

Sławomir Kalinowski

**WPLYW POTENCJAŁU POLARYZUJĄCEGO NA
POJEMNOŚĆ DWUWARSTWOWYCH MEMBRAN
LIPIDOWYCH**

Praca doktorska przedłożona
Radzie Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Promotor prof. dr hab. Zbigniew Figaszewski

Instytut Chemii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy,
Filia Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku

Białystok 1996

Spis treści

1. Wstęp.....	7
---------------	---

PRZEGLĄD LITERATURY

2. Historia badań zjawisk membranowych.....	9
3. Budowa błon biologicznych i sztucznych membran.....	10
4. Składniki membran lipidowych i ich właściwości.....	11
4.1. Naturalne lipidy membranowe.....	12
4.2. Syntetyczne lipidy.....	13
4.3. Polimorfizm lipidów.....	13
4.4. Przemiany fazowe w lipidach.....	15
5. Właściwości fizykochemiczne dwuwarstwowych membran lipidowych.....	15
5.1. Grubość membran.....	16
5.2. Przewodnictwo membran.....	16
5.3. Pojemność membran.....	17
5.4. Potencjały membranowe.....	19
5.4.1. Potencjały granicy faz.....	19
5.4.2. Potencjały membranowe.....	22
5.4.3. Rozkład potencjałów w dwuwarstwach lipidowych.....	24
5.5. Transport przez membrany.....	26
5.6. Płynność membran.....	27
5.7. Właściwości optyczne membran.....	28
5.8. Zjawiska fotoelektryczne w membranach.....	28
5.9. Pory w membranach.....	29
6. Czynniki wpływające na pojemność membran lipidowych.....	29
6.1. Zmiany pojemności w czasie.....	31
6.2. Rodzaj lipidów.....	32
6.3. Sposób tworzenia membran.....	33
6.4. Rozpuszczalniki.....	33
6.5. Skład roztworu elektrolitu.....	35
6.6. Temperatura.....	33
6.7. Częstotliwość.....	37
6.8. Napięcie.....	38
6.9. Obrzeże Plateau-Gibbsa.....	41
7. Metody pomiaru pojemności membran lipidowych.....	42
7.1. Pomiar prądu pojemnościowego.....	43

7.1.1. Pomiary przy użyciu sygnału sinusoidalnego.....	44
7.1.2. Pomiary przy użyciu sygnału o przebiegu trójkątnym.....	45
7.1.3. Pomiar potencjału minimalnej pojemności.....	46
7.2. Metody mostkowe	47
7.3. Metody impulsowe	48
7.3.1. Układy całkujące.....	49
7.3.2. Układy różniczkujące.....	50
7.3.3. Układy z ładowaniem impulsowym.....	51
7.3.4. Metoda kompensacyjna.....	52
8. Zastosowanie badań pojemności membran lipidowych.....	53
8.1. Badanie procesów formowania i stabilności membran	53
8.2. Pomiary grubości membran.....	54
8.3. Badanie procesów transportu przez membrany.....	54
8.4. Badania potencjałów membranowych.....	54
8.5. Badanie efektów fotoelektrycznych	55
8.6. Badanie tworzenia porów w membranach.....	56

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

9. Cele i struktura pracy.....	57
10. Aparatura pomiarowa	59
10.1. Struktura systemu pomiarowego	59
10.2. Opis metody pomiaru pojemności.....	62
10.3. 2-elektrodowy układ do pomiaru pojemności	65
10.4. 4-elektrodowy układ do pomiaru pojemności	69
10.5. Potencjostat-galwanostat	71
10.6. Oprogramowanie	75
10.7. Układ optyczny	77
10.8. Naczynie pomiarowe	79
11. Odczynniki i roztwory.....	80
11.1. Roztwory elektrolitów	82
11.2. Roztwory formujące	82
11.3. Elektrody.....	83
12. Metoda formowania membran lipidowych	84
13. Badanie procesu formowania membran	85
13.1. Etapy formowania się dwuwarstw lipidowych.....	85
13.2. Wpływ rodzaju n-alkanów na proces formowania membran	89
13.3. Wpływ dodatku alkoholu na proces formowania membran	92

13.4. Wpływ rodzaju lipidów na proces formowania membran.....	96
13.5. Wpływ składu elektrolitu na proces formowania membran	99
13.6. Napięcie przebicia membran	102
13.7. Rezystancja membran	104
13.8. Podsumowanie rozdziału	106
13.8.1. Proces tworzenia się dwuwarstwowych membran lipidowych.....	107
13.8.2. Rola obrzeża w procesie formowania membran	109
13.8.3. Dobór składu roztworów formujących i elektrolitu	110
14. Wpływ pola powierzchni na pojemność specyficzną membran.....	111
15. Badanie zmian pojemności pod wpływem potencjału polaryzującego	118
15.1. Zmiany pola powierzchni dwuwarstwy	121
15.2. Zmiany pojemności specyficznej membran	126
15.3. Kinetyka zmian pojemności	130
15.4. Dyskusja wyników	135
16. Badania potencjału minimalnej pojemności.....	138
17. Zastosowanie chronopotencjometrii w badaniach zjawisk membranowych.....	150
17.1. Pomiary pojemności membran	150
17.2. Charakterystyki pojemność-napięcie.....	155
17.3. Badania odwracalnego przebicia membran	156
18. Podsumowanie.....	161
19. Perspektywy dalszych badań.....	167
20. Streszczenie	168
21. Literatura	170

1. Wstęp

Podstawowym elementem strukturalnym żywych organizmów jest komórka. Mogą one istnieć dzięki błonom, które oddzielają wewnątrz komórek od otoczenia, a także oddzielają organelle wewnątrzkomórkowe. Błony te określane są jako błony biologiczne lub biomembrany. W biomembranach zachodzi wiele procesów, które zapewniają komórkom utrzymanie procesów życiowych i prawidłowe funkcjonowanie. Procesy zachodzące w błonach biologicznych związane są ze zjawiskami elektrycznymi takimi jak transport jonów przez błony, istnienie potencjałów membranowych, przenoszenie sygnałów przez komórki nerwowe.

Żywe komórki są obiektami niezwykle skomplikowanymi. Poznanie funkcjonowania całych komórek i ich poszczególnych elementów ma duże znaczenie w medycynie, biologii, rolnictwie. Dzięki wynalezieniu metod tworzenia sztucznych membran, łatwiejsze stały się badania funkcji i właściwości błon biologicznych. Możliwość tworzenia płaskich membran umożliwiła wykorzystanie do badań szeregu technik elektroanalitycznych np. chronoamperometrii, potencjometrii, chronowolt-amperometrii.

Sztuczne membrany lipidowe wykorzystywane są nie tylko do modelowego badania funkcjonowania błon biologicznych. Na bazie membran lipidowych tworzone są czujniki reagujące na różnorodne czynniki zewnętrzne np. obecność określonych substancji, temperaturę, światło.

Badania związane ze zjawiskami w płaskich membranach lipidowych są jednak bardzo uciążliwe i trudne. Dał temu wyraz White we wstępie do swej publikacji [1] pisząc: *"Płaskie membrany mogą być niewiarygodnie frustrujące. My wszyscy, którzy pracujemy z nimi, możemy organicznie irracjonalne (lecz satysfakcjonujące) wybuchy złości. Frustracje te powstają wtedy, gdy nieświadomie próbuje zrobić się coś, co jest termodynamicznie nieprawdopodobne. W miarę, jak wzrastała moja znajomość chemii fizycznej tych układów, zmniejszała się liczba zlewek rzuconych i rozbijanych o ścianę laboratorium"*.

Dwuwarstwowe membrany lipidowe zainteresowały mnie ze względu na ich potencjalne możliwości jako modeli błon biologicznych i możliwość wykorzystania ich do tworzenia biosensorów. Po zrobieniu naczynia pomiarowego, które umożliwiło mi tworzenie płaskich membran lipidowych, powstał problem, jak śledzić proces ich formowania. Wiedząc, że charakterystycznym parametrem elektrycznym membran jest ich pojemność elektryczna, konstruowałem elektroniczne układy pomiarowe umożliwiające pomiar pojemności. Podczas tych

prac stwierdziłem, że pojemność membran w dużym stopniu zależy od napięcia przyłożonego do membrany. Poszukując w literaturze prac dotyczących tego zjawiska znalazłem publikację, która po raz pierwszy opisywała to zjawisko w 1966 roku [2]. Jest ono jednak dotychczas w małym stopniu poznane i nie jest powszechnie stosowane w badaniach zjawisk membranowych. Wykorzystanie tego zjawiska w badaniach membran umożliwi wykonanie pomiarów trudnych do przeprowadzenia innymi metodami np. badania potencjałów powierzchniowych membran. Na przeszkodzie w szerszym wykorzystaniu pomiarów pojemności w badaniach membran jest niedostatecznie rozwinięta metodyka pomiarów i brak jest odpowiedniej aparatury pomiarowej.

