w XIX wieku, kiedy to zaczęto używać mikroskopu do oglądania żywych komórek. Prekursorami tej teorii byli dwaj niemieccy naukowcy, Mathias Jacob Schleiden i Theodor Schwann. Uznali

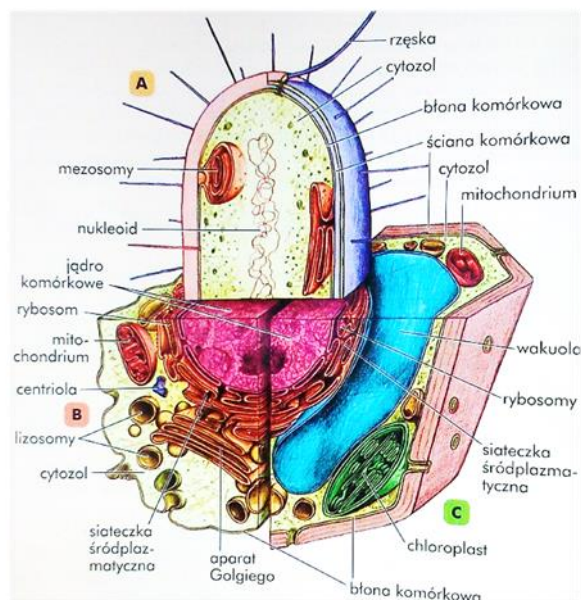
oni, że wszystkie organizmy, mimo odmiennej budowy, składają się z komórek będących ich elementarnymi jednostkami strukturalnymi [7].

Różne komórki zawierać mogą te same organella w różnych proporcjach. Pierwotna ewolucyjnie klasa komórek to bakterie, które nie posiadają organelli ani jądra. Właśnie obecność jądra lub jego brak stanowi podstawę klasyfikacji wszystkich żywych organizmów. Komórki, które mają jądro określane są mianem eukariota (wszystkie bardziej złożone organizmy wielokomórkowe – rośliny, zwierzęta, grzyby), natomiast te, które jego nie mają to prokariota (bakterie) [7]. Komórki mają zarówno różne kształty, rozmiary, strukturę wewnętrzną, jak i funkcje. Kluczowe różnice występują między komórkami eukariotycznymi i prokariotycznymi.

Prokariota to głównie małe, o długości do 7 μm organizmy. Nie zawierają osłonki jądrowej oddzielającej materiał genetyczny od cytoplazmy, nie mają organelli, natomiast posiadają grubą ścianę komórkową od 15 do 100 nm zbudowaną z proteoglikanów. Niektóre gatunki bakterii posiadają dodatkowo ścianę komórkową pokrytą śluzową otoczką. Sama ściana komórkowa utrzymuje kształt bakterii i chroni ją przed rozerwaniem. Właściwa błona komórkowa jest kompleksem lipidowo-białkowym, który kontroluje transport różnych substancji, głównie rozpuszczalnych w wodzie. Błona ta zawiera układy białkowe absorbujące światło i zmieniające energię świetlną na chemiczną oraz białka i enzymy układu przenośnikowego elektronów. Niektóre bakterie posiadają błonę komórkową, która tworzy liczne wypustki do wnętrza komórki celem zwiększenia swojej „powierzchni oddechowej”. Błona komórkowa bakterii zawiera także receptory białkowe odbierające sygnały z zewnątrz, umożliwiając tym samym komórkom przystosowanie się do środowiska. Chromosom bakterii jest dwuniciowym, kolistym DNA. Cytoplazma zawiera wszystkie rodzaje RNA, rybosomy oraz pęcherzyki gazowe, krople lipidów, wielocukry i fosforany nieorganiczne zmagazynowane w formie sferycznych ziaren [6].

Eukariotyczna komórka zwierzęca w cytoplazmie zawiera wiele organelli takich, jak: mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, rybosomy, lizosomy i inne. Natomiast eukariotyczne komórki roślinne zawierają ponadto chloroplasty i wodniczki. Jądro przeważnie jest największym organellum w komórce eukariotycznej otoczone osłonką jądrową. Jądro zawiera cząsteczki DNA, czyli długie łańcuchy polimerowe kodujące genetyczny zestaw cech organizmu. DNA komórek eukariotycznych występuje w postaci chromosomów (kompleks kwasów deoksyrybonukleinowych, białek histaminowych

i niehistaminowych). Zależnie od gatunku, komórki eukariota zawierają przynajmniej 4 rybosomy. Błona komórkowa eukariotów jest kompleksem lipidowo-białkowo-cukrowym [6].



Rysunek 1. Schemat budowy komórki prokariotycznej (A), zwierzęcej (B) i roślinnej (C) [10].

1.2. Błony biologiczne w komórce eukariotycznej

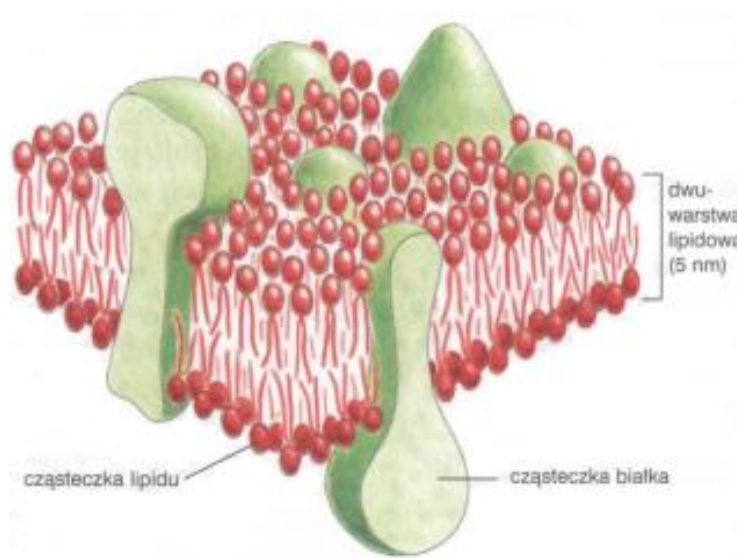
Błony biologiczne to struktury budujące komórki wszystkich organizmów. W organizmach wielokomórkowych odgradzają pojedyncze komórki i znajdują się w ich wnętrzu. Należą do nich błony komórkowe jak również błony organelli. Mimo ogromnej różnorodności struktur otoczonych błonami, budowa błon biologicznych we wszystkich organizmach jest w dużej mierze podobna. Wewnętrzne błony są nie tylko barierami, ale również pełnią inne funkcje. Subtelne różnice między błonami, zwłaszcza w składzie białek błonowych, nadają każdemu organellum indywidualny charakter [7].

Błona komórkowa to nie tylko granica jednostki życia, to także specyficzny przedział, w którym wykonywanych jest wiele istotnych funkcji komórki, w tym komunikacja z otoczeniem, transport cząsteczek i niektóre funkcje metaboliczne. Obecnie model opisujący strukturę i funkcje błony nazywa się „modelem płynnej mozaiki” [8].

Aktualny pogląd na strukturę błony komórkowej jest oparty według modelu Singera-Nicholsona. Struktura błony oparta jest na dwuwarstwie lipidowej o grubości około

5 nm będącej w fazie ciekłokrystalicznej i wbudowanych w nią białkach integralnych, które podobnie do lipidów błonalnych mogą dyfundować w powierzchni błony. Otaczają błonę związane elektrostatycznie białka peryferyczne. Częsteczki lipidów mają charakter amfipatyczny, tzn. mają zarówno właściwości hydrofilowe, jak i hydrofobowe. Częsteczki lipidów w dwuwarstwie ułożone są w ten sposób, że ich części hydrofobowe przylegają do siebie i są związane słabymi wiązaniami typu van der Waalsa. Ta część dwuwarstwy tworzy wewnątrz błonowe środowisko hydrofobowe. Natomiast części hydrofilowe cząsteczek lipidów są zlokalizowane na zewnątrz dwuwarstwy lipidowej. Oznacza to, że z jednej strony są skierowane do cytoplazmy, a z drugiej na zewnątrz komórki. W warunkach fizjologicznych cząsteczki lipidów mogą wykonywać swobodne ruchy rotacyjne oraz przemieszczać się w jednej płaszczyźnie. Dotyczy to także białek błonowych.

Obecność licznych i specyficznych białek receptorowych umożliwia komórkom wzajemne rozpoznawanie się i łączenie w zespoły, czyli tkanki. Dodatkowo obecne szczególne receptory białkowe w błonie rozpoznają i wiążą specyficzne cząsteczki sygnalizacyjne, np. hormony [6].



Rysunek 2. Schemat błony biologicznej [7].

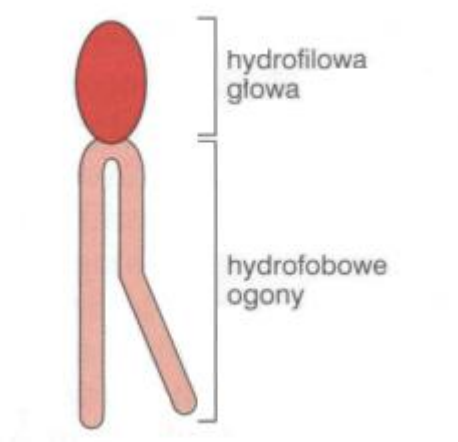
Znaczna część procesów biochemicznych komórki przebiega z udziałem błon komórkowych. Błony są miejscami działania wielu enzymów, dodatkowo zawierają antygeny powierzchniowe, dzięki którym komórka staje się specyficzna pod względem immunologicznym i może być identyfikowana przez inne komórki [9].

1.2.1. Składniki błon

Kluczowymi składnikami błon biologicznych są lipidy oraz białka. Stosunki ilościowe tych dwóch składników bardzo się różnią i zależą od typu komórki. Przeciętne błony komórkowe komórek roślinnych i zwierzęcych zawierają od 30 do 50% lipidów i odpowiednią ilość składników białkowych. Dodatkowym składnikiem w błonach komórkowych są cząsteczki węglowodanów. Związane są kowalencyjnie z lipidami jako glikolipidy lub z białkami jako glikoproteiny. Reszty cukrowe są przeważnie usytuowane na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej i stanowią, zależnie od typu komórki, od 1 do 10% suchej masy błony [6].

1.2.1.1. Lipidy

Lipidy stanowią grupę związków chemicznych dobrze rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, przede wszystkim w chloroformie, benzenie, metanolu, natomiast gorzej lub wcale nie rozpuszczalnych w wodzie, gdzie nie tworzą roztworu, lecz zawiesiny lub układy ciekłokrystaliczne [11]. Zazwyczaj lipidy są cząsteczkami amfifilowymi, a nawet mogą być pozbawione wszelkich ugrupowań zdolnych do oddziaływania z dipolami wody. Lipidy wchodzące w skład błon biologicznych cechuje amfipatyczność – ich cząsteczki zawierają polarne głowy oraz hydrofobowe, przeważnie długie łańcuchy węglowodorowe, pochodzące głównie od kwasów tłuszczowych, połączone z polarną głową kręgosłupem glicerolowym. Wykazują predyspozycje do kształtowania stabilnej termodynamicznie struktury dwuwarstwy [12]. Cząsteczki lipidów różnią się liczbą łańcuchów węglowodorowych, ich długością oraz liczbą wiązań nienasyconych. Wraz ze wzrostem liczby łańcuchów występujących w lipidach oraz ich długością, maleje płynność błony i rośnie temperatura przejścia fazowego, a zatem rośnie stabilność błony [13]. Występowanie wiązań nienasyconych powoduje boczne skręcenie łańcuchów węglowodorowych, prowadząc do zmniejszenia upakowania błony biologicznej, co za tym idzie większej płynności. Błony biologiczne w zakresie temperatur fizjologicznych są w fazie ciekłokrystalicznej. Przejście lipidów błonalnych do fazy żelu skutkuje zwykle uszkodzeniem błony.

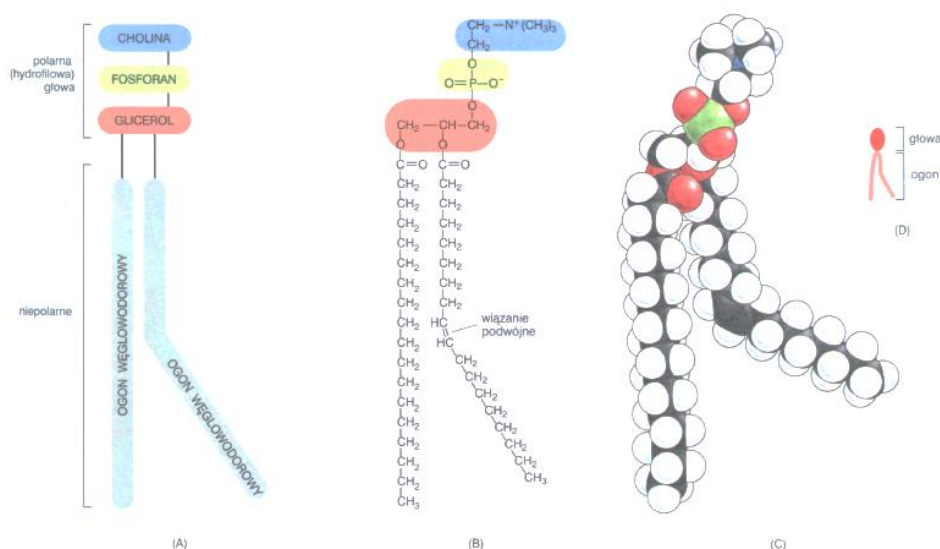


Rysunek 3. Schematyczny rysunek typowej cząsteczki lipidu błonowego [7].

Zawartość lipidów w błonach biologicznych, ich składniki, rozmieszczenie, jak i stosunek wiązań nasyconych do wiązań nienasyconych odróżniają się dla każdego organizmu żywego (bakterii, roślin, grzybów czy zwierząt). Ilość rodzajów lipidów zależy od rodzaju komórki, błony czy też warunków, w jakich się znajduje komórka. W błonach ssaków występują trzy główne typy lipidów: glicerofosfolipidy, sfingolipidy oraz sterole.

W błonach zwierzęcych glicerofosfolipidy (potocznie w komórce eukariotycznej nazwane fosfolipidami) stanowią najliczniejszą grupę lipidów membranowych (55-57% wszystkich lipidów w komórce [6]). Biorą one udział w przemianach cholesterolu, uczestniczą w transporcie czynnym i biernym substancji przez błony biologiczne [14] oraz są bardzo istotnym ogniwem podczas przekazywania informacji [15]. Podstawę tych związków stanowi kręgosłup glicerolowy, do którego wiązaniami estrowymi przyłączone są dwa nierozgałęzione łańcuchy kwasów tłuszczowych – najczęściej o parzystej liczbie atomów węgla (od 12 do 18) – oraz reszta kwasu fosforowego związana z zasadą azotową, tworzące wspólnie głowicę hydrofilową. Zasadą azotową w lipidach błonowych może być etanoloamina (mówi się wtedy o fosfotydyloetanoloaminie), cholina (fosdfatydylocholina), inozytol (fosfatydyloinozytol). W miejsce zasady azotowej może być seryna (fosfotydyloseryna) lub glicerol (fosfotydyloglicerol). Jednak najliczniej (stanowi 15-22% wszystkich fosfolipidów [6]) występującym fosfolipidem w większości błon komórki jest fosfatydylocholina (lecytyna), w której hydrofilową głowicę jest cząsteczka choliny złączona z ortofosforanem, a ogonami hydrofobowymi – dwa łańcuchy węglowodorowe (często jeden z nich występuje w konformacji *cis*, co pozwala zachować płynność błony w temperaturze pokojowej) [16]. Położenie fosfolipidów w błonie komórkowej nie jest przypadkowe. Fosfolipidy cholinowe

znajdują się głównie w zewnętrznej warstwie lipidowej błony, a fosfolipidy aminowe w warstwie wewnętrznej. Zróżnicowane rozmieszczenie fosfolipidów decyduje o asymetryczności błony komórkowej, a ona z kolei jest utrzymywana ponadto przez inne składniki lipidowe, jak: sfingolipidy, glikolipidy i cholesterol [6].

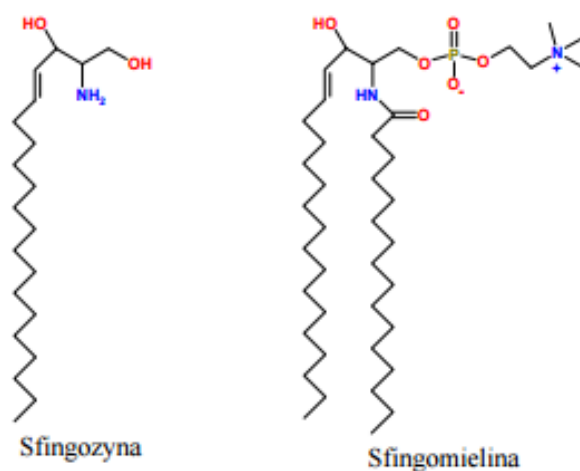


Rysunek 4. Cząsteczka fosfatydylocholiny. (A) - przedstawienie schematyczne, (B) - wzór strukturalny, (C) - model przestrzenny, (D) – wzór schematyczny [7].

Sfingolipidy dominują w komórkach nerwowych (w osłonce mielinowej otaczającej akson komórki nerwowej). Zostały wyodrębnione po raz pierwszy z osłonek mielinowych. Jednakże sfingolipidy występują w wielu tkankach ssaków, nie tylko w układzie nerwowym, a ich zawartość w błonach komórkowych waha się w przedziale od 2 do 15% i uwarunkowana jest typem komórki [17]. W przeciwieństwie do glicerofosfolipidów podstawowym składnikiem strukturalnym sfingolipidów jest sfingozyna, czyli aminoalkohol posiadający długi łańcuch węglowodorowy, zawierający grupę aminową. W 18-węglowym łańcuchu węglowodorowym sfingozyny znajduje się wiązanie podwójne o konformacji *trans* [6]. Sfingolipidy pełnią funkcje stabilizacji błony komórkowej, izolacji komórki od środowiska zewnętrznego oraz podtrzymania asymetryczności błony.

Sfingolipidy dzielą się na dwie podgrupy: sfingomieliny i glikolipidy. W sfingomielinach grupa hydroksylowa pierwszorzędowa zestryfikowana jest kwasem fosforowym, natomiast jedna z grup hydroksylowych tego kwasu zestryfikowana jest krótkołańcuchowym

aminoalkoholem (choliną). Reszta kwasu tłuszczowego wiąże się z grupą aminową sfingozyny wiązaniem amidowym, tworząc ceramid.

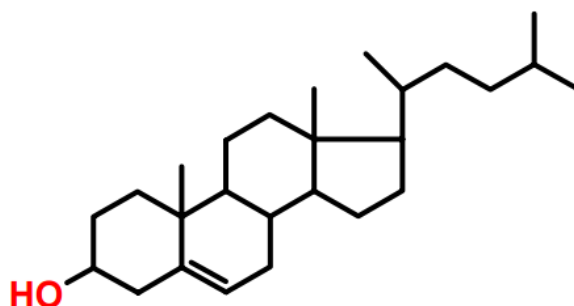


Rysunek 5. Wzory strukturalne sfingozyny i sfingomieliny.

Kolejną podklasą sfingolipidów są glikolipidy, których budowa także oparta jest na sfingozynie połączonej wiązaniem amidowym z kwasem tłuszczowym, jednak w glikolipidach nie pojawia się reszta kwasu fosforowego. Zamiast tego zawierają składnik węglowodanowy w postaci jednej lub kilku reszt cukrowych. Wszystkie cząsteczki glikolipidów umiejscowione są w zewnętrznej lipidowej dwuwarstwie błony. Domeny polarne glikolipidów wystają ponad powierzchnię błony, ustawiając swoje grupy polarne do środowiska [6]. Glikolipidy można jeszcze podzielić pod względem składu reszt cukrowych na obojętne i kwaśne (złożone). Glikolipidy obojętne zawierają reszty cukrowe obojętne jak, np. galaktocerebrozyd, który zawiera jedną resztę cukrową – galaktozę. Glikolipidy kwaśne, obok reszt cukrowych obojętnych, posiadają dodatkowo ujemnie naładowane reszty kwasu sjałowego (np. gangliozydy). Do głównych zadań glikolipidów należy stabilizacja błony komórkowej, izolacja komórek od środowiska oraz utrzymanie asymetrycznego charakteru błony. Pełnią też funkcję receptorów dla niektórych toksyn i hormonów peptydowych i markerów grupy krwi (ABO) w błonach erytrocytów [9].

Sterole, w przeciwieństwie do stosunkowo elastycznych i ruchliwych glicerofosfolipidów i sfingolipidów, zbudowane są z nieruchomego układu czteropierścieniowego z bocznymi podstawnikami. Z jednej strony do rdzenia czterech węglowodorowych pierścieni przyłączona jest grupa hydroksylowa, a z drugiej strony - długołańcuchowy kwas tłuszczowy. W komórkach zwierzęcych jedynym steroidem jest cholesterol, natomiast w komórkach

roślinnych fitosterole, jak sitosterol czy stigmasterol. Częsteczka cholesterolu posiada słabe właściwości amfipatyczne. Część hydrofilowa to pojedyncza grupa OH, a hydrofobowa to reszta molekuly, grupa steroidowa z łańcuchem węglowodorowym. Cholesterol jest umiejscowiony w błonie komórkowej w jej zewnętrznej warstwie. W niej wiąże się w swoją grupą hydroksylową z 1 węglem łańcucha alifatycznego kwasu tłuszczowego fosfolipidu. Cholesterol wpływa na właściwości fizykochemiczne błon komórkowych. Wiadomo, że cholesterol reguluje organizację i płynność błon biologicznych, wbudowując się w membranę równolegle do łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów, co ogranicza ich ruchy boczne i moduluje dyfuzję boczną [18]. Poprzez porządkowanie organizacji błony biologicznej sterol ten zmniejsza jej przepuszczalność, co z kolei powoduje wzrost jej mechanicznej wytrzymałości [19].



Rysunek 6. Schemat cząsteczki cholesterolu.

1.2.1.2. Białka

Charakteryzują się masami cząsteczkowymi w granicach od około 10 000 do kilku milionów Daltonów. Składają się z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi -CONH. Każdy aminokwas zawiera w swojej budowie atom węgla, do którego doczepione są: dwie grupy funkcyjne: karboksylowa (-COOH), aminowa (-NH₂), atom wodoru oraz charakterystyczny podstawnik alifatyczny lub aromatyczny. Liczba reszt aminokwasowych pojedynczego łańcucha polipeptydowego przeważnie jest większa niż 100, a cała cząsteczka białka może być zbudowana z wielu łańcuchów polipeptydowych.

Większość funkcji błon biologicznych pełniona jest przez białka błonowe, czyli związane z błoną biologiczną. U zwierząt białka stanowią około 50% masy błon, a reszta odpowiada lipidom i względnie małej ilości cukrom. Jednak cząsteczki lipidów są znacznie mniejsze od cząsteczek białek, dlatego w błonach jest 50 razy więcej cząsteczek lipidów niż cząsteczek białek. Oprócz transportu substancji odżywczych, metabolitów i jonów przez dwuwarstwę

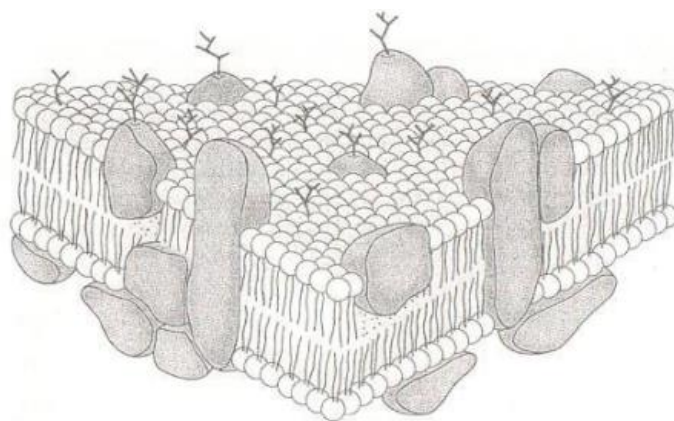
lipidową, białka pełnią wiele innych funkcji. Niektóre białka łączą błonę z makrocząsteczkami po jednej lub drugiej stronie błony komórkowej. Inne działają jako receptory wykrywające w otoczeniu komórki sygnały chemiczne i przekazujące przez nie informację do wnętrza komórki. Kolejne działają jako enzymy katalizujące specyficzne reakcje [7].

Pod względem strukturalnym można wyróżnić dwa typy białek błonowych: białka powierzchniowe oraz integralne.

Białka powierzchniowe lub peryferyjne na całej swojej powierzchni ekspozują aminokwasy hydrofilowe i przebywają w środowisku wodnym. Nie są związane hydrofobowo do powierzchni apolarnej domeny lipidowej dwuwarstwy błony komórkowej. Można je łatwo usunąć z błony nie uszkodzając dwuwarstwy lipidowej. Białka powierzchniowe są cząsteczkami hydrofilowymi i wiążą się jonowo z polarnymi fragmentami białek integralnych oraz z polarnymi fragmentami fosfolipidów błony. Istnieje też możliwość tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy hydrofilową częścią białka a ekspozowanym do cytozolu fragmentem białka integralnego bądź głowicą polarną fosfolipidu.

Białka integralne są asymetrycznie wbudowane do błony, w konformacji natywnej ekspozują na powierzchni aminokwasy hydrofobowe i ich obszarem penetrują hydrofobowy region błony biologicznej. Można je oddzielić z użyciem detergentów, których działanie niszczy strukturę błony biologicznej. Część białek integralnych może znajdować się całkowicie w części hydrofobowej dwuwarstwy lipidowej lub wynurzać się na jednej lub penetrować błonę na wskroś.

Białka błonowe pełnią decydującą rolę w funkcjonowaniu komórki. Są odpowiedzialne za transport przez błonę wybranych substancji, tworząc systemy kanałów jonowych i system transportu. Odgrywają także rolę receptorów, neuroprzekazników i antygenów. W wielu przypadkach ta sama cząsteczka białka może działać jako element struktury błony i jako biokatalizator lub czynnik, który wspomaga przenikanie substancji przez błony [16].



Rysunek 7. Schemat błony komórkowej według modelu płynnej mozaiki [6].

1.2.1.3. Węglowodany

Węglowodany powiązane są z lipidami lub białkami błon komórkowych. Występują również w błonach organelli komórkowych. Węglowodany błonowe na ogół nie są cukrami prostymi, ale oligosacharydami albo polisacharydami. Łańcuchy węglowodanowe potrafią tworzyć rozgałęzienia, co komplikuje ich budowę i daje dodatkowe możliwości różnicowania się cząsteczek. Powierzchnia komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych pokryta jest różnej grubości otoczką zbudowaną z cukrów o odmiennym stopniu polimeryzacji. Ściany komórek roślinnych zbudowane są z wielocukru – celulozy, który jest głównym elementem szkieletowym tych komórek. Celuloza określa kształt komórek i przeciwstawia się dużemu ciśnieniu osmotycznemu wnętrza komórki. Natomiast cukrowa warstwa pokrywająca powierzchnię komórek zwierzęcych to glikokaliks (9 cukrów: galaktoza, glukoza, glukozoamina, galaktozoamina, mannoza, fruktoza i kwasy sjałowe), który zabezpiecza powierzchnię komórki przed uszkodzeniami mechanicznymi i chemicznymi. Warstwa ta pochłania wodę, co powoduje, że powierzchnia komórek jest śliska. Dzięki tej własności, np. leukocyty prześlizgują się przez wąskie szczeliny w ścianach naczyń włosowatych, a krwinki czerwone nie zlepiają się i nie przyczepiają do ścian naczyń krwionośnych. Obecność glikokaliksu na powierzchni błon komórkowych zwiększa asymetrię [6].

1.2.1.4. Woda

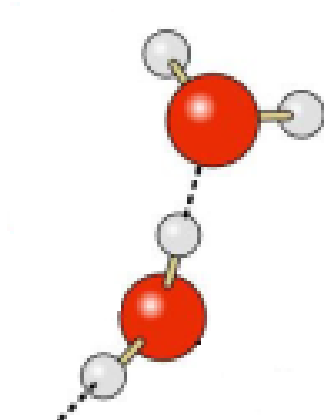
Woda jest wszechobecną cieczą w przyrodzie, a także pełni ważną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych. Stanowi około 70% masy komórek, a większość reakcji wewnątrzkomórkowych przebiega w środowisku wodnym. Życie na Ziemi zaczęło się w oceanie i warunki panujące w tym środowisku wywarły trwałe wpływy na całokształt istot żywych, dlatego o procesach życiowych decydują właściwości wody [7].

Jedna cząsteczka wody składa się z dwóch atomów wodoru połączonych kowalencyjnie z jednym atomem tlenu. Wiązania te są mocno spolaryzowane. Ma stosunkowo niską masę molową (18 g/mol) i jest niemetalem. Wodę charakteryzuje szereg anomalnych właściwości w stosunku do innych substancji o podobnej masie cząsteczkowej. Wykazuje maksimum gęstości w temperaturze 3,98°C przy ciśnieniu normalnym, wynoszące 1 g/cm³. Gęstość wody w stałym stanie skupienia jest mniejsza niż gęstość w stanie ciekłym o około 9%. Na dodatek wartość temperatury topnienia, wrzenia wody oraz temperatury krytycznej (374,1°C) są wysokie, biorąc pod uwagę fakt, że woda nie jest substancją jonową ani metaliczną. Nietypowy jest także kształt krzywej topnienia, której przebieg jest malejący. Woda posiada wysokie wartości ciepła topnienia (6,03 kJ·mol⁻¹), ciepła parowania (40,7 kJ·mol⁻¹ w 20°C) oraz ciepła sublimacji (46,93 kJ·mol⁻¹). Posiada anomalną wartość ciepła właściwego o wartości 75,42 J·mol⁻¹·°C⁻¹ w stanie ciekłym, a 37,71 J·mol⁻¹·°C⁻¹ w stanie stałym i gazowym. Ma wysoką względną przenikalność dielektryczną wynoszącą $\epsilon = 80,37$ w temperaturze 20°C. Wodę charakteryzuje również duża wartość napięcia powierzchniowego (73,05·10⁻⁵ N/m w 18°C). Kolejną interesującą własnością wody jest tworzenie polimorfów krystalicznych – 15 faz krystalicznych i trzy fazy amorficzne. Jony H⁺ i OH⁻ charakteryzują się dużą ruchliwością [21]. Poza tym woda jest powszechnym rozpuszczalnikiem i korozyjnym medium.

Molekuła wody posiada dwa wiązania O-H, które są wiązaniami kowalencyjnymi spolaryzowanymi. Bierze w nich udział orbital atomowy tlenu o hybrydyzacji *sp*³ oraz orbitale 1*s* atomów wodoru. Energia takiego wiązania wynosi 420 kJ/mol. Kąt między wiązaniami kowalencyjnymi wynosi 104,45°. Atom tlenu jest atomem silnie elektroujemnym, dlatego staje się on donorem ładunku dodatniego dla atomu wodoru w molekuale. Skutkuje to powstawaniem wiązania wodorowego między tak obdarzonym ładunkiem atomu wodoru (donorem wiązania wodorowego) jednej cząsteczki wody z atomem tlenu drugiej molekuly (akceptorem wiązania wodorowego). Oddziaływanie elektrostatyczne jest najistotniejszym czynnikiem wpływającym na energię wiązania.

Wiązanie wodorowe może powstać nie tylko między atomem wodoru i atomem tlenu, ale również pomiędzy wodorem oraz innymi atomami elektroujemnymi obecnymi w grupach: hydroksylowej, aminowej, tiolowej i innymi silnie elektroujemnymi atomami będącymi akceptorem takiego wiązania, np. chlorem, jodem, bromem czy fluorem.

Wiązania wodorowe są krótkożyciowe, w temperaturach pokojowych ich średni czas życia wyznaczony z rozpraszania światła wyniósł około 0,3 ps dla 396 K i około 1 ps dla 252 K [22]. Symulacje molekularne dostarczają wartości dwa razy krótszych [Starr i in., 1999]. Energia wiązania wodorowego (~21 kJ/mol) jest pośrednia między słabymi oddziaływaniami van der Waalsa (~1.3 kJ/mol) oraz silnymi wiązaniami kowalencyjnymi (~420 kJ/mol) [23]. Wiązanie wodorowe bywa opisywane jako oddziaływanie elektrostatyczne dipolowe, lecz ma ono pewne cechy wiązania kowalencyjnego jak: kierunkowość, siła, ograniczona liczba partnerów tworzących je, odległości między atomami mniejsze niż suma promieni van der Waalsowskich [24]. Pomimo to ich obecność ma wielkie znaczenie biologiczne. Właśnie wiązania wodorowe są odpowiedzialne za tworzenie trzeciorzędowej struktury białek oraz kwasów nukleinowych. Wiązania wodorowe wymuszają określone położenie molekuł w lodzie, co powoduje, że ma on mniejszą gęstość od wody ciekłej [9].



Rysunek 8. Dwie cząsteczki wody (kolorem czerwonym oznaczono atom tlenu, kolorem szarym – atom wodoru, szara gruba linia obrazuje wiązanie kowalencyjne spolaryzowane w obrębie molekuly, czarna przerywana linia – wiązanie wodorowe między molekułami) (wg Hoy i Bunker 1979).

1.2.2. Struktura błony biologicznej

Teoria budowy i składu błon biologicznych rozwijała się przez około 100 lat. W 1895 roku Charles Ernest Overton przedstawił model błony biologicznej. Zgodnie z jego założeniem lipidy są głównym składnikiem błon. Overton zauważył, że komórki roślinne oraz zwierzęce posiadają podobne właściwości przepuszczalności. Wyniki jego eksperymentu wykazały, że związki o charakterze hydrofobowym łatwiej przenikają przez błonę, dlatego jej składniki muszą przejawiać cechy charakterystyczne dla tłuszczów. Zauważył też, że woda i jony

również przenikają przez błony, więc uznał, że w lipidowej strukturze błony są pory umożliwiające ich migrację [25]. Następnie w 1925 roku Gorter i Grendel wykonali eksperyment z wykorzystaniem techniki monowarstw Langmuira. Dowiedli oni, że lipidy wyekstrahowane z cieni erytrocytów tworzą na powierzchni wody monowarstwę o powierzchni dwa razy większej niż powierzchnia samych komórek. Opierając się na uzyskanych wynikach, Gorter i Grendel przedstawili pierwszy model błony biologicznej jako dwuwarstwy lipidowej [26]. W 1935 roku Danielli i Davson ogłosili model błony komórkowej, według którego w błonie lipidy tworzą dwuwarstwę pokrytą z dwóch stron unieruchomionymi cząsteczkami białek [27]. Schemat ten został podważony przez wyniki mikroskopii elektronowej w 1964 roku przez Robertsona. Te obserwacje wykazały istnienie dwóch gęstszych warstw – protein, silnie oddziaływających z wiązką elektronową, podzielonych warstwą o mniejszej gęstości, która jest bardziej przeźroczysta dla tej wiązki (lipidy), jednak wynikający z nich obszar, który mogły zajmować białka, dopuszczał tylko konformację typu kartki- β . Na ogół nie jest ona konformacją natywną białek błonalnych, dodatkowo eksponując do środowiska wodnego nadmiar aminokwasów hydrofobowych. Nowe koncepcje pojawiły się wraz z rozwojem techniki kriorytownictwa. W 1968 roku F.S. Sjöstrand, po użyciu techniki kriorytu do wizualizacji błony biologicznej, a także wykonaniu zdjęć mikroskopem elektronowym, przedstawił model błony jako dwuwymiarowej struktury utworzonej przez układ miceli oraz skupisko kulistych podjednostek będących cząsteczkami białka [28]. Wadą tego modelu był fakt, że ziarna widziane w mikrogramach elektronowych, to artefakty pochodzące z preparatyki próbek (kriorytów). Dwa lata wcześniej (1966 rok) posługując się mikroskopem elektronowym Singer i Wallach zaprezentowali model mozaikowy błony biologicznej. Założono, że błona zbudowana jest z dwóch warstw lipidów w fazie żelowej oraz białek, które znajdują się nie tylko na powierzchni rdzenia lipidowego, ale również przechodzą w poprzek niego (białka integralne). Koncepcja ta niestety nie tłumaczyła dyfuzji bocznej lipidów i protein. W 1972 roku powstały pierwsze przesłanki za modelem płynnej mozaiki. P. Devaux i H.M. McConnell wykonali eksperyment używając sondę fluorescencyjną i technikę EPR [29]. W ich eksperymentach znakowano spinowo fosfolipid i umieszczano w lamellach PC z żółtka jaja kurzego. Rozkład koncentracji lipidowego znacznika spinowego był wynikiem fotochemicznego „zaślepienia” (rekombinacji znacznika). Przed fotolizą rozkład znacznika był jednorodny, natomiast po krótkiej fotolizie profil koncentracji znacznika miał kształt fali kwadratowej. Okazało się, iż lipidy budujące błonę biologiczną są w fazie ciekłokrystalicznej (poruszają się), a białka dyfundują w obrębie błony.

Obecnie obowiązującym modelem błony komórkowej jest model płynnej mozaiki, opracowany przez Singera i Nicolsona w 1972 roku. Koncepcja ta przedstawia błonę jako matrycę dwuwarstwy lipidowej, do której wbudowane są białka w postaci struktur globularnych. Białka mogą być w różnym stopniu zanurzone w błonie lub mogą utrzymywać się na powierzchni. Całość stanowi płynny, dynamiczny i jednorodny układ, w którym lipidy oraz białka mają możliwość migracji i rotacji w pewnym zakresie błony [30]. Istnieją nowe koncepcje, które tłumaczą niejednorodności budowy błon biologicznych, między innymi tratwy lipidowe oraz wgłobienia (*invaginations, caveolae*).

Tratwy lipidowe uznano za domeny zawierające cholesterol jako czynnik stabilizujący całą strukturę. Są to szczególne obszary błony biologicznej, gdzie sfingolipidy i cholesterol zbliżają się ku sobie w wyniku chemicznej afiniczności i preferowanego upakowania [31]. Takie obszary mogą zawierać lub wykluczać inne lipidy i białka, a taka szczególna segregacja molekuł może mieć wpływ na ich funkcję biologiczną [32]. Uważa się, że tratwy lipidowe mają udział w różnych funkcjach błony biologicznej, jak sortowanie białek [31], transport membranowy, m.in. białek zsyntezowanych w sieci trans aparatu Golgi'ego do błony biologicznej [33, 34]. Dodatkowo biorą udział w procesach przekazywania sygnałów [35] oraz w aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki przez zewnętrzny szlak apoptyczny [36]. Domeny lipidowe mogą też stanowić swego rodzaju komórkowe „wejścia” i „wyjścia” dla chorobotwórczych drobnoustrojów i toksyn [37]. Wiele rodzajów patogenów rozwinęło zdolność angażowania tratw lipidowych do przejęcia kontroli nad komórkami gospodarza i propagacji zmian chorobowych, np. wirus HIV wchodzi do komórek nabłonkowych właśnie przez tratwy lipidowe, na drodze endocytozy i transcytozy, natomiast wyjście wirusa następuje przez proces selektywnego pączkowania [38].

Tratwy lipidowe są strukturami dynamicznymi z czasem życia od 10^{-2} [39] do 10^3 sekundy [40]. Rozmiar pojedynczej domeny mieści się w przedziale od 10 do 200 nm [41]. Małe tratwy mogą łączyć się, tworząc duże skupiska o średnicy ponad setki nm [42]. Tratwy lipidowe powstają w aparacie Golgi'ego, gdzie syntezowane są sfingolipidy i trafia tam też syntezowany wcześniej (w retikulum endoplazmatyczne) cholesterol. Z aparatu Golgi'ego transportowane są do błony komórkowej i tutaj mogą ulegać endocytozie [32]. Biofizyczne mechanizmy, dzięki którym komórki regulują rozmiar, trwałość i przestrzenną lokalizację tych domen są słabo poznane.

Obecnie rozważa się kilka modeli tratw lipidowych:

- a) najpowszechniejsza koncepcja została zaproponowana przez K. Simonsa i E. Ikonena – tratwy uznawane są za względnie duże struktury (≈ 50 nm średnicy) wzbogacone w cholesterol i w sfingolipidy, z którymi asocjują białka; silne oddziaływania między molekułami tworzącymi tratwy czynią je ściśle upakowanymi strukturami [31];
- b) R.G. Anderson i K. Jacobson przedstawili tratwy lipidowe jako lipidowe powłoki, które są niewielkich rozmiarów, względnie dynamiczne w skali molekularnej, w których białka preferencyjnie asocjują z niektórymi rodzajami lipidów; włączenie się tych powłok do struktur czynnościowych jest procesem sterowanym i dynamicznym [43];
- c) F.R. Maxfield założył, że większa część błony biologicznej jest „tratwopodobna” i ma charakter mozaiki z domen; komórka steruje ilością domen różnych typów przy pomocy mechanizmu opartego na działaniu cholesterolu;
- d) S. Mayor oraz M. Rao zaproponowali koncepcję aktywnie generowanych przestrzennie i czasowo układu składników tratwy lipidowej; badano białka zakotwiczone do GPI (glikosyl-fosfatidyloinozytol) w żywych komórkach, otrzymano wyniki wskazujące na obecność małych i dynamicznych zgrupowań lipidów, które współistnieją jako monomery, następnie są aktywnie indukowane do formowania tratw lipidowych.

Wgłobienia lub inwaginacje błony komórkowej są jednym z przykładów domen lipidowych. Zarówno te struktury, jak i tratwy lipidowe, wyróżniają się wysoką koncentracją cholesterolu oraz lipidów nasyconych. Czynnikiem stabilizującym wgłobienia jest białko kaweolina, a także to, że są inwaginacjami błony. Wgłobienia są wykrywane w wielu typach komórek. Jednak ich występowanie zależy od rodzaju danej komórki, np. w błonie neuronów w ogóle nie stwierdzono formowania się tych struktur [44, 45]. Błony wgłobień posiadają zwiększoną zawartość cholesterolu, a skład lipidowy zbliżony jest do składu tratw lipidowych. Dodatkowo zawierają znaczną koncentrację białka integralnego kaweoliny (*caveolin*). Narzucają bardzo silną asymetrię przestrzenną rejonu swojej lokalizacji.

Kaweolina zawiera: domenę hydrofobową składającą się z 32 aminokwasów, dwa hydrofilowe końce N-terminal (101 aminokwasów) oraz C-terminal (43 aminokwasów). Obecnie wyróżnia się dwa typy kaweoliny, a mianowicie kaweolinę-1 oraz kaweolinę-2. Oba białka występują najczęściej w komórkach śródbłónka, we fibroblastach i adipocytach. Kaweolina-1 jest białkiem integralnym, które jednak nie rozpościera się

w poprzek błony biologicznej. W zamian uważa się, że domena hydrofobowa przypomina raczej spinę do włosów, która ekspozuje koniec N- lub C-, lub oba końce do cytoplazmy, po cytozolowej stronie błony komórkowej. Kaweolina-2 wykazuje duże podobieństwo do sekwencji kaweoliny-1, ale jej ekspresja jest ograniczona wyłącznie do komórek mięśniowych, gdzie jest niski poziom ekspresji kaweoliny-1.

