

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko COKAN

**TEMPERATURNNA ODVISNOST DELOVANJA ALKILPIRIDINIJEVIH  
POLIMEROV NA RAZLIČNE MEMBRANSKE SISTEME**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF TEMPERATURE ON ACTIVITY OF ALKYLPIRIDINUM  
POLYMERS ON VARIOUS MEMBRANE SYSTEMS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Meritve diferenčne dinamične kalorimetrije sem izvajal v fizikalno-kemijskem laboratoriju Katedre za kemijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka, za somentorico prof. dr. Natašo Poklar Ulrih in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom Turk  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Cokan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 577.1/.3.086: 576.33 (043)=863  
KG eritrociti/ biološke membrane/ modelne membrane/ alkilpiridinijevi polimeri/ poli-APS/ kationski detergenti/ diferenčna dinamična kalorimetrija/ DSC/ kalcein/ kritična micelarna koncentracija/ CMC  
AV COKAN, Marko  
SA TURK, Tom (mentor)/ POKLAR ULRIH, Nataša (somentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2006  
IN TEMPERATURNA ODVISNOST DELOVANJA ALKILPIRIDINIJEVIH POLIMEROV NA RAZLIČNE MEMBRANSKE SISTEME  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIV, 48 str., 2 pregl., 24 sl., 39 vir.  
JI sl/an  
IJ sl  
AI Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so biološko aktivne spojine iz morske spužve *Reniera sarai*. Spužvi naj bi zagotavljale kemično obrambo, saj so zmožne ustvariti pore in lezije v bioloških membranah. Z merjenjem hemolize, sproščanjem kalceina ter diferenčno dinamično kalorimetrijo smo hoteli pokazati kako temperatura, naboj ter vrsta fosfolipida vpliva na delovanje poli-APS. Zanimalo nas je tudi kako poli-APS v različnih razmerah vplivajo na različne naravne in umetno narejene membranske sisteme. Dokazali smo, da naboj lipidnega dvosloja nima velikega vpliva na permeabilizacijo, ima pa velik vpliv na vezavo poli-APS na lipidni dvosloj. Vrsta fosfolipida ima večji vpliv na permeabilizacijo kot naboj. Prav tako smo opazili, da temperatura nima tako velikega vpliva na poli-APS, kot smo predvidevali, ima pa velik vpliv na spremembo fizikalnega stanja tako celične membrane eritrocitov kot tudi lipidnega dvosloja v liposomih (sestavljenih iz DPPC, POPC, DPPS ter DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1) lipidov), ki pri nižjih temperaturah postanejo bolj občutljivi na delovanje poli-APS. V manjših koncentracijah poli-APS povzročajo nastanek reverzibilnih por in povzročijo večjo prepustnost celične membrane, kar je zelo zanimivo za vnos makromolekul (npr. zdravil) v celice. Prav tako so poli-APS zanimivi kot potencialna sredstva za prenos genskega materiala v celico (transfekcija DNA).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 577.1/.3.086: 576.33 (043)=863  
CX erythrocytes/ biological membranes/ model membranes/ alkylpyridinium polymers/  
poly-APS/ cationic detergents/ differential scanning calorimetry/ DSC/ calcein/ critical  
micelar concentration/ CMC  
AU COKAN, Marko  
AA TURK, Tom (supervisor)/ POKLAR ULRIH, Nataša (co-advisor)/SEPČIĆ, Kristina  
(reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology  
PY 2006  
TI EFFECT OF TEMPERATURE ON ACTIVITY OF ALKYLPIRIDINUM  
POLYMERS ON VARIOUS MEMBRANE SYSTEMS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIV, 48 p., 2 tab., 24 fig., 39 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Polymeric 3-alkylpyridinium salts (poly-APS) are bioactive compounds isolated from  
the marine sponge *Reniera sarai*. These molecules probably protect the sponge from  
being fouled by other organisms. Poly-APS are capable of creating pores and lesions in  
biological membranes. By applying hemolysis, calcein release and differential  
dynamic calorimetry measurements, we wanted to demonstrate the influence of  
temperature, charge and type of phospholipids on poly-APS activity. We also wanted  
to check how poly-APS in different conditions effect various natural and artificial  
membrane systems. We concluded that the charge of the lipid bilayer doesn't have a  
major effect on permeabilisation, although it has a considerably affects the binding of  
poly-APS to the lipid bilayer. The phospholipid types have a considerably greater  
effect on permeabilisation than the charge. We also noticed that the temperature does  
not influence the poly-APS as much as we anticipated. On the other hand, it greatly  
affects the physical state of both erythrocyte cell membrane, and lipid bilayer in  
liposomes (made from DPPC, POPC, DPPS and DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC  
(1/1) lipids), which both become more sensitive to poly-APS activity at low  
temperatures. At low concentrations, poly-APS induce the formation of reversible  
pores and increase the permeability of the cell membrane, which can have beneficial  
effects when transferring macromolecules (medical substances and gene material) into  
cells in the process called transfection.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	IV
Key words documentation	V
Kazalo vsebine	VI
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XII
<b>1 UVOD</b>	1
<b>1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA</b>	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	2
2.1 LIPIDI IN LIPIDNI VEZIKLI	2
2.2 POLIMERNE ALKILPIRIDINIJEVE SOLI (POLI-APS)	4
<b>2.2.1 Fizikalno-kemijske lastnosti poli-APS</b>	4
<b>2.2.2 Biološki učinki poli-APS</b>	5
<b>2.2.3 Delovanje poli-APS na lipidne membrane</b>	6
2.3 DELOVANJE DETERGENTOV NA LIPIDNI DVOSLOJ	7
2.4 ERITROCITI IN HEMOLIZA	8
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	11
3.1 MATERIALI	11
<b>3.1.1 Kemikalije</b>	11
3.1.2 Rastopine	11
<b>3.1.3 Laboratorijska oprema</b>	12

3.2	<b>METODE</b>	12
3.2.1	<b>Določanje kritične micelarne koncentracije (CMC)</b>	12
3.2.2	<b>Priprava suspenzije govejih eritrocitov</b>	13
3.2.3	<b>Vpliv temperature na hemolizo, povzročeno s poli-APS</b>	13
3.2.4	<b>Priprava lipidnih veziklov</b>	14
3.2.5	<b>Vpliv temperature na s poli-APS povzročeno sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov</b>	15
3.2.6	<b>Diferenčna dinamična kalorimetrija</b>	15
4	<b>REZULTATI</b>	17
4.1	<b>DOLOČANJE KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE (CMC)</b>	17
4.2	<b>VPLIV TEMPERATURE NA HEMOLIZO, POVZROČENO S POLI-APS</b>	18
4.2.1	<b>Segrevanje suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS</b>	18
4.2.2	<b>Ohlajanje suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS</b>	20
4.2.3	<b>Vpliv različnih časov inkubacije suspenzije eritrocitov in poli-APS</b>	21
4.3	<b>VPLIV TEMPERATURE MA S POLI-APS POVZROČENO SPROŠČANJE KALCEINA IZ LIPIDNIH VEZIKLOV</b>	24
4.3.1	<b>Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov(SUV) narejenih iz POPC in DPPC</b>	24
4.3.2	<b>Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) narejenih iz DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1)</b>	26
4.4	<b>DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA</b>	28

<b>4.4.1</b>	<b>Fazni prehodi lipidnih veziklov (SUV) DPPC in DPSS v odvisnosti od poli-APS</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Fazni prehodi mešanic lipidnih veziklov (SUV) DPPC/POPC (1/1) in DPSS/POPC (1/1) v odvisnosti od poli-APS</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA in SKLEPI</b>	<b>34</b>
5.1	RAZPRAVA	34
5.2	SKLEPI	39
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>42</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Temperature faznih prehodov lipidov in lipidnih mešanic ter molske mase (Crowe in sod., 1999; Higashino in sod., 2001).	4
Preglednica 2. Termodinamske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov DPPC, DPPS in mešanic lipidnih veziklov DPPC/POPC, DPPS/POPC v odvisnosti od različnih koncentracij poli-APS.	33



## KAZALO SLIK

Slika 1.	Lipidni agregati odvisno od vrste lipidov in interakcij med njimi (Nelson D.L., Cox M.M., 2000).	2
Slika 2.	Polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS) (Sepčič in sod., 1997a).	5
Slika 3.	Kritična micelarna koncentracija poli-APS v odvisnosti od koncentracije poli-APS.	17
Slika 4.	Spreminjanje kritične micelarne koncentracije v odvisnosti od temperature.	18
Slika 5.	Hitrost hemolize suspenzije govejih eritrocitov, ki smo jih segrevali od 5 °C do 40 °C, pri različnih koncentracijah poli-APS.	19
Slika 6.	Odvisnost polovičnega časa hemolize - $1/t_{50}$ od koncentracije poli-APS pri različnih temperaturah.	19
Slika 7.	Hitrost hemolize suspenzije govejih eritrocitov, ki smo jih ohlajali od 40 °C do 5 °C.	20
Slika 8.	Odvisnost polovičnega časa hemolize - $1/t_{50}$ od koncentracije poli-APS pri različnih temperaturah.	21
Slika 9.	Različni časi inkubacije suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS na določeni temperaturi.	21

Slika 10.	Hemoliza govejih eritrocitov.	22
Slika 11.	Hemoliza segrevane in ohlajane suspenzije govejih eritrocitov.	23
Slika 12.	Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih temperaturah.	24
Slika 13.	Časovni potek sproščanja kalceina iz DPPC veziklov pri različnih temperaturah.	25
Slika 14.	Časovni potek sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov DPPC POPC = 1:1 pri različnih temperaturah.	26
Slika 15.	Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov DPPS/POPC v molskem razmerju 1:1 pri različnih temperaturah.	27
Slika 16.	Odstotek sproščanja kalceina v odvisnosti od temperature.	28
Slika 17.	DSC termogrami raztopine DPPC brez in z dodanim poli-APS.	29
Slika 18. in 19.	DSC termogrami raztopine DPPC brez in z dodanim poli-APS po prvem in drugem merjenju.	30
Slika 20.	DSC termogrami veziklov DPPS in raztopine DPPS/poli-APS v molskem razmerju 1600:1.	30
Slika 21. in 22.	DSC termogrami raztopine DPPS brez in z dodanim poli-APS po prvem in drugem merjenju.	31

- Slika 23. DSC termogrami lipidnih veziklov iz DPPC/POPC (1/1) lipidov v prisotnosti različnih koncentracij poli-APS. 32
- Slika 24. DSC termogrami lipidnih veziklov DPPS/POPC (1/1) v prisotnosti poli-APS v masnem razmerju 1: 0,01 ter 1:0,5. 32

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CMC	kritična micelarna koncentracija
CPC	cetilpiridinijev klorid
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
DPPC	dipalmitoil-fosfatidilholin
DPPS	dipalmitoil-fosfatidilserin
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
HE	hemolitska enota
lizo-PC	lizofosfatidilholin
MLV	veliki večslojni liposomi (multilamellar large vesicles)
PA	fosfatidna kislina
PC	fosfatidilholin
PE	fosfatidiletanolamin
PI	fosfatidilinozitol
PIP	fosfatidilinozitol–monofosfat
Poli-APS	polimerne alkipiridinijeve soli
POPC	palmitoil-oleoil-fosfatidilholin
PS	fosfatidilserin
$T_m$	temperatura faznega prehoda
SDS	natrijev dodecil sulfat

SM	sfingomielin
SUV	majhni enoslojni liposomi (small unilamellar vesicles)

## 1. UVOD

Alkilpiridinijeve polimere (poli-APS) so izolirali iz morske spužve *Reniera sarai* (Sepčić in sod., 1997a). Ti polimeri so podobni kationskim detergentom, ki kažejo vrsto bioloških učinkov, med drugimi tudi sposobnost indukcije por v bioloških membranah (Malovrh in sod., 1999). Nedavno so dokazali, da poli-APS omogočajo stabilno transfekcijo sesalskih celic s tujerodno DNA (Tucker in sod., 2003). Transfekcija je presenetljivo bolj učinkovita pri nižjih temperaturah (McLaggan in sod., 2006). Spremembe temperature lahko povzročijo spremembo fizikalnega stanja poli-APS (monomeri ali miceli) in/ali fizikalnega stanja membrane.

### 1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

Cilj naloge je pokazati, kako temperature v območju med 5 in 40 °C vplivajo na spremembe fizikalnih lastnosti tako poli-APS kot tudi naravnih in umetnih lipidnih membran, ter kako se to posledično odraža na membransko aktivnost poli-APS. Nižanje temperature povzroča zniževanje kritične micelarne koncentracije (CMC) večine površinsko aktivnih snovi, kakor tudi povečanje rigidnosti naravnih in umetnih lipidnih membran. Ker so poli-APS podobni kationskim detergentom, predvidevamo, da bo sprememba njihovih fizikalnih lastnosti s temperaturo (posamezni polimeri ali njihovi supramolekularni agregati) vplivala na nastanek por v naravnih in umetnih lipidnih membranah.

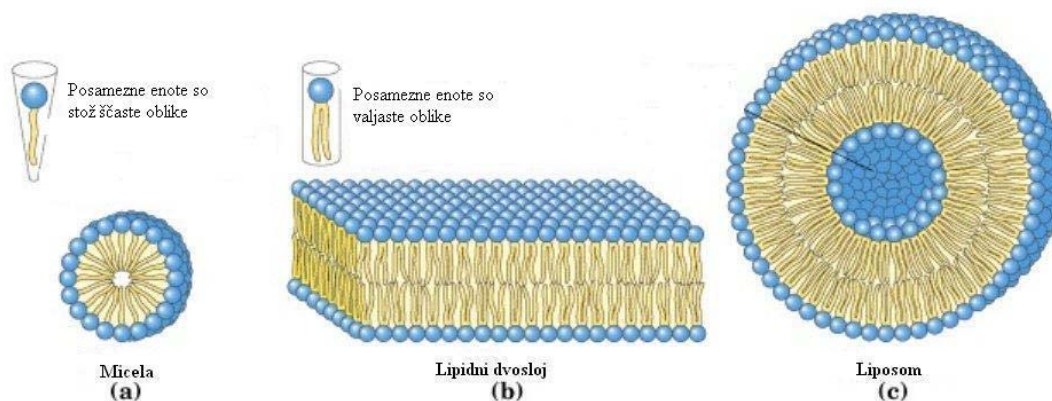
Druga hipoteza je, da temperatura vpliva na spremembo fizikalnih lastnosti membrane, ki pri nižjih temperaturah postane bolj občutljiva na delovanje poli-APS. Nadalje predvidevamo, da ima naboj naravnih in umetno narejenih membran večji vpliv na vezavo in permeabilizacijske sposobnosti poli-APS kot vrsta fosfolipida.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 LIPIDI IN LIPIDNI VEZIKLI

Lipidi so v vodi netopne molekule. V stiku z vodo tvorijo mikroskopsko majhne lipidne agregate. Lipidne agregate definiramo kot sferične delce z eno ali več lipidnimi membranami. Lipidi imajo polarne (hidrofilne) glave in nepolarne (hidrofobne) repe. Pri nastanku micel so hidrofobni repi v kontaktu med seboj, vodi so izpostavljene samo hidrofilne glave. S tem se zmanjša hidrofobna površina dostopna vodi in posledično se poveča entropija okolice (Cevec in sod., 1987).