Celem pracy było stworzenie podstaw do dalszych badań, gdzie pomiary pojemności polaryzowanych napięciowo membran stanowią będą punkt wyjściowy przy tworzeniu biosensorów i badaniach struktury membran. Z tego powodu część eksperymentalna pracy zawiera kilka rozdziałów, gdzie elementem łączącym poszczególne rozdziały jest pojemność membran. Praca ta prowadzona była w kilku kierunkach:

- rozwój technik pomiarowych i aparatury,
- rozwój metodyki pomiarów,
- badania pojemności membran: pojemność podczas procesu formowania dwuwarstw, charakterystyki pojemność-napięcie, kinetyka zmian pojemności, badania potencjału minimalnej pojemności,
- zastosowanie chronopotencjometrii w pomiarach pojemności.

W części literaturowej pracy zawarte są informacje dotyczące fizykochemicznych parametrów sztucznych membran i błon biologicznych. Następne rozdziały opisują czynniki wpływające na pojemność membran, metody pomiaru pojemności i zastosowanie pomiarów pojemności. Na tle tych rozdziałów, w części eksperymentalnej pracy opisana jest nowa metoda i sprzęt do pomiarów pojemności membran.

PRZEGLĄD LITERATURY

2. Historia badań zjawisk membranowych

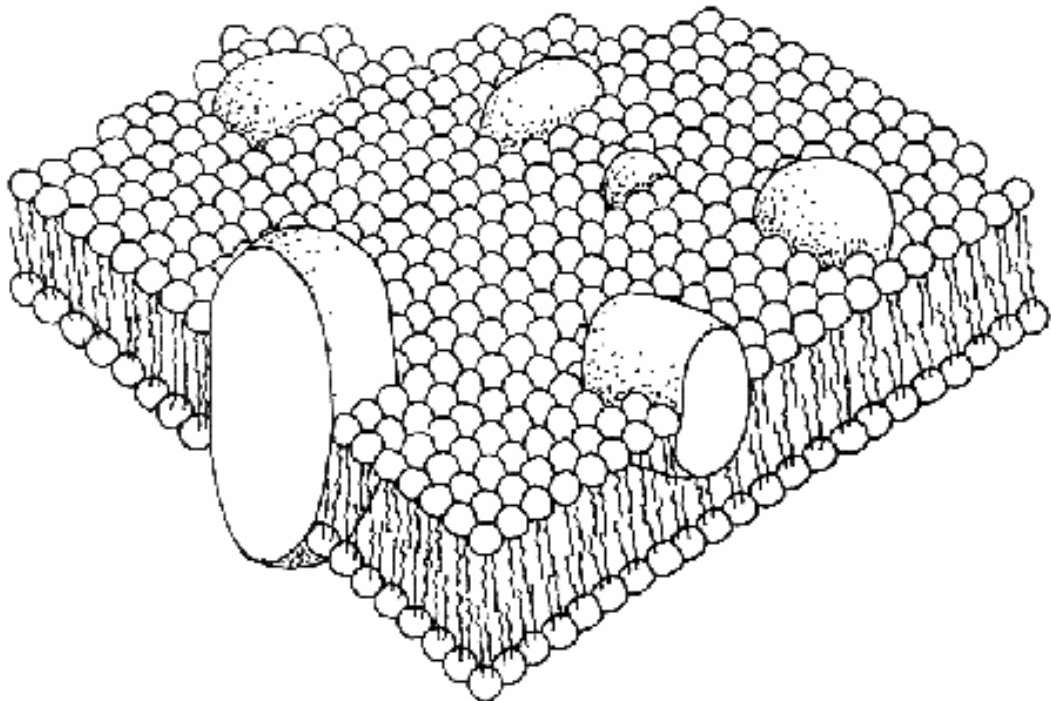
Rozwój badań sztucznych membran lipidowych zapoczątkowany został przez odkrycia związane z błonami biologicznymi. Wynalezienie sposobów tworzenia sztucznych membran o właściwościach błon biologicznych pozwoliło na znaczne rozszerzenie wiedzy o błonach biologicznych. Poniżej przedstawiony jest krótki rys historyczny ważniejszych osiągnięć naukowych z tej dziedziny:

- XIX w. - Schwann pierwszy zasugerował istnienie wyraźnej membrany oddzielającej plazmę komórki od otoczenia,
- 1855 - Nageli wskazał na istnienie błon biologicznych,
- 1899 - Overton wykrył obecność lipidów w błonach biologicznych,
- 1914 - Beutner użył polarnych olejów do tworzenia membran i przeprowadził pierwsze szczegółowe badania tych membran,
- 1917 - Langmuir rozwinął technikę badania właściwości monowarstw lipidowych pokrywających powierzchnię cieczy,
- 1925 - korzystając z doświadczeń Langmuira, Gorter i Grendel wykazali, że lipidy znajdujące się w błonie komórkowej wystarczają do utworzenia monowarstwy o powierzchni dwukrotnie większej od powierzchni komórek, z których były izolowane. Na tej podstawie zaproponowali model błony komórkowej zbudowanej z dwóch monowarstw lipidowych,
- 1935 - Davson i Danielli zaproponowali model błony komórkowej, w którym proteiny z dwóch stron pokrywają dwuwarstwę lipidową,
- 1961 - Mueller i współpracownicy wynaleźli prosty sposób tworzenia sztucznych dwuwarstwowych membran lipidowych, wykorzystujący zjawisko samoorganizacji lipidów w dwuwarstwę,
- 1972 - Montal i współpracownicy opracowali metodę tworzenia membran lipidowych poprzez łączenie monowarstw,
- 1972 - Singer i Nicholson opublikowali swój model budowy błony komórkowej, powszechnie akceptowany do dziś, nazwany modelem płynnej mozaiki.

3. Budowa błon biologicznych i sztucznych membran

Dwuwarstwy lipidowe są podstawowym elementem strukturalnym błon biologicznych np. błon komórkowych, błon mitochondrialnych, błon chloroplastów. Błony biologiczne spełniają różnorodne funkcje np. oddzielają wnętrze komórki od otoczenia, określają kształt komórki, biorą udział w przekazywaniu sygnałów między komórką i otoczeniem, uczestniczą w procesach rozpoznawania pomiędzy komórkami, uczestniczą w transporcie substancji między komórką i otoczeniem.

Powszechnie akceptowany obecnie model błony komórkowej opublikowany został w 1972 r. przez Singera i Nicholsona [3]. Podstawowe elementy strukturalne błon komórkowych przedstawione są na rysunku 3.1. Przedstawiony model nazwany został przez jego twórców modelem płynnej mozaiki. Model ten był jeszcze dalej udoskonalany [4], jednak podstawowe założenia modelu pozostają nie zmienione.



Rys. 3.1. Podstawowe elementy strukturalne błony komórkowej wg modelu Singera i Nicholsona [3].

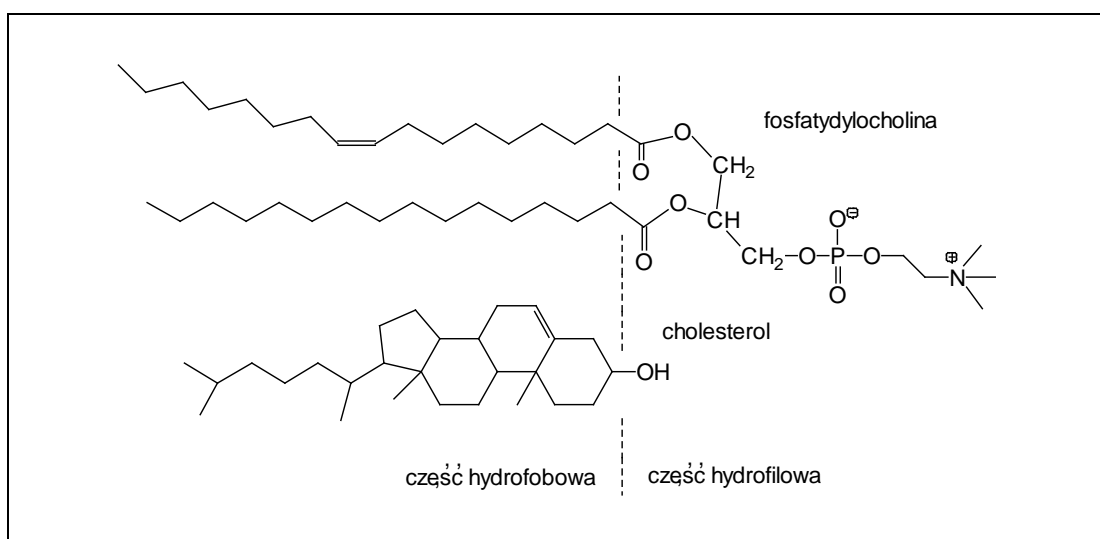
W budowie strukturalnej błon biologicznych główną rolę grają lipidy. Podstawową cechą lipidów membranowych jest ich zdolność do samoorganizacji. Ich budowa i właściwości fizykochemiczne powodują, że jedną z energetycznie uprzywilejowanych struktur jest dwuwarstwa. Łańcuchy węglowe lipidów tworzą

hydrofobowe wnętrze membrany, nadając jej szczególne właściwości fizykochemiczne. Wnętrze membrany stanowi barierę nie do przebycia dla małych jonów i większości substancji niejonowych. Dwuwarstwa lipidowa posiada rezystancję właściwą stawiającą ją w rzędzie najlepszych izolatorów. Środowisko, które tworzą lipidy zorganizowane w dwuwarstwę, stanowi matrycę, w której znajdują się białka odpowiedzialne za procesy życiowe komórek.