Kaweolina jako białko stymulujące tworzenie wgłbień charakteryzuje się skłonnością do tworzenia stabilnych homo- lub heterooligomerów o dużej masie molekularnej.

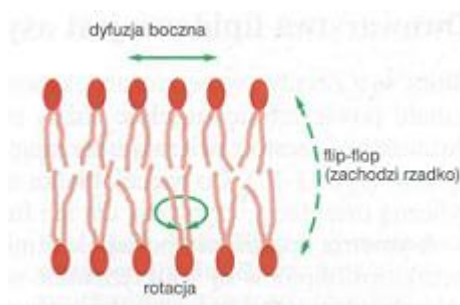
1.2.3. Właściwości błon

Płynność i dynamiczność

Cząsteczki fosfolipidów, białek błonowych i cholesterolu wykazują dużą ruchliwość. Od rodzaju ruchów oraz częstości ruchów zależy stan błon komórkowych. Również temperatura ma znaczny wpływ na ruchliwość, cząsteczki mogą poruszać się szybko lub wolno, co powoduje, że błona może być mniej lub bardziej przepuszczalna. Płynność i dynamiczność regulowana jest składem fosfolipidów, ich ruchliwością i stopniem nienasycenia łańcuchów alifatycznych. W temperaturze fizjologicznej typowej dla danej komórki, błony zawsze są w stanie płynnym [6]. Im ściślejsze i bardziej regularne upakowanie fosfolipidów, tym bardziej lepka, a mniej płynna będzie dwuwarstwa. Krótsze łańcuchy zmniejszają tendencję oddziaływania ogonów węglowodorowych ze sobą, co skutkuje zwiększeniem płynności błony. Każde podwójne wiązanie w nienasyconym ogonie węglowodorowym wytwarza małe zgięcie ogona hydrofobowego, utrudniając upakowanie tego ogona względem innych. W komórkach zwierzęcych płynność błony jest modulowana przez obecność cholesterolu. Te sztywne, krótkie cząsteczki występują w dużych ilościach głównie w błonie komórkowej, gdzie wypełniają przestrzeń między sąsiadującymi cząsteczkami fosfolipidów. Cholesterol usztywnia błonę, zmniejszając jej płynność i przepuszczalność. [7].

W związku z biegunowością hydrofobowo-hydrofilową błon komórkowych przejawiają one uporządkowanie w kierunku prostopadłym do powierzchni błony, a są cieczą w płaszczyźnie błony. Z racji tego błonę komórkową rozpatrujemy jako ciekły kryształ liotropowy. Można wyróżnić kilka typów ich ruchu:

- zginanie łańcucha na skutek dyfuzji wzbudzeń konformacyjnych typu kink, $K = G^+TG^-$ lub w wyższych temperaturach typu jogg, $J = KK$; czynnikiem, który stabilizuje błonę jest cholesterol;
- rotacja wokół długiej osi łańcucha (grupa terminalna CH_3 łańcuchów węglowodorowych w fosfolipidach) lub wokół osi prostopadłej do błony (białka);
- dyfuzja fosfolipidu w płaszczyźnie błony, czyli dyfuzja lateralna, częstotliwość wymiany w tym procesie wynosi około $10^{-7} s^{-1}$;
- znacznie rzadsze przejścia typu „flip-flop” – międzywarstwowe ruchy wymienne cząsteczek, przeskok w błonie komórkowej cząsteczki fosfolipidu z warstwy zewnętrznej do wewnętrznej odbywa się z prędkością jedna cząsteczka na 14 dni, a w błonach retikulum, co 3 sekundy;
- dyfuzja lateralna i rotacja białek – wolniejsza niż u fosfolipidów;
- wyrzucanie lub zanurzanie białek w warstwie błony.



Rysunek 9. Ruchliwość fosfolipidów w obrębie dwuwarstwy lipidowej [7].

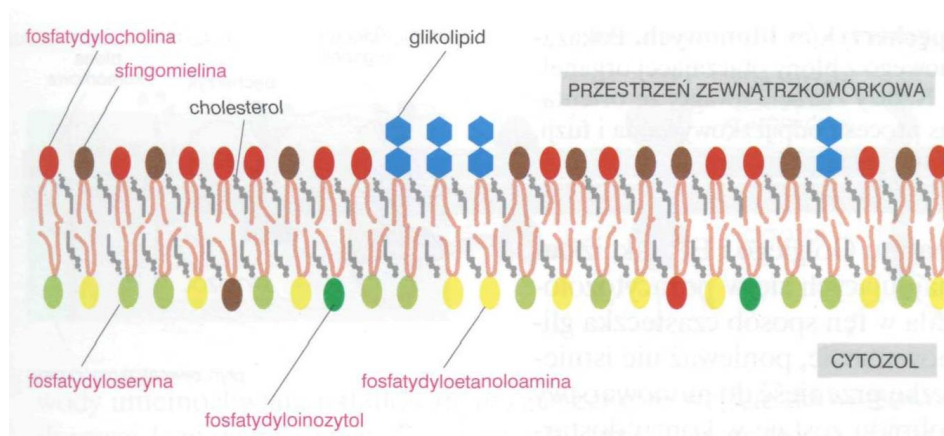
Płynność błony jest bardzo ważna dla komórki, np. umożliwia szybką dyfuzję białek błonowych w płaszczyźnie dwuwarstwy i ich wzajemne oddziaływanie istotne w sygnalizacji komórkowej. Dzięki płynności możliwe jest dyfuzyjne rozpoznawanie lipidów i białek błonowych z miejsc, w których są one po swojej syntezie wbudowane w błonę, do innych obszarów komórki. Płynność błon również pozwala na fuzję błon ze sobą i wymieszanie ich cząsteczek, co przy podziale komórki zapewnia równomierne rozdzielanie tworzących błonę cząsteczek pomiędzy komórki potomne.

Asymetria

Cechą szczególną błon biologicznych jest ich asymetria strukturalna i funkcjonalna. Różnorodność przestrzenna dotyczy zarówno lipidów, białek, jak i węglowodanów.

W błonie retikulum endoplazmatycznego fosfolipidy rozłożone są symetrycznie, natomiast dla pozostałych błon biologicznych (aparatu Golgiego, plazmatycznych i endosomalnych) standardowa jest asymetryczność fosfolipidów [46]. Najlepszym przykładem, gdzie zachowana jest asymetria są komórki erytrocytów [47].

Asymetria obu warstw błony wynika między innymi z różnic w szybkości ruchów pomiędzy tymi warstwami. Zróżnicowane rozmieszczenie fosfolipidów w błonie utrzymuje asymetrię i jest określane mianem asymetrii składu lipidowego błony. Obie monowarstwy błony lipidowej charakteryzują się różnym składem. W warstwie cytoplazmatycznej możemy wyróżnić więcej lipidów o głowach obdarzonych ładunkiem, o łańcuchach zawierających wiązania nienasycone, a także więcej białek powierzchniowych. W części pozacytozowej błony występuje dużo więcej glikolipidów i glikoprotein. Zróżnicowanie składu i budowy błony powoduje, że istnieje różnica w ładunku błony, stężeniach substancji oraz określeniu kierunku transportu przez błonę.



Rysunek 10. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów i glikolipidów w lipidowej dwuwarstwie błony komórkowej [7].

Asymetria fosfolipidów jest dla wielu rodzajów błon komórkowych dobrze znana, natomiast doniesienia dotyczące rozmieszczenia cholesterolu są sprzeczne. Wczesne badania na erytrocytach pokazały, że większa zawartość cholesterolu jest w zewnętrznej warstwie błony [48]. Niektórzy autorzy sugerują równomierne rozmieszczenie tego sterolu między dwie warstwy błony komórkowej [49]. Inni wskazują na jego przewagę po wewnętrznej stronie błony [50]. Najnowsze dane otrzymane przy pomocy metod fluorescencyjnych dla komórek linii jajnika chomika chińskiego potwierdzają, że 60-70% steroli zgromadzonych jest w warstwie cytozolowej [51]. Trudność z określeniem dystrybucji cholesterolu wynika z krótkiego czasu przeskoku tej cząsteczki pomiędzy warstwami błony (górną granicą stałej czasowej dla tego ruchu wynosi w temperaturze 37°C około 1 sekundę [52]).

Utrzymanie asymetryczności błony jest bardzo ważne dla wielu procesów komórkowych [53]. Efektem załamania się asymetrii lipidów jest przemieszczenie fosfatydyloseryny na powierzchnię komórki. Wyeksponowanie tej cząsteczki na zewnątrz błony powoduje zwiększenie przyczepności komórek, aktywację procesów krzepnięcia i późniejsze tworzenie trombiny [54]. Wymuszona zmiana położenia lipidów przekłada się także na zmiany w funkcjonowaniu wielu białek enzymatycznych związanych z lipidami, wywołując zaburzenia m.in. w transdukcji sygnału [55].

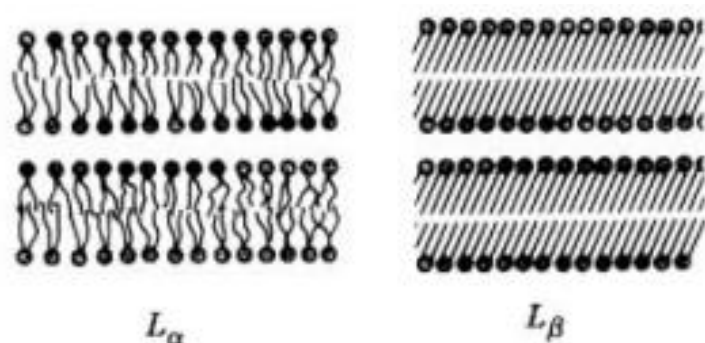
Selektywność

Jedną z ważnych funkcji błon w komórce jest tworzenie bariery, która kontroluje przechodzenie cząsteczek przez błonę. Zasadniczą rolę odgrywa przy tym hydrofobowe wnętrze dwuwarstwy lipidowej, gdyż stanowi ono przeszkodę dla większości cząsteczek hydrofilowych. Niektóre związki mogą z łatwością dyfundować przez błonę komórkową, np. tlen, woda, dwutlenek węgla, etanol. Szybkość dyfuzji przez dwuwarstwę będzie szybsza, im cząsteczka będzie mniejsza i łatwiej rozpuszczalna w olejach. By komórki mogły pobierać substancje odżywcze i usuwać produkty, błona komórkowa musi umożliwiać przechodzenie wielu cząsteczek takich, jak jony, cukry, aminokwasy, nukleotydy. Prosta dyfuzja nie jest w stanie tego zagwarantować, dlatego większości substancji w przenikaniu przez błonę pomagają struktury transportujące, jakimi są białka błonowe. W zależności od warunków środowiska, potrzeb komórki, błona może sporadycznie stać się zaporą dla danej substancji albo przeciwnie, ułatwić jej przesyłanie [7].

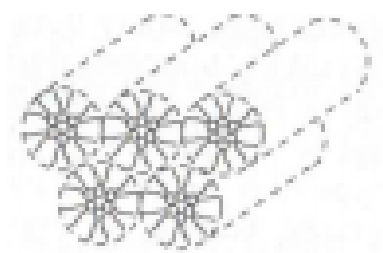
1.2.4. Wpływ lipidów na uporządkowanie błony oraz modele błon biologicznych

Właściwości fizykochemiczne błon biologicznych w znacznym stopniu uzależnione są od właściwości budujących je lipidów [56, 57]. W temperaturze fizjologicznej lipidy błonowe tworzą na ogół jedną z trzech faz liotropowych, opisanych przez współczynnik uporządkowania łańcucha alkilowego (S) oraz przez współczynnik dyfuzji (D). Wiele eksperymentów oraz modelowanie molekularne wykazują, że błony biologiczne najczęściej występują w fazie L_α , czyli w fazie lamellarnej ciekłokrystalicznej, odznaczającej się niską wartością S oraz szybkim współczynnikiem dyfuzji ok. $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Faza żelu L_β jest o wysokiej wartości S i niskiej wartości D około $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Podejrzewa się w tratwach lipidowych obecność fazy $L_{\alpha\beta}$. Ponadto podczas fuzji błon zauważa się występowanie tubul lipidowych

fazy heksagonalnej, H_{II} . Typ fazy zależy silnie od struktury lipidów, a także od ich wzajemnych proporcji. Udział cholesterolu zwiększa uporządkowanie struktury, na przykład w cieniach erytrocytów wykluczając obecność głównego przejścia fazowego w fosfolipidach [57].



Rysunek 11. Faza ciekłokrystaliczna oraz faza żelu błon biologicznych (wg V. Luzzati).



Rysunek 12. Tubule lipidowe fazy heksagonalnej H_{II} (wg V. Luzzati).

Na zachowanie się lipidów w dwuwarstwie lipidowej ma wpływ także rodzaj polarnej głowy. Fosfolipidy, które mają małe grupy polarne (fosfatydyloetanolamina), preferują powstawanie faz heksagonalnych. Uruchomienie łańcuchów alkilowych lipidu jest przejściem fazowym pierwszego rodzaju i nosi nazwę głównego przejścia fazowego. Temperatura tego przejścia nazywa się temperaturą głównego przejścia fazowego T_m , którą można oznaczyć metodą kalorymetrii skaningowej. W modelowych układach można wyróżnić, tzw. przedprzejście (ang. *pretransition*), T_p , a w niektórych czystych syntetycznych fosfolipidach również jedno lub dwa dodatkowe przejścia wiążące się ze zmianą mobilności głowy polarnej [23]. Temperatury przejść fazowych zależą też od pH środowiska oraz od siły jonowej [57].

Ze względu na rozmieszczenie cząsteczek lipidowych w błonie (warstwa dwucząsteczkowa), od bardzo dawna szukano układu zastępczego do badań, który zbudowany byłby z lipidowej warstwy dwucząsteczkowej. Dopiero w drugiej połowie XX wieku udało się tworzyć takie

układy w postaci, tzw. czarnych błon i błon liposomów. Błony liposomów do chwili obecnej są traktowane za perfekcyjne błony modelowe.

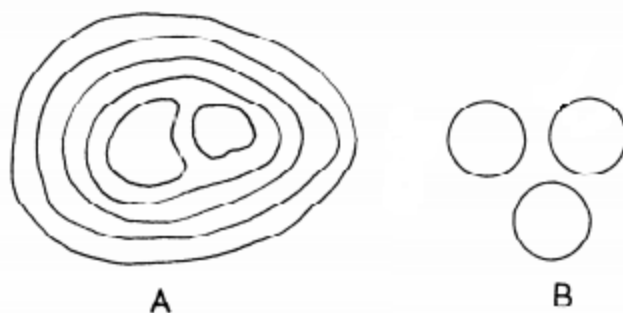
W 1962 roku Mueller wraz ze swoimi współpracownikami stworzyli dwumolekularną błonę lipidową, którą nazwali czarną błoną (ang. black lipid membrane albo painted membrane). Błona ta oddziela dwa wodne ośrodki i charakteryzuje się taką samą strukturą, jaką według przekonań cechuje się warstwa lipidowa w błonach biologicznych. Procedura przygotowania takich układów polega na naniesieniu roztworu rozpuszczonych lipidów na szczelinę znajdującą się w hydrofobowej przegrodzie i odparowywaniu rozpuszczalnika. Następnie, komora, do której wprowadza się przegrodę, zostaje wypełniona buforem [58].

Właściwości fizyczne tej błony bardzo przypominają właściwości błon biologicznych. Model ten w szczególności jest wykorzystywany do badań właściwości elektrycznych błon. Zazwyczaj mierzy się opór elektryczny lub pojemność elektryczną. Proste urządzenia do takich pomiarów pozwalają również określić przewodnictwo elektryczne błony. W związku z tym można pozyskać informacje dotyczące błony oraz procesów przenikania nośników ładunku elektrycznego. Błona czarna oprócz zalet ma i wady. Niestety, tak utworzona dwuwarstwa nie wykazuje dużej stabilności. Problemem są również resztkowe ilości rozpuszczalnika organicznego, które pozostają uwięzione w membranie. Kolejną wadą jest powierzchnia, gdyż nie przekracza ona kilku milimetrów kwadratowych. Dodatkowym ograniczeniem jest mała wytrzymałość mechaniczna oraz czas życia (od kilku sekund do kilku godzin), które utrudniają pomiary podczas długotrwałych badań. Błona czarna jest błoną płaską, dlatego też podczas eksperymentów nie ma możliwości obserwowania zjawiska związanego z krzywizną błon biologicznych.

Wśród modeli eksperymentalnych służących zbadaniu błon biologicznych można wyróżnić także, np. izolację fragmentów błon z żywych komórek przy pomocy prasy Frencha. Komórki są rozrywane podczas przepuszczania przez cienką igłę pod zwiększonym ciśnieniem i następnie wirowanie w gradiencie stężenia sacharozy. Błona zostaje pofragmentowana i jej części mogą zostać osadzone na substracie posiadającym hydrofilową powierzchnię [59, 60]. Jak każda z metod, posiada wady i zalety. Bez wątpliwości zaletą jest to, że układy są zbliżone do naturalnych, jednakże z drugiej strony trudno kontrolować parametry eksperymentu.

Krótko po odkryciu czarnych błon lipidowych w 1965 roku Bangham, stosując dyspersję fosfolipidów w wodzie i roztworach wodnych, opracował popularny i prosty w opracowaniu

nowy wzór błon liposomów. Fosfolipidy w właściwych warunkach samorzutnie tworzą w roztworach wodnych tzw. liposomy [61]. Są to złożone układy z wielu koncentrycznych zamkniętych warstw dwumolekularnych oddzielonych fazą wodną. Wielkość liposomów szacuje się na około 0,4 do 10 μm . Każda z tych warstw jest zamkniętym pęcherzykiem. Podstawowe liposomy uformowane są z jednej warstwy dwucząsteczkowej oddzielającej wypełnione wodą lub roztworem wodnym wnętrze od dowolnego ośrodka [62]. Jeżeli stężenie liposomów jest duże, to powierzchnia błon liposomów jest duża. Pozwala to na zmierzenie strumieni dyfuzyjnych, choćby nawet gdy mamy do czynienia ze słabo przenikliwymi substancjami. Czas życia liposomów wynosi od kilku dni w temperaturze pokojowej do kilku tygodni w temperaturach poniżej zera. Krzywizna błon liposomów jest zbliżona do krzywizny wielu błon biologicznych. Błony liposomów są bardzo użyteczne w obecnych czasach do badań zjawisk membranowych przy użyciu metod doświadczalnych, np. wirowania, elektroforezy, spektroskopii NMR [63].



Rysunek 13. Schematyczny obraz A - liposomów wielowarstwowych, B - liposomów jednowarstwowych.

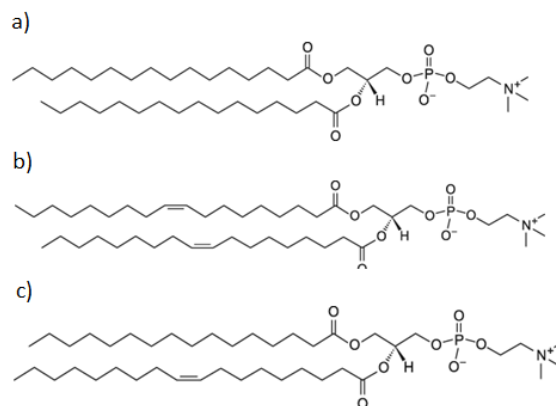
Również monowarstwy formowane metodą Langmuira na granicy faz powietrze-woda oraz dwuwarstwy (formowane metodą Langmuira-Blodgett i Langmuira-Schaefera) osadzone na stałym podłożu, mogą służyć jako modele do badań nad zachowaniem się filmów lipidowych.

W zależności od celu badawczego można wybrać dogodny model. Dlatego, jeśli trzeba określić, np. pojemność elektryczną należy zastosować czarne błony fosfolipidowe, natomiast gdy potrzeba wyznaczyć strumienie dyfuzyjne, należy wykorzystać liposomy. Każdy model można udoskonalać, przerabiać. Jednak należy pamiętać, że im więcej, np. wprowadzimy białek do układu, dzięki którym właściwości błony zbliżają się bardziej do właściwości błony biologicznej, tym trudniej będzie analizować procesy w takim modelu [64].

1.3. DPPC, DOPC i POPC

Cząsteczka DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny) jest lipidem afipatycznym, składa się ze szkieletu glicerolowego, do którego przyłączone są dwa nasycone łańcuchy kwasu palmitynowego, ortofosforan i cholina. Fosfolipid ten występuje w fazie żelu w temperaturze pokojowej, podobnym do ciała stałego (L_β), temperatura topnienia DPPC wynosi $41,3^\circ\text{C}$ [65]. Powyżej temperatury topnienia, DPPC ma postać płynną. DPPC jest związkiem aktywnym powierzchniowo, wytwarzanym przez większość zwierząt oddychających powietrzem. Udowodniono, że DPPC ma zdolność obniżania napięcia powierzchniowego cieczy pęcherzykowej. Prawdopodobnie za regulację napięcia powierzchniowego w płucach odpowiedzialne są przejścia fazowe fosfolipidów [66]. Ponadto przeprowadzone eksperymenty wykazują udział DPPC w odpowiedzi immunologicznej organizmu [67].

Przedstawicielami fosfatydylocholin nienasyconych występujących w zwierzęcych błonach biologicznych są 1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DOPC) oraz 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC).

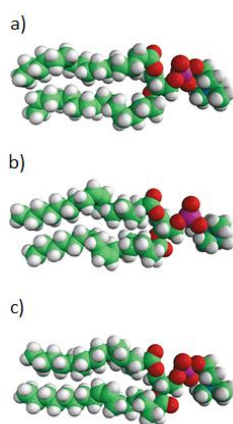


Rysunek 14. Wzór strukturalny cząsteczki DPPC (a), DOPC (b) oraz cząsteczki POPC (c) (źródło: AvantiLipids).

Podstawą cząsteczki DOPC jest kręgosłup glicerolowy, do którego przyłączone są dwa 18-węglowe łańcuchy kwasu oleinowego. Każdy z tych łańcuchów węglowodorowych ma jedno wiązanie nienasycone. Do szkieletu przyłączony jest także ortofosforan i cholina. Cząsteczka POPC ma podobną budowę do DOPC z tą różnicą, że jeden z łańcuchów kwasu oleinowego zastąpiony jest nasyconym łańcuchem kwasu palmitynowego. Dwa estry

karbonylowe w obszarze międzyfazowym tych fosfocholin decydują o tym, że cząsteczki te funkcjonują jako akceptory wodorów. Temperatura przejścia fazowego dla tych lipidów odpowiednio wynosi: około -5°C dla POPC oraz ok. -15°C dla DOPC, dlatego fosfolipidy te występują w stanie ciekłokrystalicznym L_{α} w temperaturze pokojowej.

Fosfolipidy, które zawierają grupę cholinową, są najliczniejszą klasą w komórkach eukariotycznych. Dodatkowo wybrane lipidy są najczęstszymi modelowymi układami lipidowymi wybieranymi do przeprowadzania eksperymentów [68].



Rysunek 15. Struktura cząsteczki DPPC (a), DOPC (b) oraz cząsteczki POPC (c) (źródło: Avantilipids).

1.4. Kinetyka hydratacji

Kinetyka hydratacji charakteryzowana jest jako przyrost względnej zawartości wody w danym materiale w funkcji czasu. Definiuje ona substancję pod względem wrażliwości na ustaloną wilgotność względną otoczenia oraz określa zdolność substancji do chłonięcia wody. Kinetyka hydratacji zależy głównie od materiału, temperatury oraz wilgotności względnej otoczenia. Wilgotność względna to stosunek ciśnienia cząstkowego pary wodnej w powietrzu p_w do ciśnienia cząstkowego pary wodnej nasyconej p_{wn} :

$$\varphi = \frac{p_w}{p_{wn}}. \quad (1)$$

Przyrost względnej zawartości wody $\Delta m/m_0$ nazywany jest poziomem uwodnienia układu, innymi słowy jest to stosunek ilości wody zaadsorbowanej do masy suchej m_0 układu. Masa wody zaadsorbowanej Δm to różnica między masą próbki a suchą masą. Masa sucha m_0 próbki to masa po usunięciu wody. Ta wielkość jest wzorcem, który może być

wykorzystywany do skalowania i porównywania różnych próbek. Do wyznaczania suchej masy układu badawczego stosuje się różne metody. Jedną z najbardziej popularnych metod jest osuszanie w podwyższonej temperaturze, inna to suszenie w próżni o temperaturze pokojowej lub przechowywanie próbek w środowisku o wilgotności względnej równej zero procent (nad powierzchnią żelu krzemionkowego).

Cały proces kinetyki hydratacji opisywany jest funkcją jedno eksponencjalną lub superpozycją funkcji eksponencjalnych:

$$\frac{\Delta m(t)}{m_0} = A_0 + \sum_{i=1}^2 A_i \left[1 - e^{\left(-\frac{t}{t_i} \right)} \right], \quad (2)$$

gdzie:

$\Delta m/m_0$ – względny przyrost masy,

A_0 – masa wody nieusuwalnej podczas suszenia w $p_w/p_{wn} = 0\%$,

A_i – masa wody wiązanej w danej wilgotności,

t_i – czasy uwodnienia dla odpowiednich składowych A_i .

Natomiast suma:

$$A_0 + \sum_{i=1}^2 A_i = C, \quad (3)$$

odpowiada całkowitemu poziomowi hydratacji próbki.

Stała czasowa hydratacji t_1 określana jest jako szybka składowa hydratacji, związane jest to ze stałymi czasowymi hydratacji. Im wyższa składowa hydratacji, tym wartości czasów uwodnienia będą dłuższe. Cząsteczki wody przyłączane do powierzchni w czasie t_1 wiążą się szybciej, dlatego molekuly wody nazywamy w tym wypadku wodą ściśle związaną. Składowe wolniejsze hydratacji odpowiadają za doczepianie warstw wody słabiej związanej i określamy je wodą luźno związaną.

Woda związana czasami bywa definiowana jako woda niezamarzalna, ponieważ nie zamarza w równowagowej termodynamicznie temperaturze zamarzania wody [23].

Przebieg kinetyki sorpcji może być odmienny w zależności od badanego materiału, co więcej może różnić się od podanego powyżej opisu. Dzieje się tak, gdyż każda substancja ma indywidualne właściwości mikrostrukturalne. Dotyczy to, np. substancji złożonych w formie sypkiej oraz substancji rozpuszczalnych, które potrafią krystalizować niektóre cukry. Dodatkowo w przypadku biopolimerów zaburzenia w procesie kinetyki hydratacji wywołane mogą być procesami pęcznienia, czyli przyłączaniem cząsteczek wody

do wewnętrznych struktur polimerów [23, 69] i tym samym zwiększania powierzchni dostępnej dla hydratacji.

1.5. Izoterma sorpcyjna

Izoterma sorpcyjna jest to zależność masy wody zaabsorbowanej na powierzchni badanego układu od wilgotności względnej otoczenia w stałej temperaturze. Izotermę sorpcyjną można wyznaczyć na dwa sposoby. Pierwszy sposób dotyczy procesu dehydratacji próbki i określenia ubytku masy wody przy zmniejszającej się aktywności wody. W ten sposób powstaje krzywa, którą nazywa się izotermą desorpcji. Drugi sposób związany jest z ponownym procesem dehydratacji próbki, a powstające krzywe to izoterm adsorpcji.

Adsorpcja to proces wiązania się cząsteczek, atomów lub jonów na powierzchni lub granicy zetknięcia się dwóch faz, powodując lokalne zmiany stężenia. Substancja, która gromadzi się na powierzchni to adsorbat, natomiast substancja przyjmująca to adsorbent. Adsorpcja ma charakter powierzchniowy i różni się od absorpcji, która polega na pochłanianiu adsorbentu przez całą masę adsorbentu. Często procesy adsorpcji i absorpcji występują równocześnie, dlatego nazwano ogólnie te procesy sorpcją. Rozróżnia się w zależności od sił działających pomiędzy adsorbentem a adsorbentem adsorpcję fizyczną i chemiczną. W adsorpcji fizycznej cząsteczki adsorbentu na granicy faz ulegają niezrównoważonym siłom Van der Waalsa, natomiast w adsorpcji chemicznej cząsteczki wiążą się z powierzchnią za pomocą wiązań chemicznych, którymi najczęściej są wiązania wodorowe lub kowalencyjne.

Obecnie izoterm sorpcyjne można podzielić według klasyfikacji IUPAC (Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej) [70], która zastąpiła poprzednią stworzoną przez Brunauera w 1943. Wyróżnia się w niej cztery typy izoterm, z których trzy pierwsze są zgodne z poprzednią klasyfikacją. Typ I jest charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych, opisywany izotermą Langmuira. Typ II jest najczęściej stosowany i III – bardzo rzadko występujący. Oba te typy są charakterystyczne dla adsorbentów mikroporowatych, ale opisuje się je za pomocą sigmoid. Typ IV jest powszechny i charakterystyczny dla adsorpcji wielowarstwowej na powierzchni jednorodnej. Typ V występuje rzadko, a stosuje się go do adsorbentów mezoporowatych.

Badanie izoterm sorpcyjnych wody ma ważne znaczenie praktyczne. Znajomość zależności zawartości wody od jej aktywności jest istotna w procesach przetwórstwa, przechowywania i transportu żywności. Analiza izoterm pozwala na wyznaczenie wilgotności optymalnej dla

przeżycia niektórych organizmów. Izotermę sorpcyjną opisuje wiele modeli, w szczególności wyróżnia się: model Langmuira, opisujący sorpcję jednowarstwową, model BET oraz model Denta.

Ze względu na ograniczone ilości materiału badawczego do eksperymentu, w niniejszym doświadczeniu nie wykonywano izoterm sorpcyjnych. Powyższe wiadomości jedynie pełnią funkcję informacyjną, iż istnieją możliwości dodatkowych badań z zakresu mechanizmu przyłączania i odłączania molekuł wody do powierzchni ciała stałego.

1.6. Magnetyczny rezonans jądrowy

Metoda magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) polega na wzbudzeniu jąder o niezerowym spinie znajdujących się w stałym polu magnetycznym poprzez szybkie zmiany dodatkowego pola magnetycznego. Następnie rejestruje się promieniowanie elektromagnetyczne powstające w wyniku relaksacji, gdzie przez relaksację należy rozumieć powrót układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej. NMR jest formą spektroskopii absorpcyjnej, zbliżonej do spektroskopii w podczerwieni czy nadfiolecie. W spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego używane jest promieniowanie elektromagnetyczne o częstotliwościach z zakresu radiowego. Dzięki temu można wzbudzić przejścia między poziomami o niskiej barierze energetycznej, co jest typowe dla stanów kwantowych związanych z magnetycznymi własnościami jąder atomów budujących cząsteczki chemiczne.

Zjawisko NMR odkryto w 1945 roku przez dwa niezależne zespoły Blocha i Purcella, którym przyznano nagrodę Nobla w 1952 roku. Zostało ono wykorzystane w fizyce do badań właściwości jąder atomowych oraz w chemii organicznej do badań struktury i dynamiki cząsteczek organicznych. Wielki rozwój spektroskopii NMR nastąpił wraz z wprowadzeniem metody impulsowej badania rezonansu z użyciem transformacji Fouriera do analizy sygnałów. Stosując metodę NMR, można pozyskać informacje na temat dynamiki układu spinów jądrowych. Protonowy rezonans magnetyczny (^1H -NMR) może służyć do określenia poziomu uwodnienia badanych układów biologicznych, fazy i ruchliwości zawartej w nich wody.

1.6.1. Moment pędu i moment magnetyczny

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego występuje w mikroświecie, dlatego można rozważać to zjawisko za pomocą mechaniki kwantowej. Jednak w konkretnym eksperymencie sygnały NMR pochodzą z próbek makroskopowych złożonych z dużej liczby cząsteczek, dlatego opis doświadczenia powinien być zgodny z prawami fizyki klasycznej. W takim wypadku magnetyczny rezonans jądrowy dogodniej jest opisać na bazie fizyki klasycznej, przyjmując pewne założenia mechaniki kwantowej.

Dla każdego jądra atomowego można przypisać wewnętrzny moment pędu, który wynika z ruchu wirowego jądra wokół własnej osi. Jądra atomowe, z wyjątkiem parzysto-parzystych, posiadają niezerowy moment pędu $\vec{K}$. Moment pędu jądra jest wielkością wektorową, którą można opisać jako iloczyn wektorowy pędu i promienia wodzącego:

$$\vec{K} = \vec{r} \times \vec{p}. \quad (4)$$

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego obserwuje się dla jąder atomowych posiadających własny moment pędu $\vec{K}$.

Proton, jako cząsteczka obdarzona ładunkiem elektrycznym, jest najprostszym jądrem atomowym i najczęściej stosowanym obiektem do badań NMR. Wirujące jądro sprawia, że powstaje moment magnetyczny $\vec{\mu}$. Można je przyrównać do elementarnej sztabki magnesu, która jest równocześnie dipolem magnetycznym. W elektrodynamice klasycznej moment magnetyczny powiązany jest ściśle z momentem pędu w sposób:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{K}, \quad (5)$$

gdzie γ oznacza elektronowy współczynnik giromagnetyczny, zależny od znaku, wielkości, sposobu rozłożenia ładunku, wyraża się w jednostkach $\text{erst}^{-1}\text{sek}^{-1}$. Współczynnik ten często bywa przedstawiany w postaci:

$$\gamma = g_n \frac{\mu_0 e}{2m_p c}, \quad (6)$$

gdzie e to ładunek protonu, m_p to masa protonu, a g_n jest czynnikiem Landego dla jądra.

Jeśli jądro jest obdarzone momentem magnetycznym $\vec{\mu}$ i umieszczone w jednorodnym polu magnetycznym $\vec{B}_0$, to na dane jądro działać będzie moment siły $\vec{M}_s$:

$$\vec{M}_s = \vec{\mu} \times \vec{B}_0. \quad (7)$$

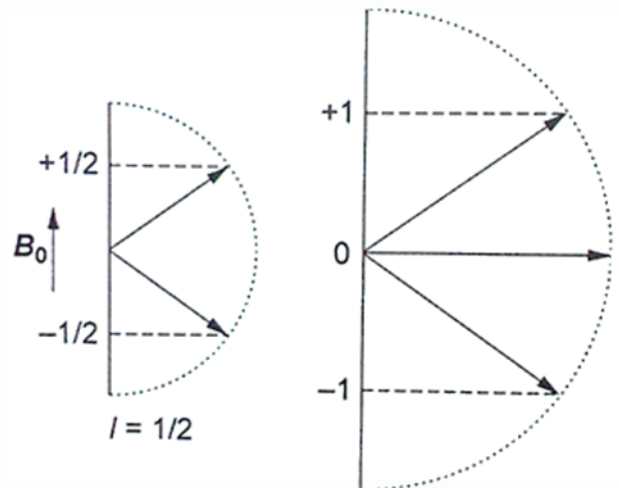
Wszystkie jądra atomowe, złożone z nieparzystej liczby nukleonów, zawierają niezerowy własny moment pędu (spin), a także niezerowy moment magnetyczny. Według mechaniki kwantowej rzut wektora momentu pędu na sprecyzowany w przestrzeni kierunek, równoległy do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego, może przybrać tylko jedną ze ściśle określonych wartości. Poprawne wartości maksymalnej składowej $\vec{K}$ w kierunku osi z w dowolnie wybranym układzie współrzędnych można zapisać według równania:

$$K_z = \hbar m, \quad (8)$$

gdzie $\hbar = \frac{\hbar}{2\pi}$, a m to liczba magnetyczna kwantowa wyrażająca stan własny jądra. Zgodnie z założeniem kwantowania, magnetyczne liczby kwantowe powiązane są ze spinową liczbą kwantową jądra I :

$$m = I, I - 1, I - 2, \dots, -I. \quad (9)$$

Spinowa liczba kwantowa dla protonu wynosi $\frac{1}{2}$, co daje rzut na oś kwantyzacji $m = +\frac{1}{2}$ lub $m = -\frac{1}{2}$. Wobec tego, proton występuje zaledwie w dwóch stanach stacjonarnych i jest dipolem magnetycznym. Spiny jądrowe, które wystawione są na działanie jednorodnego zewnętrznego pola magnetycznego $\vec{B}_0$ mogą przyjmować $2I+1$ orientacji [71].



Rysunek 16. Możliwe orientacje dla spinów $I = \frac{1}{2}$ oraz $I = 1$ względem pola magnetycznego B_0 [75].

1.6.2. Energia jądrowego momentu magnetycznego w polu magnetycznym

Rozpatrując sytuację, w której jądro zawierające moment magnetyczny $\vec{\mu}$ znajduje się w stałym polu magnetycznym $\vec{B}_0$, a to pole magnetyczne nadaje kierunek osi kwantyzacji w przestrzeni, należy wybrać laboratoryjny układ współrzędnych tak, aby oś z była równoległa i posiadała ten sam zwrot, co wektor pola magnetycznego $\vec{B}_0$. Na podstawie fizyki klasycznej energia jądrowego momentu magnetycznego oddziałującego z polem magnetycznym wynosi:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar B_0 I_z. \quad (10)$$

Rozważając współrzędną I_z jako operator, można otrzymać operator energii tzw. hamiltonian:

$$H = -\gamma \hbar B_0 I_z, \quad (11)$$

a jego własności własne wynoszą:

$$E(m) = -m \gamma \hbar B_0. \quad (12)$$

Są to wartości energii, jakie może przyjmować swobodny spin jądrowy, znajdujący się w polu magnetycznym $\vec{B}_0$. Wartości te nazwane są poziomami energetycznymi, a w skrócie poziom $E(m)$ przeważnie jest nazywany poziomem m . Natomiast odległość pomiędzy dwoma sąsiednimi poziomami wynosi:

$$\Delta E = E(m) - E(m-1) = -\gamma \hbar B_0. \quad (13)$$

Poziomy $E(m)$ z uwagi na duże podobieństwo do poziomów energetycznych występujących w zjawisku Zeemana, zaliczane są do tzw. poziomów zemanowskich jądrowych.

Zmienne pole magnetyczne $\vec{B}_1$ o częstotliwości ω wytwarza falę elektromagnetyczną, która jest strumieniem fotonów o energii równej:

$$E_f = \hbar \omega. \quad (14)$$

Jeśli energia kwantu fali elektromagnetycznej jest równa różnicy poziomów energetycznych jądra atomowego, może dojść do pochłonięcia kwantu przez to jądro. Zestawiając wzory (13) i (14), otrzymać można wartość częstotliwości pola, dla której nastąpi absorpcja energii przez badaną próbkę:

$$\omega = \gamma B_0. \quad (15)$$

Równanie to zwane jest warunkiem magnetycznego rezonansu jądrowego [72].

1.6.3. Obsadzenie poziomów energetycznych i magnetyzacja próbki

Badane makroskopowe próbki zawierają duże ilości jąder rzędu liczby Avogadro. Jądra te oddziałują z zewnętrznym polem magnetycznym, ale także z polami wewnętrznymi pochodzącymi od momentów magnetycznych elektronów, jąder oraz ładunków znajdujących się w otoczeniu danego jądra.

W warunkach równowagi termodynamicznej z otoczeniem stosunek obsadzeń dwóch sąsiednich poziomów energetycznych jest zgodny z rozkładem Boltzmanna:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{\frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi kT}}, \quad (16)$$

gdzie N_1 i N_2 to liczba jąder na poziomach odpowiednio niższym i wyższym energetycznie, ΔE to różnica energii odpowiednio niższego i wyższego poziomu energetycznego, k to stała Boltzmanna, a T to temperatura bezwzględna próbki.

Prawdopodobieństwo obsadzenia niższego energetycznie stanu jest większe niż obsadzenie stanu energetycznie wyższego. Różnica energii poziomów magnetycznych jąder jest bardzo mała w porównaniu z energią termiczną, np. stosunek obsadzeń zaprezentowany równaniem (16) jest bliski 1, a dla jąder ^1H w polach magnetycznych o wartości indukcji kilku tesli, różnica jest rzędu jednego jądra na milion. W próbce znajduje się liczba jąder rzędu 10^{24} , a różnica obsadzeń w całej makroskopowej próbce jest rzędu 10^{18} , wpływa to na wypadkowy moment magnetyczny, który staje się już mierzalny.

W przypadku, gdy analizuje się makroskopową próbkę, usytuowaną w zewnętrznym polu magnetycznym o indukcji $\vec{B}_0$, precyzuje się magnetyzację jądrową $\vec{M}$ równą sumie momentów magnetycznych na jednostkę objętości próbki [73]:

$$\vec{M} = \frac{\sum_{i=1}^n \vec{\mu}_i}{V}. \quad (17)$$

Rozkład momentów magnetycznych w próbce, w przypadku braku zewnętrznego pola magnetycznego, na skutek ciągłych i chaotycznych ruchów termicznych jest izotropowy, co daje zerową wartość magnetyzacji jądrowej. Gdy próbka zostałaby umieszczona w zewnętrznym polu magnetycznym $\vec{B}_0$, skierowanym wzdłuż osi z umownego układu

laboratoryjnego, to składowe magnetyzacji M_x i M_y wirują chaotycznie wznosząc się wzajemnie, a składowa M_z pozostaje niezerowa:

$$M_x = \frac{\sum_{i=1}^n \overrightarrow{\mu_{ix}}}{V} = 0, \quad (18)$$

$$M_y = \frac{\sum_{i=1}^n \overrightarrow{\mu_{iy}}}{V} = 0, \quad (19)$$

$$M_z = \frac{\sum_{i=1}^n \overrightarrow{\mu_{iz}}}{V} \neq 0. \quad (20)$$

Magnetyzacja próbki w stanie równowagi termodynamicznej jest równoległa do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego $\overrightarrow{B_0}$ i niezerowa.