Oblike in lastnosti lipidnih agregatov so odvisne od vrste lipidov in interakcij med njimi. Poznamo tri vrste lipidnih agregatov. Miceli so sferične strukture, ki vsebujejo od nekaj deset do nekaj tisoč molekul lipidov. Posamezen lipid v micelu ima obliko stožca (slika 1a)



Slika 1: Lipidni agregati odvisno od vrste lipidov in interakcij med njimi (Nelson D.L., Cox M.M., 2000).

Drugi tip lipidnih agregatov je dvosloj (slika 1b), kjer dva lipidna monosloja oblikujeta dvodimenzionalno lamelo. Lipidi v lipidnih lamelah imajo valjasto obliko. Hidrofobne regije na koncih dvosloja so v stalnem stiku z vodno raztopino in so zato tudi nestabilne. Zato se uredijo v tretjo obliko lipidnih agregatov, ki jim pravimo liposomi (Slika 1c). Ko se dvosloj zapre se najprej tvorijo veliki večslojni slabo definirani liposomi (MLV – multilamelar large vesicles). Te lahko nato soniciramo, da nastanejo majhni enoslojni liposomi ali vezikli (SUV – small unilamelar vesicles). Enoslojni liposomi so za nas najbolj zanimivi, ker smo jih uporabljali tako pri testu vpliva temperature na sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov s poli-APS, kot tudi pri meritvah diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC).

Lipidni dvosloj je stabilen, čeprav se lahko posamezne enote prosto premikajo znotraj lipidne strukture. Od temperature in lipidne sestave je odvisno v kakšnem stanju se pojavlja dvosloj. Lipidi se urejajo v različne faze z naraščajočo urejenostjo: tekočo kristalinično ali tekočo neurejeno fazo (liquid disordered), tekočo urejeno (liquid ordered) in gel fazo (solid). Temperaturi pri kateri lipidi preidejo iz gel faze v tekočo neurejeno pravimo temperatura faznega prehoda ( $T_m$ ). Pod temperaturo  $T_m$  je difuzija lipidnih molekul počasna (London, 2002).

Lipidi, ki smo jih uporabljali v naših poskusih so: dipalmitoil-fosfatidilholin (DPPC), palmitoil-oleoil-fosfatidilholin (POPC), dipalmitoil-fosfatidilserin (DPPS) ter lipidne mešanice DPPC/POPC in DPPS/POPC. Obe lipidni mešanici sta bili v molskem razmerju 1:1. V preglednici 1 so prikazani fazni prehodi omenjenih lipidov, kot jih navajajo Crowe in sod., 1999 ter Higashino in sod., 2001. POPC je sestavljen iz dveh različnih maščobnokislinskih verig. Ena je nasičena (16:0), druga nenasičena (18:1). DPPC in DPPS imata dve nasičeni (16:0) maščobnokislinski verigi (Crowe in sod., 1999).



Preglednica 1. Temperature faznih prehodov lipidov in lipidnih mešanic ter molske mase (Crowe in sod., 1999; Higashino in sod., 2001)

Lipidi in lipidne mešanice	M (g/mol)	T <sub>m</sub> (°C)
DPPC	734,1	41
POPC	760,1	-3
DPPS	758,0	53
DPPC/POPC (1/1)	747,1	28
DPPS/POPC (1/1)	759,0	45

Poli-APS so mešanica dveh polimerov z molekulskima masama 5,520 in 18,900 kDa.

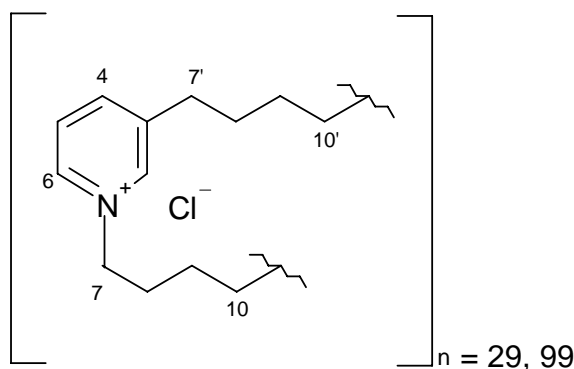
Predpostavili smo, da se polimera pojavljata v molarnem razmerju 1:1, in da je povprečna molska masa poli-APS 12,2 kDa. Iz tega smo lahko na podlagi masnega razmerja (w/w) izračunali molska razmerja (mol/mol) med lipidi in poli-APS.

## 2.2 POLIMERNE ALKILPIRIDINIJEVE SOLI (POLI-APS)

### 2.2.1 Fizikalno-kemijske lastnosti poli-APS

Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS, Slika 2) so izolirali iz morske spužve *Reniera sarai* (Sepčič in sod., 1997a). Te spojine verjetno zagotavljajo spužvi kemično obrambo, saj so zmožne ustvariti pore in lezije v bioloških membranah (Scott in sod., 2004). Poli-APS so mešanica dveh polimerov z molekulskima masama 5,520 in 18,900 kDa, sestavljenih iz 29 ali 99 3-oktilpiridinijevih enot (Sepčič in sod., 1997a). Enote so med seboj povezane s kovalentno vezjo (vez nastane med dušikom enega piridina in C<sub>3</sub> ogljikom drugega). Poli-APS imajo značilen absorpcijski maksimum pri 266 nm, kar potrjuje da vsebujejo piridinijeve obročje. Maksimalna topnost poli-APS v vodi je okoli 10 mg/mL. Vodna raztopina poli-APS je brezbarvna, viskozna in se zelo peni. Pri 4 °C se viskoznost poveča; v raztopini se pojavi oborina v obliki tankih belih vlaken. V manj polarnih topilih (etanol, metanol) so poli-APS zelo slabo topni. Pri koncentracijah večjih od 230 µg/mL spojine poli-APS agregirajo v nekovalentno povezane supramolekularne komplekse (Sepčič in sod., 1997a). Pri koncentracijah nižjih od 230 µg/mL je raztopina poli-APS polidisperzna in vsebuje delce velikosti 15 - 80 nm, kakor tudi večje število manjših delcev. Povprečni hidrodinamski radij

poli-APS v vodni raztopini pri supramicernih koncentracijah je  $23 \pm 2$  nm in je neodvisen od koncentracije poli-APS ali od ionske jakosti raztopine. Zaradi agregacije je polimere nemogoče ločiti med seboj s klasičnimi separacijskimi tehnikami.



Slika 2. Polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS) (Sepčič in sod., 1997a).

### 2.2.2 Biološki učinki poli-APS

3-alkilpiridinijevi oligomeri in polimeri (poli-APS) iz morske spužve *Reniera sarai* imajo veliko bioloških aktivnosti. Kažejo citotoksično (Sepčič in sod., 1997b; Scott in sod., 2004), hemolitično (Malovrh in sod., 1999) in antibakterijsko delovanje proti morskim bakterijam (Chelossi in sod., 2006). Nadalje inhibirajo razne holinesteraze kot so humana, rekombinantna insektna in ribja acetilholinesteraza ter butirilholinesteraza iz konjskega seruma, ne inhibirajo pa drugih serinskih hidrolaz kot sta tripsin in alkalna fosfataza (Sepčič in sod., 1997a). Visoka stopnja polimerizacije poli-APS se odraža v nenavadni večfazni inhibiciji encima acetilholinesteraze. Časovni potek inhibicije je zelo kompleksen. Začetni kratkotrajni reverzibilni inhibiciji sledi ireverzibilna inhibicija, ki je posledica obarjanja kompleksov encim-inhibitor (Sepčič in sod., 1998; Sepčič in sod., 1999). Citotoksično in citolitično aktivnost poli-APS, ki so jo opisali Sepčič in sodelavci leta 1997a, lahko deloma pripišemo njihovi podobnosti detergentom. Podobne lastnosti kot jih ima poli-APS so opazili tudi pri kationskih detergentih, ki vsebujejo piridin, kot sta cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) in cetilpiridinijev klorid (CPC) (De la Mazza in Parra, 1995). Hemolitična in citotoksična

aktivnost poli-APS nastopi pri koncentracijah 0.1 – 0.4  $\mu\text{g/mL}$  (Sepčić in sod., 1997b; Malovrh in sod., 1999).

### 2.2.3 Delovanje poli-APS na lipidne membrane

Scott in sodelavci so leta 2004 dokazali, da se ob dodatku poli-APS v eritrocitih poveča koncentracija intracelularnega  $\text{Ca}^{2+}$ , kar pa ne moremo pripisati povišani aktivnosti ionskih kanalčkov. Poli-APS deluje citolitično tako da inducira nastanek por v celični membrani. Te imajo premer okoli 5,8 nm in so večje kot jih naredijo običajni kationski detergenti pri koncentracijah, ki so veliko pod kritično micelarno koncentracijo (Malovrh in sod., 1999). Za primer: Triton X-100 in natrijev dodecil sulfat (SDS) naredita pore velikosti 4 nm (Senkovich in Chernitsky, 1998). Tvorba por v membranah z alkilpiridinijevimi polimeri je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Pri visokih koncentracijah (50  $\mu\text{g/mL}$ ) povzročijo poli-APS ireverzibilni kolaps v membranskem potencialu in nastanek nepopravljivih lezij. Pri nizkih koncentracijah (0,05 – 5  $\mu\text{g/mL}$ ) pa je opazen nastanek reverzibilnih por. Scott in sodelavci so leta 2004 napravili poskuse z dvema vrstama alkilpiridinijevih polimerov iz dveh različnih vrst morskih spužev. Prvi uporabljeni polimer - halitoksin iz spužve *Callyspongia ridleyi* sestavlja več kot 20 različnih alkilpiridinijevih polimerov s povprečno molekulsko maso 5kDa. Drugi polimer je bil poli-APS (zmes 5,5 kDa in 18,9 kDa) iz morske spužve *Reniera sarai*, ki smo ga uporabili tudi v naših poskusih. Spojine poli-APS pri nizkih koncentracijah interagirajo z membrano in povzročijo reverzibilne odzive celice kot sta reverzibilni tok  $\text{Ca}^{2+}$  in reverzibilnost membranskega potenciala. Taki učinki niso značilni za detergente. Halitoksini z molekulsko maso 5 kDa, podobno kot monomerni detergenti, kot sta CPC in CTAB, na celice nimajo reverzibilnih vplivov. Poli-APS se verjetno vežejo na negativno nabite dele membran, kjer se njihova konformacija spremeni. To, da se vežejo na kationska vezavna mesta so dokazali tako Malovrh in sod., 1999, kot tudi Scott in sod., 2004 z inhibicijo hemolize z vezavo dvovalentnih kationov na površino membrane. Dvovalentni kationi, predvsem  $\text{Zn}^{2+}$ , se vežejo na negativno nabite glave lipidov na površini membrane in s tem zasedejo vezavna mesta za poli-APS.

Naslednja faza v nastanku reverzibilne pore je, da se izpostavljene hidrofobne regije spojin poli-APS vrinejo v membrano. Tu oblikujejo strukturo, ki razmika membrano. Nastale pore so reverzibilne zaradi nestabilnosti velikih spojin poli-APS v celični membrani in hidrofobnega kolapsa le-teh. Druga, bolj verjetna razlaga nestabilnosti pore, bi bila preurejanje membranskih lipidov okoli poli-APS (McClelland in sod., 2003). Točen mehanizem vezave poli-APS in nastanek reverzibilnih por v membrani še nista znana.

### 2.3 DELOVANJE DETERGENTOV NA LIPIDNI DVOSLOJ

Hemolitična aktivnost detergentov je odvisna od njihove kritične micelarne koncentracije (CMC), dolžine alkilnih verig in narave njihove ionske glave. Novejše raziskave nakazujejo, da so fosfolipidi z detergentskimi lastnostmi kot sta lizoPC in PA primerni za transport zdravil v celice (Hoyrup in sod., 2001; Davidsen in sod., 2002). Vključitev majhnega števila lizofosfatidilholina (lizoPC) in fosfatidilne kisline (PA) v biološke membrane (pod CMC koncentracijo) naj bi pripomoglo k nastanku lokalnih heteroložnih regij, ki so transmembransko bolj permeabilne kot običajno. Tako naj bi se povečala permeabilnost biološke membrane tudi za zdravila. Membrana se nato pri fiziološki temperaturi hitro povrne v prvotno stanje. Detergenti delujejo na tak način le ko je membrana v gel stanju, ne pa takrat, ko je membrana v tekočem neurejenem ali tekočem urejenem stanju. Takrat se membranski lipidi hitro preuredijo. Weltzien je že leta 1979 dokazal, da se permeabilnost lipidnih membran za detergente močno poveča pri nižjih temperaturah, ko so lipidi v gel stanju. To si lahko razlagamo z omejeno lateralno difuzijo lipidov, saj je v gel stanju za dva razreda manjša kot v membranah v tekočem neurejenem ali tekočem urejenem stanju.