Białka stanowią 40-70% masy błon biologicznych. Większość białek błonowych jest enzymami. Wiele białek błonowych jest glikoproteinami i zawiera łańcuchy oligosacharydów. Rysunek 3.1 przedstawia białka błonowe różnych typów. Niektóre białka wystają z dwóch stron membrany, inne tylko częściowo zagłębiają się w membranie. Jest również duża grupa białek powierzchniowych, łączących się jedynie z polarną powierzchnią membrany.

4. Składniki membran lipidowych i ich właściwości

Lipidy stanowią podstawowy element budulcowy błon. Lipidy błonowe posiadają wspólną cechę, a mianowicie amfifilowość. Wykazują one powinowactwo zarówno do środowiska polarnego jak i niepolarnego. W ich budowie można wyróżnić dwa człony: wydłużoną część hydrofobową i grupę hydrofilową. Na rysunku 4.1 przedstawione są cząsteczki lipidów o właściwościach amfifilowych: fosfatydylocholina i cholesterolu.



Rys. 4.1. Budowa cząsteczek lipidów o właściwościach amfifilowych: fosfatydylocholina i cholesterolu.

Od składu lipidowego membrany zależą jej podstawowe właściwości fizykochemiczne jak np. płynność, przemiany fazowe, przepuszczalność, potencjały powierzchniowe. Lipidy wpływają również na działanie i aktywność białek tworzących układy regulacji i transportu.

Sztuczne membrany lipidowe mogą być tworzone zarówno z naturalnych lipidów, jak też i syntetycznych. Naturalne lipidy pozwalają na tworzenie membran o cechach zbliżających je do błon biologicznych, natomiast stosowanie syntetycznych lipidów pozwala na tworzenie membran o określonych parametrach np. grubości, płynności, ładunku powierzchniowym, właściwościach fluorescencyjnych, spektroskopowych.

4.1. Naturalne lipidy membranowe

Lipidy występujące w błonach biologicznych należą do kilku podstawowych grup. Najliczniejszą grupą są glicerofosfolipidy: fosfatydylocholina (lecytyna), fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol, kardiolipina. W błonach biologicznych występują również pochodne sfingozyny (sfingomielina, cerebrozyd). Do lipidów zaliczane są również sterole. W komórkach zwierzęcych w dużych ilościach występuje cholesterol.

Niektóre błony biologiczne np. komórek nowotworowych zawierają także inne, nietypowe lipidy [5]. Organizmy żyjące w środowiskach o wysokiej temperaturze (gejzery, gorące źródła) wytwarzają lipidy o szczególnych właściwościach. Są to długie np. 32-węglowe łańcuchy z grupami hydrofilowymi na obu końcach. Lipidy takie "spinają" monowarstwy lipidowe i stabilizują je [6,7].

Długość łańcuchów węglowych oraz ilość i rozmieszczenie podwójnych wiązań są zmienne w zależności od rodzaju komórek i błon. Zależą również od stanu komórek i środowiska, w którym żyją. Łańcuchy węglowe mają długość od 12 do 24 atomów w łańcuchu. Lipidy błony wątroby szczura zawierają najwięcej łańcuchów węglowych (liczba atomów węgla : liczba wiązań podwójnych) 15:0, 16:1, 17:0, 18:0, 20:4 [8], natomiast lipidy błony erytrocytów ludzkich zawierają głównie łańcuchy 16:0, 18:0, 18:1 [9].

Skład i rola poszczególnych lipidów w błonach biologicznych była przedmiotem wielu badań [10-15]. Szczególną rolę w błonach biologicznych pełni cholesterol. Jego wpływ na właściwości i funkcjonowanie błon biologicznych był przedmiotem zainteresowania wielu badaczy [16-21]. Wiele uwagi poświęcono oddziaływaniom pomiędzy lipidami i białkami w błonach biologicznych [22-33].

Do tworzenia sztucznych membran lipidowych stosowane są zwykle lipidy ekstrahowane z naturalnych surowców np: tkanek zwierzęcych, żółtek jaj, soi. Stosowano ekstrakty zawierające cały szereg lipidów np. ekstrakty z mózgow wołowych. Częściej jednak stosuje się poszczególne rodzaje lipidów wyizolowane z mieszaniny. Jednak i te są mieszaniną cząsteczek zawierających łańcuchy węglowe o różnej długości i liczbie podwójnych wiązań. Dalsze rozdzielanie jest procesem czasochłonnym i kosztownym. Czysty cholesterol nie jest używany do tworzenia membran, nie tworzy dwuwarstw o płynnej strukturze. Membrany mogą być jednak formowane z "utlenionego cholesterolu", który jest mieszaniną wielu produktów reakcji cholesterolu z tlenem [34-35].

4.2. Syntetyczne lipidy

Dzięki stosowaniu syntetycznych lipidów możliwe stało się zbadanie wpływu poszczególnych grup w lipidach na właściwości membran takie jak stabilność, grubość, przewodnictwo, pojemność, przepuszczalność, płynność, przemiany fazowe, aktywność rekonstruowanych układów z błon biologicznych, dyfuzję cząsteczek w płaszczyźnie membrany, przeskoki cząsteczek lipidów pomiędzy monowarstwami tzw. "flip flop" [36-39].

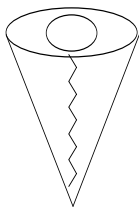
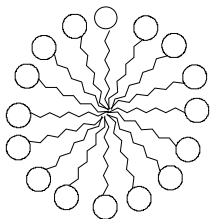
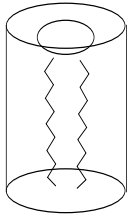
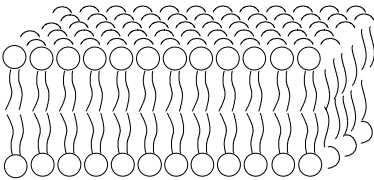
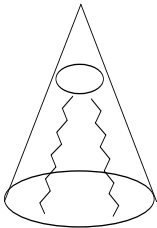
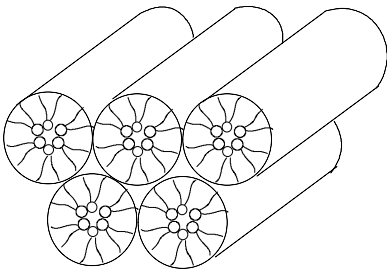
Stosując syntetyczne lipidy można nadać membranom szczególne właściwości np. kompleksujące, magnetyczne, fluorescencyjne [40-42]. Syntetyczne lipidy pozwalają na tworzenie membran o dużej trwałości, powyżej 1 dnia [43]. Niektóre lipidy mogą być polimeryzowane w membranach [44-45]. Podczas syntezy można lipidom nadać cechy, umożliwiające wykorzystanie ich przy budowie przetworników molekularnych i biosensorów [46]. Niektóre lipidy zdolne są do tworzenia agregatów w środowisku niewodnym [47-48]. Syntezowane były lipidy zawierające atomy fluoru w grupach polarnych [49], glicerydy zawierające jeden lub trzy łańcuchy węglowe w cząsteczce [50].