1.6.4. Precesja Larmora

Na bazie mechaniki klasycznej modyfikacja momentu pędu ciała jest równa działającemu na to ciało momentowi siły:

$$\overrightarrow{M_s} = \frac{d\overrightarrow{K}}{dt}. \quad (21)$$

Na jądro znajdujące się w polu magnetycznym $\overrightarrow{B_0}$ oraz posiadające moment magnetyczny $\overrightarrow{\mu}$ działa moment siły $\overrightarrow{M_s}$ dany wzorem:

$$\overrightarrow{M_s} = \overrightarrow{\mu} \times \overrightarrow{B_0}. \quad (22)$$

Biorąc pod uwagę, że moment pędu $\overrightarrow{K}$ można przedstawić w postaci:

$$\overrightarrow{K} = \overrightarrow{I} \hbar, \quad (23)$$

to ruch wektora jądrowego momentu magnetycznego w polu magnetycznym przedstawia równanie:

$$\frac{d\overrightarrow{\mu}}{dt} = \gamma \overrightarrow{\mu} \times \overrightarrow{B_0}. \quad (24)$$

Jednak w układzie, którego oś z jest równoległa do wektora zewnętrznego pola magnetycznego, wirującym wokół osi tego pola z częstością kołową $\overrightarrow{\omega}$ otrzymać można równanie w postaci:

$$\frac{d\overrightarrow{\mu}}{dt} = \gamma \overrightarrow{\mu} \times \left(\overrightarrow{B_0} + \frac{\overrightarrow{\omega}}{\gamma} \right). \quad (25)$$

W takiej sytuacji można powiedzieć, że wektor jądrowego momentu magnetycznego doznaje działania efektywnego pola magnetycznego:

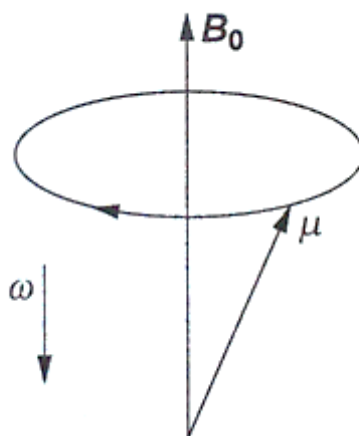
$$\vec{B}_{ef} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}. \quad (26)$$

W przypadku, gdy w układzie wirującym pole efektywne jest równe zero, to wektor momentu magnetycznego jest nieruchomy dla obserwatora, który porusza się z częstością precesji Larmora. Odbywa się to gdy:

$$B_0 = -\frac{\omega}{\gamma}, \quad (27)$$

czyli:

$$\omega_L = -\gamma B_0. \quad (28)$$



Rysunek 17. Precesja Larmora magnetycznego momentu jądrowego μ [75].

1.6.5. Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego

Jeśli próbka zlokalizowana w stałym, jednorodnym polu magnetycznym $\vec{B}_0 = [0, 0, B_0]$ zostanie poddana działaniu drugiego, zmiennego pola magnetycznego $\vec{B}_1$ o kierunku prostopadłym do $\vec{B}_0$ wirującego z prędkością kątową $\vec{\omega}$ zgodnie z ruchem wskazówek zegara, to równanie ruchu (24) trzeba uzupełnić o dodatkowe pole $\vec{B}_1$ [74]:

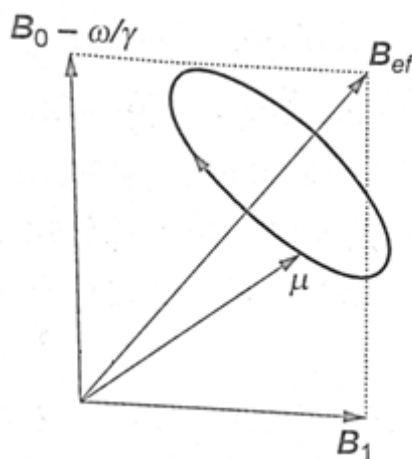
$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{B}_1 \right). \quad (29)$$

Efektywne pole magnetyczne $\vec{B}_{ef}$ działające na wektor magnetycznego momentu jądrowego $\vec{\mu}$ przez dodanie do pola stałego $\vec{B}_0$ pole $\vec{B}_1$ można przedstawić w postaci:

$$\vec{B}_{ef} = \vec{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma} + \vec{B}_1. \quad (30)$$

Spiny jądrowe realizują precesję wokół pola efektywnego.

Zakładając, że częstość wirowania układu jest równa częstości Larmora, to jedynym polem „widzianym” przez moment magnetyczny będzie pole $\vec{B}_1$. Wówczas jądrowy moment magnetyczny będzie wykonywał precesję dookoła kierunku pola $\vec{B}_1$ z częstością $\omega_1 = \gamma B_1$. Identycznie, wektor magnetyzacji będzie precesował wokół pola $\vec{B}_1$, powodując odchylenie wektora od osi z. Zważywszy na to, że pole $B_1 < B_0$, wartość częstości ω_1 jest dużo mniejsza od ω_L . Tak więc, przy pomocy słabszego, zmiennego pola magnetycznego wirującego z prędkością kątową precesji Larmora, można zmienić wartość magnetyzacji jądrowej próbki w stałym i silnym polu $\vec{B}_0$. Częstości Larmora dla stosowanych obecnie w spektroskopii NMR pól magnetycznych $\vec{B}_0$ są rzędu dziesiątek lub setek megaherców, dlatego pole $\vec{B}_1$ o podobnej częstości nosi nazwę pole częstości radiowej RF [74].



Rysunek 18. Precesja jądrowego momentu magnetycznego wokół efektywnego pola magnetycznego w warunkach, gdy prędkość wirowania pola $\vec{B}_1$ jest bliska częstości Larmora [75].

Działanie pola zmiennego ma formę selektywną pod względem rodzaju jąder w próbce. Jeżeli ustawimy pole o częstości spełniającej warunek rezonansu dla danych jąder atomowych,

to magnetyzacja innych jąder w próbce nie zostanie odchyłona. Cecha ta jest rezultatem różnicy wartości współczynnika żyromagnetycznego i częstości rezonansu dla konkretnych rodzajów jąder [75].

1.6.6. Magnetyczna relaksacja jądrowa

Wzbudzony układ spinów jądrowych będzie powracać do stanu równowagi termodynamicznej. Oznacza to, że magnetyzacja próbki podlega procesom relaksacji. Odtwarzanie boltzmanowskiego rozkładu zachodzi poprzez oddawanie energii do otoczenia, zazwyczaj nazywanego siecią. W związku z tym relaksację z-towej składowej magnetyzacji nazywa się relaksacją spinowo-sieciową. Makroskopowo odrasta składowa M_z wektora magnetyzacji, który powraca do wartości początkowej M_0 . Jako, że jest to relaksacja składowej równoległej do osi pola $\vec{B}_0$, relaksację tę można także nazwać relaksacją podłużną.

Po wychyleniu magnetyzacji z położenia równowagi, wartości składowych M_x i M_y będą wracać do równowagi. Wartością równowagową tych składowych jest 0, co oznacza, że proces relaksacji spinowo-spinowej jest zanikiem obu tych składowych. Z procesem relaksacji poprzecznej nie jest związana wymiana energii układu z otoczeniem, ponieważ energia układu spinów nie zależy od wartości składowej prostopadłej magnetyzacji jądrowej, a jest prostopadła do wektora indukcji pola magnetycznego.

Powrót składowej M_z do wartości początkowej M_0 oraz zanik składowych M_x i M_y w wirującym z prędkością Larmora układzie współrzędnych opisane są równaniami:

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2}, \quad (31)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}, \quad (32)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1}, \quad (33)$$

gdzie T_1 i T_2 to stałe czasowe procesu relaksacji, odpowiednio czas relaksacji podłużnej oraz czas relaksacji poprzecznej. Jeśli precesja magnetyzacji zostanie opisana równaniem:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{B} \times \vec{M}), \quad (34)$$

to całkowity ruch magnetyzacji można przedstawić następującymi wzorami (równaniami Blocha) [76]:

$$\frac{d\vec{M}_x}{dt} = \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_x - \frac{M_x}{T_2}, \quad (35)$$

$$\frac{d\vec{M}_y}{dt} = \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_y - \frac{M_y}{T_2}, \quad (36)$$

$$\frac{d\vec{M}_z}{dt} = \gamma(\vec{B} \times \vec{M})_z - \frac{M_0 - M_z}{T_1}, \quad (37)$$

gdzie $\vec{M}$ to magnetyzacja, $\vec{B}$ indukcja pola magnetycznego, γ współczynnik żyromagnetyczny, T_1 to czas relaksacji podłużnej, T_2 czas relaksacji poprzecznej.

Rozwiązaniem równań Blocha dla składowej x i y jest:

$$M_{xy} = -\exp\left(-\frac{T}{T_2}\right) + c. \quad (38)$$

Natomiast rozwiązaniem równania dla składowej z:

$$M_z = -\exp\left(-\frac{T}{T_1}\right) + M_0 + c_1, \quad (39)$$

c i c_1 to stałe całkowania.

Po rozwiązaniu równań Blocha można policzyć dynamiczną podatność magnetyczną χ , która powiązana jest z polem $\vec{B}_1$. Dynamiczna podatność magnetyczna składa się z dwóch części: dyspersyjnej χ' i absorpcyjnej χ'' . Część dyspersyjna jest zgodna w fazie z polem $\vec{B}_1$, a część absorpcyjna jest przesunięta w fazie o 90° względem pola $\vec{B}_1$. Gdy określi się statyczną podatność χ_0 oraz współczynnik nasycenia S , to można osiągnąć równania określające obie części dynamicznej podatności magnetycznej χ' i χ'' .

$$\chi_0 = \frac{M_0}{B_0}, \quad (40)$$

$$S = \frac{1}{1 + \gamma^2 B_0^2 T_1 T_2}, \quad (41)$$

$$\chi' = \omega_0 \chi_0 T_2 \frac{(\omega_0 - \omega) T_2 S}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 S}, \quad (42)$$

$$\chi'' = \omega_0 \chi_0 T_2 \frac{S}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 S}. \quad (43)$$

Z czasami relaksacji T_1 oraz T_2 powiązany jest czas korelacji τ_c . Jest to czas, w którym cząsteczka przemieści się o 1 radian w płaszczyźnie lub o 1 steradian w przestrzeni. Zatem, czas korelacji przedstawia ruchliwość molekuł. W ciałach stałych czasy korelacji są duże, gdyż cząsteczki poruszają się powoli, natomiast w cieczach cząsteczki poruszają się szybko,

tym samym wartości czasu korelacji są małe. Stosunek czasów relaksacji od czasu korelacji dla pary różnych spinów opisują równania wyprowadzone przez Bloembergena, Purcella i Pounda [77]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{160\pi^2} \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \mu_0^2}{b^6} \left(\frac{\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2 \tau_c^2} \right), \quad (44)$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{320\pi^2} \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 \mu_0^2}{b^6} \left(4\tau_c + \frac{\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+4\omega_1^2 \tau_c^2} + \dots + \frac{6\tau_c}{1+4\omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2 \tau_c^2} \right), \quad (45)$$

gdzie b to odległość między sąsiadującymi spinami, μ_0 to przenikalność magnetyczna próżni. Jeśli rozważa się takie same pary spinów, to wzory powyżej upraszczają się, ponieważ $\gamma_1 = \gamma_2$, $\omega_1 = \omega_2 = \omega$.

Równania modelu BPP wiążą wartości czasów relaksacji jądrowej z czasami korelacji ruchów molekularnych. Dla bardzo małych wartości czasu τ_c w stosunku do czasu relaksacji podłużnej T_1 , τ_c jest odwrotnie proporcjonalny do T_1 . Dla dużych wartości czasu korelacji w stosunku do T_1 , τ_c jest wprost proporcjonalny do T_1 . W przypadku dużych różnic wartości czasu τ_c do czasu T_2 , czas korelacji jest odwrotnie proporcjonalny do czasu relaksacji poprzecznej T_2 [72].

Procesy relaksacyjne powiązane są z oddziaływaniami spinów jądrowych z najbliższym otoczeniem chemicznym, natomiast szybkość relaksacji jest wprost proporcjonalna do kwadratu natężenia tych oddziaływań. Relaksacja podłużna T_1 związana jest z wymianą energii z otoczeniem, za to relaksacja poprzeczna T_2 ze stratą spójności fazowej między spinami jądrowymi.

Istotną rolę w procesach relaksacyjnych w próbkach biologicznych odgrywają: oddziaływania dipolowo-dipolowe, anizotropia przesunięcia chemicznego, oddziaływania skalarne, także kwadrupolowe oraz oddziaływania dipolowe z niesparowanymi elektronami paramagnetyków elektronowych (w wolnych rodnikach, jonach paramagnetycznych, metalach grup 3d i 4f). Szczególne znaczenie dla badań protonów mają oddziaływania dipolowe.

1.6.6.1. Relaksacja spinowo-spinowa

Oddziaływując impulsem $\pi/2$ na układ spinów w stanie równowagi, magnetyzacja próbki zostanie obrócona na płaszczyznę prostopadłą do kierunku wektora $\vec{B}_0$. Po ukończeniu impulsu układ spinów zaczyna precesować dookoła kierunku wyznaczonego przez wektor $\vec{B}_0$

z częstotliwością ω_L . Odmienny rzut sąsiedniego spinu generuje niejednorodności pola w miejscu spinu relaksującego wyrażoną funkcją chwilowego rozkładu pola. Spiny, których sąsiady mają inny rzut momentu magnetycznego jądra, będą precesować z różnymi prędkościami kątowymi. Jedne będą poruszały się szybciej, inne wolniej niż częstotliwość ω_L . W efekcie dochodzi do nieodwracalnego rozfazowania spinów zwanego relaksacją poprzeczną lub utratą pamięci fazy. Długość wektora magnetyzacji może maleć eksponencjalnie zgodnie z procesami opisanymi w równaniach Blocha:

$$M_{xy} = M_{xy}(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \quad (46)$$

Na relaksację ma dodatkowo wpływ pole zewnętrzne $\vec{B}_0$, które nie jest jednorodne w całej objętości próbki. Wywołuje to kolejne rozfazowanie spinów, przyspieszając relaksację poprzeczną, amplituda sygnału będzie wtedy zanikać z efektywnym czasem relaksacji poprzecznej T_2^* . Czas ten związany jest z czasem relaksacji poprzecznej T_2 relacją opisaną poniżej:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2}, \quad (47)$$

gdzie ΔB_0 jest miarą niejednorodności zewnętrznego stałego pola magnetycznego w obszarze próbki. Czas T_2^* może być zdecydowanie krótszy od T_2 .

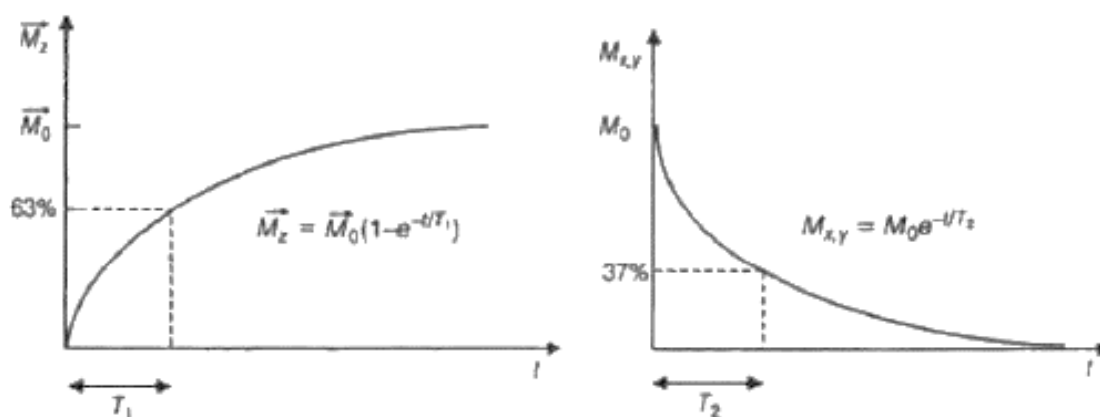
1.6.6.2. Relaksacja termiczna spinowo-sieciowa

Równania Blocha wyjaśniają zachowanie powrotu magnetyzacji jądrowej do stanu równowagi po zadziałaniu impulsu. Rozwiązanie równania dla składowej z , daje informacje o wielkości tej składowej w kierunku pola $\vec{B}_0$ w chwili t :

$$M_z(t) = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right], \quad (48)$$

T_1 to czas relaksacji spinowo-sieciowej, określa on wyrównanie się temperatury spinów z temperaturą otoczenia, czyli oddawaniem energii do sieci (ogółu innych poziomów energetycznych układu). W celu określenia czasu T_1 stosuje się impuls π , który odwraca magnetyzację do wartości antyrównoległej – M_z . Obecność procesów relaksacyjnych czyni, że po pewnym czasie t magnetyzacja uzyskuje wartość $M_z(t)$. Wówczas stosując impuls $\pi/2$ magnetyzację odwraca się na płaszczyznę XY . Proces ten doprowadza do wytworzenia w cewce siły elektromotorycznej, która jest równa co do wielkości do $M_z(t)$.

Szybkość relaksacji zależy zwykle od temperatury, stężenia magnetycznych jąder i lepkości środowiska. Relaksacja podłużna T_1 jest pomocna, gdy w roztworze znajdują się substancje paramagnetyczne posiadające niesparowane momenty magnetyczne elektronów. Substancje te wzbudzają powstawanie mocnego pola fluktuacyjnego. Czas T_1 będzie w takim przypadku się skracał. W wodzie wolnej, czyli takiej, która nie jest związana z makrocząsteczkami, ruchliwość molekuł wody jest bardzo duża. Wytworzone przez nie pola fluktuacyjne wykazują częstości dużo wyższe niż częstość Larmorowska dla protonów. W próbkach oprócz wody wolnej, występują molekuły wody związanej z makromolekułami i inne molekuły o niskiej ruchliwości. Prowadzi to do zmniejszenia częstotliwości lokalnych pól magnetycznych, która jest zbliżona do częstości Larmora protonów znajdujących się w ich sąsiedztwie. W rezultacie czas relaksacji protonów T_1 ulega skróceniu. Czas relaksacji T_1 zależy również od substancji, np. w tkankach wartość T_1 waha się w zakresie od 200 do 2500 ms, natomiast w bardzo czystej wodzie (wolnej od rozpuszczonego tlenu) w temperaturze 20°C, czas T_1 wynosi 3100 ms [78].



Rysunek 19. Wzrost składowej namagnesowania $\vec{M}_z$ oraz zanik składowej $\vec{M}_{xy}$ w czasie liczonym od momentu wyłączenia impulsu $\pi/2$. T_1 i T_2 stanowią czasy, po których wartości składowych osiągają zmianę 63% ich wartości maksymalnej [20].

Zwykle czas relaksacji poprzecznej T_2 jest krótszy od czasu relaksacji podłużnej T_1 nawet w warunkach jednorodnego pola.

1.7. Teoretyczne podstawy pomiarów NMR w domenie czasu i w domenie częstotliwości

1.7.1. Sygnał zaniku swobodnej precesji (FID – Free Induction Decay)

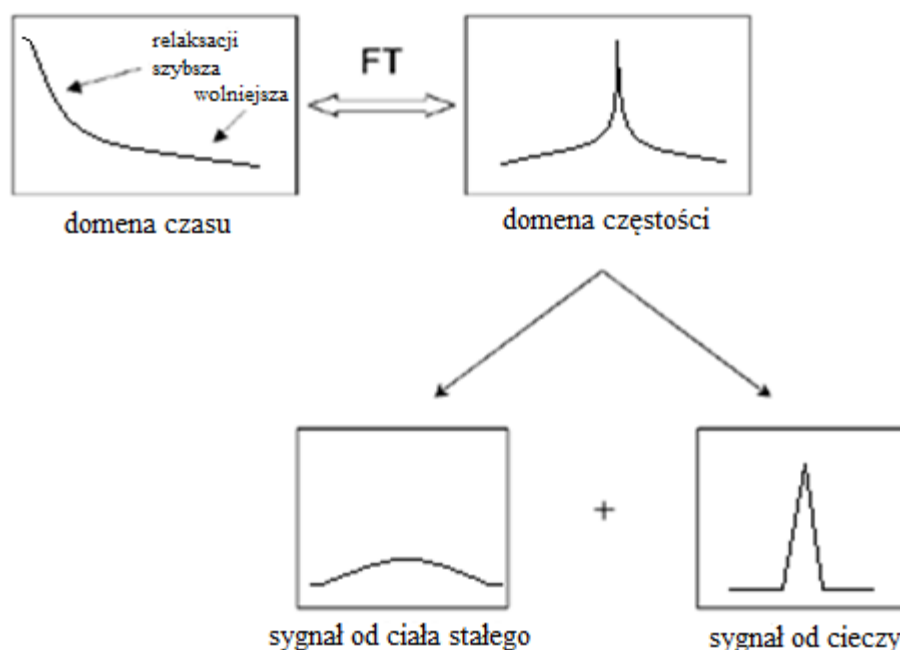
W impulsowych badaniach MRJ wykorzystuje się krótkie impulsy elektromagnetyczne o wysokiej częstotliwości, które powodują wychylenie wektora magnetyzacji z położenia równowagi. Gdy impuls zostanie wyłączony, wypadkowy wektor magnetyzacji rozpoczyna precesję i wraca, zgodnie z procesami relaksacyjnymi, do położenia równowagowego. Zmiana kierunku precesującej magnetyzacji $\vec{M}$ wytwarza zmienne napięcie w cewce nadawczo-odbiorczej otaczającej próbkę na zasadzie indukcji magneto-elektrycznej Faradaya. Napięcie to nazwano sygnałem swobodnej precesji FID [79] można go obserwować i mierzyć, jeśli zaraz po zakończeniu impulsu cewka zostanie przełączona z generatora na urządzenie odbiorcze. Zanik swobodnej precesji jest transformatą Fouriera widma NMR. Amplituda tego sygnału zależy od kąta, o jaki odchylony został wektor magnetyzacji $\vec{M}$, a zatem w tym przypadku od wartości składowej poprzecznej magnetyzacji M_{xy} . Do przeniesienia wektora magnetyzacji z położenia początkowego na płaszczyznę prostopadłą najczęściej używany jest impuls RF 90° . Zaraz po podaniu impulsu obserwowany sygnał FID osiąga maksymalną wartość. W wyniku procesów relaksacji sygnał FID zanika ze stałą czasową T_2^* (tzw. efektywny czas relaksacji).

Protonowy sygnał zaniku swobodnej precesji w próbkach suchych układów biologicznych jest sumą sygnałów pochodzących od protonów ciała stałego i protonów cieczowych [80].

$$F(t) = f_G F_G(t) + f_L F_L(t), \quad (49)$$

$F_G(t)$ to sygnał od ciała stałego, $F_L(t)$ jest całkowitym sygnałem pochodzącym od protonów cieczy, natomiast f_G i f_L to współczynniki, które wyznaczają miarę udziału składowej stałej i składowej cieczowej w sygnale FID.

Wskutek tego spiny, które pochodzą z różnych części próbki precesują z różnymi częstościami Larmora. Wirujące magnetyzacje od fragmentów próbki o różnym $\vec{B}_0$ rozwijają się w wachlarz. Skraca się w ten sposób czas relaksacji zgodnie z równaniem (47).



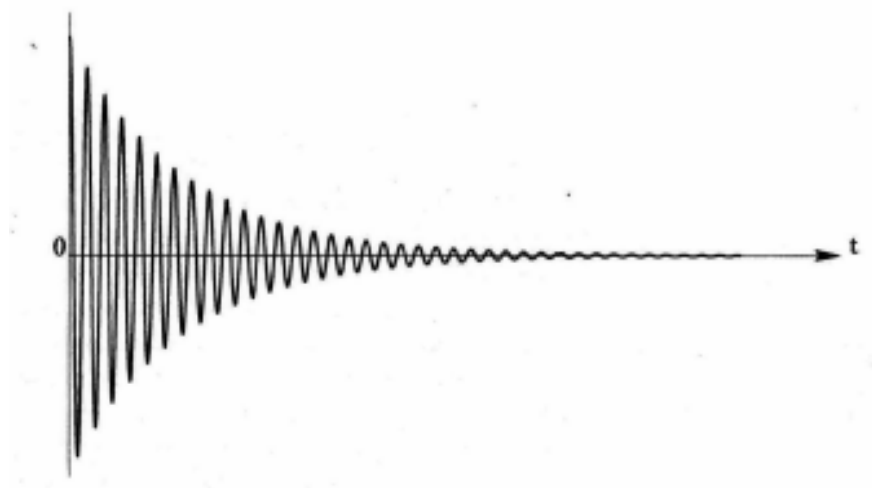
Rysunek 20. Schematyczny sygnał zaniku swobodnej precesji FID wraz z widmem NMR pochodzącym z układu składającego się z ciała stałego oraz cieczy [80].

W próbkach, w których cząsteczki poruszają się szybko (w cieczech), wartość pól lokalnych od jąder atomowych uśrednia się, a linia absorpcji jest wąska, opisana funkcją Lorentza. Sygnał zaniku swobodnej precesji FID, zgodnie z równaniami Blocha, przedstawiony jest wtedy zależnością eksponencjalną. Molekuły frakcji stałej poruszają się wolniej, powodując, że linia rezonansowa jest szeroka (gaussowska), a funkcja FID opisana jest w tym przypadku funkcją Gaussa.

Ogólna postać sygnału zaniku swobodnej precesji w zależności od czasu zawiera $N+M$ elementów:

$$FID(t) = \sum_{i=1}^N G_i e^{-\left(\frac{t}{T_{2Gi}^*}\right)^2} + \sum_{j=1}^M L_j e^{-\left(\frac{t}{T_{2Lj}^*}\right)}, \quad (50)$$

Gdzie G_i i L_j to amplitudy składowych odpowiednio stałych i cieczerwych, a T_{2Gi}^* i T_{2Lj}^* to czasy relaksacji spinowo-spinowej kolejno dla frakcji stałej i ciekłej. Pierwsza część równania pochodzi od N frakcji ciała stałego, człon drugi równania od M frakcji cieczerwych.



Rysunek 21. Sygnał swobodnej precesji o częstotliwości $\omega_0 = \gamma B_0$ pojawiający się po impulsie. Sygnał ten jest najsilniejszy, gdy impuls jest impulsem $\pi/2$ [78].

1.7.2. Transformacja Fouriera

FID jest rejestrowany w domenie czasu. W rezultacie zastosowania transformaty Fouriera, czyli przejścia do domeny częstotliwości, można otrzymać informacje o częstotliwościach ω fali elektromagnetycznej emitowanej przez spiny podczas relaksacji.

Jeśli dowolna funkcja $F(t)$ istnieje w postaci całek:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} F(t) dt \text{ oraz } \int_{-\infty}^{+\infty} |F(t)|^2 dt, \quad (51)$$

to za pomocą transformacji Fouriera można uzyskać funkcję $f(\omega)$:

$$f(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(t) \exp(i\omega t) dt. \quad (52)$$

Ponadto mając funkcję $f(\omega)$, można otrzymać funkcję $F(t)$, wykorzystując odwrotną transformację Fouriera:

$$F(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} f(\omega) \exp(i\omega t) dt. \quad (53)$$

W badaniach MRJ, aby wzbudzić spiny jądrowe, stosuje się krótkie impulsy RF. Impulsy te nie są monochromatyczne, ale polegają na wygenerowaniu fali elektromagnetycznej o częstotliwościach z zbliżonego przedziału do częstotliwości rezonansowej ω . Skrócenie czasu trwania impulsu spowoduje, że szerokość zakresu częstotliwości poszerzy się.

Bardzo krótkie impulsy o poszerzonej szerokości spektralnej powodują wzbudzenie wszystkich protonów. Zapisywany sygnał FID w takim wypadku nie jest tylko pojedynczą funkcją eksponencjalną, ale złożeniem wielu różnych funkcji. W sytuacji, gdy badaną próbką jest układ biologiczny o niskiej hydratacji, sygnał swobodnej precesji jest sumą sygnału pochodzącego od frakcji ciała stałego oraz frakcji ciekłej.

1.7.3. Zastosowanie funkcji Gaussa

W ciele stałym pola lokalne nie uśredniają się do zera, a jądra, które wchodzi w skład badanej próbki, oddziałują z zewnętrznym, stałym polem magnetycznym $\vec{B}_0$ oraz z lokalnymi polami sąsiadujących jąder. Dlatego też w każdym miejscu próbki stałe pole lokalne będzie miało inną wartość w zależności od tego, jakie jądra otaczają jądro rezonansowe. Jeśli rozpatrywane są substancje amorficzne, rozkład pól lokalnych oraz częstości rezonansowych jest przypadkowy i dobrze opisany funkcją Gaussa:

$$f(\omega) \propto \exp\left(-\frac{\omega^2}{2\sigma^2}\right), \quad (54)$$

gdzie σ jest stałą.

Istotną cechą funkcji Gaussa jest to, że transformata Fouriera tej funkcji jest również funkcją Gaussa:

$$F(t) \propto \exp\left(-\frac{\sigma^2 t^2}{2}\right). \quad (55)$$

Składowa zaniku swobodnej precesji, pochodząca od ciała stałego, będzie właśnie opisywana krzywą Gaussa. Wielokrotnie ten model wykorzystywano do opisów układów biologicznych takich, jak plechy grzybów zlichenizowanych [81], ziarna pszenicy [82], czy DNA [83].

Stałą składową funkcji zaniku swobodnej precesji można rozwinąć w szereg momentów statystycznych linii MRJ:

$$FID_G(t) = \sum_n M_{2n} (-1)^n \frac{t^{2n}}{(2n)!}. \quad (56)$$

Zasadność stosowania funkcji Gaussa dla dopasowania składowej stałej funkcji FID można sprawdzić, wyznaczając iloraz czwartego i drugiego momentu linii. Rozwinięcie funkcji Gaussa ma postać:

$$f(t) = e^{-(t/T_{2G})^2} = e^{-\frac{t^2}{2\sigma^2}} = \sum_n (-1)^n \frac{t^{2n}}{n!(2\sigma^2)^n}, \quad (57)$$

gdzie: $T_{2G} = \sqrt{2\sigma}$.

Na podstawie równań powyżej 2n moment funkcji Gaussa to:

$$M_{2n} = \frac{(2n)!}{n!(2\sigma^2)^n} \cdot \quad (58)$$

Gdzie stosunek $\frac{M_4}{(M_2)^2}$ wynosi:

$$\frac{M_4}{(M_2)^2} = \frac{\frac{3}{\sigma^4}}{\frac{1}{\sigma^4}} = 3 \cdot \quad (59)$$

Na przykład dla grzyba zlichenizowanego *Cladonia mitis* iloraz czwartego momentu statystycznego funkcji Gaussa oraz kwadratu drugiego momentu statystycznego wynosi 2.3 [84]. Wynik ten jest zbliżony do wartości 3, co pozwala w pierwszym przybliżeniu na stosowanie modelu Gaussa.

1.7.4. Funkcja Lorentza w analizie widm NMR

Szybkie ruchy molekularne, które charakteryzują próbki cieczowe, uśredniają pola lokalne, w wyniku czego linia rezonansowa będzie miała kształt funkcji Lorentza:

$$f(\omega) = \frac{\Delta\omega_{1/2}}{(\Delta\omega_{1/2})^2 + (\Delta\omega)^2}, \quad (60)$$

gdzie $\Delta\omega_{1/2}$ to szerokość połówkowa linii rezonansowej, a $\Delta\omega = \omega_0 - \omega$. Dodatkowo istnieje związek pomiędzy szerokością połówkową linii rezonansowej a czasem relaksacji poprzecznej T_2 :

$$\Delta\omega_{1/2} = \frac{1}{T_2}. \quad (61)$$

Z powodu niejednorodności pola $\vec{B}_0$ linie rezonansowe są poszerzone, dlatego miarą szerokości połówkowej jest efektywny czas relaksacji poprzecznej T_2^* :

$$\Delta\omega_{1/2} = \frac{1}{T_2^*}. \quad (62)$$

Transformata Fouriera funkcji Lorentza jest funkcją eksponencjalną, dlatego sygnał zaniku swobodnej precesji FID, pochodzący od cieczy, to funkcja eksponencjalna. Jeżeli sygnał pochodzi z N różnych podukładów cieczowych, to sygnał FID można zaprezentować następująco:

$$F_L(t) = \sum_{j=1}^N L_j \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_j}^*}\right), \quad (63)$$

gdzie N oznacza liczbę różnych składowych cieczerwych, L_j to odpowiednio amplitudy, $T_{2L_j}^*$ to efektywne czasy relaksacji poprzecznej odpowiednich składowych cieczerwych.

1.7.5. Widmo absorpcyjne

Widmo absorpcyjne $G(\omega)$ jest transformatą Fouriera sygnału zaniku swobodnej precesji FID:

$$G(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} FID(t) e^{-i\omega t} dt. \quad (64)$$

Gdy część sygnału FID, wywodząca się od protonów ciała stałego, dobrze opisuje funkcja Gaussa, to zgodnie z równaniem (60) sygnał w domenie częstotliwości również będzie opisany dobrze funkcją Gaussa o dużej szerokości połówkowej $\Delta\nu_G$ wyrażonej w jednostkach częstości. Dodatkowo między czasem relaksacji a szerokością połówkową linii zachodzi związek:

$$T_{2G} = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\pi \Delta\nu_G}. \quad (65)$$

Transformatą Fouriera funkcji eksponencjalnej, która opisuje sygnał FID pochodzący od protonów cieczerwych, jest funkcja Lorentza o szerokości połówkowej znacznie mniejszej niż funkcja Gaussa, opisująca część pochodzącą od frakcji stałej widma. Spiny cieczerwe wzbudzone są w znacznie węższym zakresie częstości, który jest dodatkowo poszerzany niejednorodnościami zewnętrznego pola magnetycznego. W ogólnym przypadku sygnał w domenie częstości (podobnie jak w domenie czasu) może być opisany kilkoma składowymi pochodzącymi od frakcji stałej:

$$G(\nu) = \sum_{i=1}^N \frac{A_{G_i}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta\nu_{G_i}} \exp\left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_{G_i}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta\nu_{G_i}}\right)^2\right], \quad (66)$$

i kilkoma składowymi pochodzącymi od frakcji ciekłej:

$$L(\nu) = \sum_{j=1}^M \frac{2A_{L_j}}{\pi} \left[\frac{\Delta\nu_{L_j}}{4(\nu - \nu_{L_j})^2 + \Delta\nu_{L_j}^2} \right], \quad (67)$$

Gdzie A_{G_i} oraz A_{L_j} to pola pod powierzchnią krzywej odpowiednio Gaussa i Lorentza, $\Delta\nu_{G_i}$, $\Delta\nu_{L_j}$ to ich szerokości połówkowe, ν_{G_i} , ν_{L_j} to położenia centrów krzywych Gaussa

i Lorentza, a N i M odpowiednio liczbą wyselekcjonowanych składowych stałych oraz cieczowych.

1.7.6. Próbki mikroheterogenne

Próbki układów biologicznych charakteryzują się często występowaniem różnych podukładów spinowych. Mimo podziału na frakcję stałą sygnału oraz frakcję cieczową, we frakcji cieczowej można wyodrębnić więcej niż jeden podukład. Każdy z podukładów określany jest różnymi czasami relaksacji lub szerokościami połówkowymi linii widma. Przykładowo dla protonów frakcji stałej w polu magnetycznym o wartości indukcji $B_0 = 0.7$ T czas relaksacji wynosi $T_{2G}^* \approx 20$ μ s. Czas ten można traktować jako T_{2G} , ponieważ dla krótkich wartości czasów relaksacji poprawka wynikająca z niejednorodności pola magnetycznego jest niewielka. Dla frakcji cieczowej można wyróżnić dwa podukłady spinów. Spiny relaksujące szybko $T_{2L}^* \approx (50-180)\mu$ s odpowiadają wodzie ściśle związanej. Natomiast spiny relaksujące wolno $T_{2L}^* > 200$ μ s to woda luźno związana. Szerokości połówkowe linii Gaussa dla pól magnetycznych o wartości indukcji $B_0 = 0.7$ T opisującego sygnał $^1\text{H-NMR}$ w domenie częstotliwości wynoszą około 45 kHz, a linii Lorentza opisującej sygnał od protonów cieczowych poniżej 1 kHz dla protonów ściśle związanych oraz powyżej 1 kHz dla protonów luźno związanych.

1.7.7. Zależność sygnału $^1\text{H-NMR}$ od poziomu uwodnienia układu biologicznego

Wielkość sygnału cieczowego $^1\text{H-NMR}$ określona w jednostkach sygnału stałego, L/G (lub A_L/A_G), może być traktowana jako miara ilości wody związanej w próbce, $\Delta m/m_0$. Jeżeli w materiale biologicznym dochodzi jedynie do adsorpcji molekuł wody, wówczas zależność $L/G(\Delta m/m_0)$ jest liniowa. Natomiast, gdy wyraz wolny jest większy od zera, oznacza to, że próbka zawiera pewną ilość wody zapułapkowanej, niewykrywalnej metodami grawimetrycznym.

1.8. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, FTIR

Spektroskopia w podczerwieni (ang. IR spectroscopy) jest obecnie jedną z najpowszechniejszych i aktywnie rozwijających się metod analitycznych. Pozwala ona na badanie właściwości fizycznych materii, interpretację wyników w powiązaniu z jej strukturą oraz budową chemiczną. Obserwowane zmiany związane są ze zdolnością materii

do pochłaniania (absorpcji), przepuszczania (transmisji), emisji lub odbijania promieniowania podczerwonego. W widmie promieniowania elektromagnetycznego zakres podczerwieni znajduje się pomiędzy promieniowaniem widzialnym i mikrofalowym. Najbardziej istotny z punktu widzenia spektroskopii biocząsteczek jest zakres podstawowy podczerwieni $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ (tzw. MIR), otoczony przez bliską podczerwień NIR (powyżej 4000 cm^{-1}) i daleką podczerwień FIR (poniżej 400 cm^{-1}). W rejonie podstawowym zachodzi większość drgań rozciągających i zginających cząsteczek organicznych. W dalekiej podczerwieni otrzymujemy informację o przejściach rotacyjnych, drgań siatki krystalicznej i drgań szkieletowych dużych cząsteczek [85]. Intensywność pasm może być wyrażona jako transmitancja (T), przedstawiająca stosunek intensywności promieniowania przepuszczonego przez próbkę do intensywności promieniowania padającego na próbkę lub jako absorbancja (A), czyli logarytm dziesiętny odwrotności transmitancji [86]. Co więcej, pomiary z wykorzystaniem spektroskopii IR są nieniszczące. Jest to szczególnie ważne w przypadku pomiarów delikatnych próbek jak, np. próbki biologiczne. Za pomocą spektroskopii w zakresie podczerwieni można mierzyć próbki w stanie ciekłym, roztwory, próbki w formie past, filmów, żeli, włókien, gazów i ciał stałych [87].

W spektroskopii IR próbka oświetlana jest promieniowaniem z zakresu podczerwieni. Jeśli energia promieniowania odpowiada różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym a stanem wzbudzonym cząsteczki, wtedy foton ulega absorpcji a cząsteczka przechodzi w stan wzbudzony o wyższej energii. Absorpcja promieniowania podczerwonego powoduje zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczki. Kształt widm w tym zakresie promieniowania w przypadku ciał stałych i cieczy zależy głównie od wzbudzeń oscylacyjnych, ponieważ rotacje cząsteczek są w tym przypadku częściowo lub całkowicie hamowane przez oddziaływania międzycząsteczkowe. Widma ciał stałych i cieczy są w związku z tym nazywane widmami oscylacyjnymi, natomiast widma cząsteczek w fazie gazowej noszą nazwę widm oscylacyjno-rotacyjnych ze względu na zarówno dużą swobodę rotacji, jak i oscylacji cząsteczek. Drgania molekuł wieloatomowych mają złożony charakter, można je przedstawić jako superpozycję pewnej liczby drgań prostych, zgodnych w fazie i o jednakowej częstotliwości. Drgania te nazywane są drganiami normalnymi. W podczerwieni obserwuje się drgania, które powodują zmiany momentu dipolowego cząsteczki. Rozróżnia się dwa rodzaje drgań cząsteczkowych [86]. Drgania rozciągające to drgania walencyjne, zachodzące wzdłuż wiązań (odległości między atomami naprzemiennie zwiększają się

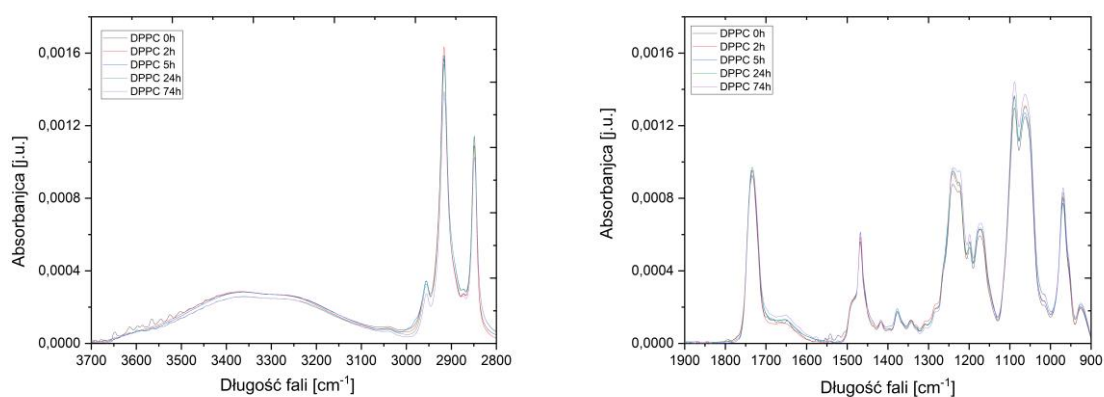
i zmniejszają). Drgania deformacyjne, związane są ze zmianami kątów pomiędzy wiązaniami. Każdy z rodzajów drgań może być dodatkowo symetryczny lub niesymetryczny.

Drgania atomów w cząsteczkach można badać klasyczną techniką absorpcyjną IR. W klasycznych spektrometrach widma IR otrzymuje się badając absorpcję dla określonej monochromatycznej wiązki promieniowania, a następnie przemiatając próbkę poprzez zmianę krokowo długości tej fali w trakcie pomiaru za pomocą elementu dyspersyjnego (pryzmat, siatka dyfrakcyjna). W ten sposób otrzymujemy sygnał absorpcji (lub transmisji) jako funkcję określonej długości fali (częściej liczby falowej wyrażonej w cm^{-1}). We współczesnych aparatach Fourierowskich FTIR stosuje się szybszą metodę, która polega na jednoczesnym oświetleniu próbki wiązką promieniowania z całego badanego zakresu podczerwieni. Po przejściu tej wiązki przez próbkę doprowadza się do interferencji z wiązką z tego samego źródła, która nie przeszła przez próbkę, a widmo otrzymuje się, stosując transformację Fouriera zarejestrowanego widma interferencyjnego. Wymaga to stosowania aparatury z oprogramowaniem, które wykonuje tę operację matematyczną i dostarcza informacji o wibracjach w postaci interferogramu. Metoda ta informuje o strukturze i oddziaływaniach międzycząsteczkowych oraz ujawnia zmiany strukturalne wywołane zewnętrznym zaburzeniem (np. temperaturą lub pH) [88]. Spektrometry FTIR pozwalają otrzymać widmo w czasie około 3600 razy krótszym niż przy użyciu tradycyjnych spektrometrów dwuwiązkowych. Dodatkowo zastosowanie w spektroskopii FTIR procedury szybkiej transformaty Fouriera (ang. fast Fourier transform, FFT) ułatwia gromadzenie znacznej liczby interferogramów i zwiększenie stosunku sygnału do szumu, sprawiając, że zarejestrowane widma odznaczają się zadawalającą rozdzielczością i mogą być z powodzeniem stosowane przy badaniu układów biologicznych w środowisku wodnym.

Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. Fourier transform infrared attenuated total reflectance, FTIR-ATR) jest jedną z powszechnie stosowanych technik do badań układów biologicznych, zaczynając od peptydów zawierających jedynie kilka reszt aminokwasowych w cząsteczce po wyizolowane enzymy, a nawet kompleksy peptyd-białko i białko-błona lipidowa o dużych masach cząsteczkowych. Otrzymanie widm (w zakresie podstawowej podczerwieni) ciał stałych bez względu na ich grubość umożliwia właśnie technika osłabionego całkowitego odbicia ATR. W technice tej próbka umieszczona jest bezpośrednio na kryształ, a promieniowanie pada na powierzchnię graniczną. Rozszerzeniem tej techniki jest uzyskanie wielokrotnych odbić wewnętrznych wzdłuż powierzchni próbki [89]. Spektroskopia FTIR w połączeniu z techniką ATR pozwala

na rejestrację widm substancji nietransparentnych, próbek o niskim stężeniu ($\leq 0,3$ mg/mL), w rozpuszczalniku zarówno wodnym, jak i organicznym, w zawiesinie, a także w środowisku błony lipidowej [90]. Należy jednak pamiętać, że metoda FTIR-ATR dostarcza informacji o wąskiej warstwie próbki stykającej się z powierzchnią kryształu [91].

Analizując widma w zakresie MIR, można przyporządkować charakterystyczne pasma odpowiednim drganiom grup funkcyjnych. Wynikiem absorpcji światła w zakresie średniej podczerwieni przez cząsteczki fosfolipidów, np. dipalmitoilofosfatydylocholina (DPPC) jest zbiór pasm drgań normalnych z zakresu od 3700 do 900 cm^{-1} . Rysunek poniżej przedstawia widmo FTIR-ATR liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC w postaci hydratowanego filmu.



Rysunek 22. Widma ATR-FTIR liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC zarejestrowanych dla różnych uwodnień (opracowanie własne).

W przypadku hydratacji liofilizowanych fosfolipidowych liposomów wielowarstwowych najszerszym pasmem w widmie FTIR jest pasmo pochodzące od wody, mające swój środek przy około 3300 cm^{-1} . Będzie ono wykorzystywane do wyznaczania uwodnienia metodą FTIR.

Drgania rozciągające apolarnych łańcuchów węglowodorowych, tj. grup metylenowych i metylowych, występują w rejonie wysokoczęstotliwościowym od 3100 do 2800 cm^{-1} . Pasma drgań rozciągających grupy metylenowej [$\nu(\text{CH}_2)$], charakteryzują się najwyższą intensywnością spośród wszystkich pasm fosfolipidu i leżą przy około 2920 i 2850 cm^{-1} , odpowiednio dla drgania $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ i $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$. Parametry spektralne tych pasm, położenie i kształt, silnie korelują z rodzajem fazy liotropowej i termotropowej agregatów lipidowych.

Pasma drgań grup metylowych występują przy około 2956 cm^{-1} [$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$] i 2870 cm^{-1} [$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$] i są to pasma o małej intensywności, co powoduje, że ich analiza jest utrudniona.

Drgania deformacyjne grup CH_2 i CH_3 dają pasma leżące w obszarze 1500 do 1190 cm^{-1} . Spośród drgań zginających grupy CH_2 należy wyróżnić drgania nożycowe [$\delta(\text{CH}_2)$], dominujące odpowiednio w zakresach $1480 - 1465\text{ cm}^{-1}$. Ich położenie i liczba odzwierciedlają siłę oddziaływań międzyłańcuchowych i dostarczają informacji o upakowaniu łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowej części błon lipidowych. Seria pasm drgań zginających wachlarzowych $\omega(\text{CH}_2)$ występuje w przedziale liczb falowych od 1370 do 1190 cm^{-1} [92]. Ich liczba koreluje z konformacją i ilością grup CH_2 budujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidowych.

Pasmo pojawiające się na widmie fosfatydylocholin w zakresie $1750 - 1700\text{ cm}^{-1}$ pochodzi od drgań rozciągających grupy estrowej. Położenie i liczba składowych tego pasma silnie zależą od sąsiedztwa grup polarnych oraz liczby utworzonych wiązań wodorowych.

Pasma drgań $\nu(\text{COC})$ antysymetryczne i symetryczne występują odpowiednio przy 1180 i 1075 cm^{-1} [93]. Pasmo drgań $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ często ulega rozszczepieniu na dwie składowe z maksimum przy 1190 i 1170 cm^{-1} pochodzące od absorpcji grup C-O-O w poszczególnych łańcuchach *sn-1* i *sn-2* [93, 94]. Binder i współpracownicy [95] sugerują, że zmiany w obrębie tych pasm są związane ze wzrostem uwodnienia.

Najbardziej rozpoznawalnymi pasmami drgań części polarnej fosfolipidowych błon lipidowych są pasma pochodzące od grupy fosforanowej. Asymetryczne i symetryczne drgania tej grupy dają pasma odpowiednio w zakresach: $1255 - 1225\text{ cm}^{-1}$ [$\nu_{\text{as}}(\text{PO}^{2-})$] i $1095 - 1085\text{ cm}^{-1}$ [$\nu_{\text{s}}(\text{PO}^{2-})$] [93]. Pasmo drgań $\nu_{\text{as}}(\text{PO}^{2-})$ wykazuje dużą wrażliwość na zmianę polarności otoczenia i możliwość oddziaływania poprzez wiązanie wodorowe. Ponadto, Lee i Chapman [96] wykazali, że w przypadku uwodnionych dwuwarstw DPPC położenie pasma drgań $\nu_{\text{as}}(\text{PO}^{2-})$ nie ulega zmianie w trakcie głównego przejścia fazowego. Jest to spowodowane wysyceniem wiązań wodorowych przez grupę fosforanową już w fazie żelowej błony, gdzie mamy już do czynienia z utworzeniem pełnej powłoki hydratacyjnej. W efekcie dalsze uwodnienie błony lipidowej podczas przejścia do fazy ciekłokrystalicznej nie wpływa na właściwości spektralne drgań grupy PO^{2-} . Jednakże położenie pasma pochodzącego od drgania $\nu_{\text{s}}(\text{PO}^{2-})$ w głównej mierze odtwarza zmiany konformacji fragmentu fosforanowego [97].

Pasma drgań grupy cholinowej tworzącej najbardziej zewnętrzną część błony, występują w trzech rejonach widma FTIR. W zakresie od 3050 do 3000 cm^{-1} pojawia się mało intensywne pasmo pochodzące od drgań $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_{\text{chol}}$. Podczas uwodnienia suchego filmu, pasmo to przesuwają się w kierunku dłuższych fal na skutek osłabienia oddziaływania między cholinową grupą metylową i grupą fosforanową [98].

Bezpośrednią miarą poziomu hydratacji dyspersji lipidów w metodzie FTIR jest zależność intensywności pasma wodnego od intensywności pasma pochodzącego od drgań asymetrycznych rozciągających grup metylowych ($\text{IvH}_2\text{O}/\text{IvCH}_2$) [99]. Ten sposób wyznaczania uwodnienia zastosowano w niniejszej pracy w celu sprawdzenia poprawności wyznaczania uwodnienia w sposób grawimetryczny.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Badanym materiałem były liofilizaty wielolamelarnych liposomów DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholiny), POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocholiny) i DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholiny). Materiał w formie proszku zakupiono w Avanti Lipids. Formowanie liposomów wielowarstwowych, ich liofilizacja, zostały przeprowadzone przez dr Małgorzatę Jemiołę-Rzemińską w ramach współpracy Zakładu Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UJ z kierowanym przez prof. dr. hab. Kazimierza Strzałkę Zakładem Biochemii Roślin Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w dziedzinie badań naturalnych błon biologicznych oraz modelowych układów lipidowych. Pomiary ATR-FTIR dla wszystkich trzech fosfolipidów oraz ich opracowane widma zostały wykonane przez dr. Andrzeja Wróbla z Zakładu Fizyki Medycznej WFAiIS UJ.

2.2. Przygotowanie próbek

Proces formowania liposomów wielowarstwowych MLV (o wielkości 0,4 do 10 μm), w doświadczeniu polegał na wykorzystaniu klasycznej metody hydratacji cienkiego filmu lipidowego. Jest to najprostszy i najczęściej stosowany sposób otrzymywania liposomów na skalę laboratoryjną. Metoda ta polega na rozpuszczeniu lipidów w rozpuszczalniku organicznym, w tym wypadku użyto chloroformu stabilizowanego etanolem. Następnie rozpuszczalnik ten samoistnie odparowuje, tworząc cienką warstwę na szklanych ściankach kolby, tzw. suchy film lipidowy. Aby sprawdzić, czy chloroform w całości odparował,

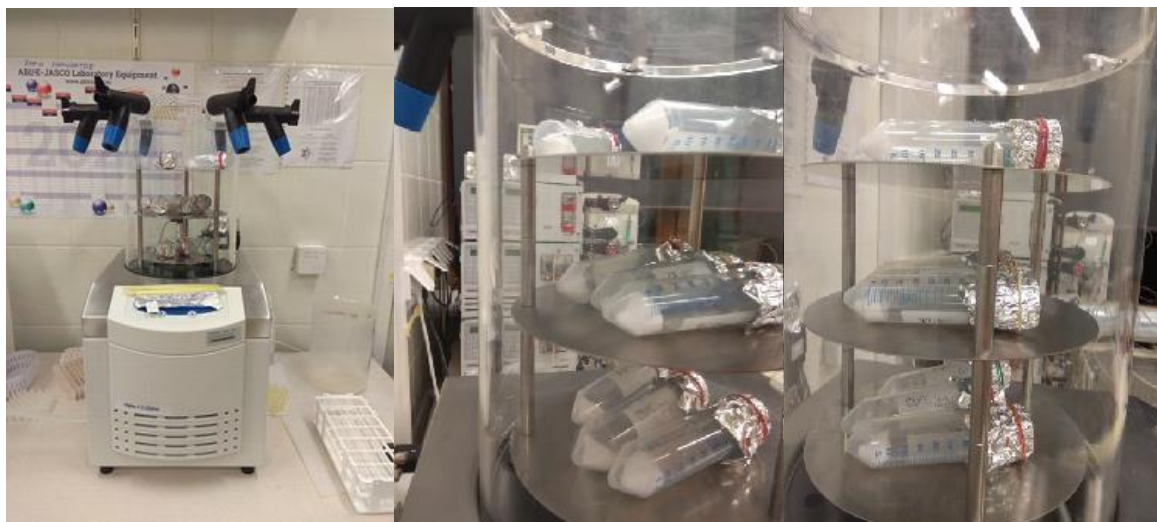
umieszcza się próbkę pod próżnią na około 1 h. Po tym czasie do kolby dodajemy wodę (dodajemy tyle wody, aby uzyskać żądane stężenie lipidu) i mieszamy na vortexie w temperaturze pokojowej przez 15 minut, do uzyskania optycznie jednorodnej mieszaniny. Jest to metoda spontanicznego tworzenia się zróżnicowanej populacji MLV [100].

Wielkość uzyskanych liposomów zależy od rodzaju fosfolipidów, wchodzących w skład błony liposomalnej, składu fazy wodnej i intensywności wytrząsania. Lipidy obdarzone ładunkiem tworzą zwykle mniejsze liposomy, z mniejszą liczbą błon. Zaletą tej metody jest możliwość przygotowania liposomów o zróżnicowanym składzie, proste wykonanie oraz wysoki stopień enkapsulacji, szczególnie substancji lipofilnych. Trudność stanowi przeniesienie metody hydratacji filmu na skalę półprodukcyjną i przemysłową (konieczność stosowania dużych objętości zawiesiny). Dodatkowo, uzupełnieniem metody hydratacji jest wymiarowa kalibracja zawiesiny MLV w celu uzyskania bardziej homogennej próbki, co generuje dodatkowe koszty oraz związane z tym potencjalne ryzyko strat materiału [101].



Rysunek 23. Cienki suchy film lipidowy oraz jego hydratacja w roztworze wodnym przez intensywne wytrząsanie.

Tak uzyskane liposomy wielowarstwowe poddawane były procesowi liofilizacji przez 3 dni, gdzie proces zamrażania wykonywano pod ciśnieniem w temperaturze -25°C , a proces suszenia – pod ciśnieniem 0,01 mbar. Użyto liofilizatora firmy Christ, model: Alpha 1-2 LD plus.



Rysunek 24. Liofilizator Alpha 1-2 LD plus oraz proces liofilizacji liposomów wielolamellarnych.

Liposomy wielowarstwowe do pomiarów NMR przygotowywano bezpośrednio po liofilizacji w szklanych probówkach przeznaczonych do tego typu pomiarów o średnicy około 5 mm, a do kinetyki hydratacji oraz do pomiarów FTIR na tackach z aluminium (minimalizując wpływ masy naczynka) o średnicy około 2 cm (Rysunek 25). Gotowe próbki poddano wstępnej dehydratacji nad żelazem krzemionkowym, a następnie uwadniano próbki w eksykatorze o wilgotności względnej 100%. Na czas pomiarów szklane probówki zaklejano parafilmem, aby zminimalizować efekt wysychania.



Rysunek 25. Przygotowane próbki do pomiarów ^1H -NMR, do pomiarów kinetyki hydratacji oraz do FTIR.

Dodatkowo przeprowadzono cykl pomiarowy, aby sprawdzić wpływ inkubacji liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC przechowywanych w temperaturze -20°C . Zliofilizowane liposomy wielowarstwowe DOPC przetrzymywano przez 6 miesięcy w temperaturze -20°C w zamkniętych szczelnie parafilmem oraz z zakręconymi nakrętkami probówek. Po tym czasie probówki z materiałem wyciągnięto z lodówki i przygotowano próbki odpowiednio do pomiarów $^1\text{H-NMR}$ i kinetyki hydratacji. Po przygotowaniu próbek przeprowadzono wstępną dehydratację materiału. Po uzyskaniu najniższej masy w procesie dehydratacji przystąpiono do pomiarów hydratacyjnych. Otrzymane wyniki dla DOPC z inkubacją porównano z wynikami z bezpośredniego przygotowywania próbki DOPC do pomiarów po procesie liofilizacji.

2.3. Pomiary grawimetryczne

Pomiar mas próbek dokonano metodą grawimetryczną na wadze laboratoryjnej typu RADWAG WAX 110 o dokładności równej 0,001 mg w temperaturze pokojowej (22°C).

2.4. Sucha masa próbek

Za suchą masę, m_0 , liofilizatów przyjęto masę uzyskaną po procesie wygrzewania próbek w temperaturze 70°C przez 72 h. Temperatura była tak dobrana, gdyż po próbach wygrzewania nie stwierdzono wizualnie degradacji materiału. Temperatura ta jest również stosowana do określania suchej masy innych układów biologicznych jak, np. plechy porostów, dodatkowo pozwala uniknąć rozkładu niektórych organicznych składników plechy [102]. Pojawiły się niejednoznaczności w określeniu zawartości wody w próbce, ponieważ niektóre wyniki pokazały niezerowy udział sygnału cieczowego nawet w wysuszonym liofilizacie. Poprawność wybranego rodzaju analizy suchej masy była sprawdzana również metodą badawczą FTIR, wyznaczając zależność intensywności pasma wodnego od intensywności grup metylowych ($\text{IvH}_2\text{O}/\text{IvCH}_2$).

2.5. Określenie poziomu uwodnienia metodą grawimetryczną

Poziom uwodnienia badanych próbek określany był jako przyrost masy $\Delta m/m_0$, zgodnie z równaniem:

$$\Delta m/m_0 = \frac{m - m_0}{m_0}, \quad (68)$$

gdzie m to masa próbki o danym uwodnieniu, m_0 to masa sucha próbki.

2.6. Dehydratacja próbek

Liofilizaty wielowarstwowe liposomów DPPC, POPC i DOPC przed każdymi pomiarami poddano dodatkowej dehydratacji. Próbki umieszczono w atmosferze nad żelazem krzemionkowym o wilgotności względnej $p/p_0 = 0\%$ i temperaturze pokojowej przez pięć dni, a następnie przystąpiono do wykonywania pomiarów hydratacyjnych. Pięć dni, był to czas wyznaczony doświadczalnie, po którym nie stwierdzono już ubytku masy próbek. Wstępna dehydratacja miała na celu usunięcie wody, którą mogły lipidy pobrać z powietrza podczas przygotowywania próbek do badań.

2.7. Pomiary hydratacyjne

Próbki dla pomiarów MRJ przechowywano w eksykatorze nad powierzchnią wody (wilgotność względna $p/p_0 = 100\%$) w temperaturze pokojowej, a jeden cykl pomiarowy trwał średnio 900 godzin, by sprawdzić i wykluczyć ewentualne procesy rozpuszczania ciała stałego. Maksymalne uwodnienie, jakie udało się wyznaczyć, to odpowiednio: $\Delta m/m_0 = 0,29$ (DPPC), $\Delta m/m_0 = 0,36$ (POPC) oraz $\Delta m/m_0 = 0,36$ (DOPC) w domenie czasu oraz $\Delta m/m_0 = 0,29$ (DPPC), $\Delta m/m_0 = 0,39$ (POPC) oraz $\Delta m/m_0 = 0,40$ (DOPC) w domenie częstotliwości. Dla liposomów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy maksymalne uwodnienie wyniosło $\Delta m/m_0 = 0,47$.

Wykonano trasę hydratacyjną z fazy gazowej dla każdej z próbek w temperaturze pokojowej w eksykatorze nad wodą destylowaną ($p/p_0 = 100\%$). Ten sposób uwadniania umożliwia łatwe wytworzenie i utrzymanie optymalnych warunków wilgotności, a wrażliwość na zmiany temperatury jest niewielka. Wytworzenie stabilnej wilgotności atmosfery zależy w tym przypadku od układu obejmującego czystość wody. Niewielkie zanieczyszczenie wody może mieć wpływ na proces hydratacji.

2.8. Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego

2.8.1. Spektrometr ^1H -NMR

Pomiary widm ^1H -NMR w domenie częstotliwości wykonano na spektrometrze Bruker Avance III 300 wyprodukowanym przez Bruker Biospin i wyposażonym w magnes nadprzewodzący o średnicy 89 mm (tzw. „wide-bore-system”), wytwarzający pole magnetyczne 7 T, głowicę pomiarową o wysokiej mocy (umożliwiające pomiary NMR jąder ^{19}F , ^1H , ^{15}N oraz ^{31}P), stabilizator temperaturowy oraz komputer PC. Magnes

nadprzewodzący umieszczony jest w ciekłym helu w temperaturze około -270°C oraz dodatkowo otoczony jest płaszczem izolującym, zawierającym warstwę ciekłego azotu o temperaturze mniejszej niż 196°C . Parametry pracy spektrometru w czasie badań przedstawiono w Tabeli 1. Przed każdym pomiarem widm mierzono masę próbki.

Tabela 1. Parametry pracy urządzenia Bruker Avance III 300.

Parametry pracy	Bruker Avance III 300
Częstotliwość rezonansowa dla protonów	300 MHz
Indukcja pola magnetycznego B_0	7 T
Długość impulsu $\pi/2$	2,2 μs

Spektrometr można podzielić na cztery części: blok kontroli aktywacji (Acquisition Control System), przedwzmacniacz wysokiej wydajności (High Performance Preampfiler), system wzmacniaczy oraz blok kontroli magnetycznej (Bruker Smart Magnet System). Blok kontroli akwizycji składa się z części SGU (Signal Generate Unit) bloku, która odpowiedzialna jest za generowanie impulsów częstotliwości radiowych wykorzystywanych do pobudzenia próbki, a część DRU (Digital Receiver Unit) za odbieranie i wzmocnienie sygnałów z badanej próbki. Zadaniem przedwzmacniacza wysokiej wydajności HPPR jest transmisja i filtracja uprzednio wygenerowanego i wzmocnionego sygnału do cewki nadawczo – odbiorczej (tor nadawczy), w której umieszczona jest próbka. Jednostka ta wzmacnia także sygnał generowany przez próbkę po pobudzeniu jej odpowiednimi impulsami (tor odbiorczy). System wzmacniaczy wzmacnia sygnały generowane w przez jednostkę SGU sygnału. System kontroli magnetycznej, BSMS, utrzymuje stałe pole magnetyczne, odpowiada za stabilizację oraz kompensuje niejednorodności pola.

Widma w funkcji uwodnienia otrzymano wykonując pomiar zaniku swobodnej precesji po potraktowaniu próbki pojedynczym impulsem $\pi/2$. Czas martwy spektrometru wynosił 6.5 μs , czas repetycji - 1.5 s, długość impulsu $\pi/2$ wynosił 2.2 μs , szerokość pasma – 1 MHz oraz wzmocnienie impulsów - 400 W. Pojedynczy pomiar widma powstawał z 40 akwizycji, a czas pomiaru wynosił około 2 minuty.

Otrzymane dane analizowane były za pomocą programu otrzymanego od producenta spektrometru: TopSpin3 oraz przy użyciu programu OriginPro.



Rysunek 26. Spektrometr Bruker Avance III 300 w laboratorium NMR Zakładu Fizyki Medycznej IF UJ.

2.8.2. Relaksometr

Pomiary relaksacyjne MRJ w domenie czasu dla protonów wykonano relaksometrem impulsowym WNS HB65 firmy Waterloo NMR Spectrometers, Waterloo, Ontario, Kanada. Parametry pracy relaksometru podczas wykonywania eksperymentu przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 2. Parametry pracy urządzenia WNS HB65.

Parametry pracy	Waterloo NMR Spectrometers
Częstotliwość rezonansowa dla protonów	30 MHz
Indukcja pola magnetycznego B_0	0,7 T
Długość impulsu $\pi/2$	1,25 μ s

Sygnały zebrane w funkcji uwodnienia dla próbek otrzymano, mierząc FID po impulsie $\pi/2$. Moc stosowanych impulsów $\pi/2$ wynosiła 400 W, umożliwiając zaobserwowanie sygnału zaniku swobodnej precesji pochodzącej od wszystkich protonów próbki (ciało stałe i ciecz). Czas martwy spektrometru był równy 9.8 μ s, natomiast czas repetycji wynosił 2.003 s. Wynik pomiaru był uśrednieniem 500 akwizycji i trwał 17 minut.

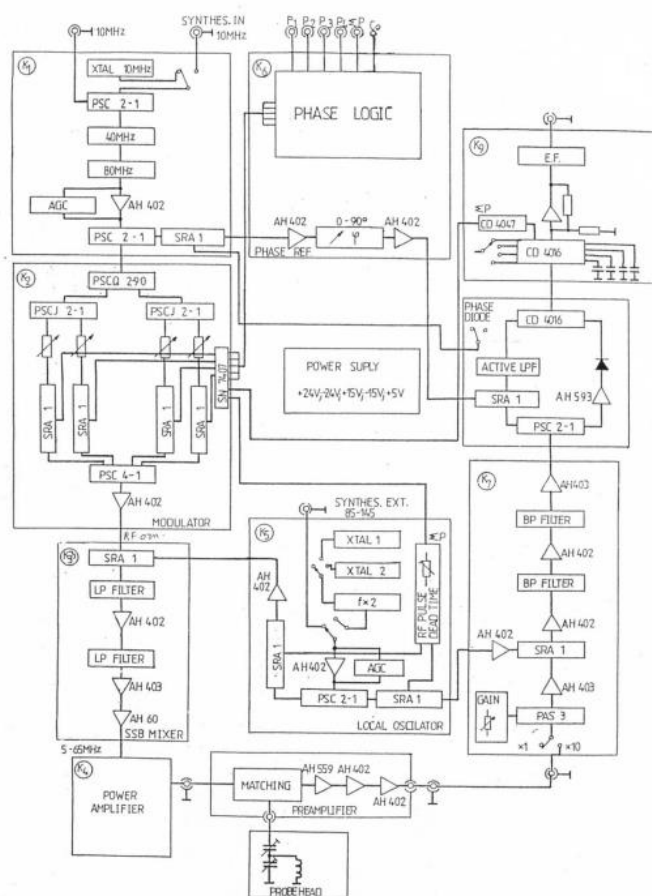
Pomiary przeprowadzano w temperaturze pokojowej (około 22°C) w funkcji uwodnienia z fazy gazowej. Przed każdym pomiarem relaksacyjnym MRJ wyznaczano masę próbki.

Do projektowania impulsów posłużył komputer IBM-PC, który pracuje w systemie operacyjnym DOS. Impuls MRJ projektowany był za pomocą programu TEX, dostarczonego przez producenta spektrometru. Zaimplementowana sekwencja trafiała do programatora impulsów, który generował schodkowy sygnał elektryczny o zadanym czasie i amplitudzie 5 V. Podczas nadawania impulsu z generatora w module K1 otrzymywany jest sinusoidalny sygnał o częstotliwości 10 MHz, który po dostarczeniu do powielacza częstotliwości modulowany jest do sygnału o częstotliwości 80 MHz. Sygnał ten zostaje prowadzony do segmentu K2, tam rozdzielany jest do czterech mieszaczy i modulowany amplitudowo impulsami prostokątnymi wytwarzanymi przez programator impulsów. Wówczas impulsy wysokiej częstości pochodzące z modułu K3 mieszają się z sygnałem o częstotliwości 110 MHz, pochodzącym z bloku K5. Po przejściu przez filtr dolnoprzepustowy powstaje sygnał 30 MHz, który jest wzmacniany i przesyłany do głowicy pomiarowej (*Probehead*). Głowica ta jest elementem łączącym tor nadawczy i odbiorczy. Głowica, umieszczona między nabiegunnikami elektromagnesu wytwarzającego pole B_0 , stanowi układ LC, w jego cewce umieszcza się próbkę. Dostraja się ją do częstotliwości rezonansowej wykorzystując kondensator o zmiennej pojemności. Sygnał siły elektromotorycznej indukowanej przez magnetyzację jądrową wirującą z częstością larmorowską z głowicy pomiarowej, po wzmocnieniu w przedwzmacniaczu, trafia do modułu K7, gdzie miesza się z sygnałem o częstotliwości 110 MHz. Przy użyciu filtra pasmowoprzepustowego wyodrębniany jest sygnał o częstotliwości 80 MHz, który dalej wzmacniany jest przy użyciu segmentu GAIN. W bloku K8 rozpoczyna się demodulacja synchroniczna lub diodowa, a w module K9 (będącym filtrem dolnoprzepustowym) zostaje przygotowany sygnał do wyjścia. Na skutek dzielenia elektronicznego pozyskany sygnał jest odfiltrowany od częstotliwości Larmora, przez co uzyskuje się jego obwiednię, tzw. zanik swobodnej precesji (FID), poddawany jest bezpośrednio na oscyloskop oraz zbierany przez kartę cyfrowego oscyloskopu Compuscope 2000 komputera PC 80386.

Otrzymane wyniki analizowano dzięki wykorzystaniu programu OriginPro.



Rysunek 27. Relaksometr impulsowy WNS HB65 firmy Waterloo NMR Spectrometers, Waterloo, Ontario, Kanada w Zakładzie Fizyki Medycznej IF UJ.



Rysunek 28. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego WNS HB65.

2.9. Pomiary widm metodą ATR-FTIR

Widma ATR-FTIR zebrano przy użyciu spektrometru Nicolet 6700 (Termo Fisher Scientific, MA, USA). Aparat ten wyposażony jest w diamentowe akcesorium ATR. Dla wszystkich przygotowanych próbek, przygotowanych na aluminiowych tackach, przeprowadzono wstępną dehydratację nad żelazem krzemionkowym, aby uzyskać najniższą masę próbki, wykorzystaną w przypadku tych pomiarów jako m_0 . Następnie po osiągnięciu najniższej masy przystąpiono do pomiarów hydratacyjnych, umieszczając próbki nad wodą destylowaną o wilgotności względnej 100% na określony czas. Pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej w funkcji uwodnienia z fazy gazowej. Przed każdym pomiarem wyznaczano masę próbki na wadze laboratoryjnej. Z zapisanych mas grawimetrycznie wyznaczono poziom uwodnienia, zgodnie z równaniem 68. Około 5 μl próbki liofilizowanych liposomów wielowarstwowych umieszczono na kryształach ATR i wykonano pomiar. Zebrane widma poddano obróbce końcowej poprzez wygładzenie, odjęcie tła i normalizację za pomocą oprogramowania SpectraGryph v. 1.2.13.

Spektrometr FT-IR Nicolet 6700 firmy Thermo Scientific umożliwia rejestrację wysokiej jakości widm w zakresie podczerwieni ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) z maksymalną rozdzielczością równą $0,09 \text{ cm}^{-1}$. Urządzenie wyposażone jest w detektory DLaTGS, MCT-A oraz zestaw przystawek: Smart ITR firmy Thermo Scientific – działających w oparciu o metodę osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (*ang. Attenuated Total Reflection*).

Po zakończeniu pomiaru kryształ był wycierany do czysta przy użyciu lekkiego rozpuszczalnika.

3. Wyniki

W celu zbadania dynamiki molekularnej śladowej wody związanej w badanych układach modelowych błon biologicznych wykonano pomiary zależności czasu relaksacji T_2^* oraz widm $^1\text{H-NMR}$ dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DPPC, POPC i DOPC. Wyniki uzyskano w domenie czasu i komplementarnie w domenie częstotliwości. Ponadto wykonano pomiary widm $^1\text{H-NMR}$ w domenie częstotliwości w funkcji poziomu uwodnienia dla próbki DOPC po półrocznej inkubacji liofilizowanych liposomów w temperaturze -20°C . Dodatkowo w celu sprawdzenia zachowania układów lipidowych wykonano trasę hydratacyjną z fazy gazowej dla każdej z próbek w temperaturze pokojowej nad powierzchnią wody destylowanej ($p/p_0 = 100\%$). W celu sprawdzenia poprawności wyznaczania grawimetrycznie poziomów uwodnienia w próbkach wykorzystano wyznaczanie uwodnienia metodą FTIR dla próbki POPC i DOPC.

Kinetyka hydratacji z fazy gazowej

Prowadzona z fazy gazowej hydratacja rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów z DPPC, POPC i DOPC może zostać przybliżona, w zależności od badanego lipidu, superpozycją funkcji eksponencjalnych (jednej, dwóch lub trzech), w dodatku można wyodrębnić frakcję wody nieusuwanej w czasie dehydratacji nad powierzchnią żelu krzemionkowego. Jeśli poziom hydratacji zostanie wyrażony jako przyrost masy próbki w jednostkach suchej masy, m_0 , to hydratację można wyrazić wzorem:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = A_0 + A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{t_2}\right) + A_3 \exp\left(\frac{-t}{t_3}\right), \quad (69)$$

gdzie t_i to czas uwodnienia danej składowej, A_0 to uwodnienie początkowe (woda pozostająca w atmosferze o wilgotności względnej 0%), natomiast A_i to przyrost poziomu hydratacji dla danej wilgotności otoczenia. Suma tych składowych daje równowagowy poziom uwodnienia próbki:

$$C^h = A_0 + A_1 + A_2 + A_3. \quad (70)$$

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera przy tłumionym całkowitym odbiciu (ATR-FTIR).

Zebrano widma dla wielowarstwowych liofilizowanych fosfolipidów POPC oraz DOPC. W dalszej analizie uwzględniono jedynie pasmo pochodzące od czystej wody oraz pasmo od grupy metylowej $\nu_{as}(\text{CH}_2)$. Bezpośrednią miarą stopnia hydratacji dyspersji lipidów jest zależność intensywności pasma wody od intensywności pasma grup metylowych ($I_{\text{H}_2\text{O}}/I_{\text{CH}_2}$). Ta metoda oznaczania hydratacji została wykorzystana w niniejszej pracy w celu sprawdzenia poprawności wyznaczenia poziomu hydratacji ($\Delta m/m_0$) metodą grawimetryczną wykorzystaną do prezentacji wyników NMR. Zakres drgań rozciągających grup O-H w wodzie użytych do analizy wynosi od 3580 cm^{-1} do 3080 cm^{-1} , a dla asymetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych [$\nu_{as}(\text{CH}_2)$] wynosi od 2934 cm^{-1} do 2912 cm^{-1} .

Pomiary sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów

Rehydratowane z fazy gazowej liofilizaty wielowarstwowych liposomów z DPPC, POPC oraz DOPC zmierzono na relaksometrze (30 MHz), wyznaczając zaniki swobodnej precesji (FID) ^1H -NMR w funkcji poziomu uwodnienia z fazy gazowej, $\Delta m/m_0$.

Sygnał zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów w próbkach fosfolipidów dopasowano superpozycją funkcji Gaussa o amplitudzie G , pochodzącej od protonów matrycy stałej lipidu oraz składowej eksponencjalnej o amplitudzie L , pochodzących od protonów mobilnych próbki, tzw. od wody ściśle związanej lub od wody luźno związanej do badanych układów. W zależności od badanych liposomów wielowarstwowych oraz ich poziomu uwodnienia używano w dopasowaniu różne kombinacje ilościowe składowych Gaussa i Lorentza:

$$FID(t) = \sum_i G_i \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2Gi}^*}\right)^2\right) + \sum_j L_j \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2Lj}^*}\right), \quad (71)$$

gdzie G_i to amplituda danej frakcji stałej, a L_j to amplituda odpowiedniej frakcji mobilnej. T_{2Gi}^* jest efektywnym czasem relaksacji spinowo-spinowej dla protonów matrycy stałej liofilizatu, będącym czasem, po którym wartość składowej gaussowskiej sygnału spada

do poziomu 1/e wartości początkowej, natomiast $T_{2L_j}^*$ to czas relaksacji spinowo-spinowej dla wyodrębnionych frakcji wody związanej, gdzie $i = 1, 2$ i $j = 1, 2$.

Dwie frakcje wody, a mianowicie woda ściśle związana oraz woda luźno związana, są rozróżnialne dzięki różnej mobilności protonów wody wchodzącej w ich skład, czyli różnym efektywnym czasem relaksacji poprzecznej.

Pomiary widm $^1\text{H-NMR}$ rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów w domenie częstotliwości

W celu porównania zachowania śladowych ilości wody w układach modelowych błon biologicznych, podobnie jak dla domeny czasu, wykonano także pomiary $^1\text{H-NMR}$ dla domeny częstotliwości.

Widma $^1\text{H-NMR}$ rehydratowanych liofilizatów DPPC, POPC i DOPC wykonano w funkcji uwodnienia w domenie częstotliwości. Sygnał jest złożeniem sygnałów pochodzących od różnych frakcji protonów próbki różniących się otoczeniem chemicznym oraz mobilnością.

Do zmierzonych widm dopasowano funkcję będącą superpozycją funkcji Gaussa dla frakcji stałej (G) i funkcji Lorentza dla frakcji ciekłej (L). W zależności od badanej próbki i jej uwodnienia funkcja dopasowana była kombinacją w ilości dopasowanych funkcji Gaussa i Lorentza.

$$y = y_0 + \sum_{i=1}^N \frac{A_{G_i}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta v_{G_i}} \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{v - v_{G_i}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta v_{G_i}} \right)^2 \right] + \sum_{j=1}^M \frac{2A_{L_j}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L_j}}{4 \cdot (v - v_{L_j})^2 + \Delta v_{L_j}^2} \right], \quad (72)$$

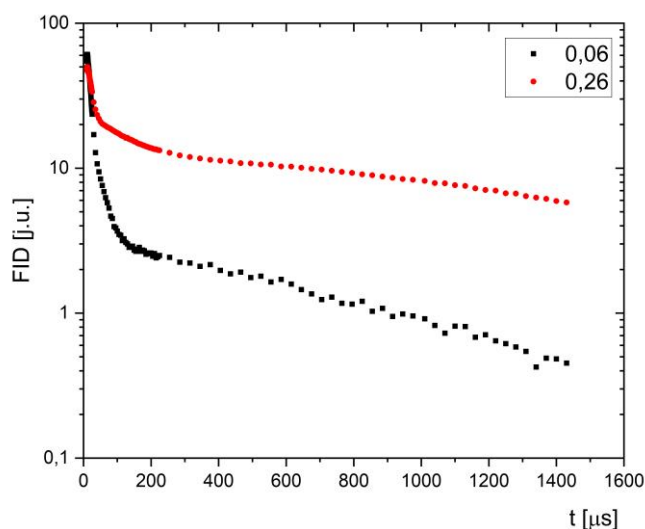
Gdzie y_0 to stała składowa sygnału (efekt aparaturowy), Δv_{G_i} , Δv_{L_j} są szerokościami połówkowymi funkcji Gaussa oraz funkcji Lorentza, odpowiednio; v_{G_i} oraz v_{L_j} są położeniami środka linii opisanej funkcją Gaussa i odpowiednio funkcją Lorentza; natomiast A_{G_i} , A_{L_j} to pola powierzchni pod pikiem Gaussa oraz pod pikiem Lorentza, gdzie $i = 1, 2$ i $j = 1, 2, 3$.

3.1. Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC

3.1.1. Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC

Uzyskane wyniki zaników swobodnej precesji FID dla wybranych dwóch uwodnień rehydratowanych liofilizatów DPPC ukazano na Rysunku 29.

Sygnał FID w całym zakresie uwodnień wielowarstwowego liofilizatu DPPC został dobrze dopasowany superpozycją funkcji Gaussa dla frakcji stałej (G) i dwóch funkcji eksponencjalnych dla frakcji ciekłej (L_1 i L_2).



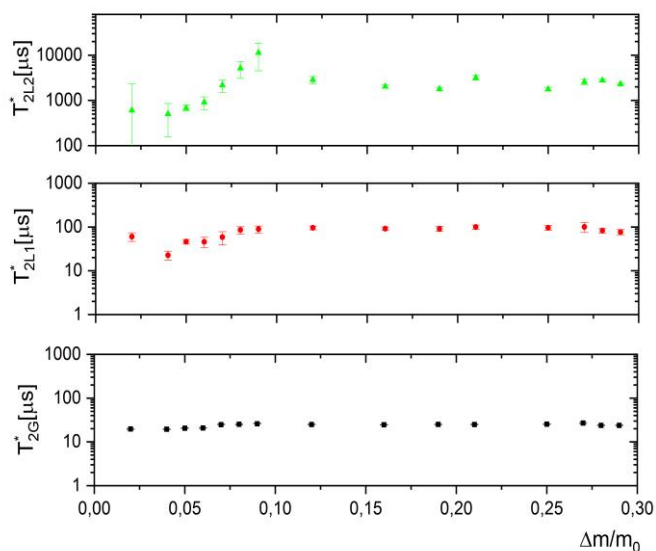
Rysunek 29. Przykładowe dwa sygnały zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR wielowarstwowych liposomów DPPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,06$ oraz do 0,26.

W Tabeli 5 zestawiono parametry dopasowania sygnału FID zgodnie ze wzorem (71).

Zależności efektywnych czasów relaksacji poprzecznej T_2^* obu zaobserwowanych frakcji cieczowych oraz jednej frakcji stałej w rehydratowanych liofilizatach wielowarstwowych liposomów DPPC przedstawiono na Rysunku 30.

W próbce DPPC stała czasowa dla sygnału pochodzącego od ciała stałego nie zależy od stopnia uwodnienia próbki i wynosi dla uśrednionego sygnału $T_{2G}^* \approx (23,8 \pm 0,4)\mu\text{s}$. Wartość efektywnego czasu relaksacji spin-spin dla składowej cieczowej T_{2L2}^* wynosi około $(1,9 \pm 0,4)\text{ms}$, co sugeruje, że składowa L_2 pochodzi od frakcji wody luźno związanej.

Z uwagi na to, że najdłuższe składowe T_2^* są ograniczone w pomiarze FID przez niejednorodności pola B_0 , składowa L_2 może być średnią z kilku luźno związanych i wolnych frakcji wody znajdujących się w reżimie szybkiej wymiany, co skutkuje fluktuacją. Na Rysunku 30 wartości czasu T_{2L2}^* [103]. Wartość uśredniona sygnału $T_{2L1}^* \approx (76 \pm 12)\mu s$ sugeruje, że składnik L_1 pochodzi z wody ściśle związanej na powierzchni membrany. Podsumowując, pomiar zaników swobodnej precesji pozwolił na wyodrębnienie dwóch frakcji kawern wodnych, mniejszych i większych, zawartych w preparacie.



Rysunek 30. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej, T_2^* , wyznaczone z sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC.

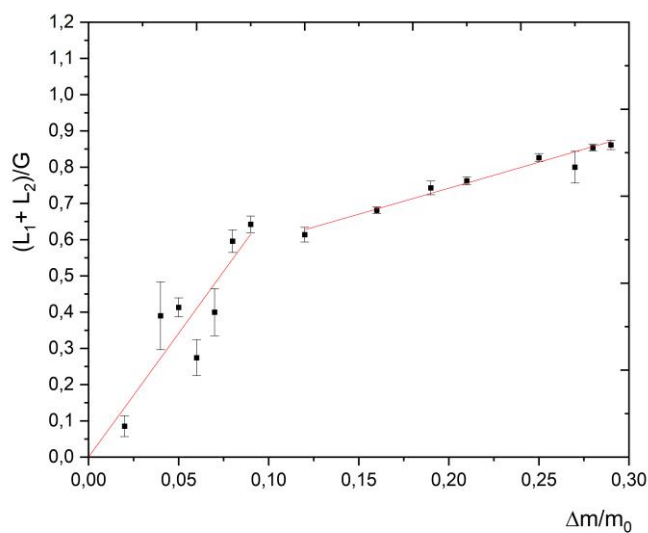
Dodatkowo wykonano analizę stosunku amplitud badanych składowych, aby określić, czy mimo zachodzącej zmiany w czasie może zachodzić rozpuszczanie matrycy lipidowej.

Przypisano amplitudę sygnału opisanego funkcją Gaussa, do stałej matrycy wielowarstwowego liofilizatu pęcherzyków. Ze względu na to, że T_{2G}^* nie ulega dużym zmianom w zależności od poziomu hydratacji, użyto amplitudę sygnału ciała stałego jako jednostkę do wyznaczenia amplitud pozostałych składników sygnału. Rysunek 31 przedstawia zależność poziomu hydratacji od amplitudy sygnału mobilnych protonów wyrażoną w jednostkach amplitudy sygnału macierzy stałej, L/G , dla wielowarstwowych liofilizatów membrany DPPC. W DPPC można wyróżnić dwa procesy, dla niskich hydratacji od $\Delta m/m_0 = 0,02$ do $\Delta m/m_0 = 0,09$ i dla wyższych od $\Delta m/m_0 = 0,12$ do $\Delta m/m_0 = 0,29$, różniące

się nachyleniem prostej, co można utożsamiać z różnym tłumieniem sygnału od wody związanej do układu w stosunku do sygnału od matrycy stałej układu. Oba procesy można opisać odpowiednio funkcją liniową.