Najpočasnejši korak v procesu interakcije detergentov z lipidnim dvoslojem je razpad detergenta na posamezne enote. Sama vezava in vrivanje enot v zunanjo plast lipidnega dvosloja je zelo hitra (Weltzein, 1979). Zelo počasni so tudi lateralni prenosi detergenta iz zunanjega v notranji sloj lipidne membrane. Visoka koncentracija detergenta v membrani povzroči micelizacijo enot detergenta in membranskih lipidov. Detergenti se lahko vežejo tudi

v bližino membranskih proteinov. Majhno število molekul detergenta obda protein in vpliva na strukturo proteina kot tudi na njegovo premestitev. Nabiranje večjega števila molekul detergenta okoli proteina privede do izrivanja proteina in nastajanja por ali celo lezij v celični membrani. Pri detergentih pore nastanejo le pri izjemno nizkih koncentracijah (pod CMC). Pri višjih koncentracijah (nad CMC) pa iz membrane preprosto iztrgajo posamezne lipide in tako membrano destabilizirajo. Tako povzročijo celotno ali delno topljenje lipidnega dvosloja (Shalel in sod., 2002).

## 2.4 ERITROCITI IN HEMOLIZA

Membrana rdečih krvnih celic ali eritrocitov je sestavljena iz 19,5 % (w/w) vode, 39,6 % proteinov, 35,1 % lipidov in 5,8 % ogljikovih hidratov. Taka sestava je značilna za večino sesalskih eritrocitov, vendar pa so razmerja med posameznimi lipidi v membranah sesalskih eritrocitov lahko zelo različna (Yawata in sod., 2003).

V naši raziskavi smo se osredotočili predvsem na lipide. Vsebnost vseh lipidov v membrani enega eritrocita je  $5,0 \times 10^{-10}$  mg. Prevladujejo fosfolipidi s 60 %, sledijo nevtralni lipidi s 30 %, med katerimi je v večini prosti holesterol. Molarno razmerje med holesterolom in fosfolipidi je 0,90. V človeških eritrocitih so najpogosteje zastopani fosfatidilholin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), sfingomielin (SM) in fosfatidilserin (PS). Manj zastopani so naslednji lipidi: fosfatidilinozitol (PI), fosfatidna kislina (PA), lizofosfatidilholin (lizo-PC), fosfatidilinozitol–monofosfat (PIP). Večina glavnih fosfolipidov, ki sestavljajo membrano so po naboju nevtralni, razen PS, PA in PI, ki so v fizioloških razmerah negativno nabiti. Razen sfingomielina in lizo-PC imajo vsi dve zaestreni maščobnokislinski verigi, ki sta pritrjeni na ogrodje iz glicerola. Stanje nasičenosti, nenasičenosti in dolžina maščobnih verig vplivajo na fluidnost celične membrane. Na fluidnost membrane pa vplivajo tudi količina holesterola ter molarno razmerje med holesterolom in fosfolipidi. Zanimivo je, da ovčji eritrociti v membrani nimajo fosfatidilholina. Podganji eritrociti pa vsebujejo več fosfatidilholina kot človeški eritrociti (Van Deenen in de Gier, 1974). Relativni nivo fosfatidiletanolamina in

fosfatidilserina je podoben tako pri ovcah kot pri podganah. Zakaj prihaja do razlik v lipidni sestavi membrane pri različnih sesalcih in kako to vpliva na delovanje membrane še ni znano. V človeških eritrocitih od maščobnih kislin prevladujejo tiste s 16:0 tipom maščobnokislinske verige, prisotne so tudi 18:0, 18:1, 18:2 in 20:4 (Yawata in sod., 2003). Lipidi v membrani eritrocitov niso simetrično razporejeni. Večina PS ( $96 \pm 4\%$ ) in PE ( $80 \pm 5\%$ ) je v notranjem sloju lipidnega dvosloja, medtem ko je v zunanem sloju kar 70% PC in 90% SM (Van Deenen in de Gier, 1974). Lipidna nesimetrija je široko razširjena v vseh evkariontskih membranah in ima pomembno vlogo pri interakciji celice z zunanjim okoljem. Porušenje lipidne nesimetrije pripelje do okvar eritrocitov in končno do njihove apoptoze.

Razpad membrane eritrocitov in posledično sproščanje hemoglobina ter ostalih komponent eritrocitov v okolje je dobro preučen pojav, ki mu pravimo hemoliza. Poznamo koloidno-osmotsko in hipoosmotsko hemolizo. Mehanizem koloidno-osmotske hemolize je leta 1941 opisal Wilbrandt. Razlaga temelji na koloidno-osmotskih pritiskih v celici. V nepoškodovanih celicah celična membrana preprečuje hemolizo. Kadar pa je membrana zaradi delovanja raznih citolitičnih snovi poškodovana, postane permeabilna za majhne ione in neelektrolite. Znotrajcelične in zunajcelične koncentracije le teh se izenačijo, s tem naraste osmotski tlak v celici. Pride do vdiranja vode in nabrekajo eritrocitov. Končna faza je citoliza. Volumen, do katerega lahko celice nabrekajo preden lizirajo je odvisen od narave in vrste citolizina. Na koloidno-osmotsko hemolizo vplivajo razni dejavniki kot so: sladkorji, pH, temperatura ter mono in dvovalentni kationi. Skozi pore, ki jih naredijo lizini hemoglobin ne prehaja, ker je prevelik.

Hipoosmotska hemoliza nastopi v primeru, ko so eritrociti v hipotoničnem mediju (voda). Voda vdira vanje in eritrociti nabreknejo. Sprva eritrociti nabrekajo, pri čemer se njihova površina le rahlo poveča. Povečanje volumna se kompenzira s spreminjanjem oblike eritrocitov. Prihaja do preurejanja citoskeletnih komponent. Pri kritičnem volumnu poteče hemoliza. Pri tem nastanejo osmotsko povzročene pore. Skozi te lahko prehaja tudi

hemoglobin. Ker so te pore posledica mehanske narave, se po končanem delovanju sile na membrane pore zaprejo.

Pri naših raziskavah nas je zanimalo kakšen je vpliv temperature na hemolizo. Z višanjem temperature se poveča permeabilnost membrane za nizkomolekularne snovi, kar poveča hitrost hemolize. Crowe in sodelavci so leta 1999 dokazali, da pri hlajenju eritrocitov nastopi fazni prehod, za katerega so odgovorni v glavni meri membranski fosfolipidi. Če so ohlajeni pod 20 °C, eritrociti očitno spremenijo obliko (Crowe in sod., 1999), povečata se koncentracija citosolnega  $\text{Ca}^{2+}$  in aktinske polimerizacije.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Kemikalije**

EDTA	Kemika, Hrvaška
Kalcein	Sigma, ZDA
Metanol	Merck, Nemčija
Kloroform	Merck, Nemčija
NaCl	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
DPPE	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPC	Avanti Polar Lipids, ZDA
DPPE	Avanti Polar Lipids, ZDA
Sephadex G-50 Medium	Sigma, ZDA
Rodamin G6	Sigma, ZDA
Tris	Merck, Nemčija
Triton X-100	Sigma, ZDA

##### **3.1.2 Raztopine**

Raztopina kalceina	80 mM, pH 8,0
Eritrocitni pufer	0,13 M NaCl; 0,02 M Tris; pH 7,4
Tris pufer za vezikle	140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
Raztopina poli-APS	2 mg/mL v deionizirani vodi
Raztopina Tritona X-100	100 mM



### 3.1.3 Laboratorijska oprema

Sonikator	Ultrasonic processor VCX 750, Sonics & Materials Inc., ZDA, 2005
Spektrofotometer	Shimadzu, Japonska
Spektrofluorimeter	Jasco FP-750, ZDA
Vodna vakuumška črpalka	Büchi, Nemčija
N-DSC III kalorimer	CSC 6300, CSC, ZDA

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje kritične micelarne koncentracije (CMC)

S to metodo smo hoteli prikazati, pri kateri koncentraciji v vodni raztopini poli-APS tvorijo micelle. Za določanje kritične micelarne koncentracije (CMC) smo uporabili rodamin G6, ki se vgrajuje v naraščajoče micelle in posledično izgublja lastno fluorescenco (De Vendittis in sod., 1981). K različnim vodnim koncentracijam poli-APS (0-1 mg/mL) smo dodali rodamin G6 v končni koncentraciji 10 µg/mL. Raztopine smo predhodno inkubirali 48 ur v temi pri različnih temperaturah (5 °C, 15 °C, 25 °C in 40 °C), potem pa smo s spektrofluorimetrom (Jasco FP-750) pomerili emisijske spektre. Ekscitacijska valovna dolžina je bila 480 nm, emisijo pa smo spremljali pri 550 nm. Ker padca fluorescence nismo uspeli zaslediti, smo CMC določili z merjenjem intenzitete sipane svetlobe pri 480 nm.

Naredili smo štiri serije raztopin različnih vodnih koncentracij poli-APS, vendar brez rodamina G6. Končne koncentracije poli-APS v vodni raztopini so bile od 0,02 do 1 mg/mL. Raztopine smo 48 ur inkubirali v temi pri različnih temperaturah (5 °C, 15 °C, 25 °C in 40 °C). S spektrofluorimetrom smo pomerili intenziteto sipane svetlobe pri ekscitacijski in emisijski valovni dolžini 480 nm.

### **3.2.2 Priprava suspenzije govejih eritrocitov**

Sveže goveje eritrocite smo hranili pri 5 °C v Alsverjevem konzervansu. Delovno suspenzijo eritrocitov smo pripravili v eritrocitnem puftru s pH vrednostjo 7,4. Eritrocite smo predhodno trikrat sprali z 0,9% NaCl in dvakrat z eritrocitnim pufrom. Vsakič smo jih centrifugirali 1 minuto na 1200 obratih/min. Suspenzija eritrocitov je imela pri sobni temperaturi in valovni dolžini 700 nm navidezno absorpcijo  $0,500 \pm 15$ .

### **3.2.3 Vpliv temperature na hemolizo, povzročeno s poli-APS**

Hemolizo smo merili s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981). Naredili smo dva poskusa. Pri prvem smo suspenzijo govejih eritrocitov in poli-APS ločeno segrevali od 5 °C do 40 °C z intervali po 5 °. Pri drugem poskusu smo poli-APS in suspenzijo eritrocitov ohlajali iz 40 °C na 5 °C, ponovno s 5 ° intervali. Čas inkubacije eritrocitov in poli-APS na določeni temperaturi je bil 15 minut. K 1 mL raztopini eritrocitov smo v kiveto dodali različne koncentracije poli-APS in spremljali časovni potek hemolize v odvisnosti od temperature. Ležišče kivete je bilo ogrevano ali ohlajano na določeno temperaturo, kot je to zahtevala meritev.

V drugem delu poskusa smo spremljali hemolizo govejih eritrocitov glede na čas inkubacije eritrocitov in poli-APS pri določeni temperaturi (15, 25 in 40 °C). Eritrocite in poli-APS smo inkubirali na vodni kopeli 15, 30 in 60 min.

V nadaljevanju poskusa smo spreminjali temperaturo inkubacije poli-APS. Temperature suspenzije eritrocitov nismo spreminjali in je bila v času trajanja poskusa ves čas 25 °C. Poli-APS smo tako segrevali kot ohlajali od 5 °C na 40 °C po 5° in obratno. Pri vsaki temperaturi smo inkubirali 15 min.

Končno smo spreminjali temperaturo inkubacije suspenzije govejih eritrocitov, medtem ko je bil poli-APS stalno na sobni temperaturi 25 °C. Eritrocite smo tako ohlajali kot segrevali od 5 °C do 40 °C po 5° in obratno. Pri vsaki temperaturi smo inkubirali 15 min

Pri vseh opisanih poskusih smo k 1 mL suspenzije eritrocitov dodali poli-APS v končni koncentraciji 16 µg/mL in spremljali časovni potek hemolize govejih eritrocitov.

### **3.2.4 Priprava lipidnih veziklov**

Želena količino lipidov smo zatehtali v obliki prahu, dodali 0,6 mL raztopine metanol/kloroform v razmerju 1:3. Lipide smo posušili v majhni stekleni bučki pri znižanem tlaku na vodni vakuumski črpalki. Sušili smo tri ure. Dodali smo 10 - 20 steklenih kroglic in 1 mL raztopine kalceina (80 mM) ali 1 mL Tris pufra. Stresali smo jih na vibracijskem stresalniku 1-2 minuti. Dobljene večslojne (multilamelarne – MLV) liposome smo sonicirali 30 minut (z 10-sekundnimi intervali) na ledu z 40% amplitudo. Tako smo dobili majhne enoslojne liposome ali vezikle. Za vezikle pripravljene v raztopini kalceina smo naredili 10 mililitrsko gelsko kolono (Sephadex G-50), ki smo jo predhodno dvakrat sprali s Tris pufrom. Na kolono smo nanegli 75 µL raztopine veziklov in kalceina. Kolono smo štirikrat centrifugirali 1 minuto na 1200 obratih/min. Zavrgli smo prvo frakcijo, ostale ki so vsebovale vezikle pa združili. Na ta način smo se znebili odvečnega kalceina, ki se iz kolone spere bistveno kasneje. Vezikle s koncentracijo 4 mg/mL smo prepihali z dušikom in spravili na 4 °C. Te vezikle smo uporabili pri testu sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov.

Lipidne vezikle raztopljene v Tris pufri smo po soniciranju prepihali z dušikom in spravili v hladilnik na 4 °C. Končna koncentracija veziklov je bila 2 mg/mL. Te vezikle smo uporabili pri poskusih z uporabo diferenčne dinamične kalorimetrije.

Naredili smo vezikle iz DPPC, POPC, DPPS in iz mešanic DPPC/POPC, DPPS/POPC lipidov v molskem razmerju 1:1.

### 3.2.5 Vpliv temperature na s poli-APS povzročeno sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov

Lizo umetno narejenih lipidnih veziklov s kalceinom (iz DPPC, POPC, DPPS, DPPC/POPC, DPPS/POPC lipidov) smo spremljali s spektrofluorimetrom Jasco FP-750. Kalcein se iz veziklov sprošča, če poli-APS lizirajo membrano veziklov. Uporabili smo kvarčno kiveto širine 1 cm in magnetno mešalo. Vezikle smo predhodno inkubirali 15 minut pri vsaki temperaturi (od 5 °C do 40 °C). V kiveto smo dali 1 mL ustrezno temperiranega pufru za vezikle. Dodali smo določeno količino veziklov ter nato še poli-APS v različnih končnih koncentracijah. Emisijo smo merili pri 550 nm 10 minut. Ekscitacijska valovna dolžina je bila 480 nm. Po končanem poskusu smo v kiveto dodali še detergent Triton X-100 v končni koncentraciji 10 mM. Triton X-100 povzroči popolno lizo veziklov. Tako smo lahko izračunali odstotek sproščanja kalceina po enačbi 1.