4.3. Polimorfizm lipidów

Polarne lipidy wykazują tendencje do tworzenia różnego rodzaju struktur w środowisku wodnym. Rodzaj tych struktur zależy od rodzaju i stężenia lipidów, temperatury, pH środowiska. Cząsteczki lipidów przyjmują w przestrzeni różne kształty, które określają rodzaj struktury tworzonej fazy (Tab. 4.1). Sposób upakowania lipidów w dwuwarstwowych strukturach zależy od ilości

łańcuchów węglowych w cząsteczce lipidu i od obecności wiązań podwójnych w łańcuchach. Gdy cząsteczki przyjmują kształt walca np. fosfatydylocholina, w środowisku wodnym uprzywilejowaną formą występowania są płaskie dwuwarstwowe struktury. Cząsteczki posiadające kształt stożka (pojedynczy łańcuch węglowy i duża grupa polarna) tworzą w środowisku wodnym micelle.

Tab. 4.1. Wpływ kształtu cząsteczek lipidów na tworzone struktury.

Lipidy	Kształt cząsteczek	Tworzona struktura
lizofosfolipidy detergenty	odwrócony stożek 	micelle 
fosfatydylocholina sfingomielina fosfatydyloseryna fosfatydyloinozytol fosfatydyloglicerol kwas fosfatydowy kardiolipina digalaktoszogliceryd	cylinder 	dwuwarstwy (L) 
fosfatydyloetanolamina (nienasycona) kardiolipina-Ca ²⁺ kwas fosfatydowy-Ca ²⁺ (pH<6.0) kwas fosfatydowy (pH<3.0) fosfatydyloseryna (pH<4.0) monogalaktoszogliceryd	stożek 	struktury heksagonalne (H) 

Głównymi siłami stabilizującymi uwodnione agregaty lipidowe są oddziaływania hydrofobowe. Układ woda-lipidy wymusza taką orientację lipidów, przy której kontakt wody z hydrofobowymi częściami cząsteczek lipidów jest najmniejszy. Następnym czynnikiem stabilizującym agregaty lipidowe są

oddziaływania van der Waalsa. Są to słabe siły, występują pomiędzy sąsiadującymi ze sobą łańcuchami węglowymi. Pomiedzy hydrofilowymi grupami cząsteczek niektórych lipidów mogą występować również wiązania wodorowe np. pomiędzy cząsteczkami fosfatydyloetanolaminy [51]. Dwuwartościowe kationy obecne w roztworze wodnym mogą dodatkowo stabilizować struktury lipidowe poprzez tworzenie mostków pomiędzy anionowymi lipidami.

4.4. Przemiany fazowe w lipidach

Na właściwości fizykochemiczne dwuwarstw lipidowych duży wpływ ma temperatura. Większość lipidów może występować w dwóch fazach: fazie żelowej lub ciekłokrystalicznej. W niektórych lipidach np. fosfatydylocholinie występuje jeszcze jedno przejście fazowe, występuje faza pomarszczona.

Temperatury, przy których zachodzą przejścia fazowe zależą od rodzaju lipidów, długości łańcuchów węglowych lipidów, liczby, rozmieszczenia i typu wiązań podwójnych w łańcuchach [52-56]. Duży wpływ na przejścia fazowe w membranach ma obecność cholesterolu [19,21]. Wpływa on na organizację łańcuchów węglowych wewnątrz membrany, lecz nie wpływa na ustawienia grup hydrofilowych. Obecność wody również wpływa na przejścia fazowe [57-59].

5. Właściwości fizykochemiczne dwuwarstwowych membran lipidowych

Lipidy membranowe rozproszone w środowisku wodnym posiadają zdolność do samoorganizacji. Jedną ze struktur energetycznie uprzywilejowanych, która może powstawać w środowisku wodnym, jest dwuwarstwa. Dwuwarstwy lipidowe określane są często w literaturze jako układy 2-wymiarowe. Dwuwarstwowe membrany posiadają kilka cech nadających im szczególne właściwości fizykochemiczne [35]:

- bardzo mała grubość membran,
- warstwowa budowa,
- właściwości anizotropowe,
- półprzepuszczalność membran,
- płynność membran,
- zdolność do samoorganizacji.

5.1. Grubość membran

Dwuwarstwowe membrany lipidowe posiadają bardzo małą grubość, równą grubości dwóch monowarstw lipidów tworzących membrane. Grubość membran zawiera się w granicach 4-13 nm [60]. Dokładna grubość membran jest jednak trudna do określenia, gdyż jest zmienna. Czynniki zewnętrzne (np. napięcie przyłożone do membrany) powodują zmiany grubości zarówno warstwy hydrofobowej jak i hydrofilowej (zmiany orientacji grup hydrofilowych np. w wyniku zmian siły jonowej roztworu wodnego).

Pomiary grubości membran wykonywane są metodami elektrycznymi i optycznymi. Na podstawie pomiarów pojemności wyznaczana jest grubość obszaru hydrofobowego membrany [50,61-64]. Konieczna jest do tego znajomość przenikalności elektrycznej warstwy hydrofobowej, którą można określić na podstawie teoretycznych rozważań [65]. Pomiary impedancji membran pozwalają również na wyznaczenie grubości warstw hydrofilowych [66,67].

Na podstawie natężenia światła odbitego od membrany wyznacza się jej całkowitą grubość [64,68,69]. Do pomiarów grubości membran osadzonych na metalu wykorzystano również skaningową mikroskopię tunelową [70].

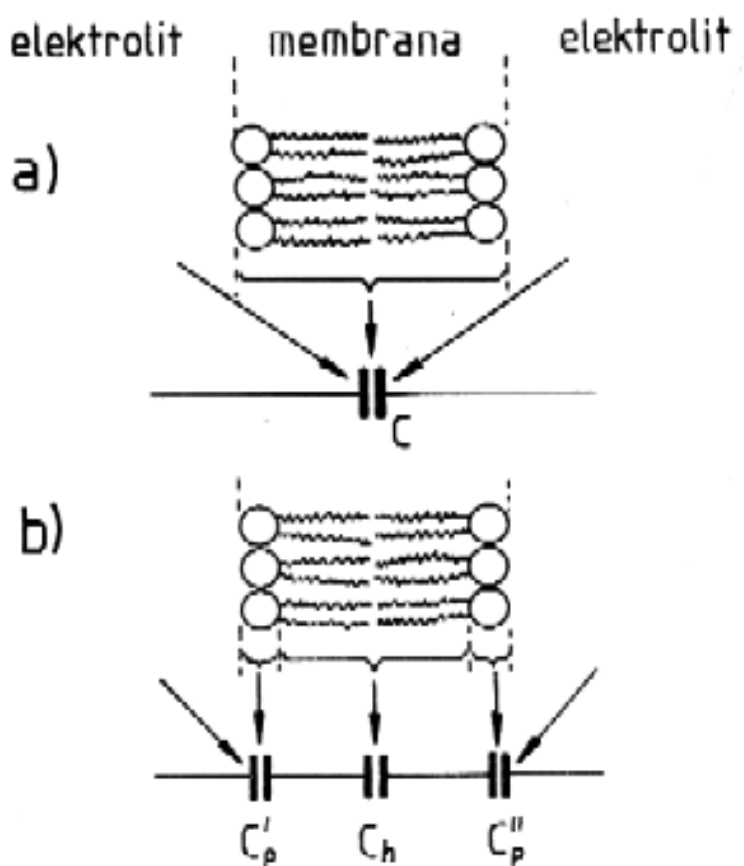
5.2. Przewodnictwo membran

Membrany lipidowe bez obecności substancji modyfikujących ich właściwości są dobrymi izolatorami elektrycznymi. Typowa rezystancja membran z lecytyny wynosi $10^8 - 10^{10} \Omega \cdot \text{cm}^2$ [35]. Rezystancja niemodyfikowanych membran lipidowych jest wielkością nieodtworzalną, odtwarzalny jest jedynie rząd wielkości. Obserwowane niewielkie przewodnictwo może być powodowane prądami płynącymi w miejscu styku membrany z powierzchnią przegrody, prądami płynącymi po powierzchni naczynia pomiarowego, prądami płynącymi w miejscach krystalizacji lipidów w membranie [35].

Obecność w roztworze jonów o właściwościach lipofilowych może drastycznie zmniejszyć rezystancję membrany, np. J^- , aniony tetrafenyloboranowe, kationy tetraalkiloamoniumowe [71-75]. Rezystancja membrany może być również zmniejszona przez substancje obecne w membranie, ułatwiające przenikanie jonów przez membranę np. jonofory, białka transportowe, białka porynowe [8,76-82]. Obecność w membranie cząsteczek przenoszących elektrony również zmniejsza rezystancję membrany [83-87].