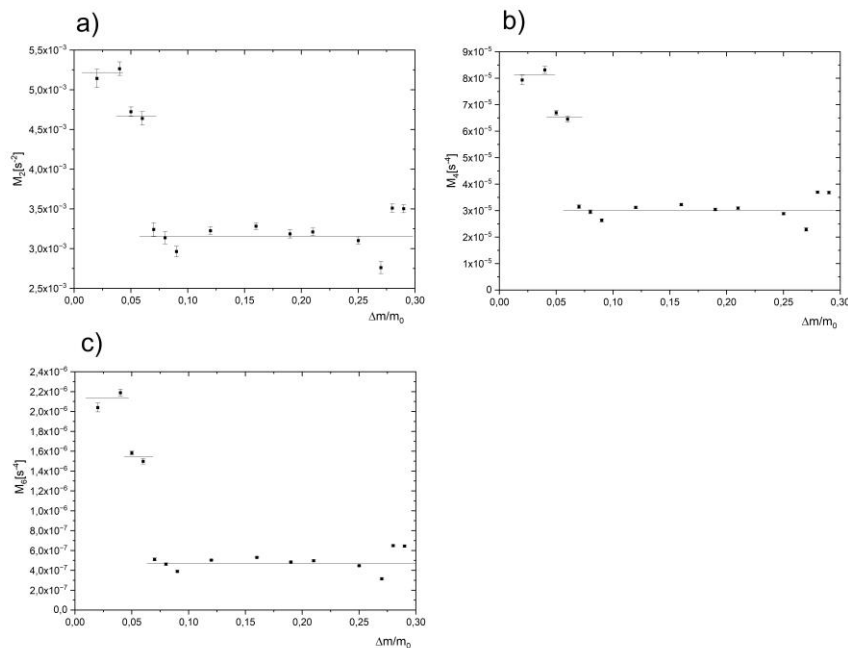
$$\text{I. } \frac{L_1+L_2}{G} = (6.83 \pm 0.55) \cdot \frac{\Delta m}{m_0}, \quad (73)$$

$$\text{II. } \frac{L_1+L_2}{G} = (1.43 \pm 0.06) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.45 \pm 0.02). \quad (74)$$



Rysunek 31. Wykres amplitudy składników cieczy FID wyrażone w jednostkach sygnału stałego, G , zarejestrowane dla uwodnionych liofilizatów pęcherzyków wielowarstwowych DPPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, wyrażone w jednostkach suchej masy.

W celu dalszej analizy rozwinięto stałą składową sygnału G protonowego FID dla liofilizowanych liposomów DPPC w szereg momentów, co szczegółowo opisano wcześniej [104]. Rysunek 32 przedstawia zależność hydratacji M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych pęcherzyków DPPC w funkcji poziomu uwodnienia.

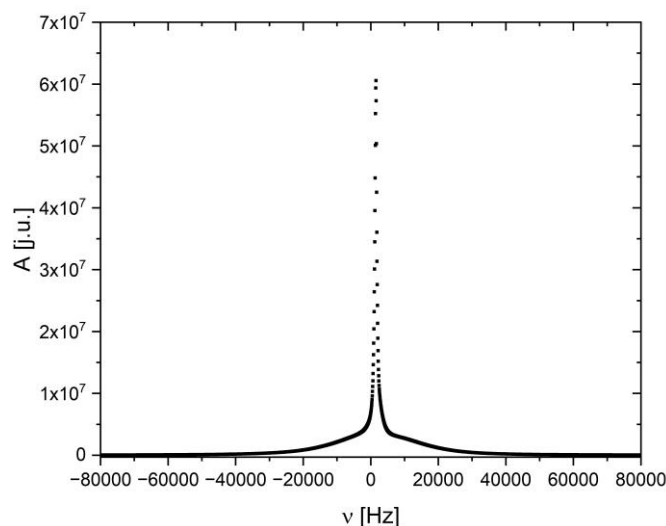


Rysunek 32. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny czasu dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej DPPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

Podczas analizy momentów liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC odkryto dwie skokowe zmiany wartości M_2 , M_4 i M_6 następujące wraz ze wzrostem stopnia hydratacji. Odzwierciedla to zmianę mobilności ciała stałego w układzie lipidowym. Obie zmiany zachodzą dla niskich poziomów uwodnienia poniżej 10%, pierwsza zmiana następuje przy około $\Delta m/m_0 = 0,04$, a druga $\Delta m/m_0 = 0,06$. Aby przeanalizować przydatność przybliżenia Gaussa do opisu stałej składowej FID, obliczono zależność między M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów DPPC w funkcji poziomu hydratacji. Dla całego zakresu badanych poziomów hydratacji otrzymano uśrednione wartości: $M_4/M_2^2 = 3$, $M_6/M_2^3 = 15$, które bardzo dobrze zgadzają się z wartościami funkcji Gaussa [104]. Oznacza to, że rozkład pól lokalnych dobrze przybliżany jest rozkładem bezładnym, jednakże nie wyjaśniło to odkrytej w pomiarach FID zmiany poziomu tłumienia sygnału od wody związanej.

3.1.2. Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DPPC

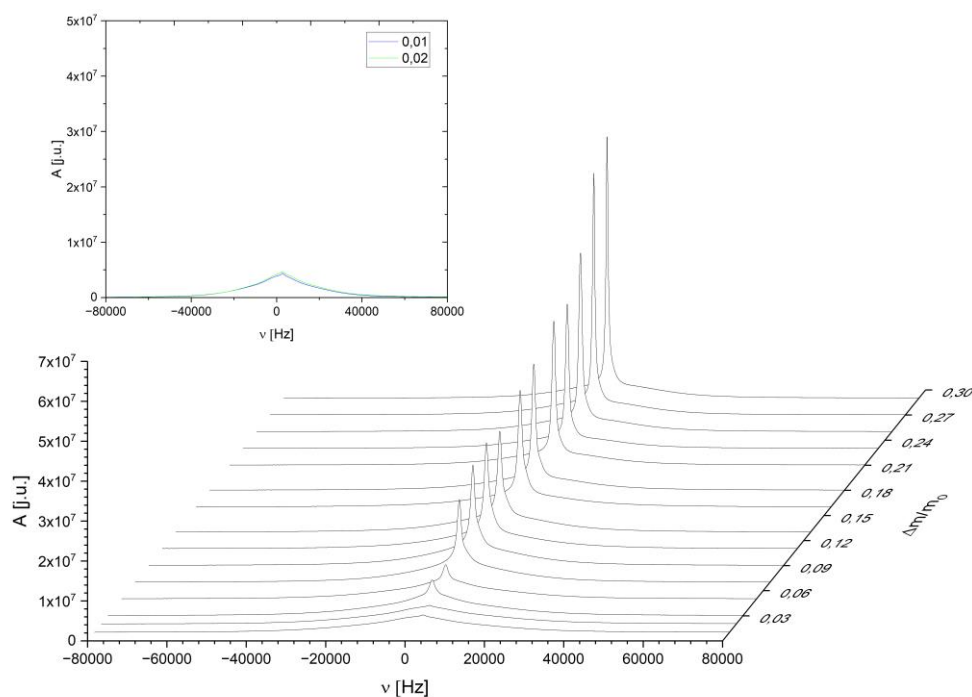
Rysunek 33 przedstawia wybrane widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla próbki DPPC.



Rysunek 33. Widmo ^1H -NMR dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,27$.

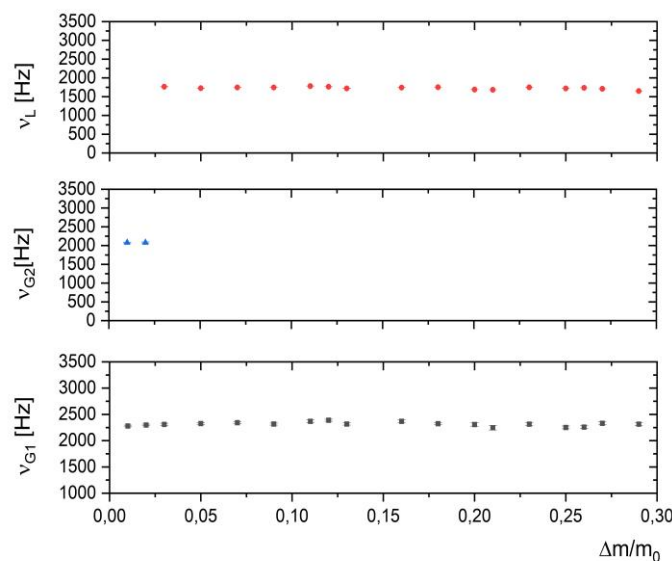
W widmach ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DPPC dla niskiego poziomu uwodnienia ($\Delta m/m_0 < 0,03$) wyodrębniono dwie składowe sygnału pochodzące od frakcji stałej protonów opisywanych funkcjami Gaussa. Dla poziomu hydratacji $\Delta m/m_0 \geq 0,03$ wyodrębniono jedną szeroką linię Gaussa oraz dodatkową składową pochodzącą od protonów mobilnych, dopasowaną funkcją Lorentza.

Na Rysunku 34 zestawiono wszystkie widma ^1H -NMR dla próbki DPPC zebrane dla całego zakresu zmierzonych wartości uwodnień.



Rysunek 34. Widma ^1H -NMR w funkcji poziomego uwodnienia próbki DPPC zarejestrowane w temperaturze pokojowej. Wstawka przedstawia powiększone widmo próbki DPPC o poziomie uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,01$ i $\Delta m/m_0 = 0,02$.

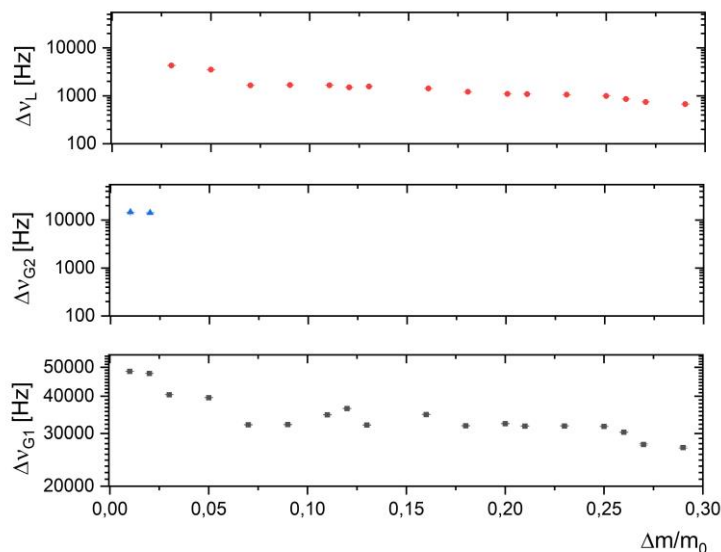
Położenie środka linii Gaussa i Lorentza charakteryzują średnie otoczenie magnetyczne próbki. Na Rysunku 35 zaprezentowano zależność środka danego piksu od wartości uwodnienia dla próbki DPPC. Na podstawie położenia środka linii wyróżniono dwie składowe od protonów unieruchomionych, $\nu_{G1} = (2315 \pm 24)\text{Hz}$ i $\nu_{G2} = (2079 \pm 14)\text{Hz}$, oraz wyróżniono linię pochodzącą od cieczy, linia $\nu_L = (1729 \pm 1)\text{Hz}$. Położenia środka linii Gaussa oraz Lorentza, opisujących sygnał pochodzący od matrycy stałej i frakcji ciekłej, są stabilne, więc można stwierdzić brak zmian otoczenia magnetycznego próbki następującego wraz ze zmianą poziomego uwodnienia.



Rysunek 35. Zależność położenia środka pików ν_{G1} , ν_{G2} , ν_L od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów DPPC, gdzie $\Delta m/m_0$ to względny przyrost masy, a m_0 to sucha masa liofilizatu.

Rysunek 36 przedstawia szerokości połówkowe linii Gaussa i Lorentza dla widm ^1H -NMR dla rehydratowanych liofilizatów DPPC wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$.

Wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia szerokość połówkowa linii ciała stałego G_1 spada od wartości $(48,4 \pm 0,1)\text{kHz}$ do $(27,1 \pm 0,1)\text{kHz}$, co sugeruje wzrost ruchliwości protonów pochodzących od matrycy stałej. Dla niskich poziomów uwodnienia obserwuje się dodatkową składową sygnału pochodzącego od protonów unieruchomionych, G_2 , która to składowa zanika wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów DPPC. Szerokość połówkowa linii drugiego wyodrębnionego ciała stałego dla dwóch najniższych poziomów uwodnienia wynosi $(14,5 \pm 0,1)\text{kHz}$. Szerokość połówkowa wąskiej linii – Lorentzowskiej L , pochodzącej od mobilnych protonów liofilizatu DPPC, obniża się od wartości odpowiednio $(4300 \pm 20)\text{Hz}$ do $(671 \pm 2)\text{Hz}$. Sugeruje to, że linia ta jest mieszaniną sygnałów od wody ściśle i od wody luźno związanej w układzie.



Rysunek 36. Zależność szerokości połówkowej dwóch składowych stałych, G_1 i G_2 oraz składowej mobilnej widma $^1\text{H-NMR}$, L , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DPPC, $\Delta m/m_0$.

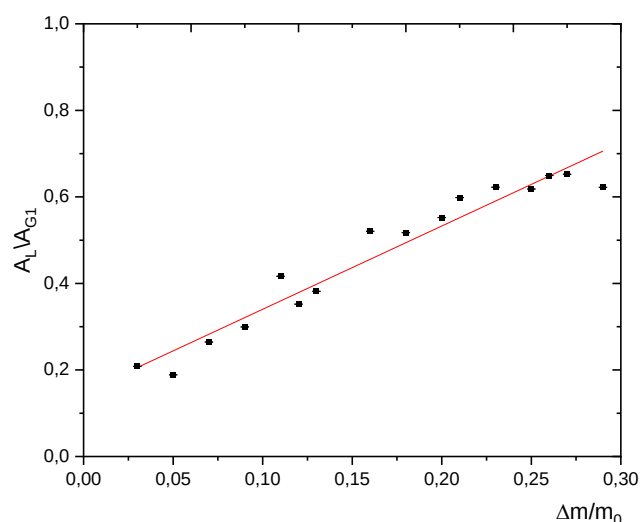
Pole powierzchni pod linią $^1\text{H-NMR}$ jest proporcjonalne do liczby protonów dających wkład do danego sygnału. Stosunek pól powierzchni od danych frakcji protonowych niesie informację na temat stosunku liczby protonów w poszczególnych podukładach. Stosunek pola powierzchni pod pikiem opisanym funkcją Lorentza do pola pod pikiem opisanym funkcją Gaussa, A_L/A_{G1} , jest miarą liczby protonów mobilnych. Tak zdefiniowany stosunek wykreślono w funkcji uwodnienia próbki DPPC i przedstawiono na Rysunku 37.

W zakresie od $\Delta m/m_0 = 0,03$ do $0,29$ badanych poziomów uwodnienia zależność liniowa pól powierzchni pod wykresami składowej mobilnej (składowa lorentzowska) od składowej o znacznym stopniu unieruchomienia (składowa gaussowska) była liniowa, co oznacza brak rozpuszczania próbki, który byłby charakteryzowany przez nieliniową zależność hydratacyjną stosunku pól powierzchni.

Dla próbki DPPC składowa cieczowa L wzrasta liniowo wraz z rosnącym poziomem uwodnienia (Rysunek 37), zgodnie z równaniem:

$$\frac{A_L}{A_{G1}} = (1,92 \pm 0,13) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0,15 \pm 0,02). \quad (75)$$

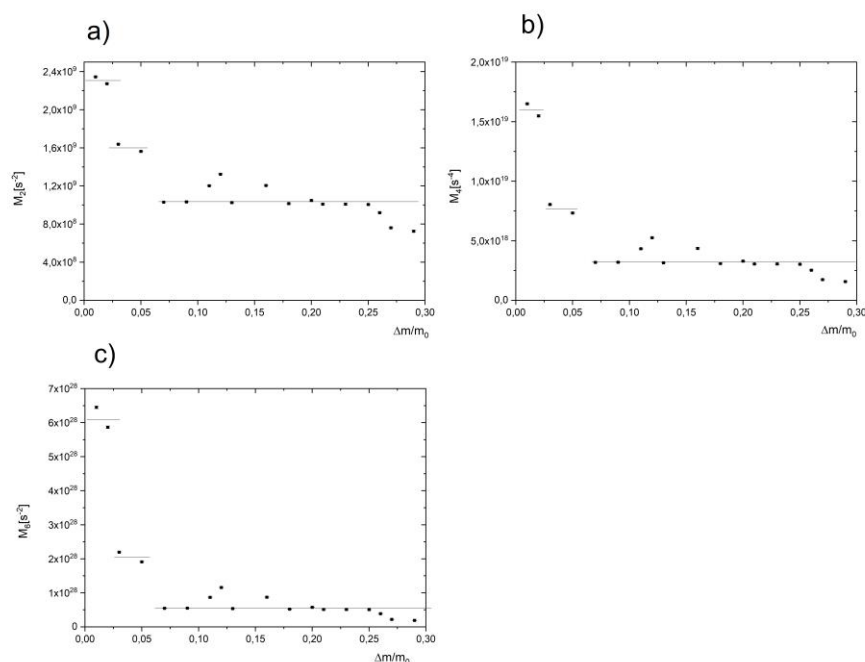
Niezerowy udział sygnału od frakcji L aproksymowany dla $\Delta m/m_0 = 0$ sugeruje, że również w suchym liofilizacie zawarta jest pewna ilość wody.



Rysunek 37. Hydratacyjna zależność składowej cieczerwowej A_L wyrażonej w jednostkach sygnału stałego A_L/A_{G1} dla rehydratowanych liofilizatów DPPC.

W celu bardziej szczegółowej analizy rozwinięto sygnał od stałej składowej sygnału protonowego, G_1 , dla liofilizowanych liposomów DPPC w szereg momentów, co szczegółowo opisano już wcześniej [104]. Rysunek 39 przedstawia zależność hydratacyjną M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych pęcherzyków DPPC.

Analizując poniższe wykresy, można wyróżnić dwie skokowe zmiany wartości momentów M_2 , M_4 i M_6 wraz ze wzrostem stopnia hydratacji. Oznacza to, iż obserwujemy dwie zmiany mobilności ciała stałego w układzie lipidowym DPPC w domenie częstotliwości. Obie zmiany zachodzą dla niskich uwodnień poniżej $\Delta m/m_0 = 0,10$, jest to zgodne z wynikami momentów z domeny czasu. Pierwsza zmiana następuje przy $\Delta m/m_0 = 0,03$, a druga przy $\Delta m/m_0 = 0,07$.



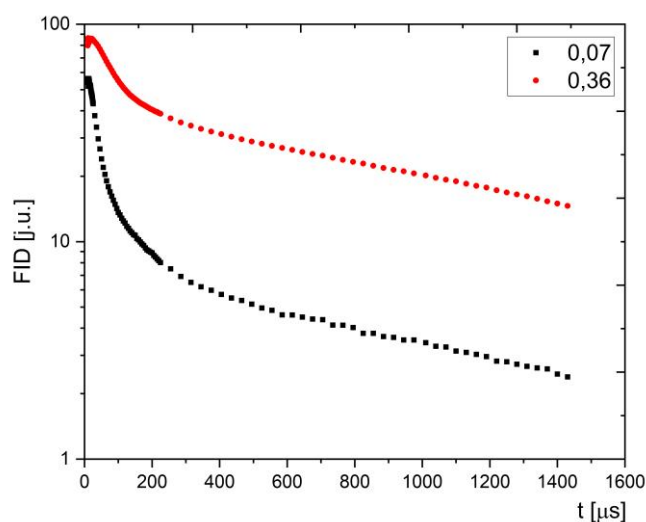
Rysunek 38. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej DPPC w funkcji poziomego uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

3.2. Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC

3.2.1. Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC

Na Rysunku 39 przedstawiono otrzymane wyniki zaników swobodnej precesji FID dla wybranych dwóch uwodnień rehydratowanych liofilizatów POPC.

Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów w zakresie $\Delta m/m_0 = 0 - 0,13$ dla wielowarstwowych liposomów liofilizatów POPC został dobrze dopasowany superpozycją funkcji Gaussa dla frakcji stałej (G) i dwóch funkcji eksponencjalnych dla frakcji ciekłej (L_1 i L_2). Powyżej $\Delta m/m_0 = 0,13$ sygnał FID został dopasowany jedynie superpozycją dwóch funkcji eksponencjalnych (L_1 i L_2).

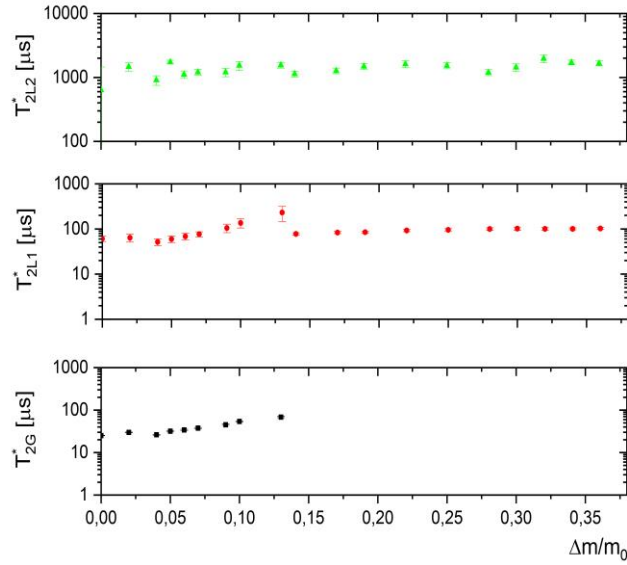


Rysunek 39. Przykładowe dwa sygnały FID wielowarstwowych liposomów POPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,07$ oraz do $0,36$.

W Tabeli 6 zestawiono parametry dopasowania zgodnie ze wzorem (71) dla FID dla rehydratowanych liofilizatów POPC.

Zależności T_2^* względem poziomu hydratacji dla obu frakcji ciekowych L_1 i L_2 oraz dla frakcji stałej G w rehydratowanych liofilizatach POPC przedstawiono na Rysunku 40.

W próbce POPC czas relaksacji T_{2G}^* dla sygnału pochodzącego od ciała stałego wzrasta od $(25,1 \pm 0,4)\mu s$ do $(68 \pm 2)\mu s$ i został zarejestrowany jedynie do poziomu hydratacji równego $0,13$. Może to świadczyć o zwilżaniu próbki, a co za tym idzie zwiększeniu mobilności protonów w matrycy stałej. Uśredniona wartość czasu relaksacji T_{2L2}^* dla składowej ciekowej wynosi około $(1388 \pm 202)\mu s$, co wskazuje, że składowa L_2 pochodzi od luźno związanej frakcji wodnej. Wartość uśredniona sygnału $T_{2L1}^* \approx (94 \pm 14)\mu s$ sugeruje, że składnik L_1 pochodzi z wody ściśle związanej na powierzchni błony. Pomiar zaników swobodnej precesji rozdzielił dwie frakcje kawern wodnych zawartych w próbce. Tak wyróżnione frakcje ciekowe są zgodne z podukładami wydzielonymi w pomiarach widm ^1H -NMR.



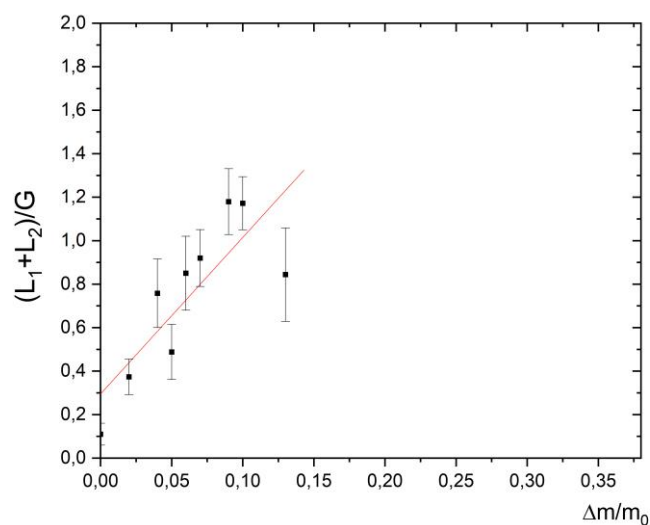
Rysunek 40. Zależność hydratacyjna czasów T_2^* wyznaczonych z sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC.

Dodatkowo wykonano analizę stosunku amplitud badanych składowych i przedstawiono na Rysunku 41.

Przypisano amplitudę sygnału opisanego funkcją Gaussa, G , do stałej matrycy liofilizatów liposomów POPC i użyto amplitudy tego składnika jako jednostki do skalowania amplitud składowych cieczowych. Z uwagi na to, że T_{2G}^* jest tylko wyznaczone w zakresie hydratacji od 0 do 0,13, zależność hydratacji od amplitudy sygnału ruchomego protonu wyrażona w jednostkach amplitudy sygnału macierzy stałej, L/G , dla wielowarstwowych liofilizatów POPC została tylko wykreślona właśnie w tym zakresie. Proces ten można opisać funkcją liniową równą:

$$\frac{L_1+L_2}{G} = (7.20 \pm 1.98) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.29 \pm 0.14). \quad (76)$$

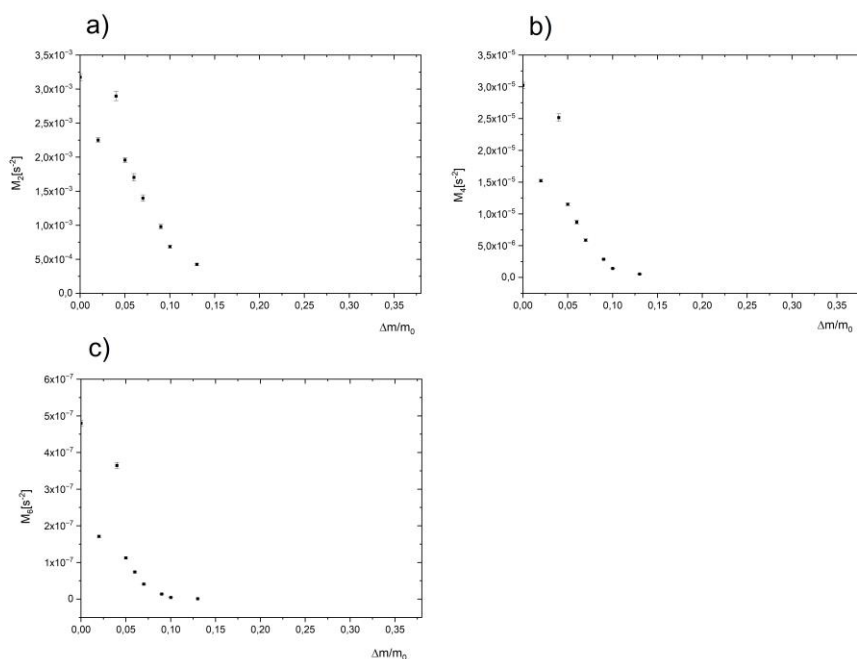
Oznacza to, iż w tym przypadku również nie obserwujemy rozpuszczania matrycy stałej w układzie lipidowym, a sygnał cieczowy od wody związanej narasta wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia w zakresie wyznaczonego ciała stałego.



Rysunek 41. Wykres amplitudy składników cieczy FID wyrażonych w jednostkach sygnału stałego, G , zarejestrowanego dla uwodnionych liofilizatów liposomów wielowarstwowych POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, wyrażonej w jednostkach suchej masy.

Stałą składową sygnału G protonowego FID dla liofilizowanych liposomów POPC rozwinięto w szereg momentów. Rysunek 42 przedstawia zależność hydratacji M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych pęcherzyków POPC w funkcji poziomu hydratacji w zakresie $\Delta m/m_0$ od 0 do 0,13.

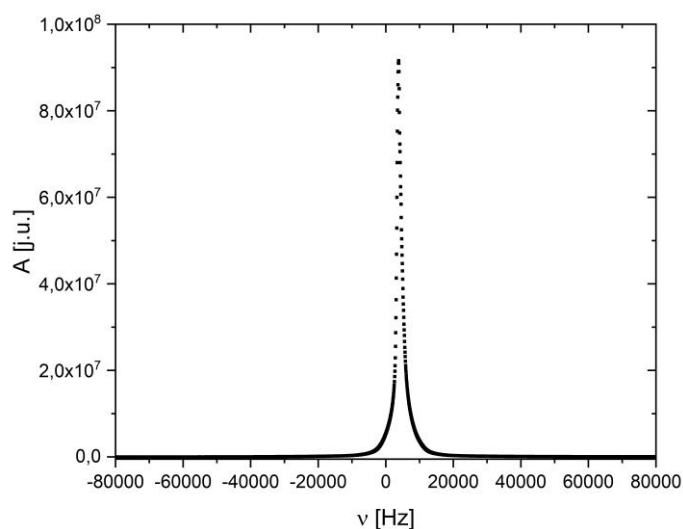
Podczas analizy momentów liposomów wielowarstwowych POPC trudno jest wyróżnić skokowe zamiany mobilności ciała stałego. W sposób ciągły zmieniają się wartości momentów M_2 , M_4 i M_6 wraz ze wzrostem poziomu hydratacji. Prawdopodobnie jest to związane z zachowaniem się ciała stałego w układzie, zmienia się jego szerokość połówkowa, powodując wzrost ruchliwości protonów pochodzących od ciała stałego wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia układu lipidowego POPC.



Rysunek 42. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny czasu dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

3.2.2. Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów POPC

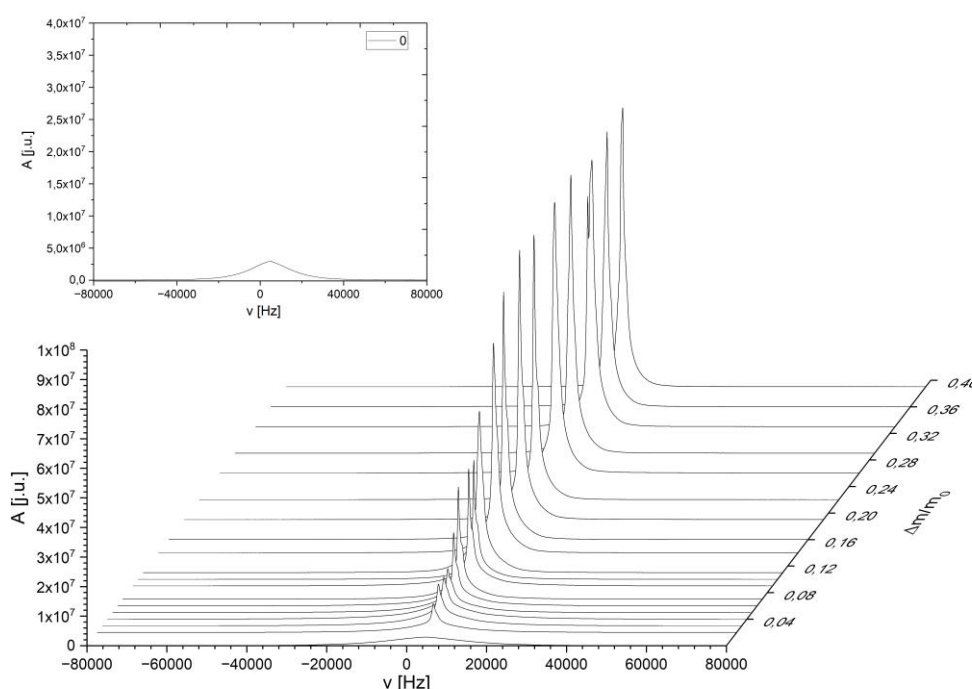
Rysunek 43 przedstawia wybrane widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla próbki POPC.



Rysunek 43. Widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów POPC uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0,26$

W widmach ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów POPC dla suchej próbki ($\Delta m/m_0 = 0$) wyodrębniono dwie składowe sygnału pochodzące od frakcji stałej opisywanej funkcją Gaussa. Dla poziomów hydratacji od $\Delta m/m_0 \geq 0,02$ do $\Delta m/m_0 = 0,10$ wyodrębniono dwie linie Gaussa oraz dwie dodatkowe składowe pochodzące od protonów mobilnych, dopasowane funkcją Lorentza, pomimo niewidocznego optycznie rozdzielenia piku różniły się przesunięciem chemicznym. Od poziomu hydratacji $\Delta m/m_0 = 0,11$ rozdzielono sygnał na jedną szeroką linię Gaussa oraz dwie wąskie linie Lorentza.

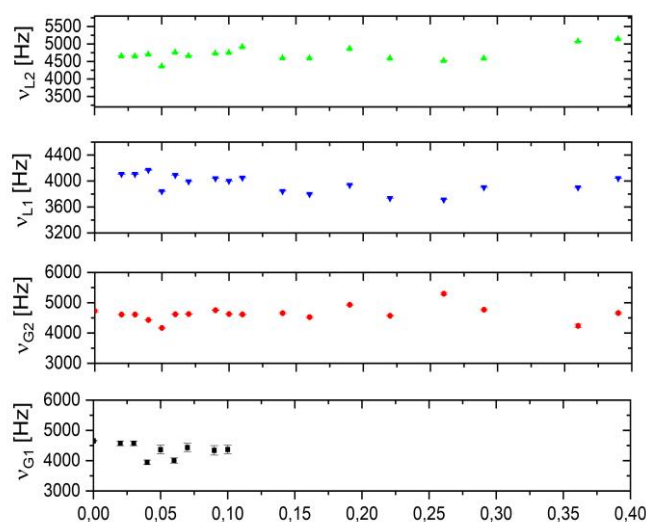
Na Rysunku 44 zestawiono widma ^1H -NMR dla próbki POPC zebrane dla całego zakresu zmierzonych wartości uwodnień.



Rysunek 44. Widma ^1H -NMR próbki POPC zarejestrowane w funkcji poziomu uwodnienia w temperaturze pokojowej. Wstawka przedstawia powiększone widmo próbki suchej o względnej masie wody związanej $\Delta m/m_0 = 0$.

Na Rysunku 45 przedstawiono zależność położenia środka danego piku od wartości uwodnienia dla próbki POPC. Na podstawie położenia środka linii, w zależności od stopnia uwodnienia próbki POPC, wyróżniono dwie składowe od protonów unieruchomionych, G_1 i G_2 o średnich wartościach położenia środka linii równych odpowiednio: $\nu_{G1} = (4363 \pm$

101)Hz, $\nu_{G2} = (4634 \pm 19)$ Hz. Wyróżniono również dwie linie pochodzące od cieczy, L_1 i L_2 , ich średnie wartości położenia linii wynoszą: $\nu_{L1} = (3957 \pm 2)$ Hz, $\nu_{L2} = (4716 \pm 5)$ Hz. Położenia środków linii Gaussa oraz linii Lorentza, opisujących sygnały pochodzące od matrycy stałej i od wody związanej, są stabilne wraz ze wzrostem uwodnienia, co świadczy o braku zmian otoczenia magnetycznego próbki.

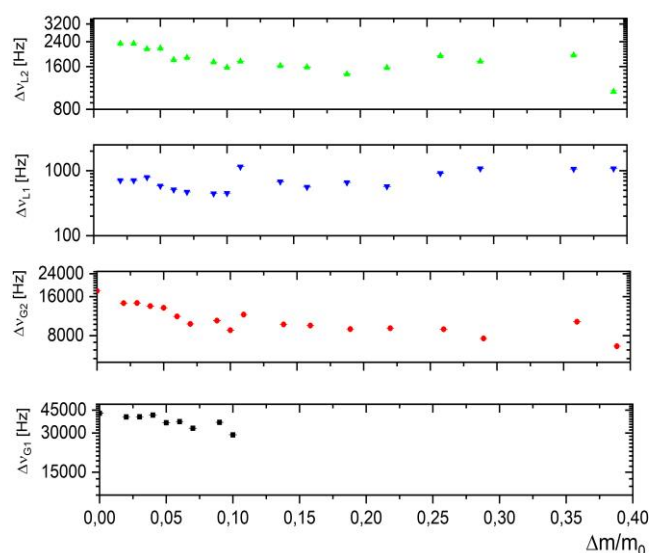


Rysunek 45. Zależność położenia środka pików ν_{G1} , ν_{G2} , ν_{L1} , ν_{L2} od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów POPC.

Rysunek 46 przedstawia szerokości połówkowe linii Gaussa i Lorentza dla widm $^1\text{H-NMR}$ rehydratowanych liofilizatów POPC wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia.

Wraz z rosnącym poziomem uwodnienia szerokość połówkowa linii od składowej stałej G_1 spada od wartości $(43 \pm 0,1)$ kHz do $(29,07 \pm 0,04)$ kHz, co sugeruje wzrost ruchliwości protonów pochodzących od tej frakcji stałej matrycy. Składowa ta zanika dla uwodnień wyższych niż $\Delta m/m_0 = 0,1$. Dla całego zakresu uwodnień obserwuje się dodatkową węższą składową sygnału pochodzącego od protonów unieruchomionych, G_2 . Szerokość połówkowa tej składowej również maleje od wartości $(17,68 \pm 0,01)$ kHz do $(6,64 \pm 0,01)$ kHz wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów POPC, wskazując na wzrost ruchliwości tej składowej stałej matrycy. Szerokość połówkowa wąskiej linii L_1 , pochodzącej od protonów mobilnych liofilizatów POPC, jest stała wraz ze wzrostem poziomu hydratacji i jej średnia wartość wynosi (730 ± 1) Hz. Szerokość połówkowa drugiej wąskiej linii L_2 , pochodzącej od wody związanej, obniża się od wartości odpowiednio (2326 ± 3) Hz do $(1064$

± 19)Hz. Sugeruje to, że linia L_2 jest mieszaniną wody ściśle związanej oraz wody luźno związanej w układzie, natomiast linia L_1 pochodzi wyłącznie od frakcji wody luźno związanej w liposomach POPC. Tak rozróżnialne linie zarówno pod względem położenia, jak i szerokości przekonują, że dekompozycja sygnału protonowego w domenie częstotliwości została przeprowadzona poprawnie.



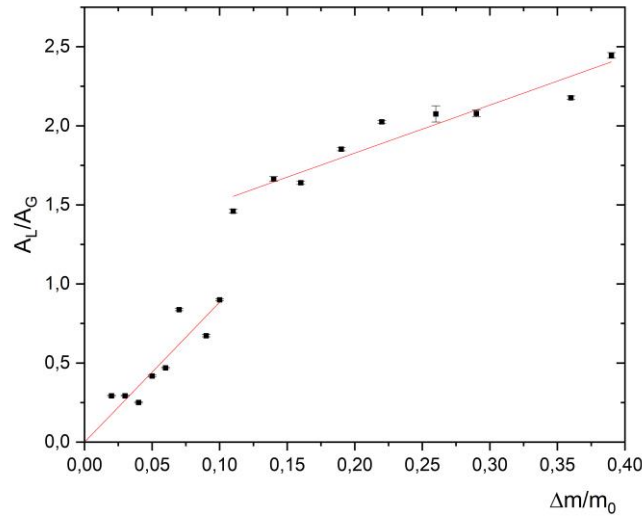
Rysunek 46. Zależność szerokości połowkowej dwóch składowych stałych, G_1 i G_2 oraz dwóch składowych mobilnych widma $^1\text{H-NMR}$, L_1 i L_2 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów POPC.

Wyznaczony stosunek A_L/A_G wykreślono w funkcji uwodnienia próbki POPC i przedstawiono na Rysunku 47. A_L oraz A_G jest odpowiednio sumowany w zależności od liczby wyznaczonych sygnałów dla danego poziomu uwodnienia. W całym zakresie poziomu hydratacji wyróżniono dwa liniowe procesy wzrostu udziału frakcji cieczowej w całym sygnale pochodzącym od próbki liofilizowanych liposomów POPC. W zakresie od $\Delta m/m_0 = 0,02$ do $0,10$ badanych poziomów uwodnienia zależność pól powierzchni pod wykresami A_L od składowej A_G była liniowa, a aproksymowany udział sygnału cieczowego dla $\Delta m/m_0 = 0$ sugeruje, że próbka została efektywnie poddana liofilizacji. W przedziale poziomu uwodnienia od $0,11$ do $0,39$ zależność A_L/A_G również była liniowa. Dla obu tych procesów składowa cieczowa wzrasta liniowo wraz z rosnącym poziomem uwodnienia (Rysunek 47), zgodnie z równaniami:

$$\text{I. } \frac{A_L}{A_{G1}} = (8.84 \pm 0.64) \cdot \frac{\Delta m}{m_0}, \quad (77)$$

$$\text{II. } \frac{A_L}{A_{G1}} = (3.04 \pm 0.33) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (1.22 \pm 0.08) \quad (78)$$

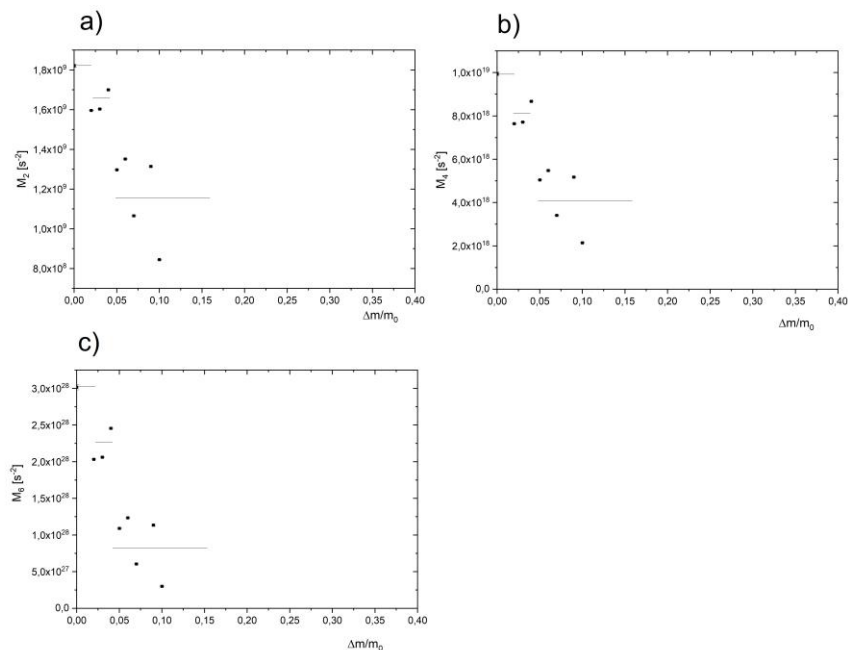
Oznacza to, że brak jest rozpuszczania frakcji stałej próbki POPC, a dopasowane funkcje liniowe do odpowiednich procesów różnią się nachyleniem, co sugeruje różne tłumienie sygnału od wody związanej do układu w stosunku do tłumienia sygnału od matrycy stałej układu. Warto zauważyć, że ta zmiana w całości zachodzi dla poziomów uwodnienia niższych od około 0.11.