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = (F_{\text{poli-APS}} - F_0) / (F_{\text{Triton X-100}} - F_0) * 100 \quad \dots(1)$$

$F_{\text{poli-APS}}$  - predstavlja najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku poli-APS,

$F_{\text{Triton X-100}}$  - predstavlja najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku detergenta Triton X-100

$F_0$  – začetna fluorescenca (pred dodajanjem poli-APS ali Tritona X-100)

### 3.2.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija

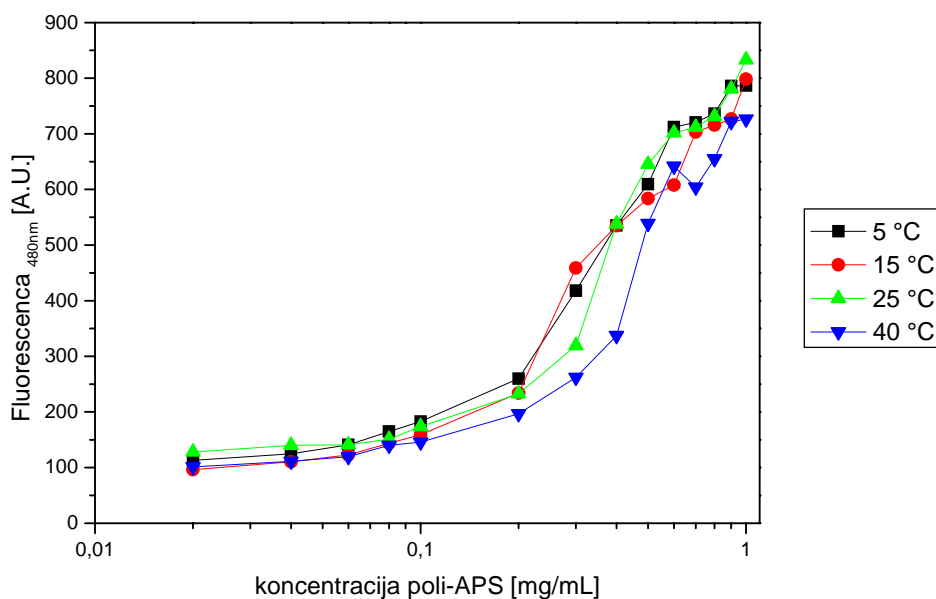
Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (Differential Scanning Calorimetry) smo spremljali fazne prehode različnih lipidnih veziklov (iz DPPC, POPC, DPPS, DPPC/POPC in DPPC/DPPS lipidov) pri različnih koncentracijah poli-APS. Uporabili smo vezikle raztopljene v Tris pufru (glej točko 3.2.3). Pripravili smo raztopine majhnih enoslojnih veziklov, poli-APS in pufru za vezikle v različnih molskih razmerjih (DPPC:poli-APS=33:1 in 16:1, DPPS:poli-APS=1600:1, DPPC/POPC:poli-APS=33:1, 22:1 in 16:1 ter DPPC/DPPS:poli-APS=1600:1 in 32:1). Končni volumen raztopine je bil 1 mL. Raztopino smo 20 minut odzračevali, da smo preprečili nastanek mehurčkov med poskusom. Referenčno celico smo napolnili s Tris

pufrom, vzorčno pa s preiskovano raztopino. Zaprli smo kalorimeter, povišali tlak na 3 atmosfere in začeli s poskusom. Vzorce smo segrevali, ohlajali in ponovno segrevali, da smo dobili podatke o reverzibilnosti. Segrevali smo od 15 °C do 60 °C za DPPC raztopino, od 0 °C do 70 °C za DPPS raztopino, od 5 °C do 60 °C za DPPC/POPC in od 0 °C do 70 °C za DPPS/POPC raztopino. Hitrost segrevanja in ohlajanja je bila 1°/min. Iz DSC poskusov dobljene termograme (enote izhodnih signalov so bile mcal/K v odvisnosti od T) smo z uporabo softverskega programa (Origin za DSC v.4.1) obdelali. Termogrami so prikazani kot presežna toplotna kapaciteta  $\langle C_p \rangle$  (kcal/molK) v odvisnosti od temperature (°C)

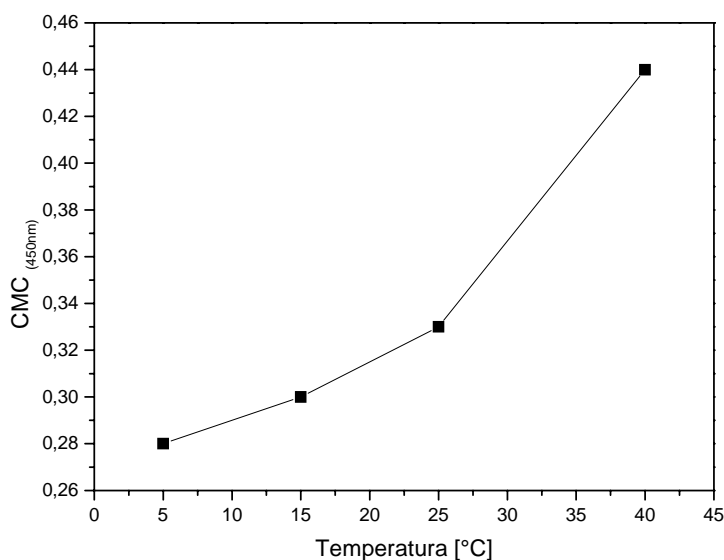
## 4. REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE KRITIČNE MICELARNE KONCENTRACIJE (CMC)

Iz slike 3 je razvidno, da se je fluorescenca opazno povečala pri koncentracijah poli-APS, višjih od 0,2 mg/mL. To pomeni, da poli-APS v vodni raztopini agregirajo v miclele pri teh koncentracijah. Agregacija je hitrejša pri nižjih temperaturah (5 °C in 15 °C), kot pri višjih. Kot je razvidno iz slike 4, poli-APS najhitreje tvorijo miclele pri 5 °C. Z zvišanjem temperature se zvišuje tudi kritična micelarna koncentracija.



Slika 3. Kritična micelarna koncentracija poli-APS v odvisnosti od koncentracije poli-APS. Simboli prikazujejo rezultate meritev različnih koncentracij vodne raztopine poli-APS, inkubirane 48 ur v temi pri 5, 15, 25 in 40 °C.

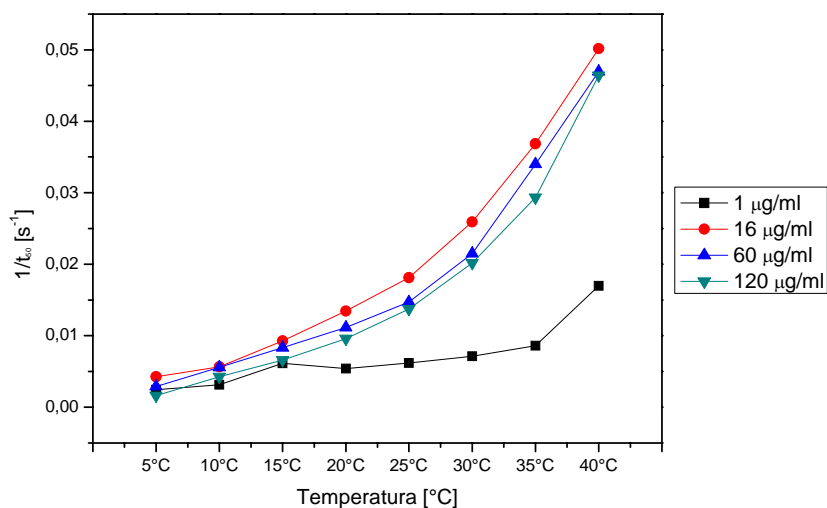


Slika 4. Spreminjanje kritične micelarne koncentracije v odvisnosti od temperature. Prikazana je koncentracija poli-APS, odčitana pri polovični točki preloma (450 nm).

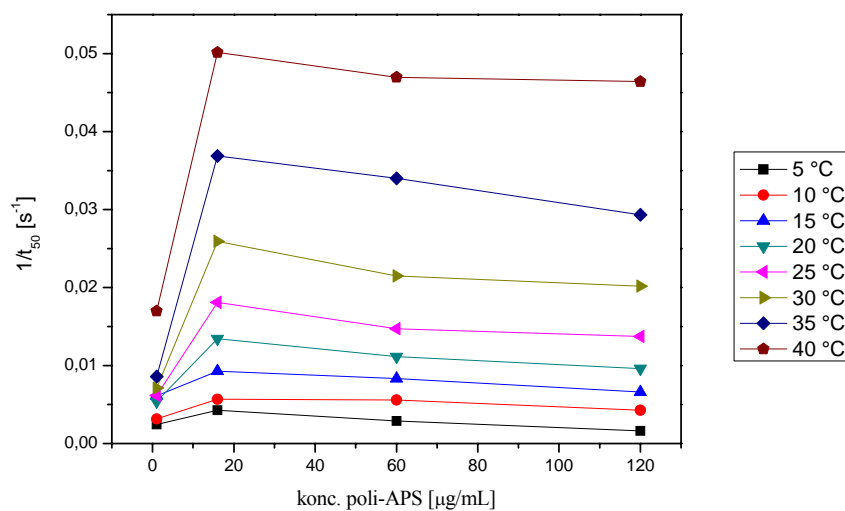
## 4.2 VPLIV TEMPERATURE NA HEMOLIZO, POVZROČENO S POLI-APS

### 4.1.1 Segrevanje suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS

Hemoliza suspenzije govejih eritrocitov najhitreje poteka pri končni koncentraciji poli-APS 16  $\mu\text{g/mL}$  (slika 5). Sledita koncentraciji 60  $\mu\text{g/mL}$  in 120  $\mu\text{g/mL}$ . Najpočasneje poteka hemoliza eritrocitov pri koncentraciji 1  $\mu\text{g/mL}$ . Iz slike 5 lahko razberemo, da poteka hemoliza, ko suspenzijo govejih eritrocitov in poli-APS segrevamo, hitreje pri višjih temperaturah, kar je razvidno tudi na sliki 6. Hemoliza se linearno povečuje z zviševanjem temperature.



Slika 5. Hitrost hemolize suspenzije govejih eritrocitov, ki smo jih segrevali od 5°C do 40°C, pri različnih koncentracijah poli-APS. Ločeno smo ohlajali tudi raztopino poli-APS. Prikazana je odvisnost hitrosti hemolize -  $1/t_{50}$  od temperature.

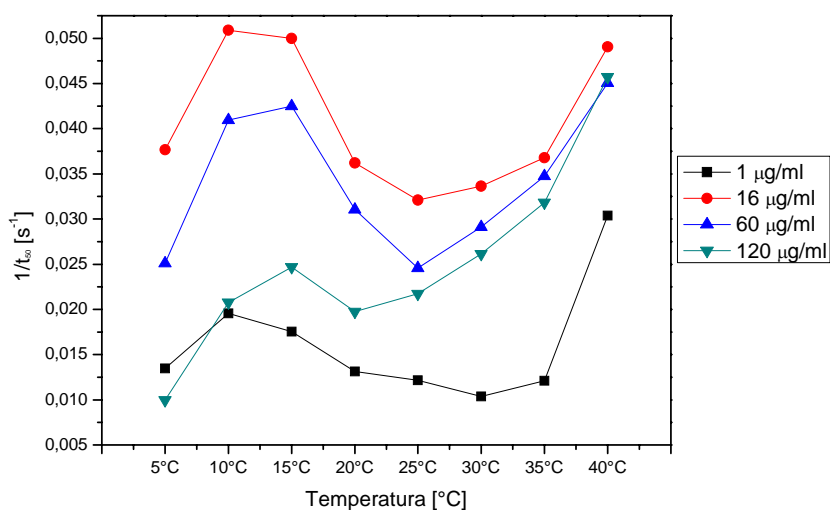


Slika 6. Odvisnost polovičnega časa hemolize -  $1/t_{50}$  od koncentracije poli-APS pri različnih temperaturah. Suspenzijo eritrocitov in raztopino poli-APS smo ločeno segrevali od 5°C do 40°C.

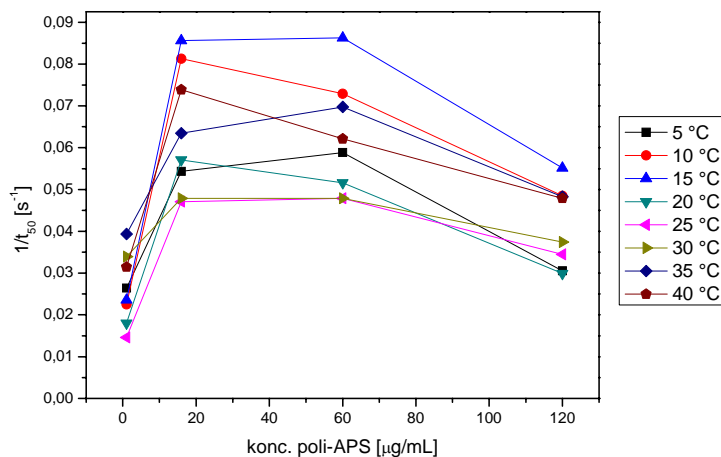


#### 4.1.2 Ohlajanje suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS

Pri ohlajanju suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS je, tako kot pri segrevanju, hemoliza najhitrejša pri končni koncentraciji poli-APS 16  $\mu\text{g/mL}$ . Sledijo končne koncentracije 60  $\mu\text{g/mL}$ , 120  $\mu\text{g/mL}$  in 1  $\mu\text{g/mL}$ . Pri ohlajanju ima krivulja hemolize zelo nenavadno obliko, saj poteka najhitreje pri 10  $^{\circ}\text{C}$ , 15  $^{\circ}\text{C}$  in 40  $^{\circ}\text{C}$ , najpočasneje pa pri 5  $^{\circ}\text{C}$  in 25  $^{\circ}\text{C}$  (slika 7). Enako situacijo nam kaže tudi slika 8, na kateri je prikazana zveza med polovičnim recipročnim časom hemolize pri različnih temperaturah in koncentracijo poli-APS.