5.3. Pojemność membran

Dwuwarstwowa membrana lipidowa wraz z elektrolitami tworzy kondensator, w którym membrana jest dielektrykiem, natomiast elektrolity przylegające do membrany są okładkami kondensatora. Membrana nie posiada jednak jednolitej struktury. Pod względem właściwości fizykochemicznych w membranie można wyróżnić trzy warstwy: dwie warstwy o właściwościach hydrofilowych, a między nimi warstwa hydrofobowa. Podczas badań membrana bywa traktowana jako pojedynczy kondensator (Rys. 5.1a) lub jako trzy szeregowo połączone kondensatory (Rys. 5.1b). Podczas niektórych badań membrana rozpatrywana jest jako szeregowe połączenie pięciu kondensatorów [66,67].



Rys. 5.1. Dwuwarstwa lipidowa jako pojedynczy kondensator (a) lub jako trzy szeregowo połączone kondensatory (b).

Gdy membrana traktowana jest jako pojedynczy kondensator, pojemność jej opisana jest równaniem:

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon S}{d} \quad (5.1)$$

gdzie: C - całkowita pojemność membrany
 ϵ_0 - przenikalność elektryczna próżni
 ϵ - efektywna względna przenikalność elektryczna membrany
 S - pole powierzchni membrany
 d - efektywna grubość membrany

Ze względu na niejednorodną strukturę membrany w opisie użyte zostało określenie "efektywna". Parametrem charakteryzującym membranę jest pojemność specyficzna C_M - pojemność przypadająca na jednostkę powierzchni membrany:

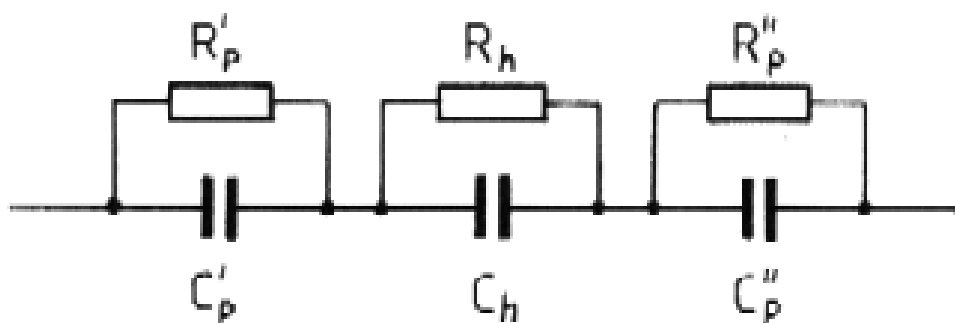
$$C_M = \frac{C}{S} = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{d} \quad (5.2)$$

Jeżeli membranę rozpatruje się jako szeregowe połączenie trzech kondensatorów, całkowita pojemność jest funkcją trzech składowych:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_p'} + \frac{1}{C_h} + \frac{1}{C_p''} \quad (5.3)$$

gdzie: C_p', C_p'' - pojemności warstw hydrofilowych
 C_h - pojemność warstwy hydrofobowej

Przy rozważaniach właściwości elektrycznych membran należy również uwzględniać rezystancje poszczególnych warstw (Rys. 5.2).



Rys. 5.2. Model elektryczny dwuwarstwowej membrany lipidowej uwzględniający pojemności i rezystancje warstw hydrofilowych i warstwy hydrofobowej.

Na podstawie teoretycznych rozważań oraz pomiarów impedancji membran określono pojemności i rezystancje poszczególnych warstw [66,67,88-91]. Pojemności warstw hydrofilowych są kilkadziesiąt razy większe od pojemności

warstwy hydrofobowej. Można więc z niewielkim błędem przyjąć, że całkowita pojemność membrany równa jest pojemności warstwy hydrofobowej. Natomiast rezystancje warstw hydrofilowych są o kilka rzędów wielkości mniejsze od rezystancji warstwy hydrofobowej. Dane liczbowe podane są w rozdziale 6 w tabeli 6.2.

5.4. Potencjały

Pod względem elektrycznym dwuwarszowe membrany lipidowe są obiektem bardzo złożonym. Pomiędzy roztworami elektrolitów znajdują się dwie podwójne warstwy elektryczne rozdzielone warstwą hydrofobową o grubości kilku nanometrów. W podwójnych warstwach elektrycznych związanych z membranami, do zjawisk adsorpcji rozpatrywanych w typowych granicach faz metal-roztwór, dochodzą zjawiska związane z właściwościami grup polarnych lipidów takie jak dysocjacja, asocjacja, orientacja przestrzenna, wiązania wodorowe, hydratacja, przestrzenny rozkład ładunków. Warstwy polarne membran wpływają na właściwości elektryczne części hydrofobowej membrany. W błonach biologicznych istnieje wiele białek, które dodatkowo wpływają na właściwości elektryczne membran, przy czym właściwości tych białek zależne są również od zjawisk elektrycznych zachodzących w membranach. Współzależności pomiędzy poszczególnymi składnikami membran i ich właściwościami powodują dużą komplikację zjawisk elektrycznych w membranach. Dyfuzja jonów przez membrany powoduje również zmiany w rozkładzie potencjałów w membranach.

Z membranami związany jest szereg potencjałów, których przyczyny powstawania i natura są odmienne. Niektóre z nich źródło swe mają w składzie i właściwościach elektrolitów, natomiast inne wynikają z budowy i właściwości membrany. Procesy elektryczne zachodzące na granicach faz metal-roztwór stanowią punkt wyjściowy do analizy właściwości elektrycznych membran. Opis zjawisk elektrycznych w membranach zawarty jest w wielu pracach np. [8,9,35,86,92,93].

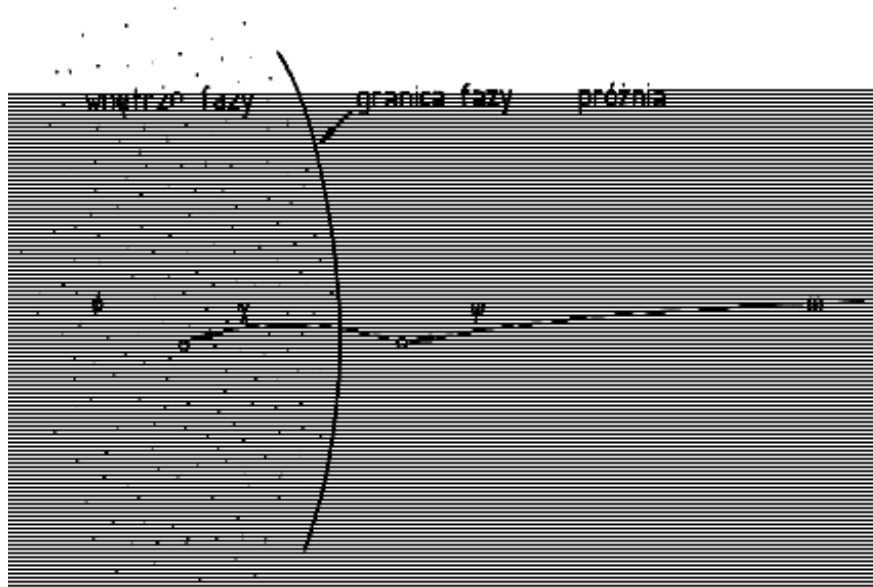
5.4.1. Potencjały granicy faz

Przeniesienie jednostkowego dodatniego ładunku elektrycznego z nieskończoności do punktu leżącego w pobliżu granicy fazy związane jest z wykonaniem pracy

koniecznej do pokonania sił elektrostatycznych. Praca ta nosi nazwę *potencjału zewnętrznego fazy*, ψ (Rys. 5.3). Potencjał ψ określany jest dla punktu znajdującego się w odległości 10^{-4} cm od granicy fazy. Przy takiej odległości występują tylko oddziaływania elektrostatyczne ładunku z polem elektrycznym fazy. Nie występują dodatkowe siły związane z przemieszczaniem ładunku wewnątrz fazy, wywołanym zbliżającym się ładunkiem, tzw. siły lustrzanego odbicia. Siły te zaczynają objawiać się w odległości ładunku od granicy fazy poniżej 10^{-5} cm.

Gdy ładunek przenoszony jest z nieskończoności do wnętrza fazy, wykonana praca określana jest jako *potencjał wewnętrzny fazy*, ϕ . Różnica pomiędzy potencjałem wewnętrznym i zewnętrznym fazy nazywana jest *potencjałem powierzchniowym*, χ . Jest to praca przeniesienia jednostkowego ładunku elektrycznego przez granicę faz.