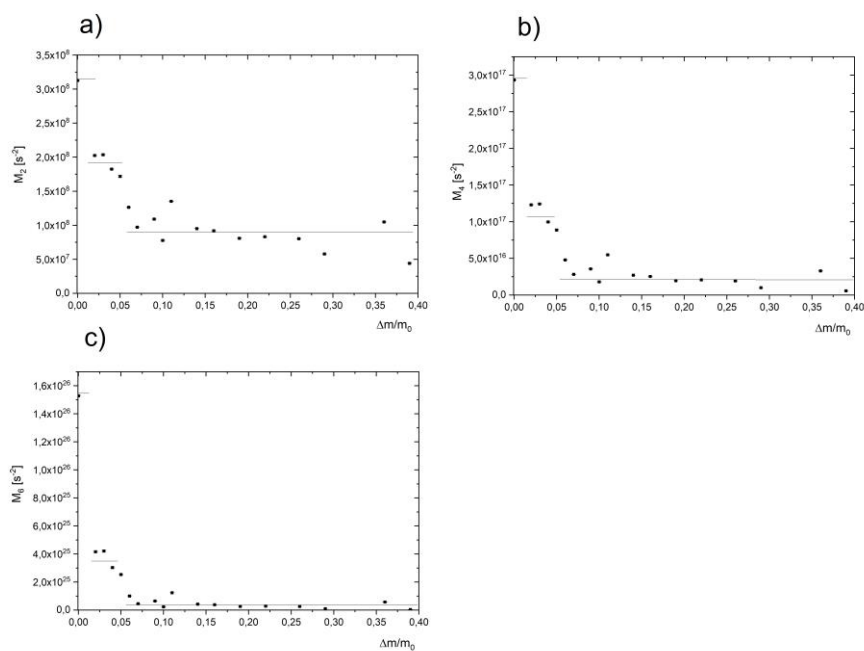
Rysunek 47. Hydratacyjna zależność składowej cieczerwowej A_L wyrażonej w jednostkach sygnału stałego A_L/A_{G1} dla rehydratowanych liofilizatów POPC.

Rozwinięto sygnał od stałej składowej sygnału protonowego, G_1 i G_2 , dla liofilizowanych liposomów POPC w szereg momentów. Rysunek 48 i 49 przedstawiają zależność hydratacji M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych POPC w funkcji poziomu hydratacji dla odpowiednich sygnałów stałych sygnału.

Analizując wykresy zależności hydratacyjnych wartości momentów linii dla obu sygnałów od frakcji stałej liposomów, można wyróżnić dwie skokowe zmiany wartości M_2 , M_4 i M_6 , zachodzące wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. Obie zmiany zachodzą dla niskich uwodnień poniżej $\Delta m/m_0 = 0,10$. Pierwsza zmiana dla G_1 następuje przy $\Delta m/m_0 = 0,02$, a druga $\Delta m/m_0 = 0,05$. Dla G_2 pierwsza zmiana zachodzi przy $\Delta m/m_0 = 0,02$, a druga dla $\Delta m/m_0 = 0,06$.



Rysunek 48. Momenty linii NMR dla składowej stałej sygnału G_1 dla wielowarstwowych liofilizatów błony z POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .



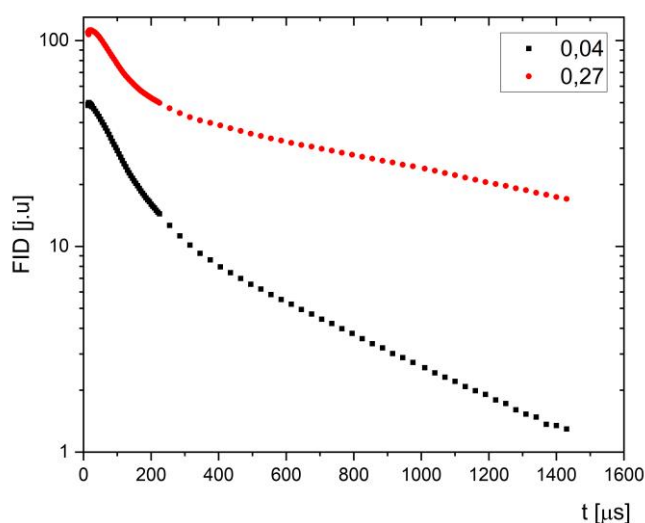
Rysunek 49. Momenty linii dla składowej stałej sygnału $^1\text{H-NMR } G_2$ dla wielowarstwowych liofilizatów błony z POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

3.3. Wyniki liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC

3.3.1. Pomiar zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów z DOPC

Na Rysunku 50 przedstawiono wyniki zaników swobodnej precesji zarejestrowane dla wybranych dwóch uwodnień rehydratowanych liofilizatów DOPC.

Sygnał FID dla protonów w zakresie uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0 - 0,02$ dla wielowarstwowych liposomów liofilizatów DOPC został dobrze dopasowany superpozycją dwóch funkcji Gaussa dla frakcji stałej (G_1 i G_2) i dwóch funkcji eksponencjalnych dla frakcji ciekłej (L_1 i L_2). Od poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,03$ składowa opisana funkcją Gaussa przestała być widoczna, a sygnał FID został dopasowany jedynie superpozycją dwóch funkcji eksponencjalnych (L_1 i L_2).

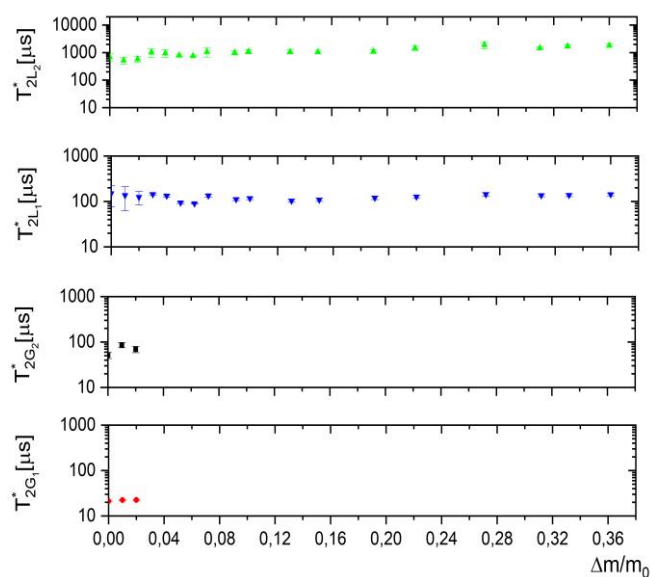


Rysunek 50. Przykładowe dwa sygnały FID wielowarstwowych liposomów DOPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,04$ oraz do 0,27..

W Tabeli 7 zestawiono parametry dopasowania zgodnie ze wzorem (71) dla FID dla rehydratowanych liofilizatów DOPC.

Zależności czasu T_2^* względem poziomu hydratacji obu frakcji ciekłych L_1 i L_2 oraz dla frakcji stałej G_1 i G_2 w rehydratowanych liofilizatach DOPC przedstawiono na Rysunku 51.

W próbce DOPC efektywne czasy relaksacji spinowo-spinowej T_{2G1}^* i T_{2G2}^* dla sygnałów pochodzących od ciała stałego wynoszą odpowiednio $T_{2G1}^* = (22 \pm 1)\mu\text{s}$ oraz $T_{2G2}^* = (69 \pm 10)\mu\text{s}$. Czas zaniku składowej T_{2G2}^* jest stosunkowo długi i ta składowa mogłaby równie dobrze zostać dopasowana funkcją eksponencjalną. Zostały one zarejestrowane jedynie dla trzech najniższych wyznaczonych poziomów uwodnienia. Dla wyższych poziomów hydratacji nie udało się dopasować funkcji Gaussa. Wartość średnia T_{2L1}^* wynosi $(125 \pm 18)\mu\text{s}$ i wskazuje, że składowa L_1 pochodzi od wody ściśle związanej na powierzchni modelowej błony biologicznej DOPC. Średnia wartość czasu relaksacji T_{2L2}^* dla dłuższej składowej cieczowej wynosi około $(1114 \pm 223)\mu\text{s}$, sugerując, iż składowa cieczowa L_2 pochodzi z luźno związanej frakcji wodnej. Pomiar zaników swobodnej precesji pozwolił wyodrębnić dwie frakcje protonów mobilnych zawartych w próbce DOPC. Stałą składową ze względu na wykrycie jej tylko dla trzech najniższych uwodnień wykluczono z analizy, aczkolwiek może ona korelować z wynikami uzyskanymi dla DPPC i POPC dla zbliżonych wartości poziomu uwodnienia. Do wyższych uwodnień niż 0,03 w ogóle nie udało się dopasować funkcji Gaussa.



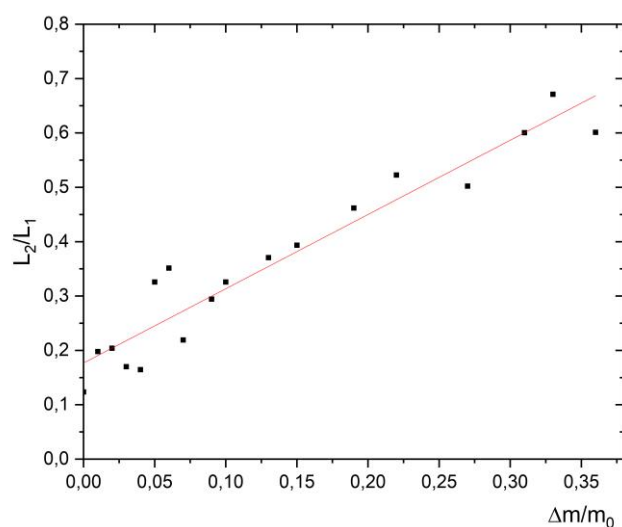
Rysunek 51. Zależność hydratacyjna czasów T_2^* wyznaczonych z sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC.

Ze względu na brak możliwości wyznaczenia stosunku sygnału cieczowego w jednostkach sygnału od ciała stałego wykonano jedynie stosunek amplitudy sygnału pochodzącego od wody luźno związanej do sygnału od wody ściśle związanej w badanym układzie

liposomów wielowarstwowych DOPC. Stosunek L_2/L_1 przedstawiono na Rysunku 52. Do wyników dopasowano funkcję liniową opisaną:

$$\frac{L_2}{L_1} = (1.37 \pm 0.10) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.18 \pm 0.20). \quad (79)$$

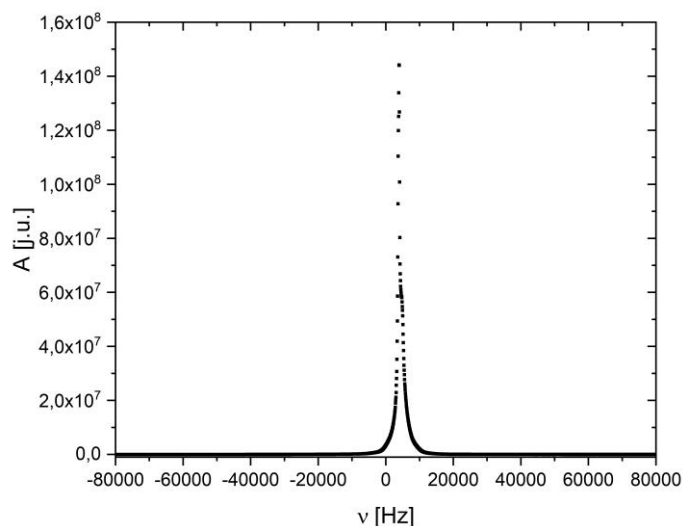
Analizując poniższy wykres, można stwierdzić, że składowej L_2 , pochodzącej od wody luźno związanej w układzie, przybywa liniowo wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia w stosunku do wody ściśle związanej w układzie lipidowym DOPC, której amplituda nie przyrasta.



Rysunek 52. Wykres stosunku L_2/L_1 składników cieczy FID zarejestrowanych dla uwodnionych liofilizatów pęcherzyków wielowarstwowych DOPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$.

3.3.2. Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC

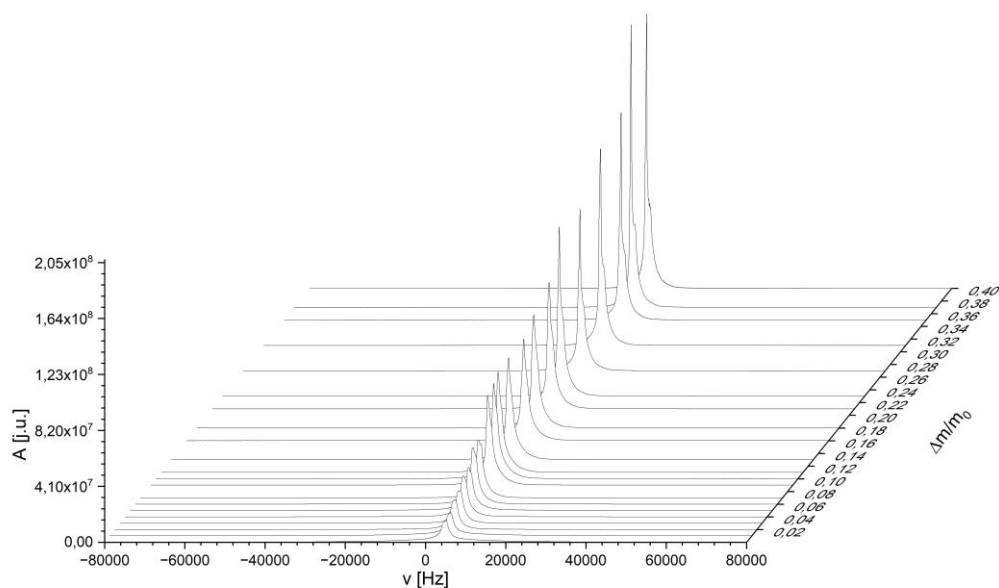
Rysunek 53 przedstawia wybrane widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla próbki DOPC.



Rysunek 53. Widmo ^1H -NMR dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,31$.

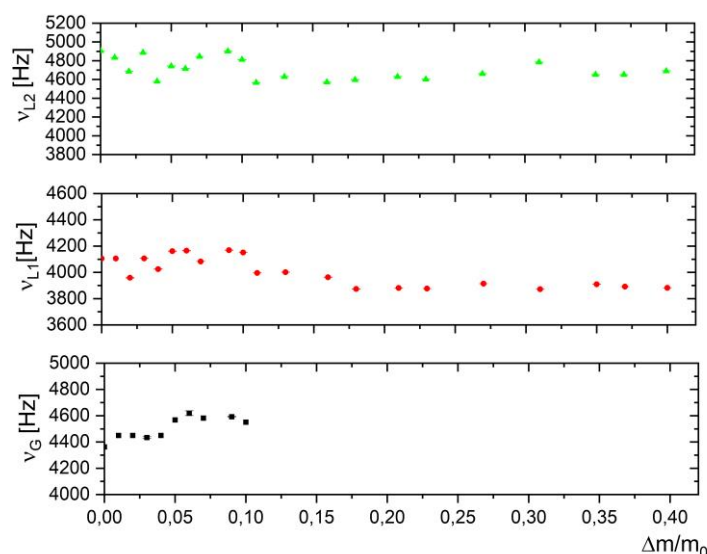
W widmach ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC, dla próbki w zakresie poziomu uwodnienia powyżej $\Delta m/m_0 \geq 0,10$, wyodrębniono jedną składową sygnału pochodzącą od frakcji stałej opisanej funkcją Gaussa oraz dwie składowe cieczowe, różniące się mobilnością, dopasowane funkcją Lorentza. Pomimo braku optycznego rozdzielania pozycji linii lorentzowskiej w niskich poziomach uwodnienia udało się dopasować dwie funkcje Lorentza, które różniły się przesunięciem chemicznym. Ich środki były oddalone od siebie około 700 Hz. Od poziomu hydratacji $\Delta m/m_0 = 0,11$, sygnał rozdzielono jedynie na dwie wąskie linie Lorentza, natomiast składowej stałej nie udało się dopasować.

Na Rysunku 54 zestawiono wszystkie widma ^1H -NMR dla próbki DOPC zebrane dla całego zakresu zmierzonych wartości uwodnień.



Rysunek 54. Widma ^1H -NMR w funkcji poziomu uwodnienia próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC zarejestrowane w temperaturze pokojowej.

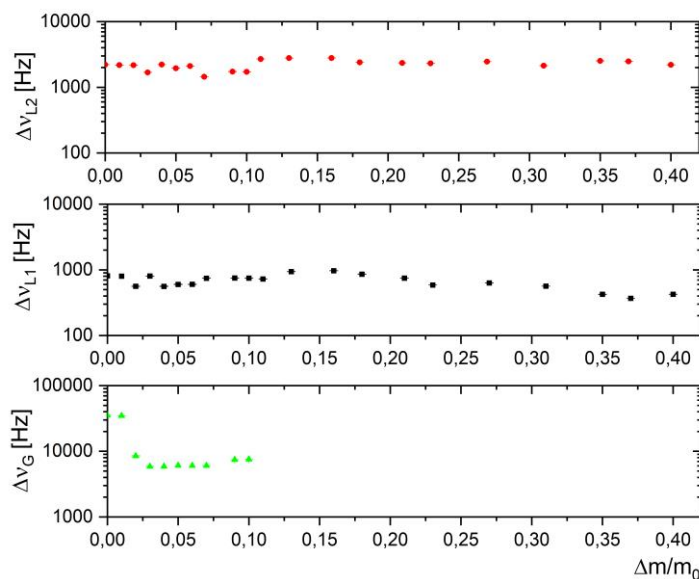
Na Rysunku 55 przedstawiono zależność położenia środka danej linii od wartości uwodnienia dla próbki DOPC. Na podstawie położenia środka linii, w zależności od stopnia uwodnienia próbki DOPC, wyróżniono jedną składową od protonów unieruchomionych, G , o średniej wartości położenia środka linii równej: $\nu_G = (4506 \pm 3)\text{Hz}$. Wyróżniono również dwie linie pochodzące od ciecży, L_1 i L_2 , ich średnie wartości położenia środka linii wynoszą: $\nu_{L1} = (4004 \pm 1)\text{Hz}$, $\nu_{L2} = (4711 \pm 3)\text{Hz}$. Położenia środka linii Gaussa oraz linii Lorentza są stabilne wraz ze wzrostem uwodnienia, co świadczy o braku zmian otoczenia magnetycznego próbki wraz z narastającym poziomem uwodnienia.



Rysunek 55. Zależność położenia środka linii ν_G , ν_{L1} , ν_{L2} od poziomu uwodnienia dla rehydratowanych liofilizatów DOPC.

Rysunek 56 przedstawia wartości szerokości połówkowych linii Gaussa i Lorentza dla widm ^1H -NMR dla rehydratowanych liofilizatów DOPC wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia.

Wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia szerokość połówkowa linii składowej o ograniczonej mobilności (ciała stałego), G , spada od wartości $(35,0 \pm 0,1)\text{kHz}$ do $(5,88 \pm 0,01)\text{kHz}$, wskazując na wzrost ruchliwości protonów stałej matrycy następujący ze wzrostem poziomu uwodnienia. Składowa ta zanika dla poziomów uwodnienia wyższych niż $\Delta m/m_0 = 0,1$. Dla całego zakresu uwodnień obserwuje się dwie wąskie składowe sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, a mianowicie L_1 oraz L_2 . Szerokość połówkowa linii L_1 liofilizatów DOPC jest stała wraz ze wzrostem poziomu hydratacji i jej średnia wartość wynosi $(677 \pm 4)\text{Hz}$. Szerokość połówkowa drugiej wąskiej linii, L_2 , także jest stała wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, a średnia wartość szerokości połówkowej wynosi $(2215 \pm 5)\text{Hz}$. Wobec tego, że linia L_1 jest mieszaniną wody luźno związanej w układzie, to linia L_2 jest sygnałem od wody ściśle związanej w liposomach wielowarstwowych DOPC. Tak rozróżnialne linie zarówno pod względem położenia, jak i szerokości sugerują, że dekompozycja sygnału protonowego w domenie częstotliwości została przeprowadzona poprawnie. Tak wyróżnione frakcje cieczowe można utożsamić z podukładami wydzielonymi w pomiarach zaniku swobodnej precesji w domenie czasu.



Rysunek 56. Zależność szerokości połówkowej dwóch składowych stałych, G , oraz dwóch składowych mobilnych widma ^1H -NMR, L_1 i L_2 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DOPC.

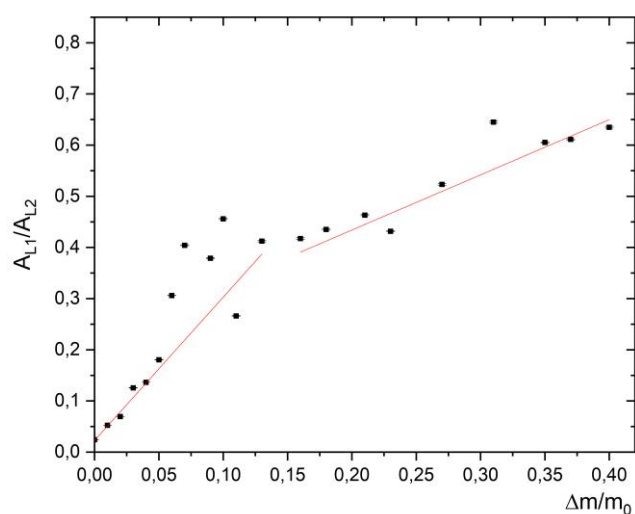
Wyznaczono stosunek intensywności sygnału pochodzącego od wody luźno związanej do sygnału od wody ściśle związanej A_{L1}/A_{L2} w funkcji uwodnienia próbki DOPC i przedstawiono na Rysunku 57. W całym zakresie badanych poziomów hydratacji wyróżniono dwa procesy wzrostu udziału frakcji wody luźno związanej pochodzącej od próbki liofilizowanych liposomów DOPC.

W zakresie od $\Delta m/m_0 = 0$ do 0,13 badanych poziomów uwodnienia zależność A_{L1}/A_{L2} była liniowa, a w przedziale poziomu uwodnienia od 0,16 do 0,40 zależność A_{L1}/A_{L2} również była liniowa, jednakże z innym nachyleniem. Dla obu tych procesów składowa A_{L1} , pochodząca od wody luźno związanej, wzrasta liniowo wraz z rosnącym poziomem uwodnienia (Rysunek 57), zgodnie z równaniami:

$$\text{I. } \frac{A_{L1}}{A_{L2}} = (2.80 \pm 0.26) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.022 \pm 0.004), \quad (80)$$

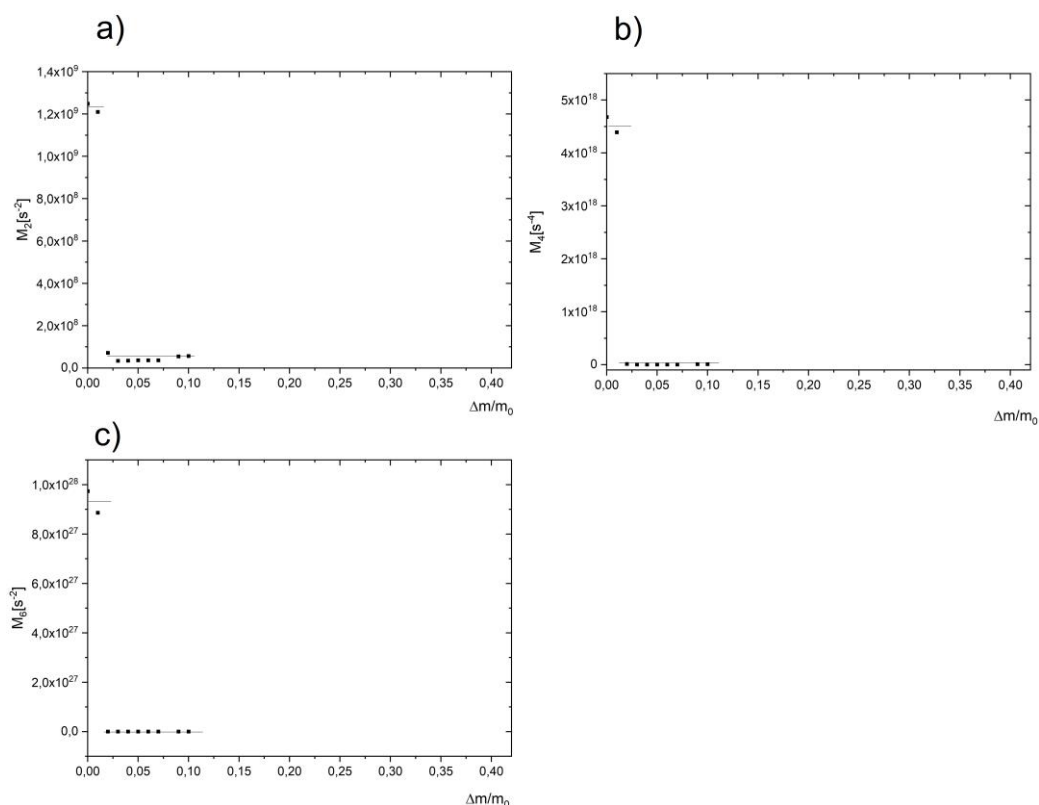
$$\text{II. } \frac{A_{L1}}{A_{L2}} = (3.04 \pm 0.33) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.22 \pm 0.04). \quad (81)$$

Oznacza to, że brak jest rozpuszczania próbki. Dopasowane funkcje liniowe do odpowiednich procesów różnią się nachyleniem, co sugeruje inny poziom tłumienia sygnału od wody ściśle związanej i od wody luźno związanej w układzie lipidowym DOPC.



Rysunek 57. Hydratacyjna zależność składowej cieczonej A_{L1} wyrażonej w jednostkach sygnału A_{L2} dla rehydratowanych liofilizatów DOPC.

Rozwinięto stałą składową sygnału protonowego, G , dla liofilizowanych liposomów DOPC w szereg momentów linii dla uwodnień z zakresu 0 – 0,10. Rysunek 58 przedstawia zależność hydratacji M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych DOPC. Analizując wykresy rozwinięcia w szereg momentów dla składowej sygnału pochodzącej od protonów unieruchomionych liposomów DOPC, można wyróżnić jedną skokową zmianę wartości momentów M_2 , M_4 i M_6 zachodzącą w bardzo niskim uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,02$.

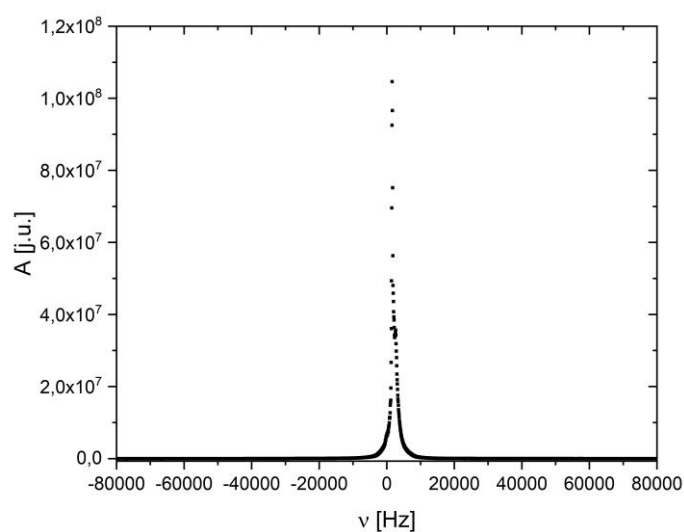


Rysunek 58. Momenty linii dla składowej stałej sygnału w domenie częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony z DOPC w funkcji poziomego uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

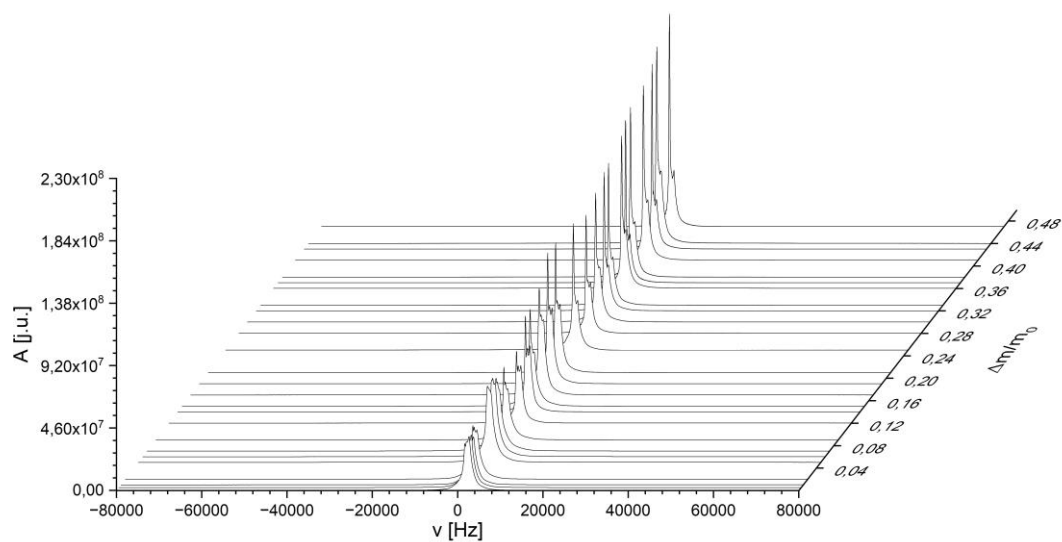
3.3.3. Pomiary widm ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy

Proces długotrwałej inkubacji zmienia wewnętrzną strukturę rehydratowanego liofilizatu DOPC. Rysunek 59 przedstawia wybrane widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla próbki DOPC przewlekłe inkubowanej przez 6 miesięcy.

W widmach ^1H -NMR rehydratowanych liofilizatów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy w temperaturze -20°C w całym wyznaczonym zakresie poziomego uwodnienia wyodrębniono jedną składową sygnału pochodzącą od frakcji o ograniczonej mobilności, opisaną funkcją Gaussa, oraz trzy dobrze rozdzielone składowe pochodzące od frakcji ciekowych, różniące się mobilnością, dopasowane funkcją Lorentza. Na Rysunku 60 zestawiono wszystkie widma ^1H -NMR dla próbki DOPC zebrane dla całego zakresu zmierzonych wartości uwodnień.

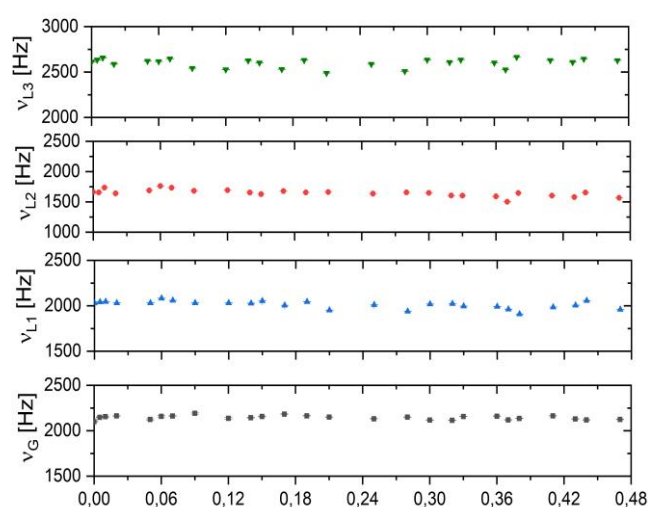


Rysunek 59. Widmo ^1H -NMR zarejestrowane dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC inkubowanych 6 miesięcy o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,33$.



Rysunek 60. Widma ^1H -NMR w funkcji poziomu uwodnienia próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC, inkubowanych przez 6 miesięcy, zarejestrowane w temperaturze pokojowej.

Na Rysunku 61 przedstawiono zależność środka danego pików od wartości uwodnienia dla próbki wielowarstwowych liposomów DOPC liofilizowanych, a następnie inkubowanych przez 6 miesięcy. Na podstawie położenia środka linii, w zależności od stopnia uwodnienia próbki DOPC, wyodrębniono jedną składową od protonów unieruchomionych, G o średniej wartości położenia środka linii równej: $\nu_G = (2145 \pm 4)\text{Hz}$. Wyodrębniono również trzy linie pochodzące od protonów o wysokiej mobilności, od cieczy, frakcje L_1 , L_2 , L_3 . Ich średnie wartości położenia linii wynoszą: $\nu_{L1} = (2600 \pm 2)\text{Hz}$, $\nu_{L2} = (2013 \pm 1)\text{Hz}$, $\nu_{L3} = (1648 \pm 1)\text{Hz}$. Położenia środka linii Gaussa oraz Lorentza nie zmieniają się wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, co świadczy o braku zmian otoczenia magnetycznego próbki.

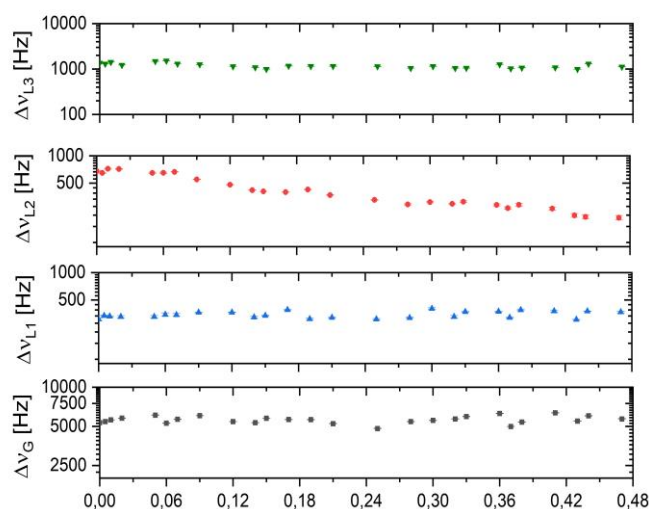


Rysunek 61. Zależność położenia środków pików Gaussa, ν_G , oraz Lorentza, ν_{L1} , ν_{L2} , ν_{L3} , od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów DOPC przewlekale inkubowanych przez 6 miesięcy.

Rysunek 62 przedstawia szerokości połówkowe linii Gaussa i Lorentza dla widm $^1\text{H-NMR}$ dla rehydratowanych liofilizatów DOPC, inkubowanych przez 6 miesięcy, wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia.

Wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia, szerokość połówkowa linii od ciała stałego G jest stała i średnia jej wartość wynosi zaledwie $(5,61 \pm 0,02)\text{kHz}$. Wartość ta jest mniejsza niż w przypadku lipidów bez inkubacji, powodując, iż ruchliwość protonów od stałej matrycy w tym przypadku jest jeszcze mniej ograniczona. Dla całego zakresu uwodnień obserwuje się ponadto trzy wąskie składowe sygnały pochodzące od protonów mobilnych, L_1 , L_2 , L_3 .

Szerokość połówkowa linii L_3 inkubowanego liofilizatu DOPC jest stała wraz ze wzrostem poziomu hydratacji i jej średnia wartość wynosi $(1185 \pm 4)\text{Hz}$. Sugeruje to, że linia L_3 jest wodą ściśle związaną w układzie lipidowym inkubowanego liofilizatu DOPC. Druga wąska linia L_1 także jest stała wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, a średnia wartość szerokości połówkowej wynosi $(344 \pm 6)\text{Hz}$, wskazując, iż jest to mobilna woda luźno związana. Natomiast szerokość połówkowa linii L_2 spada wraz ze wzrostem poziomu hydratacji od wartości $(800 \pm 9)\text{Hz}$ do $(200 \pm 3)\text{Hz}$. To znaczy, że jest mieszaniną sygnału od wody ściśle i od wody luźno związanej w układzie inkubowanym DOPC. Tak rozróżnialne linie zarówno pod względem przesunięć chemicznych, jak i szerokości połówkowych linii przekonują, że dekompozycja sygnału protonowego w domenie częstotliwości dla liofilizowanych pęcherzyków wielowarstwowych DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy została przeprowadzona poprawnie.



Rysunek 62. Zależność szerokości połówkowej składowej stałej, G , oraz trzech składowych mobilnych widma protonowego, L_1 , L_2 i L_3 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DOPC przewlekale inkubowanych przez 6 miesięcy.

Ponadto wyznaczono stosunek sygnału pochodzącego od kolejnych frakcji wody związanej A_{L1} , A_{L2} i A_{L3} do sygnału od protonów unieruchomionych frakcji stałej A_G w funkcji uwodnienia próbki DOPC i przedstawiono na Rysunku 63.

W całym zakresie badanych poziomów hydratacji składowa A_{L3} , pochodząca od wody ściśle związanej w układzie, zmienia się przypadkowo wokół jednej wartości, jednak rozrzut jest

zbyt duży, by móc opisać zachowanie tej frakcji wody. Natomiast dla składowej A_{L1} od protonów mobilnych, opisanej jako woda luźno związana, sygnał wzrasta wraz ze wzrostem poziomu hydratacji w sposób liniowy, zgodnie z równaniem:

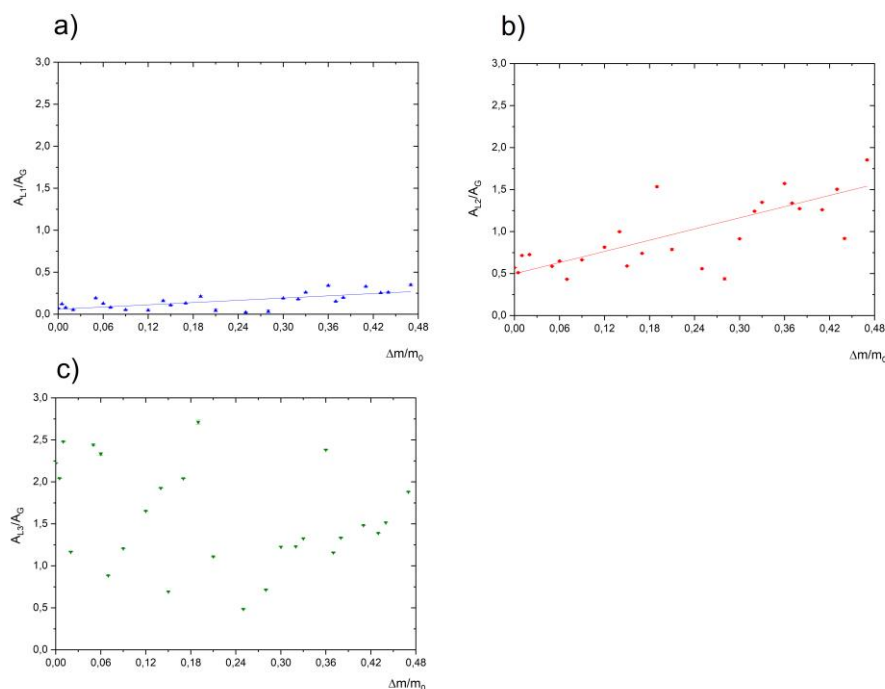
$$\frac{A_{L1}}{A_G} = (0.45 \pm 0.09) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.06 \pm 0.02). \quad (82)$$

Udział ostatniej wyznaczonej w układzie lipidowym frakcji wody, która jest mieszaniną wody ściśle i luźno związanej i opisana jako A_{L2} , znacząco wzrasta wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia badanego lipidu. Zależność tę można opisać funkcją liniową zgodnie z równaniem:

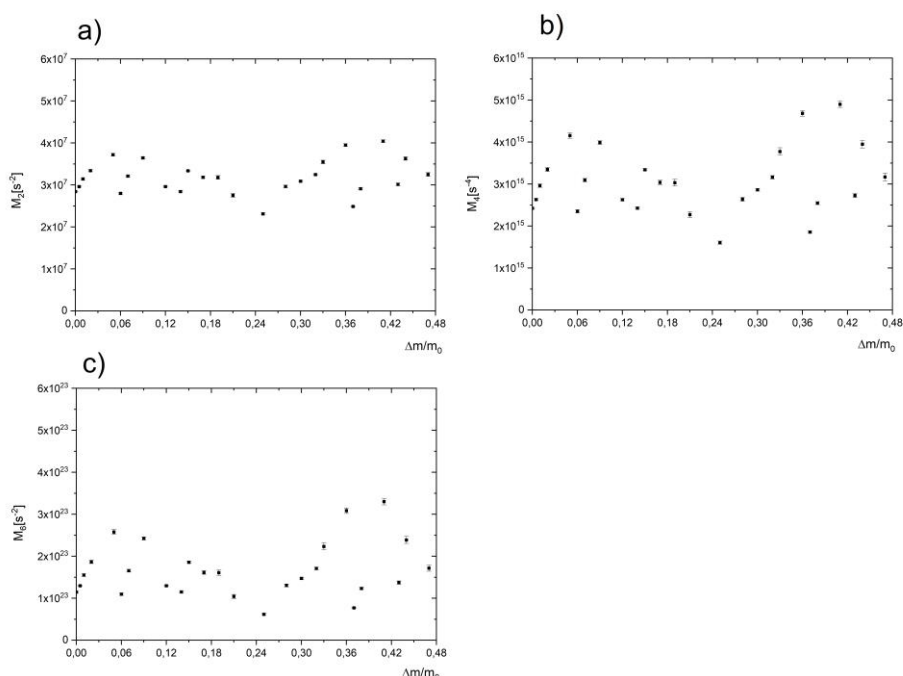
$$\frac{A_{L2}}{A_G} = (2.22 \pm 0.21) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (0.50 \pm 0.05). \quad (83)$$

Analizując powyższe dwa wzory (82) i (83), można stwierdzić, iż składowa sygnału A_{L2} ma największy udział w całym sygnale pochodzącym od cieczy, a porównując wartości nachylenia, sygnał składowej A_{L2} szybciej rośnie wraz z poziomem uwodnienia układu lipidowego DOPC inkubowanego przez 6 miesięcy niż składowa A_{L1} . Oznacza to, że prawdopodobnie w układzie lipidowym DOPC możemy rozróżnić kawerny o zróżnicowanych wielkościach, w których może lokalizować się woda związana.

Dodatkowo rozwinięto stałą składową sygnału protonowego, G , dla liofilizowanych liposomów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy w szereg momentów linii. Rysunek 64 przedstawia zależność hydratacyjną trzech wyznaczonych momentów linii, M_2 , M_4 i M_6 dla liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy. Analizując wykresy momentów linii dla składowej sygnału pochodzącego od protonów unieruchomionych liposomów DOPC, można stwierdzić brak widocznych zmian mobilności ciała stałego w układzie lipidowym DOPC w domenie częstotliwości. Wartości momentów fluktuują wokół jednej wartości, a ich rozrzut jest duży i prawdopodobnie przypadkowy.