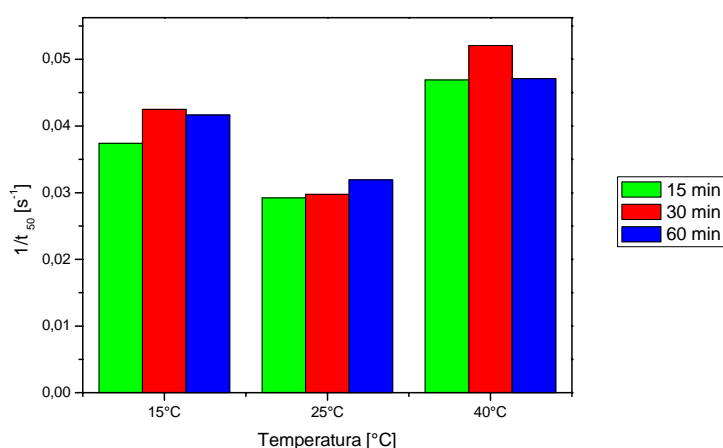
Slika 7. Hitrost hemolize suspenzije govejih eritrocitov, ki smo jih ohlajali od 40  $^{\circ}\text{C}$  do 5  $^{\circ}\text{C}$ . Ločeno smo ohlajali tudi Raztopino poli-APS. Hemolizo smo merili pri štirih različnih koncentracijah poli-APS.



Slika 8. Odvisnost polovičnega časa hemolize -  $1/t_{50}$  od koncentracije poli-APS pri različnih temperaturah. Suspenzijo eritrocitov in raztopino poli-APS smo ločeno ohlajali od 40°C do 5°C.

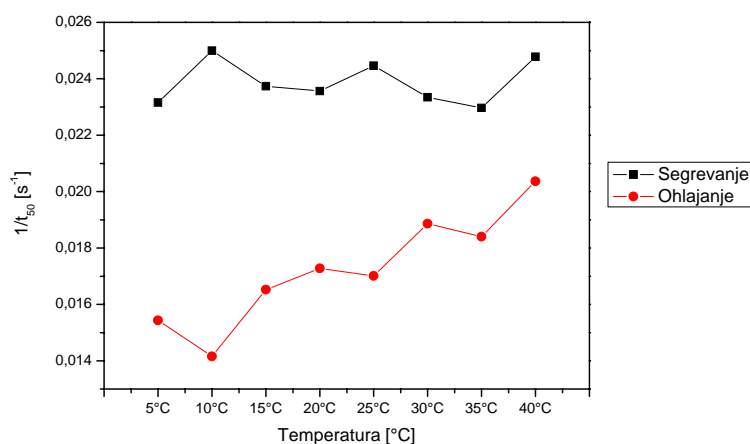
#### 4.1.3 Vpliv različnih časov inkubacije suspenzije eritrocitov in poli-APS

Hemoliza se bistveno ne spremeni po različnih časih inkubacije (15, 30 in 60 min) suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS pri določeni temperaturi. Iz slike 9 lahko opazimo, da je hemoliza najhitrejša pri 40 °C. Sledita temperaturi 15 in nato 25 °C.



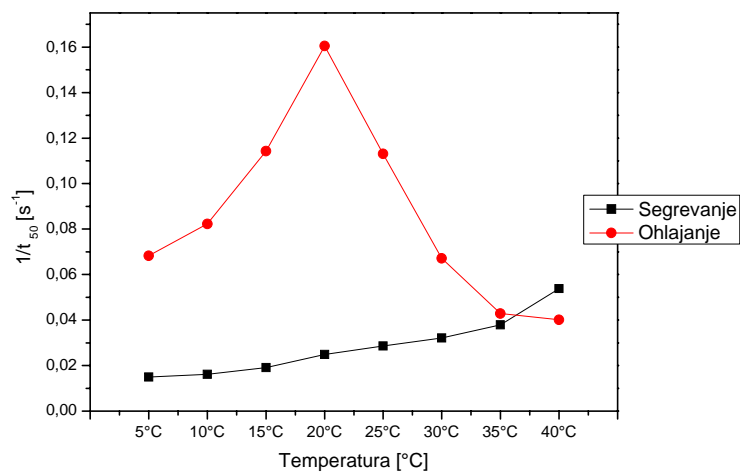
Slika 9. Različni časi inkubacije suspenzije govejih eritrocitov in poli-APS na določeni temperaturi. Odvisnost polovičnega časa hemolize -  $1/t_{50}$  od temperature.

Če smo poskus izvedli tako, da smo segrevali in ohlajali samo poli-APS, ne pa tudi suspenzije eritrocitov, pri spremljanju hemolize nismo opazili bistvenih razlik v aktivnosti, povezanih s temperaturo. Aktivnost poli-APS se je nekoliko zmanjšala samo takrat, če smo ga pred meritvami hemolize ohlajali (Slika 10).



Slika 10. Hemoliza govejih eritrocitov. Segrevali in ohlajali smo le poli-APS, medtem ko je bila suspenzija govejih eritrocitov na stalni temperaturi 25 °C. Hitrost hemolize -  $1/t_{50}$  v odvisnosti od temperature.

Končno smo poskus izvedli še tako, da smo poli-APS inkubirali pri stalni temperaturi (25 °C), ter smo segrevali in ohlajali samo raztopino eritrocitov. Pri segrevanju suspenzije govejih eritrocitov s povečevanjem temperature hemoliza počasi narašča. Pri ohlajanju je hemoliza najhitrejša pri 20 °C. Od tu hitrost hemolize pada na obe strani skoraj enakomerno proti obema temperaturnima ekstremoma (40 °C in 5 °C). Najnižja hitrost hemolize je tako pri 40 °C in pri 5 °C (Slika 11).



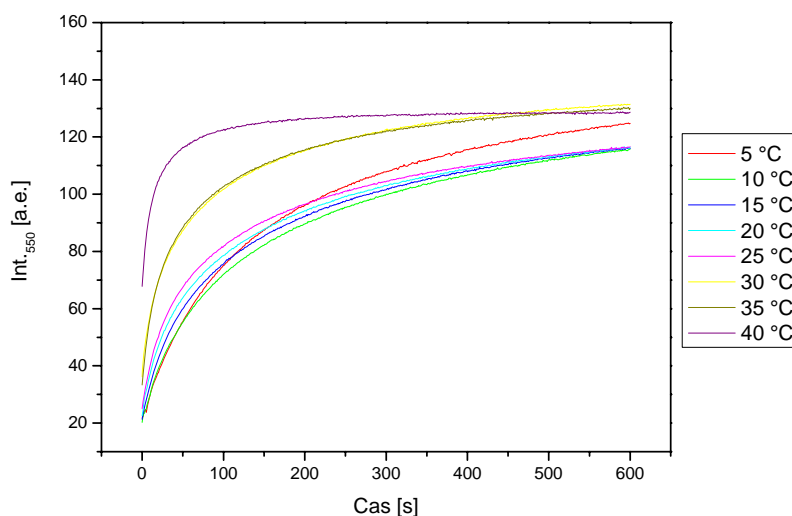
Slika 11. Hemoliza segrevane in ohlajane suspenzije govejih eritrocitov. Poli-APS so bili inkubirani na stalni temperaturi 25 °C. Hitrost hemolize -  $1/t_{50}$  v odvisnosti od temperature.

#### 4.3 VPLIV TEMPERATURE NA S POLI-APS POVZROČENO SPROŠČANJE KALCEINA IZ LIPIDNIH VEZIKLOV

##### 4.3.1 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) narejenih iz POPC in DPPC

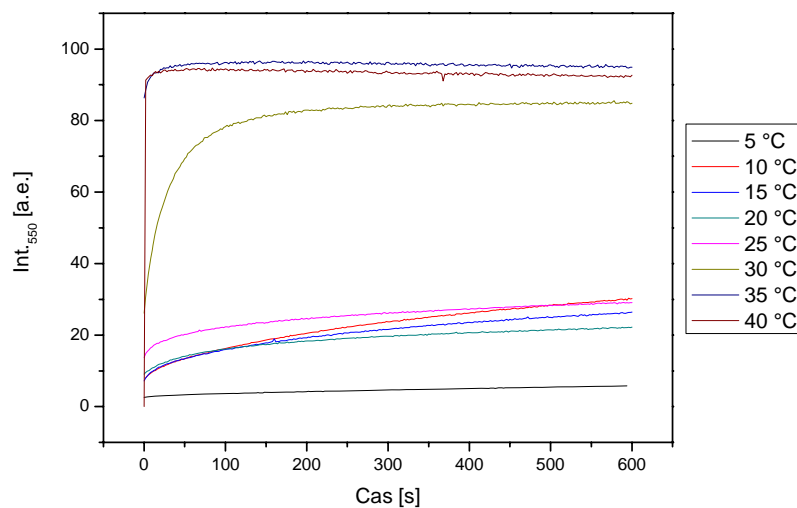
Kako temperatura inkubacije vpliva na lipidne vezikle ter na poli-APS smo preučevali z metodo sproščanja kalceina. Po dodatku Tritona X-100 v končni koncentraciji 1 mM po vsakem poskusu smo lahko po enačbi 1 izračunali odstotek sproščenega kalceina.

Pri POPC veziklih opazimo, da sproščanje kalceina narašča s temperaturo. Zanimiva je le krivulja pri 5 °C, saj poteka sproščanje kalceina prvih 100 sekund v primerjavi z drugimi krivuljami počasneje, a se ne ustavi kot se to zgodi pri ostalih temperaturah. Tako je končni odstotek sproščenega kalceina celo večji kot pri temperaturah 10, 15, 20 in 25 °C (Slika 12).



Slika 12. Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih temperaturah. Končna koncentracija POPC veziklov je 20 µg/mL, poli-APS pa 10 µg/mL. Ekscitacijska valovna dolžina je 480 nm. Meritve intenzitete fluorescence pri emisijski valovni dolžini 550 nm ( $Int_{550}$ ) smo opravili na spektrofotometru Jasco FP-750. a. e. - arbitrarne enote.

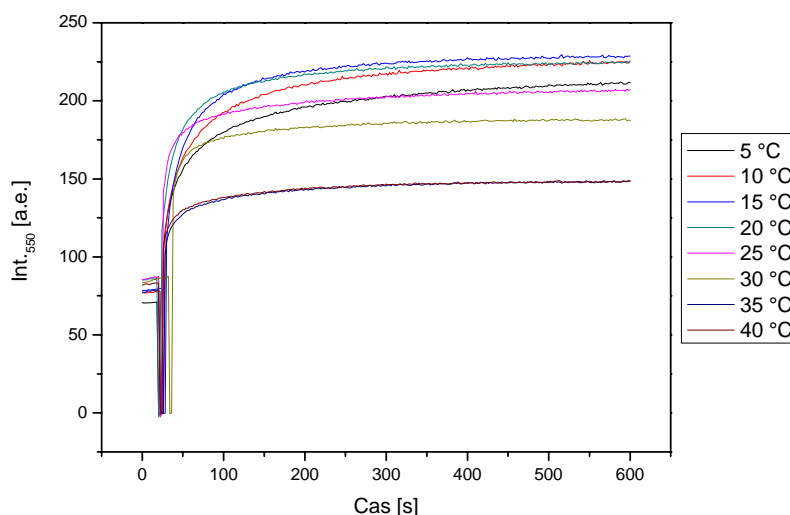
Pri DPPC veziklih prav tako hitrost sproščanja kalceina narašča s temperaturo, vendar vidimo veliko razliko nad 25 °C. Pri 35 in 40 °C takoj pride do 100 % sproščanja kalceina (Slika 13).



Slika 13. Časovni potek sproščanja kalceina iz DPPC veziklov pri različnih temperaturah. Končna koncentracija DPPC veziklov je 20 µg/mL, poli-APS pa 10 µg/mL. Meritve intenzitete fluorescence pri emisijski valovni dolžini 550 nm ( $Int_{550}$ ) smo opravili na spektrofluorimetru Jasco FP-750. a. e. - arbitrarne enote.

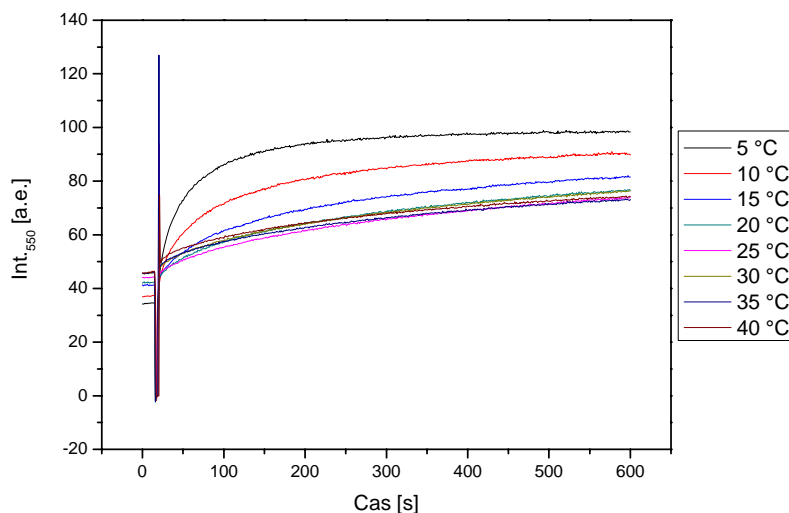
#### 4.3.2 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) narejenih iz mešanic DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1)

Obnašanje lipidnih veziklov sestavljenih iz mešanic DPPC/POPC se razlikuje od veziklov pripravljenih iz posameznih čistih lipidov (DPPC, POPC). Najmanjše sproščanje kalceina opazimo pri 35 in 40 °C. Hitrost sproščanja kalceina narašča do 15 °C, nato pa začne padati do 5 °C (Slika 14).



Slika 14. Časovni potek sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov DPPC:POPC = 1:1 pri različnih temperaturah. Končna koncentracija lipidnih veziklov je 40 µg/mL, poli-APS pa 1 µg/mL. Meritve intenzitete fluorescence pri emisijski valovni dolžini 550 nm (Int<sub>550</sub>) smo opravili na spektrofluorimetru Jasco FP-750. a. e. - arbitrarne enote.