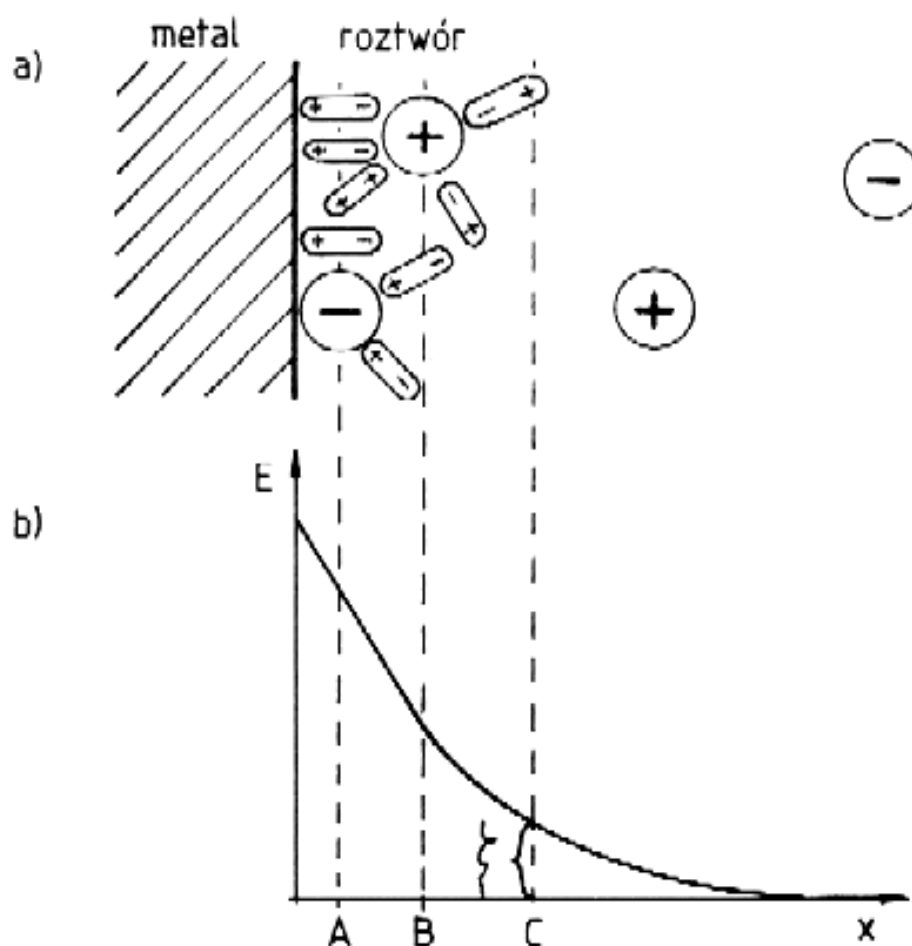
$$\phi = \psi + \chi \quad (5.4)$$



Rys. 5.3. Przeniesienie jednostkowego ładunku elektrycznego do wnętrza fazy. ψ - potencjał zewnętrzny fazy (potencjał Volty), ϕ - potencjał wewnętrzny fazy (potencjał Galwaniego), χ - potencjał powierzchniowy.

Na granicy styku dwóch faz występuje obszar zwany *podwójną warstwą elektryczną*. Na rysunku 5.4 przedstawiona jest budowa podwójnej warstwy elektrycznej dla metalu umieszczonego w roztworze elektrolitu. Wskutek zjawiska adsorpcji jonów i polarnych cząsteczek następuje powstanie na powierzchni metalu nadmiarowego ładunku elektrycznego. Na powierzchni tworzy się ściśle przylegająca warstwa o grubości 1-2 średnic zaadsorbowanych jonów, zwana

warstwą *Helmholtza-Sterna*. Poza tą warstwę rozciąga się rozmyta atmosfera jonowa (*warstwa dyfuzyjna Gouya-Chapmana*). Potencjał panujący na krańcu warstwy *Helmholtza-Sterna*, na płaszczyźnie poślizgu pomiędzy metalem z zaadsorbowaną warstwą a fazą ciekłą, nosi nazwę *potencjału elektrokinetycznego*, ζ . Istnienie tego potencjału decyduje o zjawiskach elektrokinetycznych takich jak efekt Dorna, potencjał przepływu, elektroforeza, elektroosmoza.



Rys. 5.4. Budowa podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz metal-roztwór (a) i rozkład potencjałów (b). A - wewnętrzna płaszczyzna Helmholtza, B - zewnętrzna płaszczyzna Helmholtza, C - płaszczyzna poślizgu, ζ - potencjał elektrokinetyczny.

Potencjał elektrokinetyczny

Komórki lub liposomy umieszczone w polu elektrycznym poruszają się pod wpływem sił elektrostatycznych. Zjawisko to nazwane jest elektroforezą. Ruchliwość elektroforetyczna jest proporcjonalna do potencjału elektrokinetycznego

ζ , występującego na granicy błony komórkowej i roztworu wodnego. Potencjał ten jest z reguły mniejszy od potencjału powierzchniowego. Wartość jego zależy od obecności w membranie składników posiadających ładunek elektryczny na powierzchni membrany np. lipidy, białka, gangliozydy.

Potencjał elektrokinetyczny w membranach tworzonych z fosfatydylocholiny uzależniony jest od orientacji grup polarnych [95,96]. Na wartość tego potencjału ma wpływ siła jonowa roztworu i temperatura. Wyniki badań wskazują na bardzo duże zmiany w orientacji grup polarnych lipidu. Zmiana siły jonowej elektrolitu może nawet zmienić znak potencjału elektrokinetycznego. Przy małej sile jonowej roztworu elektrolitu grupy fosfatydylowe są odsłonięte. Gdy siła jonowa roztworu zwiększa się, grupy polarne przyjmują położenie wzdłuż osi cząsteczki i na powierzchni membrany znajdują się grupy cholinowe, posiadające dodatni ładunek elektryczny. Na wartość potencjału elektrokinetycznego wpływa również pH roztworu. Jony H^+ mogą asocjować z ujemnie naładowanymi grupami polarnymi lipidów. Ruchliwość elektroforetyczna erytrocytów ludzkich jest stała przy wartościach pH 6-9, natomiast znacznie zmniejsza się przy pH poniżej 5 [9].

Potencjał elektrokinetyczny ζ dla żywych komórek posiada ujemny znak i wynosi zwykle od kilku do kilkunastu miliwoltów [9]. Dla ludzkich erytrocytów wartość ta wynosi -15.9 mV (przy sile jonowej roztworu 145 mM). Potencjał ten wzrasta do -64 mV przy obniżeniu siły jonowej do 2.18 mM.

5.4.2. Potencjały membranowe

Do opisu układów, w którym dwa roztwory elektrolitów rozdzielone są membraną, konieczne jest wprowadzenie nowych pojęć: potencjał transmembranowy, potencjał polaryzujący, potencjał Gibbsa-Donnana i potencjał dyfuzyjny.

Potencjał transmembranowy

Jeżeli do elektrolitów po obu stronach membrany włoży się dwie jednakowe elektrody niepolaryzowalne, to różnica potencjałów między nimi równa będzie różnicy potencjałów pomiędzy elektrolitami. Mierzony potencjał nazywany jest potencjałem transmembranowym. Jako elektrody mogą być użyte np. elektrody kalomelowe, chlorosrebrze. Istnienie tego potencjału uwarunkowane jest właściwościami fizykochemicznymi składników membrany i elektrolitu oraz procesów zachodzących w membranie. Wartość potencjału transmembranowego

zależna jest od zjawisk powierzchniowych zachodzących na granicach faz membrana-roztwór, zależy od składu i stężenia roztworów wodnych, transportu jonów przez membranę. Potencjał ten nazywany jest również potencjałem membranowym. Procesy życiowe komórek związane są z utrzymywaniem określonej wartości tego potencjału. Potencjał we wnętrzu komórki posiada ujemny znak i wartość od kilku do ponad 100 mV [9].

Potencjał polaryzujący

Wartość potencjału transmembranowego może być funkcją składu membrany i roztworów wodnych kontaktujących się z membraną oraz procesów zachodzących w układzie. Potencjał transmembranowy można narzucić również z zewnątrz poprzez przyłożenie określonego napięcia do odwracalnych elektrod umieszczonych w roztworach wodnych. Dla odróżnienia od potencjału generowanego samorzutnie przez układ, narzucony z zewnątrz potencjał nazwany jest potencjałem polaryzującym.

Potencjał Gibbsa-Donnana

Potencjał Gibbsa-Donnana powstaje wtedy, gdy spełnione są następujące warunki:

- dwa roztwory elektrolitów rozdzielone są półprzepuszczalną membraną,
- nieprzepuszczalne przez membranę jony rozłożone są nierównowagowo pomiędzy elektrolitami,
- w roztworach istnieją inne jony zdolne do swobodnego przemieszczania się przez membranę.