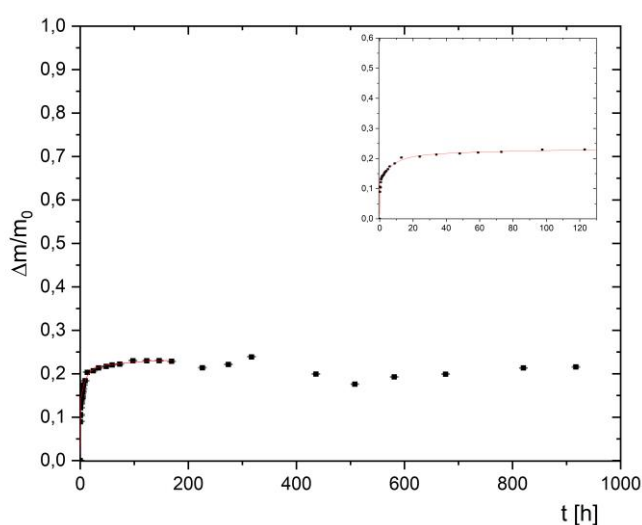
Rysunek 63. Hydratacyjna zależność sygnałów od trzech składowych cieczowych A_{L1} , A_{L2} , A_{L3} , wyrażonych w jednostkach sygnału stałego A_G dla rehydratowanych liofilizatów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy.



Rysunek 64. Drugi, czwarty i szósty moment linii składowej stałej sygnału z domeny częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony modelowej DOPC inkubowanej przez 6 miesięcy w funkcji poziomego uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .

3.4. Kinetyka hydratacji liposomów DPPC, POPC i DOPC

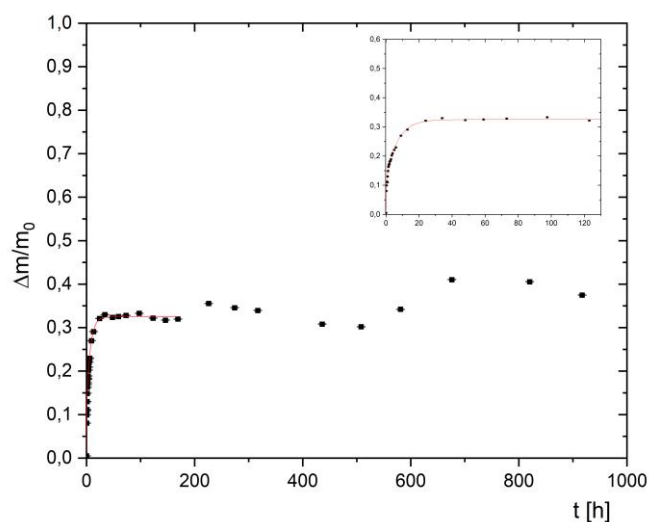
Rysunki 65 – 67 przedstawiają kinetykę hydratacji z fazy gazowej dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DPPC, POPC i DOPC. Wykonana kinetyka hydratacji opisywana jest funkcją trzyeksponencjalną dla próbek DPPC, natomiast dwueksponencjalną dla próbek POPC, DOPC zgodnie z równaniem 2. Wyodrębniono w tych układach frakcje wody: wodę A_0 najściślej związaną do powierzchni (nieusuwaną przez dehydratację nad żelem krzemionkowym), A_1 wodę ściśle związaną, A_2 wodę luźno związaną i wreszcie A_3 wodę swobodną, różniące się czasami hydratacji. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli 3.



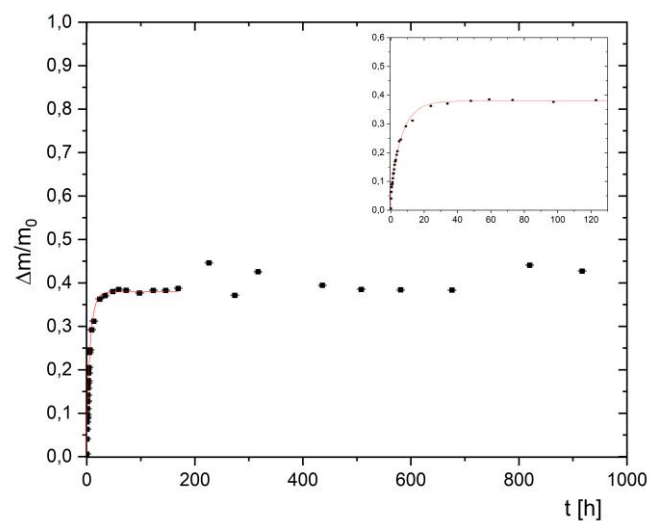
Rysunek 65. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej wielowarstwowych liposomów DPPC prowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100%. Dopasowano funkcję trzyeksponencjalną.

Tabela 3. Wyniki dopasowań superpozycji funkcji eksponencjalnych liofilizowanych próbek liposomów wielowarstwowych podczas hydratacji z fazy gazowej.

Liposom	A_0	A_1	A_2	A_3	t_1 [h]	t_2 [h]	t_3 [h]
DPPC	$0,015 \pm 0,005$	$0,115 \pm 0,007$	$0,075 \pm 0,013$	$0,027 \pm 0,010$	$0,31 \pm 0,02$	$8,3 \pm 0,7$	70 ± 13
POPC	$0,016 \pm 0,007$	$0,098 \pm 0,009$	$0,211 \pm 0,005$	—	$0,30 \pm 0,07$	$6,8 \pm 0,5$	—
DOPC	$0,006 \pm 0,001$	$0,057 \pm 0,006$	$0,316 \pm 0,004$	—	$0,29 \pm 0,06$	$6,9 \pm 0,3$	—



Rysunek 66. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC przeprowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwueksponencjalną.



Rysunek 67. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC przeprowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwueksponencjalną.

Jak wynika z Tabeli 3 dla wszystkich próbek wyznaczono parametr A_0 , który stanowi wartość do 1,6% suchej masy badanych próbek. Parametr ten może świadczyć o zawartości wody, która była mocno związana ze strukturą próbki i nie ulegała dehydratacji w trakcie wstępnego odwadniania nad żelem krzemionkowym. Układem wiążącym największą ilość wody jest DOPC. Wynika to z budowy strukturalnej i fazy, w jakiej się znajduje, będąc w temperaturze pokojowej. Podobnie, niewiele większą wartość czasu hydratacji oraz niewiele mniejszą maksymalną wartość poziomu uwodnienia zaobserwowano dla liofilizatów POPC. Dla próbki DPPC czas hydratacji t_1 jest podobny, jak w przypadku pozostałych lipidów, a czas t_2 jest dłuższy o 1,4 h. Dodatkowo w przypadku próbki DPPC wyznaczono dodatkową składową swobodną A_3 o czasie hydratacji 70 h. W odróżnieniu od badanej próbki DPPC, w przypadku lipidów DOPC i POPC nie udało się dopasować trzeciej funkcji eksponencjalnej (wzór 69). Czasy hydratacji t_1 , t_2 wyznaczone u wszystkich lipidów oraz t_3 u DPPC są bardzo zbliżone do wartości wyznaczonych dla czystego DNA, dla którego czasy hydratacji dwóch frakcji wody ściśle związanej wynosiły $t_1 = (0,27 \pm 0,08)\text{h}$ i $t_2 = (9,8 \pm 3,2)\text{h}$, a czas hydratacji wody luźno związanej $t_3 = (44 \pm 14)\text{h}$ [83].

Na Rysunku 68 pokazano wykonaną kinetykę hydratacji dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy w -20°C . Dla próbki DOPC inkubowanej przez 6 miesięcy i uwadnianej w środowisku o wilgotności względnej 100% zaobserwowano dodatkowy, opóźniony proces hydratacji, rozpoczynający się po około (281 ± 4) godzinach uwadniania, który zinterpretowany został jako pęcznienie. Proces tej hydratacji dla atmosfery o $p/p_0 = 100\%$ opisano funkcją:

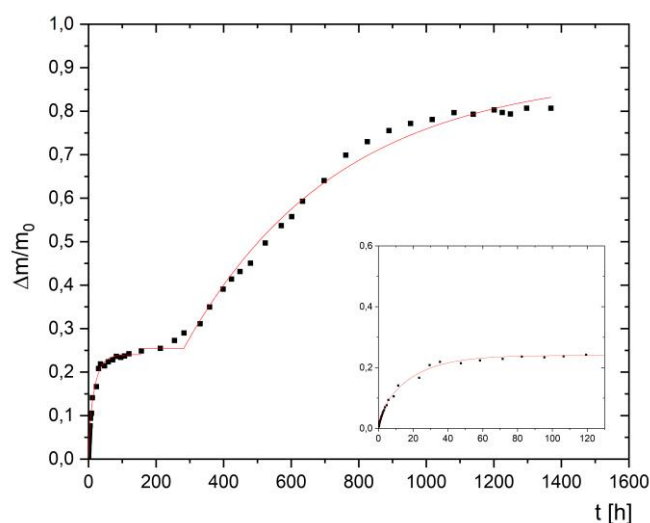
$$\frac{\Delta m}{m_0} = A_0 + A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{t_2}\right) + \begin{cases} 0 & t < t_0 \\ A_3 \exp\left(\frac{-t}{t_3}\right) & t > t_0 \end{cases}, \quad (84)$$

gdzie A_3 jest amplitudą pęcznienia, t_3 czasem pęcznienia, zaś t_0 czasem, po którym rozpoczyna się pęcznienie. Uzyskane parametry z dopasowania przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 4. Wyniki dopasowań dwustopniowej funkcji (84) liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC przewlekle inkubowanych przez 6 miesięcy podczas hydratacji z fazy gazowej.

Liposom	A_0	A_1	A_2	A_3	t_0 [h]	t_1 [h]	t_2 [h]	t_3 [h]
DOPC z inkubacją 6m.	0	$0,046 \pm 0,015$	$0,195 \pm 0,015$	$0,636 \pm 0,022$	281 ± 4	$2,46 \pm 1,02$	$19,4 \pm 2,2$	454 ± 26

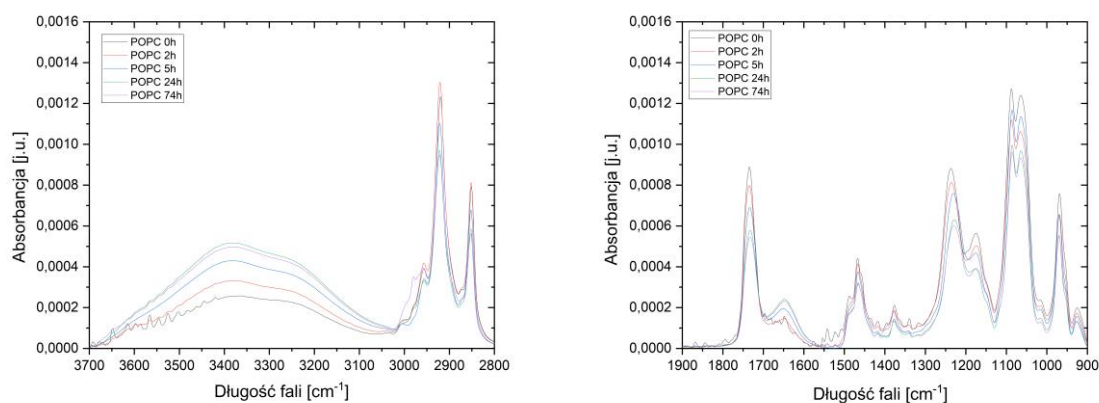
Proces pęcznienia zaczyna się dla DOPC po czasie $t_0 = (281 \pm 4)$ h od rozpoczęcia trasy hydratacyjnej. Dla próbki DOPC inkubowanej przez 6 miesięcy uwadnianej w środowisku o wilgotności 100% także wyznaczono całkowity nasyceniowy poziom uwodnienia bez uwzględnienia procesu pęcznienia, czyli $A_0 + A_1 + A_2$, który wyniósł $(0,241 \pm 0,031)$. Poziom ten jest niższy niż w przypadku wyznaczonego całkowitego poziomu uwodnienia dla DOPC bez inkubacji ($0,379 \pm 0,011$) i POPC ($0,325 \pm 0,021$), natomiast bardzo zbliżony do wartości poziomu uwodnienia próbki dla DPPC ($0,232 \pm 0,035$).



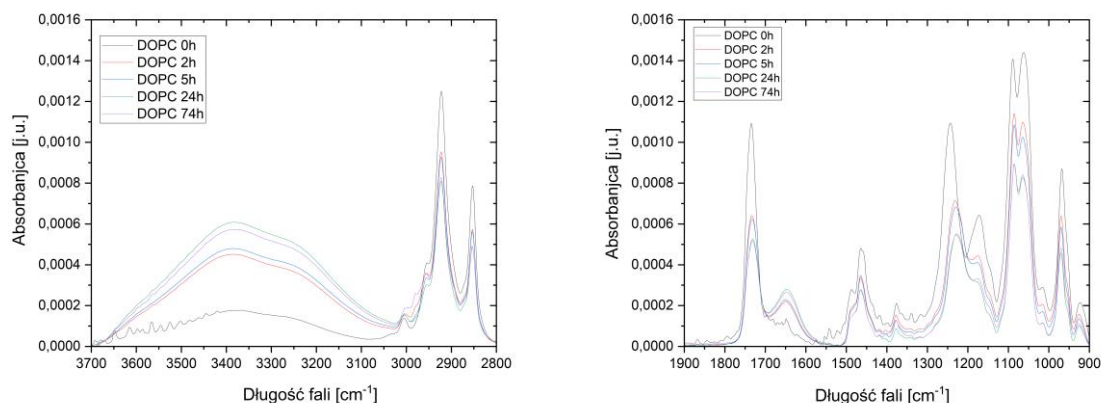
Rysunek 68. Kinetyka hydratacji wielowarstwowych liposomów DOPC przewlekle inkubowanych z fazy gazowej przez 6 miesięcy zarejestrowana dla wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwustopniową (równanie 84).

3.5. FTIR-ATR dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów POPC oraz DOPC

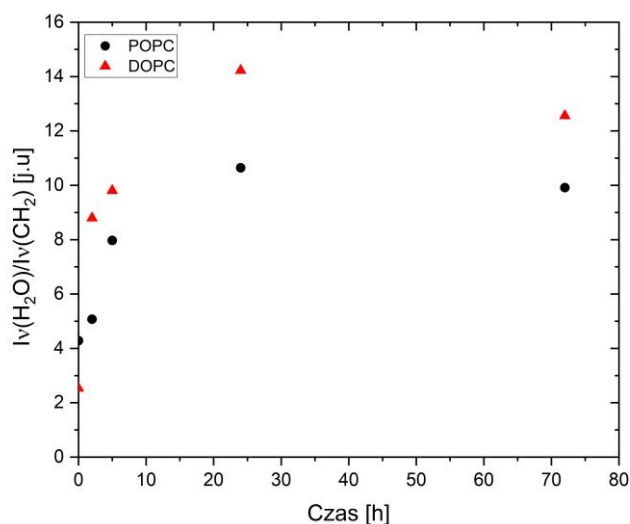
Poniżej przedstawiono zebrane widma FTIR-ATR (Rysunek 69 i 70) dla wielowarstwowych liofilizowanych liposomów POPC oraz DOPC w zależności od poziomu uwodnienia próbek. Na widmach zarówno liposomów POPC, jak i DOPC widać znaczący wzrost intensywności pasma pochodzącego od drgań rozciągających grup O-H w wodzie w miarę wydłużania czasu uwadniania próbki, natomiast odwrotna zależność jest w przypadku intensywności pasma $\nu_{as}(\text{CH}_2)$, która maleje wraz z wydłużaniem czasu hydratacji próbek. Do analizy uwzględniono pasmo od czystej wody w zakresie długości fali od 3580 cm^{-1} do 3080 cm^{-1} oraz pasmo od grupy metylowej $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ w zakresie od 2934 cm^{-1} do 2912 cm^{-1} długości fali. Dla tych zakresów długości fali wyznaczono pole pod krzywą dla wody i dla grupy metylowej, a następnie obliczono parametr $(I_{\nu\text{H}_2\text{O}}/I_{\nu\text{CH}_2})$, który opisuje stopień hydratacji lipidów. Na Rysunku 71 wykreślono zależność $(I_{\nu\text{H}_2\text{O}}/I_{\nu\text{CH}_2})$ od czasu uwadniania próbek liofilizowanych liposomów. Poziom hydratacji próbek wyznaczony metodą FTIR ukazuje charakter eksponencjalny, co zgadza się z pomiarami kinetyki hydratacji przeprowadzanych dla liofilizowanych liposomów POPC i DOPC. Niestety, ze względu na małą ilość punktów nie można zrealizować dopasowania funkcji eksponencjalnej dla wyników otrzymanych metodą ATR-FTIR.



Rysunek 69. Widmo ATR-FTIR zarejestrowane w zależności od czasu uwadniania liofilizowanych liposomów wielowarstwowych POPC.



Rysunek 70. Widmo ATR-FTIR zarejestrowane w zależności od czasu uwadniania liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC.



Rysunek 71. Zależność parametru ($I_{\text{H}_2\text{O}}/I_{\text{CH}_2}$) od czasu uwadniania próbek liofilizowanych liposomów POPC (czarne kółka) i DOPC (czerwone trójkąty).

W kolejnym kroku przedstawiono na Rysunku 72 i 73 otrzymane metodą grawimetryczną poziomy uwodnienia dla odpowiednich próbek w czasie uwadniania w stosunku do parametru ($I_{\text{H}_2\text{O}}/I_{\text{CH}_2}$) wynikającego z pomiarów ATR-FTIR. Ta metoda oznaczania hydratacji została wykorzystana w niniejszej pracy w celu sprawdzenia poprawności wyznaczenia poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0$ metodą grawimetryczną, wykorzystaną do prezentacji wyników NMR. Zarówno dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych POPC, jak i DOPC zależność ($I_{\text{H}_2\text{O}}/I_{\text{CH}_2}$) od $\Delta m/m_0$ można opisać funkcją liniową:

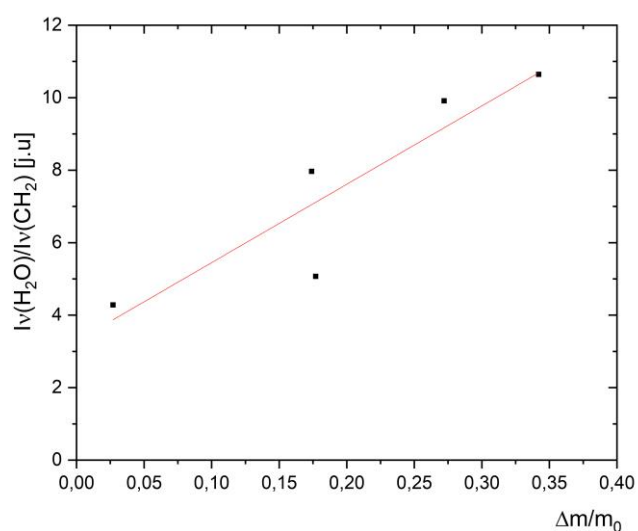
dla POPC:

$$I\nu(H_2O)/I\nu(CH_2) = (21.65 \pm 5.82) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (3.29 \pm 1.31), \quad (85)$$

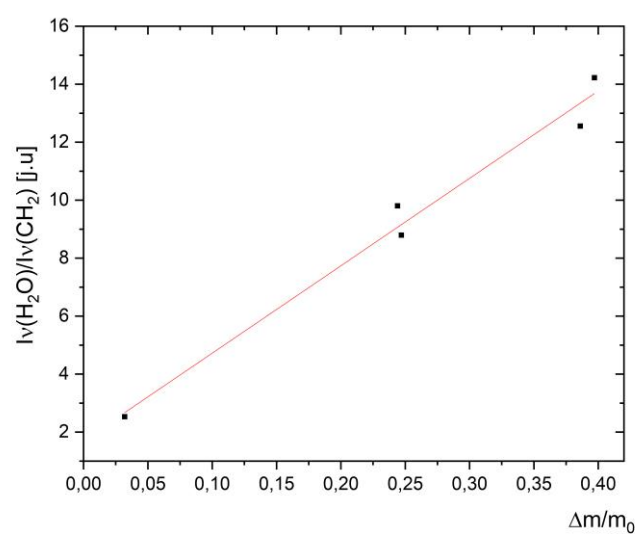
oraz dla DOPC:

$$I\nu(H_2O)/I\nu(CH_2) = (30.16 \pm 2.49) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} + (1.71 \pm 0.73). \quad (86)$$

Podsumowując, dla POPC oraz DOPC wyznaczona wartość hydratacji grawimetrycznie koreluje z wartością wyznaczoną metodą ATR-FTIR.



Rysunek 72. Wartość parametru ($I\nu H_2O/I\nu CH_2$) wyznaczonego z pomiarów FTIR w funkcji $\Delta m/m_0$ wyznaczonego grawimetrycznie dla liofilizowanych liposomów POPC.



Rysunek 73. Wartość parametru ($I_{\nu}\text{H}_2\text{O}/I_{\nu}\text{CH}_2$) wyznaczonego z pomiarów FTIR w funkcji $\Delta m/m_0$ wyznaczonego grawimetrycznie dla liofilizowanych liposomów DOPC.

4. Dyskusja wyników

Dla trzech wybranych układów modelowych błon biologicznych analizowano zachowanie śladowej ilości wody adsorbowanej z pary wodnej. Badania wykonano dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC, POPC i DOPC. Badane lipidy różniły się budową łańcuchów hydrofobowych, jednakże ich głowy hydrofilowe były identyczne. Zbadano również zjawisko przewlekłej inkubacji 6-cio miesięcznej próbki liofilizatu DOPC przechowywanej w temperaturze -20°C . Dodatkowo wyznaczanie suchej masy próbek, m_0 , metodą grawimetryczną skontrolowano metodą ATR-FTIR. Proces rehydratacji z fazy gazowej liofilizowanych wielolamelarnych liposomów DPPC, POPC i DOPC znacznie różni się od siebie. Istotnym czynnikiem może być liotropowa faza ciekłokrystaliczna dla dwóch badanych fosfolipidów POPC i DOPC, podczas gdy DPPC jest w fazie żelu poniżej głównego przejścia fazowego. Kolejną przyczyną różnic w dynamice wody między badanymi układami jest budowa strukturalna badanych cząsteczek. Cząsteczka POPC ma jeden nienasycony łańcuch węglowodorowy, a cząsteczka DOPC posiada dwa łańcuchy nienasycone. Spodziewamy się, że cząsteczki te będą znacznie bardziej mobilne od cząsteczki DPPC. Nie jest jasne, która z liotropowych faz krystalicznych powstaje w kompletnie zdehydratowanych liofilizatach fosfolipidów. Jednakże dla lameli fotosyntetycznych pszenicy uwodnionych z liofilizatów do stosunkowo wysokiego poziomu uwodnienia widma ^{31}P -NMR wykazują charakterystyczny obraz lipidowej fazy lamellarnej L ze znacznym udziałem sygnału izotropowego, pochodzącego z ruchomych sferycznych liposomów/miceli [105, 106, 107].

Ocena kinetyki hydratacji z fazy gazowej pozwoliła wyodrębnić od jednej do trzech frakcji wody o różnym stopniu związania w układzie lipidowym, jednak metodami ^1H -NMR nie dało się ich wszystkich wyróżnić w pomiarach. Powodem jest fakt, że kinetyka hydratacji rozróżnia frakcje wody na podstawie siły ich wiązania do powierzchni, natomiast ^1H -NMR rozdziela podukłady sygnału różniące się dynamiką molekularną (mobilnością) protonów. W zależności od badanych liofilizatów modelowych błon biologicznych, analiza kinetyki procesu hydratacji przeprowadzanej z fazy gazowej, pozwoliła wyróżnić trzy lub cztery frakcje wody związanej: (1) bardzo ściśle związanej, pozostającej w układzie nawet dla wilgotności względnej otoczenia równej 0%, frakcję wody (2) ściśle związanej, frakcję wody (3) luźno związanej, oraz wreszcie (4) frakcję wody swobodnej. Dla próbki DOPC przewlekłe inkubowanej w atmosferze o wilgotności względnej 100%, po około (281 ± 1) godzinach uwadniania zaobserwowano proces pęcznienia, objawiający się rozpoczęciem dodatkowego,

jednego procesu hydratacji (opisanego funkcją jednoeksponencjalną). Wydaje się, że wraz z hydratacją modyfikuje się matryca stała liofilizatu, umożliwiając dalszą penetrację wody w głąb struktury. Proces pęcznienia odkryto wcześniej w innych układach, w kompleksach DNA-surfaktant czy czystym DNA [83].

Analiza pomiarów relaksacyjnych ^1H -NMR w domenie czasu pozwoliła na wyodrębnienie we wszystkich badanych próbkach liofilizowanych wielowarstwowych liposomów dwóch frakcji wody, różniących się efektywnym czasem relaksacji spinowo – spinowej dla protonów. Udało się wyróżnić wodę ściśle związaną i wodę luźno związaną w układzie modelowych błon biologicznych, obecną w całym zakresie badanych poziomów uwodnień, podobnie jak miało to miejsce w przypadku anhydrobiotycznych grzybów zlichenizowanych [108, 109] lub kompleksach DNA – surfaktant [69]. W zależności od badanej próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów efektywny czas relaksacji spinowo – spinowej, T_{2L1}^* , dla składowej relaksacyjnej pochodzącej od wody ściśle związanej wynosił: $(76 \pm 12)\mu\text{s}$ dla DPPC, $(94 \pm 14)\mu\text{s}$ dla POPC i $(125 \pm 18)\mu\text{s}$ dla DOPC. Natomiast T_{2L2}^* dla składowej od wody luźno związanej odpowiednio wynosił: $(1900 \pm 400)\mu\text{s}$ dla DPPC, $(1388 \pm 400)\mu\text{s}$ dla POPC oraz $(1114 \pm 223)\mu\text{s}$ dla DOPC. Takie przypisanie obu frakcji wody jest podobne do obserwowanej w relaksacji protonów dla wody związanej z błonami fotosyntetycznymi [110], plechami porostów [81, 84, 111], czy wody związanej w nieorganicznym układzie modelowym kontrolowanego szkła porowatego [112]. Z tym, że dla próbki DPPC, która znajduje się w fazie żelu, wartość czasu T_{2L2}^* oscyluje w granicach 2 ms. Wartość ta jest bardziej zbliżona do wartości otrzymywanych czasów relaksacji dla polimerów [113, 114]. W badanych liofilizatach wyróżnione stałe czasowe dla sygnału pochodzącego od ciała stałego zależą od badanego rodzaju liposomów. Dla próbki DPPC stała czasowa T_{2G}^* nie zależy od stopnia uwodnienia próbki i wynosi dla uśrednionego sygnału około $(23,8 \pm 0,4)\mu\text{s}$, co jest wartością zbliżoną dla innych biologicznych stałych porowatych matryc, np. plech porostów [81, 84, 111], nasion pszenicy [107] oraz kory i łyka [115]. W porównaniu z próbkami wykonanymi z POPC i DOPC, stała czasowa T_{2G}^* dla protonów unieruchomionych zależy od stopnia uwodnienia próbki i składowa ta jest rejestrowana jedynie dla niskich uwodnień. Własności magnetyczne próbki spowodowały, iż nie udało się dopasować funkcji Gaussa do otrzymanych wyników sygnału zaniku swobodnej precesji FID. W przypadku POPC stała czasowa T_{2G}^* wzrasta wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki od wartości $(25 \pm 04)\mu\text{s}$ do $(68 \pm 04)\mu\text{s}$, sugerując, że matryca stała staje się bardziej mobilna. Dla próbki DOPC wyznaczono dwie składowe, dla trzech

najniższych poziomów uwodnień, pochodzące od frakcji stałej charakteryzujące się średnimi efektywnymi czasami relaksacji poprzecznej o wartościach: $(22 \pm 1)\mu\text{s}$ oraz $(69 \pm 10)\mu\text{s}$. Składowe stałe dla tych próbek zachowują się podobnie, jak w przypadku kompleksów DNA – surfaktant [69] lub polimerów [113, 114].

Zachowanie przesunięć chemicznych oraz położenia pików w funkcji uwodnienia w widmie ^1H -NMR jest odmienne dla każdego z badanych układów. W próbce POPC przesunięcie chemiczne między frakcjami ciekłymi zwiększa się od 500 Hz do 1100 Hz wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. W próbce DOPC przesunięcie chemiczne wynosi 700 Hz i nie zmienia się pod wpływem uwodnienia. Natomiast dla inkubowanej próbki DOPC przesunięcia chemiczne frakcji ciekłych wynoszą 400 Hz, 600 Hz oraz 900 i nie zmieniają się pod wpływem poziomu uwodnienia. Położenie pików frakcji stałej w próbce DPPC i inkubowanej próbce DOPC jest stabilne w przeciwieństwie do próbek POPC i DOPC. W odniesieniu do POPC i DOPC może to wynikać z reorganizacji składników lub zmiany w strukturze zachodzącej w układzie. W dziedzinie częstotliwości frakcja stała G_1 (z malejącą szerokością połówkową linii) dla wielowarstwowych liposomów DPPC staje się bardziej mobilna wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. Następną linią ciągłą, G_2 , zarejestrowana jest tylko dla niskich poziomów hydratacji, a jej szerokość połówkowa $(14,5 \pm 0,1)\text{kHz}$ wskazuje na mniej unieruchomione ciało stałe niż G_1 . Natomiast, zachowanie szerokości połówkowej wyodrębnionej linii Lorentza ($\Delta\nu_L$ malejąca od $(4300 \pm 20)\text{Hz}$ do $(671 \pm 2)\text{Hz}$) sugeruje, że jest to mieszanina sygnału od frakcji wody luźno i od frakcji wody ściśle związanej. W przeciwieństwie do wyników z relaksometrii, gdzie wykryto dwie składowe cieczowe L_1 (woda ściśle związana) i L_2 (woda luźno związana), w widmie ^1H -NMR wykazać można tylko jedną uśrednioną wąską linię pochodzącą od wody związanej w DPPC. Uzyskane wyniki różnią się od wyników otrzymanych już wcześniej dla DPPC [116]. Poza tym wielowarstwowe pęcherzyki DPPC w niniejszej pracy przygotowano w odmienny sposób, a procedura liofilizacji też była inna. Zabiegi te mogą skutkować różnymi formami morfologii powierzchni zewnętrznych, które lepiej zabezpieczają lokalne struktury przed wnikaniami cząsteczek wody osadzających się w parze wodnej. Jednak eksperyment wykonany już przez grupę badaczy [116] przeprowadzono tylko w dziedzinie czasu, gdzie nie rejestruje się różnic w przesunięciach chemicznych, a dokładniejsza analiza frakcji związanej wody nie była możliwa. Widmo dla liofilizowanych liposomów POPC i DOPC jest trudniejsze do analizy i daje bardziej złożony obraz. Dla POPC otrzymano dwie frakcje stałe G_1 i G_2 , które wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia stają się bardziej mobilne, gdyż ich szerokości połówkowe

maleją odpowiednio dla G_1 : od $(43 \pm 0,1)\text{kHz}$ do $(29,07 \pm 0,04)\text{kHz}$, a dla G_2 : $(17,68 \pm 0,01)\text{kHz}$ do $(6,64 \pm 0,01)\text{kHz}$. Dodatkowo jedna z nich, G_1 , jest bardziej unieruchomiona (posiada podobną szerokość połówkową, jak G_1 w DPPC) i rejestrowana jest jedynie dla bardzo niskich poziomów uwodnień, $\Delta m/m_0 > 0,10$. W POPC wyróżniono również w widmie $^1\text{H-NMR}$ dwie frakcje wody. Jedna z nich, L_1 ($\Delta\nu_{L1} = (730 \pm 1)\text{Hz}$), jest wodą luźno związaną w układzie, a druga, L_2 ($\Delta\nu_{L2}$ malejąca od $(2326 \pm 3)\text{Hz}$ do $(1064 \pm 19)\text{Hz}$), to mieszanina wody ściśle i wody luźno związanej. Oznacza to, że wyniki potwierdziły, iż struktura POPC jest w stanie związać więcej wody w układzie niż struktura DPPC. Dla DOPC uzyskano jedną frakcję stałą, G ($\Delta\nu_{L1}$ malejącą od $(35,0 \pm 0,1)\text{kHz}$ do $(5,88 \pm 0,01)\text{kHz}$), przy czym widoczną jedynie dla niskich poziomów uwodnień, $\Delta m/m_0 \geq 0,10$, która bardziej przypomina ciało stałe G_2 , widoczne w całym zakresie uwodnień w POPC (bardziej mobilne, o zmniejszającej się szerokości połówkowej). Dopasowane linie Lorentzowskie, opisują frakcję wody luźno, L_1 ($\Delta\nu_{L1} = (677 \pm 4)\text{Hz}$), i wody ściśle związanej, L_2 ($\Delta\nu_{L1} = (2215 \pm 5)\text{Hz}$). Tak więc cząsteczka DOPC charakteryzuje się w całym zakresie hydratacji jeszcze większą mobilnością niż POPC i DPPC. Inny obraz uzyskano dla próbki DOPC inkubowanej przez sześć miesięcy. Analizując widmo, scharakteryzowano ciało stałe ($\Delta\nu_G = (5,61 \pm 0,02)\text{kHz}$), które jest w całym zakresie zmierzonych uwodnień mniej unieruchomione niż w poprzednich badanych układach. Wyodrębniono także trzy frakcje wody związanej w układzie, które odpowiednio opisano jako wodę ściśle związaną, L_3 ($\Delta\nu_{L3} = (1185 \pm 4)\text{Hz}$), wodę luźno związaną, L_1 ($\Delta\nu_{L1} = (344 \pm 6)\text{Hz}$) i jako mieszaninę wody luźno i ściśle związanej, L_2 ($\Delta\nu_{L2}$ maleje od $(800 \pm 9)\text{Hz}$ do $(200 \pm 3)\text{Hz}$). W pomiarach zarówno relaksometrycznych, jak i w spektroskopii $^1\text{H-MRJ}$, wyznaczone zależności L/G czy A_L/A_G w próbkach liofilizowanych liposomów wielowarstwowych różnią się od siebie, ale wszystkie zależności są opisywane funkcjami liniowymi. Często jest to proces dwustopniowy, sugerujący, że w badanych układach nie obserwujemy rozpuszczania lub przemian fazy z stałej w ciekłą. Jedynie możemy wnioskować, iż sygnał od podukładów cieczowych rośnie liniowo w procesie hydratacji, akumulując wodę dostarczaną z fazy gazowej w czasie procesu hydratacji. W przypadku inkubowanej próbki DOPC analiza hydratacyjna składowych mobilnych wiedzie do wniosków, że w procesie hydratacji udział obu linii cieczowych L_1 i L_2 , rośnie liniowo. Natomiast udział składowej cieczowej L_3 nie wzrasta wraz ze wzrostem uwodnienia próbki, co sugeruje, że jest ona sygnałem od wody szczelnie zapuławkowanej w porach struktury rehydratowanego liofilizatu. Można przypuszczać, iż proces inkubacji próbki DOPC spowodował, że układ się ustabilizował, osiągając równowagę w porównaniu z próbkami mierzonymi przed inkubacją.

Analizując momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego NMR przedstawione zarówno w domenie czasu, jak i częstotliwości dla próbki DPPC oraz w domenie częstotliwości dla próbki POPC, ciało stałe, G , wykazuje dwie skokowe zmiany ruchliwości. Obie zmiany zachodzą przy niskich hydratacjach poniżej 10% uwodnienia próbek. Wynik ten jest zbliżony do wyników otrzymanych dla fotosyntetycznych lameli pszenicy [117]. Wyjątkiem jest próbka DOPC, w której w domenie częstotliwości wykryto jedną zmianę ruchliwości ciała stałego zachodzącą dla poziomu hydratacji 0,02. Brak drugiej skokowej zmiany mobilności ciała stałego dla DOPC może być związane z oddziaływaniem pomiędzy głowicą lipidu a hydrofilowymi łańcuchami węglowodorowymi. Dodatkowo w próbce POPC ciało stałe w dziedzinie czasu wykazuje ciągłą zmianę ruchliwości dla poziomów uwodnień w zakresie od 0 do 0,13, co może być związane z szybkimi procesami uruchamiania ruchów ciała stałego, spowodowanych wzrostem udziału frakcji wody luźno związanej w układzie lipidowym. Dla inkubowanej próbki DOPC nie wykryto żadnych zmian mobilności ciała stałego. Wartości momentów fluktuują wokół jednej wartości, a ich rozrzut jest duży i prawdopodobnie przypadkowy.

Uwzględniając powyższą analizę, można stwierdzić, że w liofilizatach wielolamellarnych liposomów występują kawerny o różnych rozmiarach: mniejsze, w których wszystkie molekuly wody są w niewielkiej odległości od ścianek kawerny, a przez to ich mobilność jest w znacznym stopniu ograniczona, a także kawerny większe, w których mogą się zawierać molekuly wody o ruchliwości ograniczonej w mniejszym stopniu – wody luźno związanej.

5. Wnioski

1. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej liofilizatów modelowych błon biologicznych z DPPC, POPC i DOPC opisana jest superpozycją funkcji eksponencjalnych. Ujawniła obecność trzech lub czterech frakcji wody: 1) związanej bardzo ściśle A_0 , 2) związanej ściśle A_1 (charakteryzującej się krótkim średnim czasem hydratacji $t_1 = (0,30 \pm 0,05)\text{h}$), 3) frakcji wody luźno związanej A_2 (o dłuższym średnim czasie hydratacji $t_2 = (7,33 \pm 0,5)\text{h}$) oraz 4) frakcji wody swobodnej A_3 (o czasie $t_3 = (70 \pm 13)\text{h}$, obecna jedynie w układzie DPPC).
2. Dla rehydratowanych z fazy gazowej liofilizatów wielowarstwowych liposomów z DOPC inkubowanego przez 6 miesięcy w temperaturze -20°C zaobserwowano proces pęcznienia. Pęcznienie zwiększyło sygnał od wody o $(0,636 \pm 0,022)$, w jednostkach suchej masy; rozpoczęło się po $(281 \pm 4)\text{h}$; natomiast czas pęcznienia wyniósł $(454 \pm 26)\text{h}$.
3. Sygnał zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dał się rozdzielić na sygnał od matrycy stałej liofilizatów wielowarstwowych, opisywany funkcją Gaussa oraz sygnałów od frakcji wody różniących się mobilnością: od wody ściśle oraz od wody luźno związanej na powierzchniach kompleksu. Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, L/G , jest dobrze opisywana funkcjami liniowymi, co sugeruje brak frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie.
4. Im bardziej mobilna próbka badanych wielowarstwowych liposomów, tym sygnał zaniku swobodnej precesji pochodzący od ciała stałego zanika wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki, a jego efektywny czas relaksacji spinowo – spinowej, T_{2G}^* , wynosi odpowiednio: a) dla DPPC $T_{2G}^* = (23,8 \pm 0,4)\mu\text{s}$ w całym zakresie badanych poziomów uwodnień, b) dla POPC rośnie od wartości $(25,1 \pm 0,4)\mu\text{s}$ do $(68 \pm 2)\mu\text{s}$, sugerując wzrost mobilności frakcji stałej, zarejestrowane dla uwodnień od 0 do 0,13, c) dla DOPC $T_{2G1}^* = (22 \pm 1)\mu\text{s}$ i $T_{2G2}^* = (69 \pm 10)\mu\text{s}$, tylko wyznaczone dla trzech najniższych poziomów uwodnień.
5. Pomiary hydratacyjne widm ^1H -NMR potwierdziły obecność frakcji wody związanej, a w sygnale od wody związanej można wyróżnić jedną, dwie lub trzy (w przypadku inkubowanego DOPC) przesunięte względem siebie linie Lorentzowskie, pochodzące

od frakcji wody różniących się mobilnością molekularną. Kształt linii pochodzących od matrycy stałej opisany był skutecznie funkcją Gaussa.

6. Dla próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy w temperaturze -20°C pomiary hydratacyjne widm $^1\text{H-NMR}$ dały inny wynik niż dla liofilizatów bez inkubacji. Dla DOPC inkubowanego przez 6 miesięcy wyodrębniono trzy frakcje wody związanej oraz jedną frakcję ciała stałego zarejestrowanego w całym zakresie badanych poziomów uwodnień. Jedną z frakcji wodnych jest wodą szczelnie zapuławpkowaną w porach struktury rehydratowanego liofilizatu ($\Delta\nu_{L3} = (1185 \pm 4)\text{kHz}$). Natomiast ciało stałe nie wykazało zmian ruchliwości w całym zakresie badanych uwodnień ($\Delta\nu_G = (5,61 \pm 0,02)\text{kHz}$).
7. Analiza rozwinięcia linii w szereg momentów dla M_2 , M_4 i M_6 składowych stałych sygnału protonowego wykazała dla próbek DPPC i POPC dwie skokowe zmiany ruchliwości zachodzące dla niskich poziomów uwodnienia poniżej 0,1. Ze względu na różnice w budowie łańcuchów węglowodorowych w DPPC i POPC można wysunąć wniosek, iż wykryte dwie jednakowe skokowe zmiany mobilności ciała stałego w wielowarstwowych liposomach DPPC i POPC zachodzą w polarnej głowicy.
8. Analiza momentów linii M_2 , M_4 i M_6 dla składowej stałej sygnału protonowego dla wielowarstwowych liofilizowanych liposomów DOPC ukazała jedną skokową zmianę ruchliwości zachodzącą dla niskich poziomów uwodnienia poniżej 0,1.
9. Zarówno dla rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC, jak i dla DOPC wykonane pomiary grawimetryczne $\Delta m/m_0$ korelują z poziomem hydratacji lipidów wyznaczonym metodą ATR-FTIR. Sugeruje to, że w sygnale L_1 udział mobilnych grup molekularnych lipidu jest zaniedbywalny.

Tabele wartości dopasowanych parametrów sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR

Tabela 5. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC. Oznaczenia: G amplituda funkcji Gaussa, ΔG niepewność, T_{2G}^* efektywny czas relaksacji spinowo-spinowej dla protonów matrycy stałej liofilizatu, ΔT_{2G}^* niepewność, L_1 i L_2 amplitudy składowych cieczowych, a ΔL_1 , ΔL_2 niepewności, $T_{2L_1}^*$ oraz $T_{2L_2}^*$ to czasy relaksacji spinowo-spinowej dla obu wyodrębnionych frakcji wody związanej, $\Delta T_{2L_1}^*$, $\Delta T_{2L_2}^*$ i ich niepewności.