Pri mešanici lipidov DPPS : POPC = 1:1 je sproščanje kalceina najbolj učinkovito pri 5 °C, sledita temperaturi 10 in 15 °C. Pri višjih temperaturah (20, 25, 30, 35, in 40 °C) ni bistvenih razlik v hitrosti sproščanja kalceina (Slika 15).

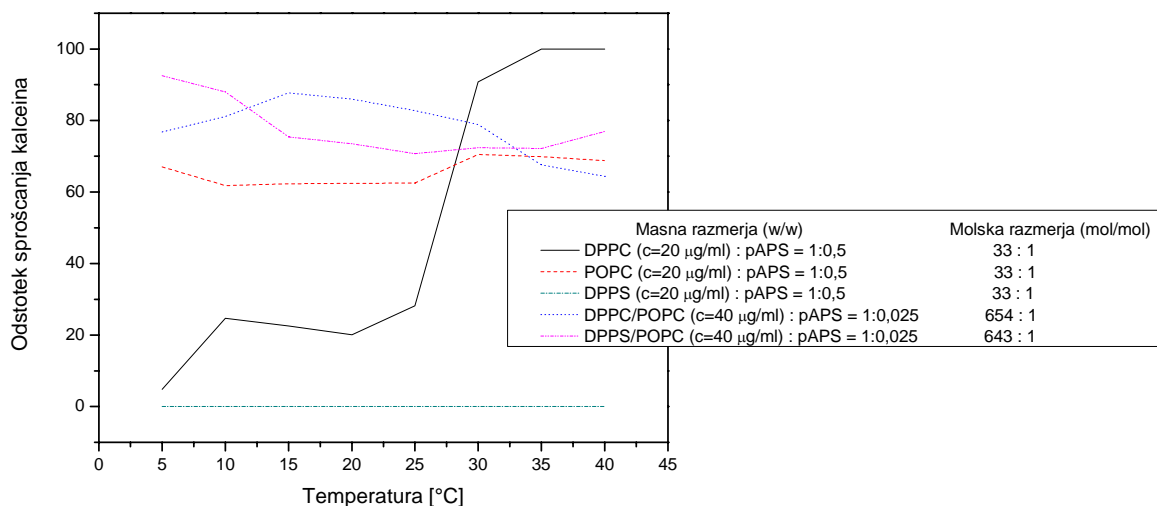


Slika 15. Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov DPPS/POPC v molskem razmerju 1:1 pri različnih temperaturah. Končna koncentracija lipidnih veziklov je 40  $\mu\text{g/mL}$ , poli-APS pa 1  $\mu\text{g/mL}$ . Meritve intenzitete fluorescence pri emisijski valovni dolžini 550 nm ( $\text{Int}_{550}$ ) smo opravili na spektrofotometru Jasco FP-750. a. e. - arbitrarne enote.

Pri DPPS lipidnih veziklih ne pride do sproščanja kalceina ne glede na koncentracijo poli-APS ali lipidov in razmerij med njimi ter je neodvisno glede na temperaturo. Vezikli narejeni iz DPPS lipidov so popolnoma odporni na delovanje poli-APS (ni prikazano).

Slika 16 prikazuje odstotke kalceina, sproščenega po 10 minutah interakcije s poli-APS, v odvisnosti od temperature inkubacije in sestave lipidnih veziklov.





Slika 16. Odstotek sproščanja kalceina v odvisnosti od temperature.

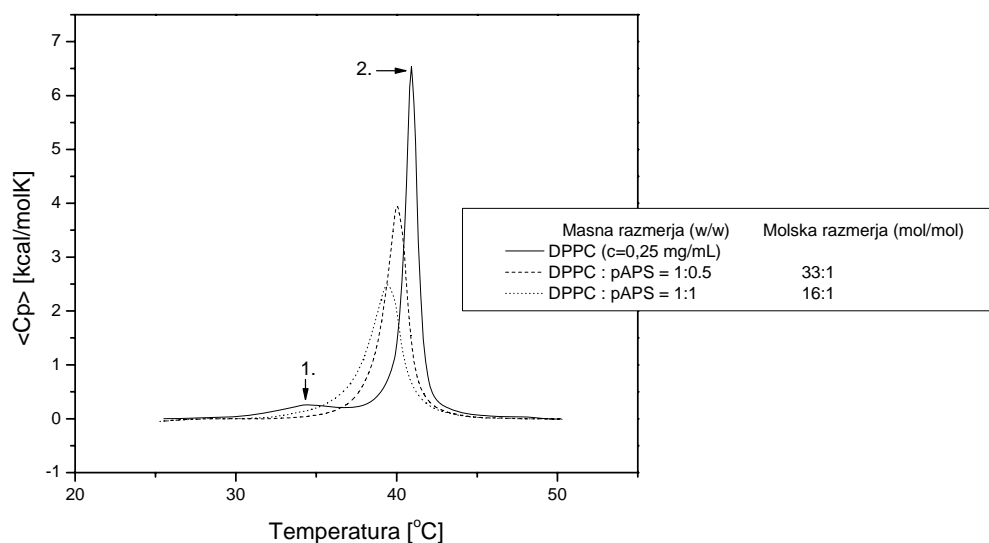
#### 4.4 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

##### 4.4.1 Fazni prehodi lipidnih veziklov (SUV) DPPC in DPPS v odvisnosti od poli-APS

DSC termograma lipidnih veziklov DPPC in DPPS sta si zelo podobna. Oba imata ostre glavne fazne prehode (2. puščica na sliki 17 in 20). Na DSC termogramu so lepo vidni tudi fazni predprehodi (1. puščica). Razlikujeta se v višini vrha in temperaturi pri kateri pride do faznega prehoda. Velika razlika pa se kaže v entalpiji faznega predprehoda obeh lipidnih veziklov.

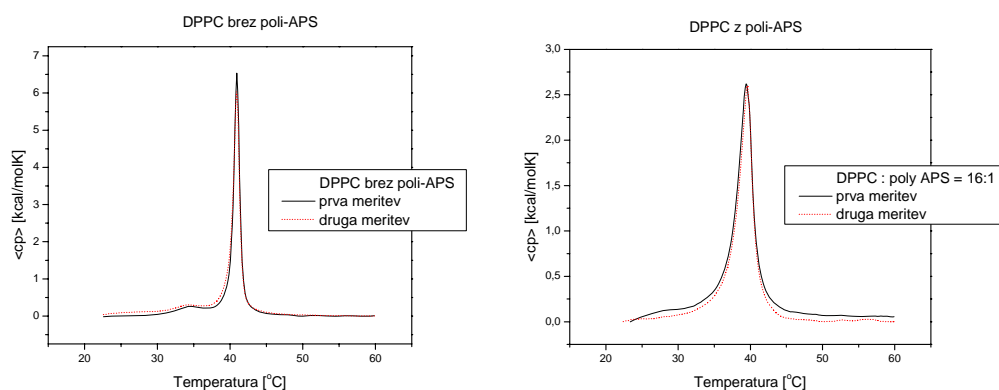
Po dodanem poli-APS se zniža entalpija glavnega prehoda (2. puščica) DPPC veziklov v odvisnosti od dodanega poli-APS. Več poli-APS ko dodamo, manjša je entalpija prehoda. Zniža se tudi temperatura pri kateri pride do glavnega faznega prehoda (2. puščica). Iz slike 17 je razvidno, da fazni predprehod (1. puščica) po dodanem poli-APS izgine pri obeh koncentracijah poli-APS.

Pri lipidnih veziklih DPPS prav tako pride do zmanjšanja entalpije glavnega faznega prehoda ob dodatku poli-APS. Tudi entalpija faznega predprehoda se nekoliko zmanjša. Večje koncentracije poli-APS povzročijo agregacijo in posledično obarjanje lipidov (rezultatov nismo prikazali).

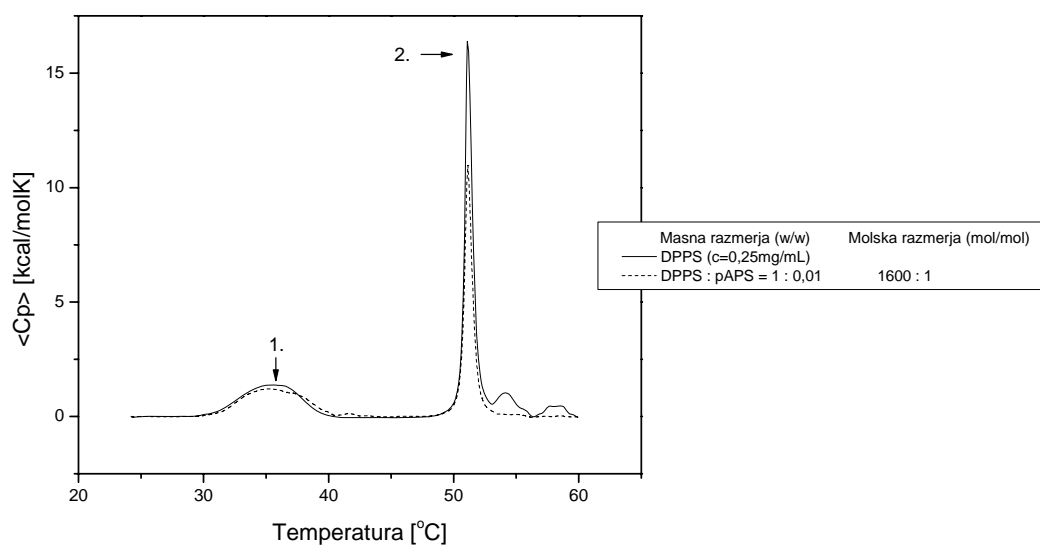


Slika 17. DSC termogrami raztopine DPPC brez in z dodanim poli-APS. Molska razmerja DPPC:pAPS so: 33:1 in 16:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,25 mg/mL. Koncentracija poli-APS je 0,125 in 0,25 mg/mL; puferski sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.

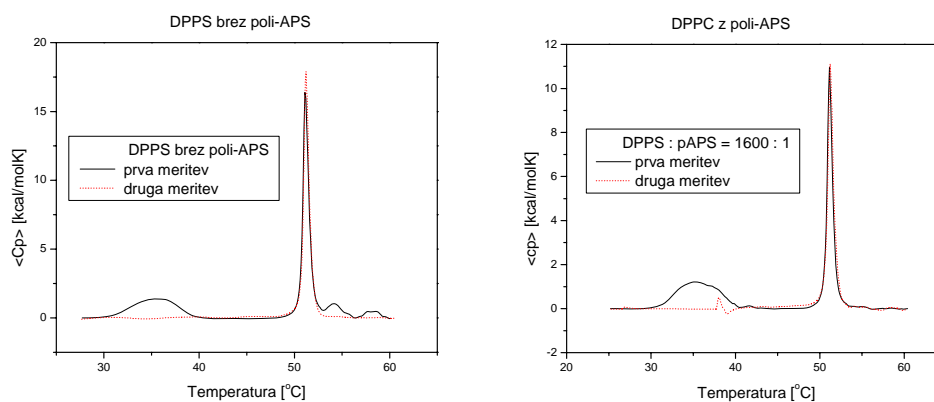
Slike 18, 19 in 21, 22 prikazujejo rezultate reverzibilnosti faznih prehodov DPPC in DPPS lipidov z ali brez dodanega poli-APS. Opazimo, da pri DPPS veziklih, ne glede na prisotnost ali odsotnost poli-APS, izgine fazni predprehod, medtem ko pri DPPC veziklih fazni predprehod izgine le ob prisotnosti poli-APS.



Slika 18 in 19. DSC termogrami raztopine DPPC brez in z dodanim poli-APS po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,25 mg/mL. Puferski sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.



Slika 20: DSC termogrami veziklov DPPS in raztopine DPPS/poli-APS v molskem razmerju 1600:1. Koncentracija DPPS veziklov je 0,25 mg/mL, poli-APS pa 0,25  $\mu$ g/mL. Puferski sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.



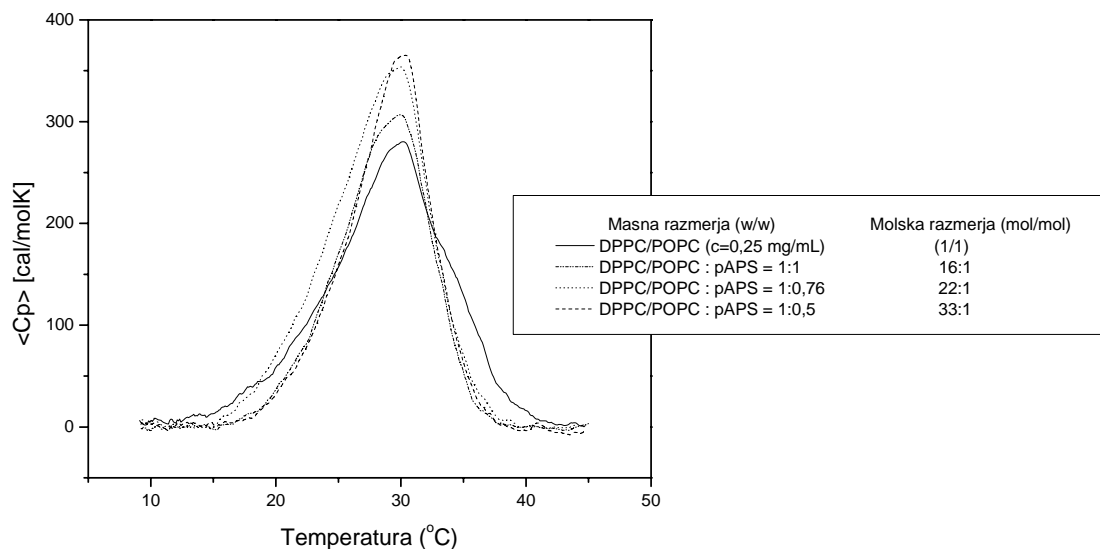
Slika 21 in 22. DSC termogrami raztopine DPPS brez in z dodanim poli-APS po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPS veziklov je 0,25 mg/mL. Puferni sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.