W roztworach ustala się równowaga określona przez drugą zasadę termodynamiki i zasadę elektroobojętności. Pierwsze ograniczenie mówi, że każdy poruszający się jon może przesuwac się tylko w kierunku niższego potencjału elektrochemicznego. Drugie ograniczenie wymaga, aby liczba ładunków dodatnich i ujemnych w każdym z elektrolitów była jednakowa. Gdy układ jest w równowadze, wypadkowy przepływ jonów pomiędzy elektrolitami jest równy zero. Stężenia poszczególnych jonów i ustalają się zgodnie z równaniem:

$$\phi^{\text{II}} - \phi^{\text{I}} = \Delta\phi = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{c_i^{\text{I}}}{c_i^{\text{II}}} \quad (5.5)$$

gdzie: $\phi^{\text{I}}, \phi^{\text{II}}$ - potencjały wewnętrzne faz po obu stronach membrany
 z_i - ładunek elektryczny składnika i
 $c_i^{\text{I}}, c_i^{\text{II}}$ - stężenia składnika i po obu stronach membrany

Potencjał Gibbsa-Donnana z punktu widzenia termodynamiki jest potencjałem równowagowym.

Potencjał dyfuzyjny

Potencjał dyfuzyjny powstaje wtedy, gdy spełnione są następujące warunki:

- dwa roztwory elektrolitów o różnych stężeniach rozdzielone są półprzepuszczalną przegrodą
- jony zdolne są do dyfuzji przez przegrodę
- kationy i aniony różnią się współczynnikami dyfuzji

W takiej sytuacji kationy i aniony będą dyfundować z roztworu o większym stężeniu do roztworu o mniejszym. Jony o wyższym współczynniku dyfuzji będą dyfundować z większą prędkością, w wyniku czego nastąpi nierównomierny przestrzenny rozkład ładunków dodatnich i ujemnych. Spowoduje to powstanie różnicy potencjałów pomiędzy roztworami. Powstały potencjał powoduje zmniejszenie szybkości jonów posiadających wyższy współczynnik dyfuzji, a przyspieszenie jonów o niższym. Potencjał ten ustala się przy wartości, przy której szybkości dyfuzji jonów wyrównują się. Potencjał dyfuzyjny jest większy przy większej różnicy stężeń elektrolitów i przy większej różnicy w ruchliwościach kationów i anionów. Potencjał ten jest potencjałem termodynamicznie nierównowagowym. Wyrównanie się stężeń elektrolitów powoduje zanik potencjału dyfuzyjnego.

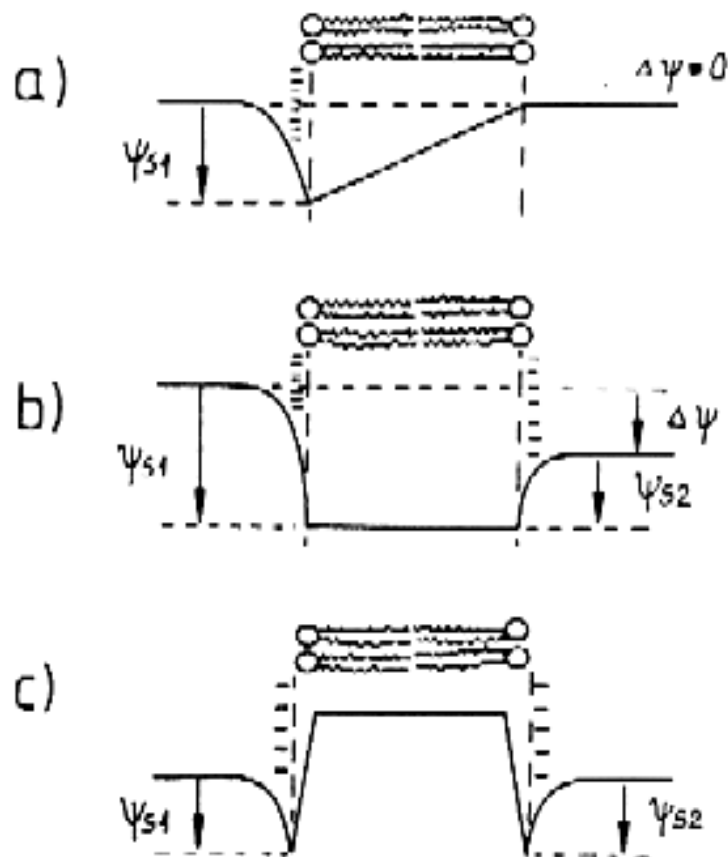
Istnienie potencjału dyfuzyjnego jest typowe dla błon biologicznych, które oddzielają wnętrze komórki od otoczenia, a także cytoplazmę od zawartości organelli wewnątrzkomórkowych. Błony biologiczne rozdzielają roztwory różniące się stężeniem jonów np. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , a obecność kanałów i pomp jonowych umożliwia przenoszenie jonów przez błony i istnienie gradientu stężeń.

5.4.3. Rozkład potencjałów w dwuwarstwach lipidowych

Powierzchnia większości membran lipidowych posiada ujemny ładunek elektryczny. Zwykle 10-20% lipidów w błonach biologicznych występuje w formie anionowej [8]. Na ładunek elektryczny membran mają również wpływ inne składniki błon np. białka, gangliozydy. Ładunek elektryczny zdysocjowanych grup jest częściowo neutralizowany przez jony o przeciwnym ładunku, nie związane jednak

ściśle z membraną i znajdujące się w pewnej odległości od powierzchni membrany. Tworzą one podwójną warstwę elektryczną.

Potencjały powierzchniowe wpływają na profil potencjału wewnątrz membrany. Mogą również zmieniać właściwości przepuszczalne membran (np. przez wpływ na organizację białek błonowych). Powoduje to, że w skład potencjału transmembranowego nie wchodzi prosta suma potencjałów powierzchniowych. Przykłady rozkładu potencjałów w dwuwarstwowych membranach lipidowych przedstawione są na rysunku 5.5.



Rys. 5.5. Przykłady rozkładu potencjałów w dwuwarstwowych membranach lipidowych.

- Membrana złożona z niesymetrycznych monowarstw. Lewa część membrany posiada ujemny powierzchniowy ładunek elektryczny. Powoduje to powstanie ujemnego potencjału powierzchniowego ψ_{S1} . Potencjał transmembranowy $\Delta\psi$ równy jest 0. Skok potencjału wewnątrz membrany kompensuje potencjał powierzchniowy ψ_{S1} .
- Membrana o różnej gęstości ładunków powierzchniowych po obu stronach membrany. Potencjały powierzchniowe ψ_{S1} i ψ_{S2} przyjmują różne wartości. Przy skoku potencjału wewnątrz membrany równym 0 potencjał transmembranowy $\Delta\psi$ równy jest różnicy potencjałów powierzchniowych.

- c) Membrana o jednakowych potencjałach powierzchniowych ψ_{S1} i ψ_{S2} i potencjale transmembranowym $\Delta\psi$ równym 0. W warstwie hydrofobowej membrany zaznaczony jest potencjał dipolowy, posiadający dodatnią wartość względem roztworów elektrolitów.

Przy opisach potencjałów organelli wewnątrzkomórkowych, nie są przyjęte w literaturze jednolite zasady określania znaków potencjałów. Próby ustalenia tych zasad podjęte zostały przez grupę wiodących naukowców w tej dziedzinie [94].

Potencjał dipolowy

Badania transportu jonów przez membrany wskazują na obecność wewnątrz membrany dodatniego potencjału względem przylegających roztworów (Rys. 5.5c). Potencjał ten nazywany jest potencjałem dipolowym. Ma on wartość kilkuset miliwoltów i występuje nawet wtedy, gdy membrany wykonane są z obojętnych lipidów np. fosfatydylocholiny [92]. Istnienie potencjału dipolowego uwarunkowane jest orientacją dipoli cząsteczek wody przylegających do membrany, orientacją polarnych grup lipidów i obecnością w membranie wiązań estrowych pomiędzy szkieletem glicerolu i łańcuchami węglowymi [92,97-100]. Natura tego potencjału jest mało znana, jak również niemożliwy jest jego bezpośredni pomiar. Potencjał dipolowy badany jest poprzez pomiary potencjałów asymetrycznych membran, tworzonych z różnych lipidów, transport jonów lipofilowych, szacowany na podstawie badań monowarstw Langmuira-Blodgett. Przy badaniach wykorzystywane są również znaczniki fluorescencyjne i znaczniki NMR.