$\Delta m/m_0$	G	ΔG	T_{2G}^*	ΔT_{2G}^*	L_1	ΔL_1	$T_{2L_1}^*$	$\Delta T_{2L_1}^*$	L_2	ΔL_2	$T_{2L_2}^*$	$\Delta T_{2L_2}^*$
0,02	65,53	1,54	19,72	0,44	5,31	1,73	60,06	13,37	0,27	0,43	608,77	1707,00
0,04	42,60	4,10	19,49	0,32	15,93	6,66	22,66	5,45	0,68	0,27	502,11	347,37
0,05	33,64	1,04	20,57	0,26	11,54	1,32	46,26	5,69	2,35	0,25	681,33	98,77
0,06	61,33	2,76	20,76	0,37	13,99	3,58	45,95	11,89	2,82	0,56	910,24	286,53
0,07	22,54	1,53	24,84	0,65	6,04	1,85	58,50	19,54	2,98	0,33	2183,11	677,47
0,08	21,81	0,91	25,25	0,62	7,92	0,99	85,26	16,06	5,07	0,36	5145,95	2093,25
0,09	21,39	0,81	25,98	0,58	7,29	0,88	89,15	16,16	6,45	0,32	11343,06	6828,51
0,12	43,39	0,96	24,90	0,36	17,60	0,99	95,79	9,58	9,03	0,53	2852,29	528,65
0,16	31,94	0,62	24,68	0,30	12,47	0,64	92,03	8,48	9,28	0,35	2039,96	181,68
0,19	31,51	0,85	25,05	0,41	11,80	0,87	91,14	12,10	11,60	0,49	1780,68	155,74
0,21	32,77	0,71	24,95	0,36	12,63	0,73	100,09	10,56	12,34	0,41	3183,85	370,38
0,25	30,75	0,72	25,39	0,37	11,35	0,73	96,04	11,63	14,06	0,45	1775,58	117,17
0,27	32,45	1,40	26,91	0,73	10,05	1,44	100,76	26,10	15,91	0,82	2564,22	374,13
0,28	34,23	0,80	23,87	0,34	12,05	0,86	82,73	9,37	17,18	0,35	2784,49	182,37
0,29	35,54	0,95	23,89	0,35	11,49	1,04	76,56	10,31	19,13	0,37	2292,97	122,05

Tabela 6. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC. Oznaczenia jak w tabeli wyżej.

$\Delta m/m_0$	G	ΔG	T_{2G}^*	ΔT_{2G}^*	L_1	ΔL_1	T_{2L1}^*	ΔT_{2L1}^*	L_2	ΔL_2	T_{2L2}^*	ΔT_{2L2}^*
0	50,70	1,31	25,10	0,39	5,28	1,35	60,60	8,15	0,28	0,20	635,32	816,71
0,02	18,67	0,88	29,80	0,45	5,79	1,03	63,73	12,64	1,19	0,22	1469,63	217,67
0,04	25,88	2,17	26,28	0,61	15,78	2,67	51,45	8,71	3,84	0,44	907,41	155,10
0,05	37,34	2,30	31,95	0,60	14,24	2,93	59,65	9,59	3,99	0,21	1737,37	120,00
0,06	19,33	2,10	34,26	1,10	16,87	2,42	68,30	11,22	6,76	0,60	1111,03	150,07
0,07	17,00	1,85	37,81	1,29	19,91	2,10	76,49	9,65	9,44	0,60	1208,22	120,35
0,09	26,25	2,50	45,17	1,58	18,55	2,64	105,07	22,56	12,41	1,34	1208,71	183,92
0,1	27,52	2,26	53,97	1,61	17,28	2,27	135,78	30,98	14,97	1,51	1532,94	245,56
0,13	33,79	3,24	68,42	2,49	12,80	4,86	230,91	84,81	15,71	6,91	1553,84	156,35
0,14	-	-	-	-	54,53	1,22	77,65	4,40	21,90	1,42	1132,43	117,33
0,17	-	-	-	-	52,99	1,22	83,37	4,65	23,20	1,40	1267,47	129,92
0,19	-	-	-	-	56,15	1,28	85,00	4,80	25,51	1,47	1488,99	164,87
0,22	-	-	-	-	53,65	1,43	92,39	5,68	26,07	1,62	1614,71	200,36
0,25	-	-	-	-	55,69	1,46	95,73	5,51	28,10	1,64	1528,62	168,46
0,28	-	-	-	-	54,20	1,90	99,55	6,90	30,65	2,13	1191,72	125,19
0,3	-	-	-	-	52,19	2,23	101,65	8,85	32,52	2,49	1433,92	192,25
0,32	-	-	-	-	55,28	1,72	100,28	6,87	31,56	1,91	1965,54	275,95
0,34	-	-	-	-	55,26	1,32	100,68	5,15	35,30	1,47	1717,03	146,92
0,36	-	-	-	-	57,50	1,47	102,58	5,47	36,87	1,63	1660,94	146,01

Tabela 7. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC. Oznaczenia jak w tabeli wyżej.

$\Delta m/m_0$	G_1	ΔG_1	$T_{2G_1}^*$	$\Delta T_{2G_1}^*$	G_2	ΔG_2	$T_{2G_2}^*$	$\Delta T_{2G_2}^*$	L_1	ΔL_1	$T_{2L_1}^*$	$\Delta T_{2L_1}^*$	L_2	ΔL_2	$T_{2L_2}^*$	$\Delta T_{2L_2}^*$
0,00	74,79	3,45	21,29	0,54	14,24	3,02	51,05	7,93	11,73	2,66	149,95	74,48	1,45	3,71	686,60	222,00
0,01	31,20	2,26	22,38	0,63	7,43	4,69	86,27	11,47	16,73	5,03	137,02	75,26	10,00	4,96	523,84	142,98
0,02	58,33	2,76	22,44	0,48	10,60	4,28	69,16	11,17	25,60	5,20	124,27	41,26	10,26	3,81	580,44	141,24
0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	45,44	2,19	143,65	8,83	7,73	2,31	1015,36	346,88
0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	47,10	1,98	133,00	7,45	7,75	2,10	949,79	287,06
0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	40,83	1,09	93,97	4,49	13,30	1,22	792,62	82,37
0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	39,89	0,78	90,18	3,23	14,02	0,88	757,86	53,16
0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	43,48	2,62	133,90	11,31	9,53	2,79	1075,78	390,49
0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	42,43	1,62	111,43	6,97	12,49	1,76	1001,69	178,07
0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	40,49	1,61	116,95	7,50	13,19	1,74	1095,20	192,27
0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	39,67	1,56	103,23	7,40	14,70	1,72	1066,91	170,82
0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	41,27	1,74	108,20	7,89	16,24	1,91	1052,98	164,51
0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	39,29	2,10	119,64	10,13	18,15	2,27	1105,39	183,42
0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	34,80	1,81	127,10	10,82	18,19	1,95	1444,20	253,89
0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	39,58	2,48	143,00	14,21	19,88	2,65	1913,52	518,32
0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	40,44	1,78	135,63	9,24	24,29	1,91	1458,21	185,12
0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	39,48	1,76	137,09	9,75	26,50	1,88	1701,20	223,40
0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	42,69	1,87	142,59	9,81	25,66	2,00	1822,30	275,71

Bibliografia

1. A.G. Lee, „How lipids affect the activities of integral membrane proteins”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2004, 1666, 62-87.
2. P. Ball, „Water as an active constituent in cell biology”, *Chem. Rev.* 2008, 108, 74-108.
3. V. Luzzati, „Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 661-668.
4. R. Rand, V. Parsegian, „Hydration forces between phospholipid bilayers”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1989, 988, 351-376.
5. T. Söderlund, J.-M.I. Alakoskela, A.L. Pakkanen, P.K. Kinnunen, „Comparison of the effects of surface tension and osmotic pressure on the interfacial hydration of a fluid phospholipid bilayer”, *Biophys. J.* 2003, 85, 2333-2341.
6. W. Kilarski, „Strukturalne podstawy biologii komórki”, *Wydawnictwo naukowe PAN*, Warszawa 2005.
7. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, P. R. Walter, „Podstawy biologii komórki”, Wprowadzenie do biologii molekularnej, *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa 1999.
8. J. Lombard, „Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research”, *Biology Direct*, 2014, 9, 32.
9. S. Przestalski, „Błony biologiczne”, *Wiedza Powszechna*, Warszawa 1983.
10. J. Balerstet, L. Betleja, T. Falkowski, B. Jakubik, R. Kościelniak, K. Kulpiński, A. Tyc, M. Zalewska – Szczygieł, *Biologia Vademecum maturalne 2011*, Operon, Gdynia 2010.
11. F. Callegarin i wsp.: „Lipids and biopackaging”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, 74, 1183-1192.
12. M. Bogdanov, P. N. Heacock, W. Dowhan, A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition, *The EMBO Journal*, 2002, 21 ,2107-2116.
13. D.Chapman, J.Urbina, „Biomembrane phase transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry”, *J. biol. Chem.*, 1974, 249, 2512-21.
14. M. J. Hope, P. R. Cullis, „Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes: a ³¹P NMR study”, *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 92, 846-52.
15. S.H. Zeisel, „Choline phospholipids: Signal transduction and carcinogenesis”, *FASEB Journal*, 1993, 7, 551-557.
16. L.Stryer, „Biochemia”, *PWN*, Warszawa 2003.

17. J. P. Slotte, B. Ramstedt, „The functional role of sphingomyelin in cell membranes”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007, 109, 977-981.
18. O. G. Mouritsen, K. Jørgensen, „Dynamical order and disorder in lipid bilayers”, *Chem Phys Lipids*, 1994, 73, 3-25.
19. T. J. Pucadyil, A. Chattopadhyay, „Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors”, *Prog Lipid Res.*, 2006, 45, 295-333.
20. Jaroszyk Feliks, Biofizyka, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
21. M. Eigen, L. de Maeyer, „Self-dissociation and protonic charge transport in water and”, *Proceedings of the Royal Society of London*, 1958.
22. J. Teixeira, M.-C. Bellissent-Funel, S. H. Chen, and A. J. Dianoux, „Experimental determination of the nature of diffusive motions of water molecules at low temperatures”, *Physical Review A*, 1985, 31, 1913.
23. Harańczyk Hubert, *On Water in Extremely Dry Biological Systems*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003.
24. Wendell M. Latimer and Worth H. Rodebush, „Polarity and ionization from the standpoint of the Lewis theory of”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1920, 42, 7, 1419-1433.
25. Michael Edidin, „Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4, 414-8.
26. E. Gorter and J. Grendel, „On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood”, *The Journal of experimental medicine*, 1925, 41, 439-443.
27. J. F. Danielli, H. Davson, „A contribution to the theory of permeability of thin films”, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1935, 5, 495-508.
28. F. S. Sjöstrand, „The structure of mitochondrial membranes: A new concept”, *Journal of Ultrastructure Research*, 1978, 64, 217-245.
29. P. Devaux, H. M. McConnell, „Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 4475-81.
30. S.J. Singer, G.L. Nicolson, „The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes”, *Science*, 1972, 175, 720-731.
31. K. Simons, E. Ikonen, „Functional rafts in cell membranes”, *Nature*, 1997, 387, 569-72.
32. K. Simons, D. Toomre, „Lipid rafts and signal transduction”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1, 31-9.
33. M. F. Hanzal-Bayer, J. F. Hancock, „Lipid rafts and membrane traffic”, *FEBS Letters*, 2007, 581, 2098-2104.

34. X. Cao, M. A. Surma & K. Simons, „Polarized sorting and trafficking in epithelial cells”, *Cell Research*, 2012, 22, 793-805.
35. L. J. Pike, „Lipid rafts: bringing order to chaos”, *Journal of Lipid Research*, 2003, 44, 655-67.
36. C. Gajate, F. Mollinedo, „Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts”, *Blood*, 2006, 109, 711-719.
37. Kai Simons 1, Robert Ehehalt, „Cholesterol, lipid rafts, and disease”, *J. Clin. Invest.*, 2002, 110, 597-603.
38. G. C. Carter, L. Bernstone, D. Sangani, J. Wynter Bee, T. Harder, W. James, „HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts”, *Virology*, 2009, 386, 192-202.
39. A. Kusumi, I. Koyama-Honda, K. Suzuki, „Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts”, *Traffic*, 2004, 5, 213-230.
40. A. Pralle , P. Kellera , E.-L. floren , K. Simonsa , JKH Hörber, „Sphingolipid–Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells”, *Journal of Cell Biology*, 2000, 148, 997-1008.
41. L. J. Pike, „Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function”, *Journal of Lipid Research*, 2006, 47, 1597-1598.
42. B. P. Atshaves, J. R. Jefferson, A. L. McIntosh, A. Gallegos, B. M. McCann, K. K. Landrock, A. B. Kier & Friedhelm Schroeder, „Effect of Sterol Carrier Protein-2 Expression on Sphingolipid Distribution in Plasma Membrane Lipid Rafts/Caveolae”, *Lipids*, 2007, 42, 871-884.
43. R. G. W. Anderson, K. Jacobson, „A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains”, *Science*, 2002, 296, 1821-5.
44. D. A. Brown, E. London, „Functions of lipid rafts in biological membranes”, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1998, 111-36.
45. B. Razani et al. „Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities”, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 8635-47.
46. G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, „Membrane lipids: where they are and how they behave”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9, 112-24.
47. P. F. Devaux, A. Zachowski, „Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, 73, 107-120.

48. K. A. Fisher, „Analysis of membrane halves: cholesterol”, *PNAS*, 1976, 73, 173-177.
49. R. Bittman, S. Rottem, „Distribution of cholesterol between the outer and inner halves of the lipid bilayer of mycoplasma cell membranes”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, 71, 318-324.
50. F. Schroeder et.al., „Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1991, 1066, 183-192.
51. M. Mondal, B. Mesmin, S. Mukherjee, and F. R. Maxfield, „Sterols Are Mainly in the Cytoplasmic Leaflet of the Plasma Membrane and the Endocytic Recycling Compartment in CHO Cells”, *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 20, 571-744.
52. T. L. Steck, J. Ye, Y. Lange, „Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin”, *Biophysical Journal*, 2002, 83, 2118-2125.
53. M. Ikeda, A. Kihara, Y. Igarashi, „Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29, 1542-1546.
54. E. M. Bevers, P. L. Williamson, „Phospholipid scramblase: An update”, *FEBS Letters*, 2010, 584, 2724-2730.
55. A.J. Verkleij & J.A. Post, „Membrane Phospholipid Asymmetry and Signal Transduction”, *The Journal of Membrane Biology*, 2000, 178, 1-10.
56. G. W. Feigenson, „Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure”, *Phase Boundaries and Biological Membranes*, 2007, 36, 63-77.
57. M. Eeman, M. Deleu, „From biological membranes to biomimetic model membranes”, *Scientific Journals*, 2010, 14, 719-736.
58. G. Szabo, G. Eisenman, S. Ciani, „The effects of the macrotetralide actin antibiotics on the electrical properties of phospholipid bilayer membranes”, *The Journal of Membrane Biology*, 1969, 1, 346-382.
59. L. Mustardy, F.X. Cunnigham, E. Grantt, „Photosynthetic membrane topography: quantitative in situ localization of photosystems I and II.”, *PNAS*, 1992, 89, 10021-10025.
60. A.A. Arteni, L.-N. Liu, T.J. Aartsma, Y.-Z. Zhang, B.-C. Zhou, E.J. Boekema, „Structure and organization of phycobilisomes on membranes of the red alga *Porphyridium cruentum*”, *Photosynthesis Research*, 2008, 95, 169 -174.
61. S. Moskalewski, W. Sawicki, „Fizjologia molekularna komórki”, Tom I, *Akademia Medyczna w Warszawie*, Warszawa, 2002.
62. S. Janicki, A. Fiebig, M. Sznitowska, T. Achmatowicz, „Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji”, *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, Warszawa, 2003.

63. R. Jelinek, L. Silbert, „Biomimetic approaches for studying membrane processes”, *Molecular Biosystems*, 2009, 5, 811-818.
64. K. Hac-Wydro, P. Dynarowicz-Łątka, „Biomedical applications of the Langmuir monolayer technique”, *Annales UMCS, Ser. AA (Chemia)*, 2008, 63, 47-60.
65. R. Biltonen, D. Lichtenberg, „The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1993, 64, 129-142.
66. S. L. Duncan, R. G. Larson, „Comparing Experimental and Simulated Pressure-Area Isotherms for DPPC”, *Biophysical Journal*, 2008, 94, 2965-2986.
67. A. Tonks et.al, „Pulmonary surfactant and DPPC inhibit superoxide production in monocytes”, *Blood*, 2001, 98, 227A-227A.
68. Thompson, G.A.J., „In Form and Function of Phospholipids”, *Elsevier: Amsterdam*, The Netherlands, 1973.
69. H. Harańczyk, J. Kobierski, D. Zalitacz, P. Nowak, A. Romanowicz, M. Marzec, J. Nizioł, E. Hebda, and J. Pielichowski, „Rehydration of CTMA modified DNA powders observed by NMR,” *Acta Phys. Pol. A*, 2012, 121, 485-490.
70. K. S. W. Sing, „Reporting physisorption data for gas/solid systems”, *Pure Appl. Chem.*, 1982, 54, 2201-2218.
71. J. W. Hennel, „Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego”, *Wydawnictwo IFJ*, Kraków 1997.
72. J. W. Hennel, J. Klinowski, „Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego”, *Wydawnictwo Naukowe UAM*, Poznań 2000.
73. R. H. Hashemi Bradley, G. William, Lisanti, J. Christopher, „MRI: the basics”, *Ovid Technologies, Inc.*, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
74. K. H. Hausser, H. R. Kalbitzer, „NMR w biologii i medycynie”, *Wydawnictwo Naukowe UAM*, Poznań, 1993.
75. A. Ejchart, A. Gryff-Keller, „NMR w cieczech. Zarys teorii i metodologii”, *Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej*, Warszawa 2004.
76. F. Bloch, „Nuclear Induction”, *Physical Review*, 1946, 70, 460-474.
77. N. Bloembergen, E. M. Purcell, and R. V. Pound, “Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption”, *Phys. Rev.*, 1948, 73, 679.
78. J. W. Hennel, T. Kryst-Widźgowska, „Na czym polega tomografia magnetyczno-rezonansowa”, *Wydawnictwo IFJ*, Kraków, 1995.

79. E. Fukushima, S.B.W. Roeder, „Experimental pulse NMR”, *Addison-Wesley Publishing Company Inc.*, Massachusetts, 1981.
80. Derbyshire, M. Van den Bosh, D. Van Dusschoten, W. MacNaughtan, I. Farhat, M. Hemminga, J. Mitchel, „Fitting of the bit pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solution”, *Journal of Magnetic Resonance*, 2004, 168, 278-283.
81. H. Harańczyk, S. Gaździński, M. Olech, „Freezing protection mechanism in *Cladonia* mitosis observed by proton magnetic relaxation”, *Bibliotheca Lichenologica*, 2000, 75, 265-274.
82. H. Harańczyk, K. Strzałka, G. Jasiński, K. Mosna-Bojarska, „The initial stages of wheat (*Triticum aestivum* L.) seed imbibition as observed by proton nuclear magnetic relaxation”, *Colloids and Surfaces A*, 1996, 115, 47-54,.
83. H. Harańczyk, J. Czak, P. Nowak, J. Nizioł, „Initial Phases of DNA rehydration by NMR and Sorption Isotherm”, *Acta Physica Polonica A*, 2010, 117, 516-520.
84. H. Harańczyk, S. Gaździński, M.A. Olech, „Initial stages of lichen hydration observed by proton magnetic relaxation”, *New Phytologist*, 1998, 138, 192–202.
85. W. Szczepaniak. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, *WN PWN*, Warszawa 2004.
86. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, „Spectrometric Identification of Organic Compounds”, *Wiley*, 2014.
87. B. H. Stuart, “Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications”, *New York: John Wiley and Sons*, 2004.
88. H. Fabian, C.P. Schultz, Fourier transform infrared spectroscopy of peptide and protein analysis [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley & Sons, Inc, 2001.
89. M. R. Derrick, S. Dusan, and M. James, „Landry. Infrared spectroscopy in conservation science”, *Getty Publications*, 2000.
90. J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi, *Chem Phys Lipids*, 1998, 96, 53.
91. E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.-M. Ruyschaert, *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1422, 105.
92. R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1828, 2347, T. Le Bihan, M. Pézolet, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 94, 13.

93. H. Binder, „The Molecular Architecture of Lipid Membranes—New Insights from Hydration-Tuning Infrared Linear Dichroism Spectroscopy”, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2003, 38, 15-69.
94. X. Bin, I. Zawisza, J.D. Goddard, J. Lipkowski, „Electrochemical and PM-IRRAS studies of the effect of the static electric field on the structure of the DMPC bilayer supported at a Au (111) electrode Surface”, *Langmuir*, 2005, 21, 330-347.
95. H. Binder, A. Anikin, G. Lantzsch, G. Klose, „Lyotropic phase behavior and gel state polymorphism of phospholipids with terminal diene groups: infrared measurements on molecular ordering in lamellar and hexagonal phases”, *The journal of physical chemistry B*, 1999, 103, 461-471.
96. D.C. Lee, D. Chapman, „Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes”, *Bioscience Reports*, 1986, 6, 235-256.
97. J. Grdadolnik, D. Hadži, „Conformational effects of metal salt binding to the polar head of phosphatidylcholines investigated by FTIR spectroscopy”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1993, 65, 121-132.
98. J. Grdadolnik, J. Kidrič, D. Hadži, „Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers—an infrared spectroscopic study”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1991, 59, 57-68.
99. A. S. Rosa, J. P. Cejas, E. A. Disalvo, M. A. Frías, „Correlation between the hydration of acyl chains and phosphate groups in lipid bilayers: Effect of phase state, head group, chain length, double bonds and carbonyl groups”, *BBA – Biomembranes*, 2019, 1861, 1197-1203.
100. N. Düzgüneş, G. Gregoriadis, „Introduction: The origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham”, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2005, 391, 1–3.
101. A. Wagner, K. Vorauer-Uhl, „Liposome technology for industrial purposes”, *Journal of drug delivery*, 2011, 1–9.
102. D.F. Gaff, „Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa”, *Oecologia*, 1977, 31, 95-109.
103. J.R. Zimmerman, and W.E. Brittin, „Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems: lifetime of a water molecule in an adsorbing phase on silica gel”, *J. Phys. Chem.*, 1957, 61, 1328-1333.
104. A. Abragam, „The principles of nuclear magnetism”, *Oxford University Press*, London, 1961.

105. S.B. Krumova, C. Dijkema, P. de Waard, H. Van As, G. Garab, and H. van Amerongen, „Phase behavior of phosphatidylglycerol in spinach thylakoid membranes as revealed by ^{31}P -NMR”, *Biochim. et Biophys. Acta*, 2008, 1778, 997-1003.
106. H. Harańczyk, K. Strzałka, T. Bayerl, G. Klose, and J.S. Blicharski, „ ^{31}P -NMR measurements in photosynthetic membranes of wheat”, *Photosynthetica*, 1985, 19, 414-416.
107. H. Harańczyk, K. Strzałka, W. Dietrich, and J.S. Blicharski, „ ^{31}P -NMR observation of the temperature and glycerol induced non-lamellar phase formation in wheat thylakoid membranes”, *J. Biol. Phys.*, 1995, 21, 125-139.
108. H. Harańczyk, P. Nowak, M. Bacior, M. Lisowska, M. Marzec, M. Florek, and M. A. Olech, „Bound water freezing in Antarctic *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis”, *Antarct. Sci.*, 2012, 24, 342-352.
109. H. Harańczyk, M. Bacior, and M. A. Olech, „Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm”, *Antarct. Sci.*, 2008, 20, 527-535.
110. H. Harańczyk, A. Leja, and K. Strzałka, „The effect of water accessible paramagnetic ions on subcellular structures formed in developing wheat photosynthetic membranes as observed by NMR and by sorption isotherm”, *Acta Phys. Polon. A*, 2006, 109, 389-398.
111. H. Harańczyk, A. Pietrzyk, A. Leja, K. Strzałka, „Bound water structure on the surfaces of *Usnea antarctica* as observed by NMR and sorption isotherm”, *Acta Phys. Pol. A*, 2006, 109, 411-416.
112. H. Harańczyk, K.G. Soga, R.J. Rumm, M.M. Pinter, „Can we see, by proton spin relaxation, a percolation transition upon drying controlled pore size glass?”, *Magnetic Resonance Imaging*, 1991, 9, 723-726.
113. K. Kubat, A. Krupa, W. Brniak, A. Węgrzyn, D. Majda, A. Bogdał, H. Harańczyk, „How rotational speed of planetary ball mill and polymer load influence the performance and water vapor sorption in solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus”, *Particuology*, 2023, 73, 37-46.
114. K. Kubat, A. Krupa, W. Brniak, A. Węgrzyn, D. Majda, A. Bogdał, H. Harańczyk, „Data regarding particle size distribution, thermal properties and gaseous phase hydration of co-milled solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus”, *Data in Brief*, 2022, Volume 43.
115. H. Harańczyk, W.P. Węglarz, S. Sojka, *Holzforschung*, „The investigation of hydration processes in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) and pine (*Pinus*

- silvestris L.) bark and bast using proton magnetic relaxation”, *Holzforschung*, 1999, 53, 299–310.
116. H. Harańczyk, A. Leja, P. Nowak, E. Baran, and K. Strzałka, „The effect of mild rehydration on freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) multilamellar membranes as observed by proton NMR and sorption isotherm”, *Acta Phys. Pol. A*, 2016, 129, 179–184.
117. H. Harańczyk, E. Baran, P. Nowak, M. Florek-Wojciechowska, A. Leja, D. Zalicz, K. Strzałka, „Non-cooperative immobilization of residual water bound in lyophilized photosynthetic lamellae”, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2015, 20, 717-735.

Spis ilustracji

Rysunek 1. Schemat budowy komórki prokariotycznej (A), zwierzęcej (B) i roślinnej (C) [10].	16
Rysunek 2. Schemat błony biologicznej [7].	17
Rysunek 3. Schematyczny rysunek typowej cząsteczki lipidu błonowego [7].	19
Rysunek 4. Cząsteczka fosfatydylocholiny. (A) - przedstawienie schematyczne, (B) - wzór strukturalny, (C) - model przestrzenny, (D) – wzór schematyczny [7].	20
Rysunek 5. Wzory strukturalne sfingozyny i sfingomieliny.	21
Rysunek 6. Schemat cząsteczki cholesterolu.	22
Rysunek 7. Schemat błony komórkowej według modelu płynnej mozaiki [6].	24
Rysunek 8. Dwie cząsteczki wody (kolorem czerwonym oznaczono atom tlenu, kolorem szarym – atom wodoru, szara gruba linia obrazuje wiązanie kowalencyjne spolaryzowane w obrębie molekuly, czarna przerywana linia – wiązanie wodorowe między molekułami) (wg Hoy i Bunker 1979).	26
Rysunek 9. Ruchliwość fosfolipidów w obrębie dwuwarstwy lipidowej [7].	31
Rysunek 10. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów i glikolipidów w lipidowej dwuwarstwie błony komórkowej [7].	32
Rysunek 11. Faza ciekłokrystaliczna oraz faza żelu błon biologicznych (wg V. Luzzati).	34
Rysunek 12. Tubule lipidowe fazy heksagonalnej H_{II} (wg V. Luzzati).	34
Rysunek 13. Schematyczny obraz A - liposomów wielowarstwowych, B - liposomów jednowarstwowych.	36
Rysunek 14. Wzór strukturalny cząsteczki DPPC (a), DOPC (b) oraz cząsteczki POPC (c) (źródło: Avantilipids).	37
Rysunek 15. Struktura cząsteczki DPPC (a), DOPC (b) oraz cząsteczki POPC (c) (źródło: Avantilipids).	38
Rysunek 16. Możliwe orientacje dla spinów $I = \frac{1}{2}$ oraz $I = 1$ względem pola magnetycznego B_0 [75].	43
Rysunek 17. Precesja Larmora magnetycznego momentu jądrowego μ [75].	47
Rysunek 18. Precesja jądrowego momentu magnetycznego wokół efektywnego pola magnetycznego w warunkach, gdy prędkość wirowania pola $\vec{B}_1$ jest bliska częstości Larmora [75].	48

Rysunek 19. Wzrost składowej namagnesowania $\overrightarrow{M_z}$ oraz zanik składowej $\overrightarrow{M_{xy}}$ w czasie liczonym od momentu wyłączenia impulsu $\pi/2$. T_1 i T_2 stanowią czasy, po których wartości składowych osiągają zmianę 63% ich wartości maksymalnej [20].	53
Rysunek 20. Schematyczny sygnał zaniku swobodnej precesji FID wraz z widmem NMR pochodzącym z układu składającego się z ciała stałego oraz cieczy [80]......	55
Rysunek 21. Sygnał swobodnej precesji o częstotliwości $\omega_0 = \gamma B_0$ pojawiający się po impulsie. Sygnał ten jest najsilniejszy, gdy impuls jest impulsem $\pi/2$ [78].	56
Rysunek 22. Widma ATR-FTIR liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC zarejestrowanych dla różnych uwodnień (opracowanie własne).	63
Rysunek 23. Cienki suchy film lipidowy oraz jego hydratacja w roztworze wodnym przez intensywne wytrząsanie.....	66
Rysunek 24. Liofilizator Alpha 1-2 LD plus oraz proces liofilizacji liposomów wielolamelarnych.	67
Rysunek 25. Przygotowane próbki do pomiarów $^1\text{H-NMR}$, do pomiarów kinetyki hydratacji oraz do FTIR.	67
Rysunek 26. Spektrometr Bruker Avance III 300 w laboratorium NMR Zakładu Fizyki Medycznej IF UJ.	71
Rysunek 27. Relaksometr impulsowy WNS HB65 firmy Waterloo NMR Spetrometers, Waterloo, Ontario, Kanada w Zakładzie Fizyki Medycznej IF UJ.	73
Rysunek 28. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego WNS HB65.	73
Rysunek 29. Przykładowe dwa sygnały zaniku swobodnej precesji $^1\text{H-NMR}$ wielowarstwowych liposomów DPPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,06$ oraz do 0,26.	78
Rysunek 30. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej, T_2^* , wyznaczone z sygnału zaniku swobodnej precesji $^1\text{H-NMR}$ dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC.....	79
Rysunek 31. Wykres amplitudy składników cieczy FID wyrażone w jednostkach sygnału stałego, G , zarejestrowane dla uwodnionych liofilizatów pęcherzyków wielowarstwowych DPPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, wyrażone w jednostkach suchej masy.	80
Rysunek 32. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny czasu dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej DPPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6	81

Rysunek 33. Widmo $^1\text{H-NMR}$ dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DPPC o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,27$.	82
Rysunek 34. Widma $^1\text{H-NMR}$ w funkcji poziomu uwodnienia próbki DPPC zarejestrowane w temperaturze pokojowej. Wstawka przedstawia powiększone widmo próbki DPPC o poziomie uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,01$ i $\Delta m/m_0 = 0,02$.	83
Rysunek 35. Zależność położenia środka pików ν_{G1} , ν_{G2} , ν_L od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów DPPC, gdzie $\Delta m/m_0$ to względny przyrost masy, a m_0 to sucha masa liofilizatu.	84
Rysunek 36. Zależność szerokości połówkowej dwóch składowych stałych, G_1 i G_2 oraz składowej mobilnej widma $^1\text{H-NMR}$, L , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DPPC, $\Delta m/m_0$.	85
Rysunek 37. Hydratacyjna zależność składowej cieczerwowej A_L wyrażonej w jednostkach sygnału stałego A_L/A_{G1} dla rehydratowanych liofilizatów DPPC.	86
Rysunek 38. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej DPPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .	87
Rysunek 39. Przykładowe dwa sygnały FID wielowarstwowych liposomów POPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,07$ oraz do $0,36$.	88
Rysunek 40. Zależność hydratacyjna czasów T_2^* wyznaczonych z sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC.	89
Rysunek 41. Wykres amplitudy składników cieczy FID wyrażonych w jednostkach sygnału stałego, G , zarejestrowanego dla uwodnionych liofilizatów liposomów wielowarstwowych POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, wyrażonej w jednostkach suchej masy.	90
Rysunek 42. Momenty linii dla składowej stałej sygnału protonowego z domeny czasu dla wielowarstwowych liofilizatów błony syntetycznej POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6 .	91
Rysunek 43. Widmo $^1\text{H-NMR}$ zarejestrowane dla liofilizowanych wielowarstwowych liposomów POPC uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0,26$.	91
Rysunek 44. Widma $^1\text{H-NMR}$ próbki POPC zarejestrowane w funkcji poziomu uwodnienia w temperaturze pokojowej. Wstawka przedstawia powiększone widmo próbki suchej o względnej masie wody związanej $\Delta m/m_0 = 0$.	92
Rysunek 45. Zależność położenia środka pików ν_{G1} , ν_{G2} , ν_{L1} , ν_{L2} od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów POPC.	93

Rysunek 46. Zależność szerokości połówkowej dwóch składowych stałych, G_1 i G_2 oraz dwóch składowych mobilnych widma $^1\text{H-NMR}$, L_1 i L_2 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów POPC.....	94
Rysunek 47. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej A_L wyrażonej w jednostkach sygnału stałego A_L/A_{G1} dla rehydratowanych liofilizatów POPC.....	95
Rysunek 48. Momenty linii NMR dla składowej stałej sygnału G_1 dla wielowarstwowych liofilizatów błony z POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6	96
Rysunek 49. Momenty linii dla składowej stałej sygnału $^1\text{H-NMR}$ G_2 dla wielowarstwowych liofilizatów błony z POPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6	96
Rysunek 50. Przykładowe dwa sygnały FID wielowarstwowych liposomów DOPC uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,04$ oraz do $0,27$	97
Rysunek 51. Zależność hydratacyjna czasów T_2^* wyznaczonych z sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC.	98
Rysunek 52. Wykres stosunku L_2/L_1 składników cieczy FID zarejestrowanych dla uwodnionych liofilizatów pęcherzyków wielowarstwowych DOPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$	99
Rysunek 53. Widmo $^1\text{H-NMR}$ dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,31$	100
Rysunek 54. Widma $^1\text{H-NMR}$ w funkcji poziomu uwodnienia próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC zarejestrowane w temperaturze pokojowej.....	101
Rysunek 55. Zależność położenia środka linii ν_G , ν_{L1} , ν_{L2} od poziomu uwodnienia dla rehydratowanych liofilizatów DOPC.	102
Rysunek 56. Zależność szerokości połówkowej dwóch składowych stałych, G , oraz dwóch składowych mobilnych widma $^1\text{H-NMR}$, L_1 i L_2 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DOPC.	103
Rysunek 57. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej A_{L1} wyrażonej w jednostkach sygnału A_{L2} dla rehydratowanych liofilizatów DOPC.	104
Rysunek 58. Momenty linii dla składowej stałej sygnału w domenie częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony z DOPC w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6	105

Rysunek 59. Widmo $^1\text{H-NMR}$ zarejestrowane dla liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC inkubowanych 6 miesięcy o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,33$	106
Rysunek 60. Widma $^1\text{H-NMR}$ w funkcji poziomu uwodnienia próbki liofilizowanych wielowarstwowych liposomów DOPC, inkubowanych przez 6 miesięcy, zarejestrowane w temperaturze pokojowej.	106
Rysunek 61. Zależność położenia środków pików Gaussa, ν_G , oraz Lorentza, ν_{L1} , ν_{L2} , ν_{L3} , od poziomu uwodnienia rehydratowanych liofilizatów DOPC przewlekale inkubowanych przez 6 miesięcy.	107
Rysunek 62. Zależność szerokości połówkowej składowej stałej, G , oraz trzech składowych mobilnych widma protonowego, L_1 , L_2 i L_3 , od poziomu uwodnienia dla próbki rehydratowanych liofilizatów DOPC przewlekale inkubowanych przez 6 miesięcy.	108
Rysunek 63. Hydratacyjna zależność sygnałów od trzech składowych cieczowych A_{L1} , A_{L2} , A_{L3} , wyrażonych w jednostkach sygnału stałego A_G dla rehydratowanych liofilizatów DOPC inkubowanych przez 6 miesięcy.	110
Rysunek 64. Drugi, czwarty i szósty moment linii składowej stałej sygnału z domeny częstotliwości dla wielowarstwowych liofilizatów błony modelowej DOPC inkubowanej przez 6 miesięcy w funkcji poziomu uwodnienia, $\Delta m/m_0$, a) – M_2 ; b) – M_4 ; c) – M_6	110
Rysunek 65. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej wielowarstwowych liposomów DPPC prowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100%. Dopasowano funkcję tryeksponecjlną.	111
Rysunek 66. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC przeprowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwueksponecjlną.....	112
Rysunek 67. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC przeprowadzona w atmosferze o wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwueksponecjlną.	112
Rysunek 68. Kinetyka hydratacji wielowarstwowych liposomów DOPC przewlekale inkubowanych z fazy gazowej przez 6 miesięcy zarejestrowana dla wilgotności względnej 100% z dopasowaną funkcją dwustopniową (równanie 84).	114
Rysunek 69. Widmo ATR-FTIR zarejestrowane w zależności od czasu uwadniania liofilizowanych liposomów wielowarstwowych POPC.	115
Rysunek 70. Widmo ATR-FTIR zarejestrowane w zależności od czasu uwadniania liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC.	116

Rysunek 71. Zależność parametru ($I_{\text{vH}_2\text{O}}/I_{\text{vCH}_2}$) od czasu uwadniania próbek liofilizowanych liposomów POPC (czarne kółka) i DOPC (czerwone trójkąty).....	116
Rysunek 72. Wartość parametru ($I_{\text{vH}_2\text{O}}/I_{\text{vCH}_2}$) wyznaczonego z pomiarów FTIR w funkcji $\Delta m/m_0$ wyznaczonego grawimetrycznie dla liofilizowanych liposomów POPC.....	117
Rysunek 73. Wartość parametru ($I_{\text{vH}_2\text{O}}/I_{\text{vCH}_2}$) wyznaczonego z pomiarów FTIR w funkcji $\Delta m/m_0$ wyznaczonego grawimetrycznie dla liofilizowanych liposomów DOPC.....	118

Spis tabel

Tabela 1. Parametry pracy urządzenia Burker Avance III 300.	70
Tabela 2. Parametry pracy urządzenia WNS HB65.	71
Tabela 3. Wyniki dopasowań superpozycji funkcji eksponencjalnych liofilizowanych próbek liposomów wielowarstwowych podczas hydratacji z fazy gazowej.	111
Tabela 4. Wyniki dopasowań dwustopniowej funkcji (84) liofilizowanych liposomów wielowarstwowych DOPC przewlekłe inkubowanych przez 6 miesięcy podczas hydratacji z fazy gazowej.	114
Tabela 5. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DPPC. Oznaczenia: G amplituda funkcji Gaussa, ΔG niepewność, T_{2G}^* efektywny czas relaksacji spinowo-spinowej dla protonów matrycy stałej liofilizatu, ΔT_{2G}^* niepewność, L_1 i L_2 amplitudy składowych cieczowych, a ΔL_1 , ΔL_2 niepewności, $T_{2L_1}^*$ oraz $T_{2L_2}^*$ to czasy relaksacji spinowo-spinowej dla obu wyodrębnionych frakcji wody związanej, $\Delta T_{2L_1}^*$, $\Delta T_{2L_2}^*$ i ich niepewności.	126
Tabela 6. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów POPC. Oznaczenia jak w tabeli wyżej.	127
Tabela 7. Parametry dopasowań sygnału FID dla protonów rehydratowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów DOPC. Oznaczenia jak w tabeli wyżej.	128

Dorobek naukowy Autora

Spis publikacji

1. Piotr Nowak, Anna Krupa, Karol Kubat, Agnieszka Węgrzyn, Hubert Harańczyk, Agata Ciulkowska, Renata Jachowicz, Water vapour sorption in tadalafil-Soluplus co-milled amorphous solid dispersions, *Powder Technology*, 2019, Volume 346, 373-384. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.010>, [IF = 5,13 (2020)], (140 pkt. MNiSW). cyt. = 12.
2. Karol Kubat, Anna Krupa, Witold Brniak, Agnieszka Węgrzyn, Dorota Majda, Agata Bogdał, Hubert Harańczyk, How rotational speed of planetary ball mill and polymer load influence the performance and water vapor sorption in solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus, *Particuology*, February 2023, Volume 73, 37-46, <https://doi.org/10.1016/j.partic.2022.04.003>, [IF = 3,02 (2020)], (100 pkt. MEiN). cyt. = 0.
3. Karol Kubat, Anna Krupa, Witold Brniak, Agnieszka Węgrzyn, Dorota Majda, Agata Bogdał, Hubert Harańczyk, Data regarding particle size distribution, thermal properties and gaseous phase hydration of co-milled solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus, *Data in Brief*, August 2022, Volume 43, 10.1016/j.dib.2022.108451, (40 pkt. MEiN). cyt. = 0.
4. A. Bogdał, K. Kubat, M. Jemioła-Rzemińska, K. Strzałka, H. Harańczyk, Comparison of residual bound water pool classification in DPPC, and in POPC rehydrated phospholipid lyophilizates, *prepared for Chem. Phys. Lipids*.

Lista prezentacji konferencyjnych

1. **Agata Ciulkowska**, Karol Kubat, Hubert Harańczyk, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, *Gaseous phase hydration of DOPC and POPC multilayer vesicles*, 12th International Conference on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substances, 4-7 Czerwca 2018 Lublin, Polska (**Poster**).
2. **Agata Ciulkowska**, Karol Kubat, Hubert Harańczyk, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, *¹H-NMR identification of trapped water fractions in multilamellar DOPC and in POPC liposomes*, The AMPERE NMR School, 10-16 Czerwca 2018 Zakopane, Polska (**Poster**).

3. **Agata Bogdał**, Hubert Harańczyk, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, *Badanie i klasyfikacja śladowej wody związanej w rehydratowanych liofilizatach wielolamellarnych modelowych błon biologicznych DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)*, 45. Zjazd Fizyków Polskich, Kraków, Polska, 13-18 Września 2019, Kraków, Polska **(Poster)**.
4. Karol Kubat, Hubert Harańczyk, Paulina Kijak, Angelica Casanova-Katny, Maria Olech, **Agata Bogdał**, Kazimierz Strzałka, *Własności hydratacyjne Heterodermia leucomelos i Ramalina tigrina z Pustyni Atacama*, 45. Zjazd Fizyków Polskich, 13 – 18 Września 2019 Kraków, Polska **(Poster)**.
5. **Agata Bogdał**, Karol Kubat, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, Hubert Harańczyk, *The classification of residual bound water fractions in rehydrated phospholipid lyophilizates*, 18th International School-Conference MAGNETIC RESONANCE 8 AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 w Petersburgu, Rosja – Online **(Poster)**.
6. Karol Kubat, Anna Krupa, **Agata Bogdał**, Hubert Harańczyk, *Hydration properties of tadalafil preparations in the matrix of the Soluplus polymer*, 18th International School Conference MAGNETIC RESONANCE AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 w Petersburgu, Rosja - Online **(Poster)**.