#### 4.4.2 Fazni prehodi mešanic lipidnih veziklov (SUV) DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1) v odvisnosti od poli-APS

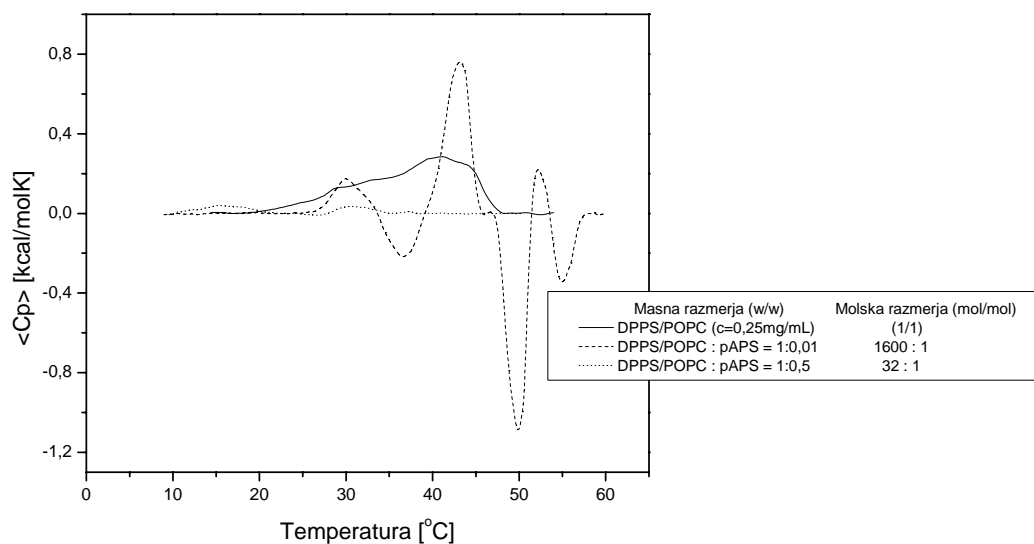
Lipidni termogrami veziklov narejenih iz DPPC/POPC (1/1, Slika 23) in DPPS/POPC (1/1, Slika 24) se zelo razlikujejo od predhodno omenjenih lipidnih veziklov, ki so narejeni iz ene same vrste lipida. Glavni fazni prehod DPPS/POPC veziklov je tako kot pri veziklih DPPC/POPC zelo raztegnjen. Temperaturni interval na polovici višine glavnega prehoda je 14,6 °C pri DPPS/POPC in 10,4 °C pri DPPC/POPC veziklih.

Če lipidnim veziklom DPPC/POPC dodamo poli-APS, pride do povečanja entalpije glavnega faznega prehoda. Več kot dodamo poli-APS, večja je entalpija prehoda.

Ob dodatku poli-APS (končna koncentracija 125  $\mu\text{g/mL}$ ) veziklom DPPS/POPC pride do agregacij lipidnih veziklov in obarjanja. Pri končni koncentraciji spojine poli-APS 2,5  $\mu\text{g/mL}$  fazni prehod lipidnih veziklov popolnoma izgine.



Slika 23: DSC termogrami lipidnih veziklov iz DPPC/POPC (1/1) lipidov v prisotnosti različnih koncentracij poli-APS. Koncentracija lipidov je 0,25 mg/mL, poli-APS pa 0,25, 1,9 ter 0.125 mg/mL. Puferski sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.



Slika 24. DSC termogrami lipidnih veziklov DPPS/POPC (1/1) v prisotnosti poli-APS v masnem razmerju 1:0,01 ter 1:0,5. Puferski sistem je 140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0.

Preglednica 2. Termodinamske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov DPPC, DPPS in mešanic lipidnih veziklov DPPC/POPC, DPPS/POPC v odvisnosti od različnih koncentracij poli-APS.  $\Delta H_{cal}'$  - entalpija predprehoda;  $\Delta H_{cal}$  - entalpija glavnega prehoda;  $T_m'$  - temperatura predprehoda;  $T_m$  - temperatura glavnega prehoda;  $\Delta T_{1/2}'$  - temperaturni interval na polovici višine predprehoda;  $\Delta T_{1/2}$  - temperaturni interval na polovici višine glavnega prehoda.

Molska razmerja	$\Delta H_{cal}'$ (kJ/mol)	$\Delta H_{cal}$ (kJ/mol)	$T_m'$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_{1/2}'$	$\Delta T_{1/2}$
<b>DPPC (c=0,25mg/mL)</b>	5,4± 0,5	41,4± 1	34,5± 0,1	40,9± 0,2	5,3± 0,1	0,9± 0,1
DPPC : pAPS = 16:1	/	35,6± 1	/	40,1± 0,2	/	1,6± 0,1
DPPC : pAPS = 33:1	/	33,5± 1	/	39,4± 0,2	/	2,3± 0,1
<b>DPPS (c=0,25mg/mL)</b>	32,2± 1	60,7± 2	35,3± 0,2	51,1± 0,2	5,5± 0,1	0,7± 0,1
DPPS : pAPS = 1600:1	31,0± 1	42,3± 2	35,2± 0,2	51,1± 0,2	6,0± 0,1	0,6± 0,1
<b>DPPC/POPC (c=0,25mg/mL)</b>	/	13,4± 0,5	/	30,2± 0,5	/	10,4± 0,4
DPPC/POPC : pAPS = 33:1	/	12,6± 0,5	/	30,1± 0,5	/	7,2± 0,4
DPPC/POPC : pAPS = 22:1	/	14,6± 0,5	/	30,0± 0,5	/	8,9± 0,4
DPPC/POPC : pAPS = 16:1	/	11,7± 0,5	/	30,0± 0,5	/	8,5± 0,4
<b>DPPS/POPC (c=0,25mg/mL)</b>	/	17,2± 0,5	/	41,1± 0,5	/	14,6± 0,4
DPPS/POPC : pAPS =1600:1	obarjanje	obarjanje	/	/	/	/
DPPS/POPC* : pAPS = 32:1	obarjanje	obarjanje	/	/	/	/

\* - c=0,125 mg/mL

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Za določanje kritične micelarne koncentracije poli-APS smo uporabili rodamin G6 (De Vendittis in sod., 1981). Rodamin je fluorescentni označevalec za agregacijo kationskih detergentov, ki ga miceli osamijo od polarnega topila. Koncentracija rodamina v topilu se tako zmanjša in posledično tudi fluorescenca rodamina. Poskus ni uspel, saj ni prišlo do zmanjšanja fluorescence pri koncentraciji 0,23 mg/mL kjer poli-APS agregirajo v micelle (Sepčič in sod., 1997a). Predvidevamo, da je rodamin uhajal iz micel. Tako smo pri vseh koncentracijah poli-APS dobili podobne rezultate, ki jih nismo prikazali. Kritično miceralno koncentracijo smo zato določili s testom sipanja svetlobe, kjer opazimo, da CMC pada sorazmerno s temperaturo (slika 4). Če povišamo temperaturo, poli-APS v vodni raztopini agregirajo pri višji koncentraciji, zaradi višje kinetične energije molekul. Iz slike 3 je razvidno, da je kritična micelarna koncentracija poli-APS pri približno 0,3 mg/mL. Ta rezultat se ujema s prej objavljeno vrednostjo CMC, ki so jo določili z rodaminom (Sepčič in sod., 1997a).

Hemoliza govejih eritrocitov, povzročena s poli-APS, se linearno povečuje z zvišanjem temperature. Vendar to velja le v primeru, če smo eritrocite in poli-APS segrevali. Pri ohlajanju eritrocitov in poli-APS pride do nenavadno hitre hemolize pri nizkih temperaturah (slika 7). Znano je tudi, da se ob prisotnosti proteinov ali polipeptidov fazni prehod lahko premakne k nižji temperaturi in lahko postane tudi širši (Chernitsky in Senkovich, 1997). Ob hlajenju eritrocitov naj bi fazni prehod lipidov v membrani eritrocitov nastopil med 18 °C in 25 °C (Moore in sod., 1996). Lipidna membrana postane tako bolj rigidna in s tem tudi lažje dostopna za poli-APS, ki lažje naredijo pore v rigidni lipidni dvosloj kot v fluidnega.

Naši rezultati se lepo ujemajo z rezultati iz literature. Tako Hoyrup in sod., 2001 kot Davidsen in sod., 2002 navajajo hitrejšo hemolizo z ionskimi detergenti pri nižjih temperaturah, ko je membrana eritrocitov v gel stanju. To je lepo vidno na sliki 7.

Prav tako se hitrost hemolize poveča pri višjih temperaturah, še posebej nad telesno temperaturo 37 °C. Tu še ne prihaja do denaturacije beljakovin, ki nastopi šele pri 45 °C, vendar pa hemoliza vseeno nastopi tudi brez poli-APS, saj prihaja nad kritično temperaturo 37 °C do prerazporejanja lipidnega dvosloja v eritrocitih. Posledica tega je, da določeni deli celične membrane za kratek čas ostanejo brez lipidnega dvosloja, kar vodi do hemolize (Gershfeld in Murayama, 1988).

Ionski detergenti, kar naj bi bil tudi poli-APS, bolje delajo pore, če so lipidi v rigidnem (gel) stanju (Chernitsky in Senkovich, 1997). Kakorkoli, rezultati testa sproščanja kalceina, ki jih lahko primerjamo z rezultati diferenčne dinamične kalorimetrije, kažejo rahlo drugačno podobo, kot je navedeno v literaturi.

Vezikli sestavljeni iz DPPC lipidov imajo fazni prehod pri 41 °C in tu se sprostijo največ kalceina. Tudi pri 35 °C se sprostijo enaka količina, saj imajo tu lipidni vezikli iz DPPC lipida fazni predprehod. Pri faznem predprehodu se razprejo glave lipidnega dvosloja, kar omogoči poli-APS še lažjo vezavo in posledično nastanek pore. Zanimivo je, da so DPPC vezikli ves čas v gel stanju, a opazimo večjo aktivnost poli-APS, ko se bližamo faznemu prehodu, torej neurejeni tekoči fazi. Žal pa nismo merili sproščanja kalceina po temperaturi faznega prehoda, ki je pri tej mešanici pri 41,1 °C, ker smo merili samo do 40 °C.

DPPS vezikli so negativno nabiti in imajo temperaturo faznega prehoda pri 51,1 °C. Tako so tudi te vezikli ves čas poskusa v gel stanju, saj smo merili le do 40 °C. Opazimo lahko, da pri nobeni temperaturi ne pride do sproščanja kalceina.

Prav tako smo opazili večjo aktivnost sproščanja kalceina iz veziklov iz lipidnih mešanic DPPS/POPC in DPPC/POPC, kot pri lipidnih veziklih, ki so sestavljeni samo iz enega lipida. Pri sestavljenih veziklih je za aktivnost potrebno manjše molsko razmerje med lipidnimi vezikli in poli-APS. Pri lipidni mešanici DPPC/POPC opazimo povečano aktivnost sproščanja kalceina, ko se pričinja fazni prehod (pri 15 °C). Ko lipidi počasi prehajajo iz gel stanja v



tekoče neurejeno stanje pa aktivnost pada, kar se nadaljuje tudi po faznem prehodu pri 30 °C. Lipidna mešanica DPPS/POPC je med merjenjem ves čas v gel stanju in tu prvič opazimo večjo aktivnost sproščanja kalceina pri nižjih temperaturah, kot pri višjih.

Z DSC meritvami smo ugotovili, da imajo samo tisti lipidni vezikli, ki so narejeni le iz ene vrste lipida (DPPC, DPPS) ostre fazne prehode. Enako imajo ti lipidni vezikli viden fazni predprehod. Nasprotno imajo vezikli iz lipidnih mešanic (DPPC/POPC in DPPS/POPC) širok fazni prehod.

Iz slik 17 in 20 lahko vidimo, da se fazni prehod zmanjša ob dodatku manjše koncentracije poli-APS v primeru lipidnih veziklov iz DPPS kot pri veziklih iz DPPC. Obe vrsti lipidov sta nasičeni (16:0/16:0), razlika med njima je le v različnem naboju glave. DPPC ima nevtralno holinsko glavo, DPPS pa negativno nabito serinsko. Poli-APS se obnašajo kot kationski detergentski (Sepčić in sod., 1997a) in se zato lažje vežejo na negativno nabite glave DPPS lipidnih veziklov. Pri višji koncentraciji poli-APS pride do agregacij lipidnih veziklov narejenih iz DPPS, saj po končanem poskusu v epruveti opazimo večje agregate. Pri veziklih iz DPPC pa ob dodatku večje količine poli-APS prihaja do znižanja temperature in entalpije faznega prehoda. Fazni predprehodi izginejo pri obeh vrstah lipidnih veziklov (DPPC, DPPS). V dodatnem poskusu smo merili tudi fazne prehode lipidnih veziklov iz POPC. DSC termogram ni uspel, saj imajo POPC lipidi fazni prehod pri -3 °C (Crowe in sod., 1999). Tako nizka temperatura faznega prehoda nam je onemogočila merjenje na DSC kalorimetru.

Dodatek poli-APS povzroča večjo kooperativnost faznega prehoda pri veziklih narejenih iz DPPC/POPC lipidov. Tu gre za mešanico nasičenih in nenasičenih lipidov, ki sta v večini prisotna tudi v membrani človeških eritrocitov (Crowe in sod., 1999). Ob dodatku poli-APS se zmanjša temperaturni interval na polovici višine glavnega prehoda. Vrhovi so višji, čeprav je entalpija glavnega faznega prehoda manjša. Izjema je poskus, kjer je razmerje med lipidnimi vezikli DPPC/POPC in poli-APS 1:0,76. Tu se entalpija faznega prehoda poviša, kar kaže na entalpijsko stabilizacijo lipidnih veziklov. Poli-APS z vgraditvijo v membrano verjetno

povzročajo večjo urejenost lipidnega dvosloja in s tem stabilizacijo. Potrebni bodo še drugi poskusi, da bomo to pokazali.

Vezikli iz DPPS/POPC lipidov kažejo drugačno sliko kot vezikli iz DPPC/POPC. Lipidni vezikli iz DPPS/POPC so mešanica nasičenih in nenasičenih lipidov z negativnim nabojem serinske glave. Ob dodanem kationskem detergentu (poli-APS) prihaja do zlivanja veziklov in obarjanja, kar je verjetno posledica privlaka med negativno glavo serina in pozitivno nabitimi poli-APS.

Vse entalpijske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov iz DPPC, DPPS ter DPPC/POPC in DPPS/POPC se ujemajo z rezultati iz literature (Crowe in sod., 1999; Higashino in sod., 2001).

Slike 18, 19 in 21, 22 prikazujejo reverzibilnost faznih prehodov lipidov z ali brez poli-APS. Opazimo, da je fazni prehod ireverzibilen pri DPPS veziklih, medtem, ko je pri DPPC veziklih reverzibilen. Poli-APS ne vplivajo na reverzibilnost faznega prehoda.

Iz vseh dobljenih podatkov pa tudi iz neobjavljenih podatkov Kristine Sepčič lahko sklepamo, da naboj lipidnega dvosloja nima večjega pomena za permeabilizacijo veziklov (lipidov) s poli-APS. Ima pa naboj zelo izrazit vpliv na vezavo poli-APS na lipidne vezikle. Naši rezultati kažejo, da ima vrsta fosfolipida večji vpliv na permeabilizacijo kot naboj. Iz tega lahko sklepamo, da poli-APS ne delujejo kot tipični kationski detergenti, a tudi ne kot tipični citolizini porinskega tipa. Njihov način delovanja je nekakšna kombinacija obojega. Kationski detergenti so znani tudi kot snovi, ki inhibirajo rast po Gramu pozitivnih bakterij (Varricchio in sod., 1967), medtem ko poli-APS inhibitorno delujejo le proti nekaterim vrstam morskih bakterij, predvsem proti Gram negativnim (Chelossi in sod., 2006).

Dodaten dokaz v prid hipotezi, da naboj ne vpliva na permeabilizacijo membrane s poli-APS je vsebnost DPPS lipida v lipidnem dvosloju. Iz neobjavljenih rezultatov Kristine Sepčič in

lastnih rezultatov smo ugotovili, da višja vsebnost negativno nabite serinske glave v lipidnem sloju znižuje s poli-APS povzročeno permeabilizacijo.

Opazimo lahko tudi to, da poli-APS nimajo enakega učinka na membrane lipidnih veziklov in membrane eritrocitov v gel stanju. Kationski detergenti namreč bolje lizirajo membrano eritrocitov, ko je ta v gel stanju. Enak učinek opazimo tudi s poli-APS. Kakorkoli, to ne velja za čiste sisteme, kot so lipidni vezikli sestavljeni iz ene ali dveh vrst lipidov. Predvidevamo, da ima pomembno vlogo pri hemolizi predvsem holesterol v membrani eritrocitov. Holesterol naj bi pripomogel k nastanku na poli-APS občutljivih mikrodomen v gel fazi, ki se nahajajo v lipidnem matriksu, in posledično k povečani vezavi poli-APS na membrano.

## 5.2 SKLEPI

- temperatura nima bistvenega vpliva na spremembo permeabilizacijske aktivnosti poli-APS, čeprav vpliva na njihovo kritično miceralno koncentracijo (le-ta se znižuje z zniževanjem temperature)
- izkazalo pa se je, da ima temperatura velik vpliv na spremembo fizikalnega stanja membrane, ki pri nižjih temperaturah postane bolj občutljiva na delovanje poli-APS. To je verjetna posledica večje rigidnosti in zmanjšane lateralne difuzije posameznih lipidnih molekul v lipidnem dvosloju.
- naboj lipidnega dvosloja nima velikega pomena na permeabilizacijo membran s poli-APS. Naboj pa ima izrazit vpliv na vezavo poli-APS na lipidne vezikle. Ugotovili smo, da ima vrsta fosfolipida večji vpliv na permeabilizacijo kot naboj.
- poli-APS ne vplivajo na reverzibilnost faznega prehoda.
- poli-APS v vodni raztopini agregirajo pri višjih temperaturah kasneje. Potrebna je višja koncentracija spojin poli-APS, ker imajo le-te večjo kinetično energijo.
- poli-APS ne delujejo kot tipični kationski detergenti. Njihov način delovanja je nekakšna kombinacija med delovanjem kationskih detergentov in citolizinov porinskega tipa.

## 6 POVZETEK

Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so biološko aktivne spojine iz morske spužve *Reniera sarai*. Spužvi naj bi zagotavljale kemično obrambo, saj so zmožne ustvariti pore in lezije v bioloških membranah. Z merjenjem hemolize, sproščanjem kalceina ter diferenčno dinamično kalorimetrijo smo hoteli pokazati kako temperatura, naboj ter vrsta fosfolipida vplivajo na delovanje poli-APS. Zanimalo nas je tudi kako poli-APS v različnih razmerah vplivajo na različne naravne in umetno narejene membranske sisteme. Dokazali smo, da naboj lipidnega dvosloja nima velikega vpliva na permeabilizacijo, ima pa velik vpliv na vezavo poli-APS na lipidni dvosloj. Vrsta fosfolipida ima večji vpliv na permeabilizacijo kot naboj. Prav tako smo opazili, da temperatura nima tako velikega vpliva na poli-APS, kot smo predvidevali, ima pa velik vpliv na spremembo fizikalnega stanja tako celične membrane eritrocitov kot tudi lipidnega dvosloja v liposomih (sestavljenih iz DPPC, POPC, DPPS ter DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1) lipidov), ki pri nižjih temperaturah postanejo bolj občutljivi na delovanje poli-APS. V manjših koncentracijah poli-APS povzročajo nastanek reverzibilnih por in povzročijo večjo prepustnost celične membrane, kar je zelo zanimivo za vnos makromolekul (npr. zdravil) v celice. Prav tako so poli-APS zanimivi kot potencialna sredstva za prenos genskega materiala v celico (transfekcija DNA).

## SUMMARY

Polymeric 3-alkylpyridinium salts (poly-APS) are bioactive compounds isolated from the marine sponge *Reniera sarai*. These molecules probably protect the sponge from being fouled by other organisms. Poly-APS are capable of creating pores and lesions in biological membranes. By applying hemolysis, calcein release and differential dynamic calorimetry measurements, we wanted to demonstrate the influence of temperature, charge and type of phospholipids on poly-APS activity. We also wanted to check how poly-APS in different conditions effect various natural and artificial membrane systems. We concluded that the charge of the lipid bilayer doesn't have a major effect on permeabilisation, although it has a considerably affects the binding of poly-APS to the lipid bilayer. The phospholipid types have a considerably greater effect on permeabilisation than the charge. We also noticed that the temperature does not influence the poly-APS as much as we anticipated. On the other hand, it greatly affects the physical state of both erythrocyte cell membrane, and lipid bilayer in liposomes (made from DPPC, POPC, DPPS and DPPC/POPC (1/1) in DPPS/POPC (1/1) lipids), which both become more sensitive to poly-APS activity at low temperatures. At low concentrations, poly-APS induce the formation of reversible pores and increase the permeability of the cell membrane, which can have beneficial effects when transferring macromolecules (medical substances and gene material) into cells in the process called transfection.

## 7 VIRI

Bendzko P.I., Wolfgang A.P., Privalov P.L., Tiktopulo E.I. 1988. Temperature-induced phase transitions in proteins and lipids volume and heat capacity effects. *Biophysical Chemistry*, 29: 301-307

Chernitsky E.A., Senkovich 1997. Erythrocyte hemolysis by detergents. *Membrane & Cell Biology*, 11,4: 475-485

Cevce G. Marsh D. 1987. Phospholipid bilayers. New York, John Wiley & Sons: 369-406

Chelossi E., Mancini I., Sepčić K., Turk T., Faimali M. 2006 Comparative antibacterial activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* and their synthetic analogues. *Biomolecular Engineering*, 23: 317-323

Constantinescu A., Frangopol P.T., Bajenaru L., Niculescu M., Magineanu D.G. 1987. Temperature dependence of the tertiary amines on osmotic hemolysis. *Biomedica et Biochimica Acta*, 46: 67-73

Crowe J.H., Tablin F., Tsvetkova N., Oliver A.E., Walker N., Crowe L.M. 1999. Are lipid phase transitions responsible for chilling damage in human platelets. *Cryobiology*, 38: 180-191

Dolgan K. 2003. Raziskave interakcij hemolitičnega proteina iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) z lipidnimi membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 37str.

Dauidsen J., Mouritsen O.G., Jorgensen K. 2002. Synergistic permeability enhancing effect of lysophospholipids and fatty acids on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1564: 256-262

DeGrado W.F., Musso G.F., Lieber M., Kaiser E.T., Kezdy F.J. 1982. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by synthetic melittin analogue. *Biophysical Journal*, 37: 329-338

Fritz J. 1998. Termodinamika vezanja ekvinatoksina II z modelnimi lipidnimi membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 58 str.

Gershfeld N.L., Murayama M. 1988. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *Journal of Membrane Biology*, 18: 67-72

Higashino Y., Matsui A., Ohki K. 2001. Membrane fusion between liposomes composed of acidic phospholipids and neutral phospholipids induced by melittin: a differential scanning calorimetric study. *Journal of Biochemistry*, 130: 393-397

Hoyrup P., Dauidsen J., Jorgensen K. 2001. Lipid membrane partitioning of lysolipids and fatty acids: effects of membrane phase structure and detergent chain length. *Journal of Physical Chemistry*, 105: 2649-2657

Kitagawa T., Inoue K., Nojima S. 1975. Effect of temperature on hemolysis of human erythrocytes induced by dilauroyllecithin. *Journal of Biochemistry*, 78: 431-434

London E. 2002. Insight into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486



Malovrh P. 1997. Vpliv dvovalentnih kovinskih kationov na koloidno-osmotsko hemolizo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 37 str.

Malovrh P., Sepčič K., Turk T., Maček P. 1999. Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 124, 2: 221-226

de la Maza A., Parra J.L. 1995. Solubilizing effects caused by alkyl pyridinium surfactants in phosphatidylcholine liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 77, 1: 79-87

McLaggan D., Adjimatera N., Sepčič K., Jaspars M., Macewan D.J., Blagbrough I.S., Scott R.H. 2006. Pore forming polyalkylpyridinium salts from marine sponges versus synthetic lipofection systems: distinct tools for intracellular delivery of cDNA and siRNA. *BMC Biotechnology*, 6, 1:6 -6  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/6>

McClelland D., Evans R.M., Abidin I., Sharma S., Choudhry F.Z., Jaspars M., Sepčič K., Scott R.H. 2003. Irreversible and reversible pore formation by polymeric alkylpyridinium salts (poly-APS) from the sponge *Reniera sarai*. *British Journal of Pharmacology*, 139: 1399-1408

Nelson D.L., Cox M.M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Worth Publisher: 1152 str.

Peričin D., Leskovac V. 1980. Influence of temperature on hemolysis of erythrocytes by Digitonin. *Blut*, 41: 41-46

Richieri G.V., Howard C.M. 1985. Temperature effect on osmotic fragility, and the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 813: 41-50

Scott R.H., Tucker S.J., Evans R.M., MacEwan D.J., Jaspars M., Sepčič K. 2004. Cell membrane permeabilisation by alkylpyridinium sponge toxin preparations and their utilisation as novel transfection reagents. V: Neurotoxicological targets from functional genomics & proteomics. Proceedings of Neurotox'03, Neurotoxicological Targets from Functional Genomics & Proteomics, University of Nottingham, 1-4 September 2003. Beadle D.J., Mellor I.R., Usherwood P.N.R. (eds). London, Society of Chemical Industry (SCI): 51-58

Senkovich O.A., Chernitsky E.A. 1998. On the size of pores arising in erythrocytes under the action of detergents. *Membrane & Cell Biology*, 11: 679–89

Sepčič K., Guella G., Mancini I., Pietra F., Serra M.D., Menestrina G., Tubbs K., Maček P., Turk T. 1997a. Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. *Journal of Natural Products*, 10: 991-996

Sepčič K., Batista U., Vacelet J., Maček P., Turk T. 1997b. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C: 47-53

Sepčič K., Marcel V., Kläbe A., Turk T., Šuput D., Fournier D. 1998. Inhibition of acetylcholinesterase by an alkyl pyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387: 217-225

Sepčič K., Poklar N., Vesnaver G., Fournier D., Turk T., Maček P. 1999. Interaction of 3-alkylpyridinium polymers from the sea sponge *Reniera sarai* with insect acetylcholinesterase. *Journal of Protein Chemistry*, 18: 251-257

Shalel S., Streichman S., Marmur A. 2002. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. *Journal of Colloid and Interface Science*, 252: 66–76

Tanaka Y., Inoue K., Nojima S. 1980. Interaction of dilauroylglycerophosphocholine with erythrocytes pre-hemolytic events and hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 600: 126-139

Tucker S.J., McClelland D., Jaspars M., Sepčić K., MacEwan D.J., Scott R.H. 2003. The influence of alkylpyridinium sponge toxins on membrane properties, cytotoxicity, transfection and protein expression in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614: 171-181

Urbaneja M.A., Alonso A., Gonzalez-Manas J.M., Goni F.M., Partearroyo M.A., Tribout M., Paredes S. 1990. Detergent solubilization of phospholipid vesicle. Effect of electric charge. *Biochemical Journal*, 270:305-308

Van Deenen L.L.M., Gier J. 1974. *The red blood cell: lipids of the red cell membrane*. New York, Academic Press: 147-211

Varricchio F., Doorenbos N.J., Stevens A. 1967. Effect of azasteroids on gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*: 93, 2: 627-635

De Vendittis E., Palumbo G., Parlato G., Bocchini V. 1981. A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants. *Analytical Biochemistry*, 115: 278-286

Weltzein H.U. 1979. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559: 259-287

Weltzein H.U., Arnold B., Kalkoff H.G. 1976. Quantitative studies on lysolecithin mediated hemolysis: benzylated lysolecithin as a probe to study effects of temperature and red cell species on the hemolytic reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455: 56-65

Yawata Y. 2003. Cell membrane, the red blood cell as a model. Weinheim, WILEY-VHC  
Verlag: 439 str.

## **ZAHVALA**

Največja zahvala gre prof. dr. Kristini Sepčič, ki mi je res bila v veliko pomoč in vzpodbudo tako pri laboratorijskem delu kot pri pisanju diplomskega dela. Hvala tudi mentorju prof.dr. Tomu Turku ter somentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih za nasvete pri pisanju in dopolnjevanju diplomskega dela ter pomoči in svetovanju pri laboratorijskem delu.

Hvala vsem sodelavcem Katedre za biokemijo Oddelka za biologijo in Katedre za kemijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete. Hvala za nasvete in prijetno družbo pri delu.

In še na koncu hvala mojim staršem in celi družini za moralno in finančno pomoč tekom celotnega študija.