5.5. Transport przez membrany

Zagadnienia transportu przez membrany są bardzo ważną częścią badań zjawisk w membranach lipidowych. Procesy życiowe komórek zależą od transportu przez membrany np. transport substancji odżywczych do komórki, wydalanie metabolitów, transport jonów, przekazywanie sygnałów.

Istnieje kilka mechanizmów transportu substancji jonowych i niejonowych przez membrany lipidowe. Transport może być bierny, w dół gradientu elektrochemicznego substancji. W błonach biologicznych istnieją też układy transportu aktywnego, gdzie kierunek transportu jest przeciwny do gradientu elektrochemicznego, wymagające dostarczenia energii np. pompa sodowo-potasowa, utrzymująca wewnątrz komórki wysokie stężenie jonów K^+ i niskie jonów Na^+ [8,101].

Dwuwarstwowe membrany lipidowe są niemal nieprzepuszczalne dla jonów o małych rozmiarach [102,103]. Jest jednak wiele substancji umożliwiających jonom przejście przez membrany. Są to jonofory, które tworzą z jonami kompleksy mające zdolność do dyfuzji przez hydrofobowe wnętrza membrany np. nonaktyna, walinomycyna, etery koronowe [76,77,104-108]. Inną grupą substancji umożliwiających transport jonów przez membrany są cząsteczki pochodzenia naturalnego lub syntetyczne, tworzące w membranach hydrofilowe kanały np. gramicydyna A, alametycyna [109-116].

Jony organiczne o dużych rozmiarach, posiadające właściwości lipofilowe mają zdolność do dyfuzji przez membrany lipidowe np. aniony tetrafenylofosfoniowe, tetrafenyloboranowe, dipikryloamoniowe, kationy tetraalkiloamoniowe [18,73-75, 102,117]. Stanowią one dużą grupę związków wykorzystywanych przy badaniach zjawisk transportu przez membrany. Używane są przy badaniach potencjałów membranowych [118].

Ważnym zagadnieniem jest transport wody przez membrany lipidowe [102,119-122]. Jest ona stosunkowo łatwo przepuszczana przez membrany. W błonach biologicznych istnieją również białka tworzące kanały ułatwiające transport wody [102].

Przepuszczalność membran dla substancji niejonowych przyjmuje szeroki zakres wartości np. $3 \cdot 10^{-11} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ dla D-glukozy, $1,3 \cdot 10^{-1} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ dla amoniaku. W literaturze jest wiele prac dotyczących biernego i aktywnego transportu substancji niejonowych przez membrany lipidowe [8,102,123-126].

5.6. Płynność membran

Żywe organizmy zdołały przystosować się do życia w skrajnie niekorzystnych warunkach. Zarówno lodowce Antarktydy jak i wrzące wody gejzerów zamieszkane są przez żywe istoty. Temperatura, w której egzystują komórki, wpływa na skład lipidów tworzących ich błony. W błonach bakterii utrzymywanych w niskich temperaturach stwierdzono wzrost liczby krótkich i nienasyconych łańcuchów alkilowych, które powodują zwiększenie płynności membran [8]. Od płynności membran zależy prawidłowe funkcjonowanie błon biologicznych. Duży wpływ na płynność membran ma obecność cholesterolu i jego analogów [8,16,17].

Płynność membran określana jest przez zdolność cząsteczek tworzących membrany do wykonywania ruchów oscylacyjnych, rotacyjnych i translacyjnych. Objawia się to głównie w giętkości łańcuchów alkilowych lipidów, dyfuzji

cząsteczek w płaszczyźnie membrany i przeskokami cząsteczek pomiędzy monowarstwami tworzącymi membranę ("flip-flop").

Płynność membran wpływa na wiele zjawisk zachodzących w błonach np. transport substancji przez błony, dyfuzję enzymów i substratów wzdłuż powierzchni membrany, biogenezę błon [127]. Zbyt duża płynność nie jest korzystna ze względu na małą trwałość membrany.

Środki znieczulające, przeciwbólowe, antydepresyjne, uspokajające i antybiotyki zmieniają temperatury przejścia fazowego, płynność i przepuszczalność błon. Np. desipramina, chloropromazyna już w niskich stężeniach obniżają temperaturę przejścia fazowego i podwyższają płynność błon [127].

5.7. Właściwości optyczne membran

Dwuwarstwowe membrany lipidowe ze względu na ich małą grubość (zwykle kilka nanometrów) w bardzo małym stopniu odbijają światło. Podczas obserwowania w świetle odbitym membran formowanych metodą Muellera-Rudina zaobserwować można kilka etapów. Początkowo membrana odbija światło jak lustro. W miarę zmniejszania się grubości membrany obserwowane są barwy interferencyjne. Gdy membrana przyjmuje grubość dwuwarstwy, obserwuje się zanik odbicia światła. Z tego powodu dwuwarstwowe membrany lipidowe nazywane są też czarnymi membranami. Pomiar niewielkiego natężenia światła odbitego od membrany wykorzystywany jest do wyznaczania całkowitej grubości membran [64,68,69].

5.8. Zjawiska fotoelektryczne w membranach

Zjawiska fotoelektryczne w błonach biologicznych są podstawą dwóch procesów decydujących o rozwoju życia na Ziemi: fotosyntezy i procesów widzenia. Podstawą procesów fotosyntezy jest przeniesienie elektronu pod wpływem światła. Rośliny wytworzyły bardzo wydajne układy przetwarzania światła na energię chemiczną, natomiast niektóre zwierzęta posiadają niezwykle czuły wzrok, którego receptory zdolne są do reakcji na pojedyncze fotony.

Wysoka wydajność i czułość układów przetwarzania światła na inne rodzaje energii w żywych organizmach skłoniła ludzi do badań nad zrozumieniem mechanizmów rządzących biologicznymi fotoefektami. Podjęte zostały próby stworzenia sztucznych układów funkcjonujących w oparciu o te procesy [128]. Do

badania zjawisk fotoelektrycznych w membranach wykorzystywane są naturalne substancje biorące udział w przetwarzaniu światła w membranach np. rodopsyna, bakteriorodopsyna, chlorofil [129-132]. Sztuczne membrany lipidowe mogą być uczulane na światło również przy użyciu wielu innych naturalnych i syntetycznych substancji np. pochodnych azobenzenu [133-137], porfiryn [138-141], peptydów [142], syntetycznych lipidów [143]. Dużą grupą substancji chemicznych nadających membranom właściwości fotoelektryczne są barwniki organiczne [144,145]. Fullereny wbudowane w dwuwarstwowe membrany lipidowe powodują powstawanie w nich fotoprądów [146-147]. Fotoefekty w membranach mogą objawiać się również w zmianach przepuszczalności membran dla jonów [148-151].

5.9. Pory w membranach

Dwuwarstwowe membrany lipidowe ulegają przebiciu pod wpływem przyłożonego napięcia. Zjawisko to dotyczy całych komórek i płaskich membran [152-158]. Napięcie przebicia membran wynosi od 150 do 500 mV. Przy grubości membrany rzędu kilku nm, natężenie pola elektrycznego, przy którym następuje przebicie wynosi $10^5 - 10^6$ V/cm. Pierwszym etapem tego zjawiska jest utworzenie w membranie hydrofilowych porów. Przy dostatecznie szybkim zaniku napięcia na membranie pory te mogą zamknąć się. Pory mogą również powiększać się doprowadzając do zniszczenia membrany. Dwa czynniki powodują powstawanie porów w membranach pod wpływem pola elektrycznego. Pierwszym jest orientacja naładowanych lub dipolowych grup hydrofilowych lipidów, a drugim ograniczona przepuszczalność dla jonów. Średnice utworzonych porów zawierają się zwykle w granicach 1-10 nm.

Zjawisko tworzenia porów w membranach pod wpływem pola elektrycznego znalazło praktyczne zastosowanie. Całe komórki, poddane działaniu impulsów napięciowych o dużej wartości, lecz małym czasie trwania ulegają poracji. Efekt ten pozwala na wprowadzenie do wnętrza komórki określonych substancji np. obcego DNA, białek, wypływ plazmy z wnętrza komórki lub fuzję sąsiadujących ze sobą komórek [152,153].

6. Czynniki wpływające na pojemność membran lipidowych

Membrany lipidowe posiadają trójwarstwową strukturę. Całkowita pojemność membrany uzależniona jest od właściwości i zjawisk w poszczególnych warstwach. Membranę można traktować jako szeregowo połączenie trzech kondensatorów (Rys. 5.2, s.18), której pojemność opisana jest równaniem:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C'_p} + \frac{1}{C_h} + \frac{1}{C''_p} \quad (6.1)$$

Ponieważ pojemności warstw hydrofilowych C'_p i C''_p są znacznie większe niż pojemność warstwy hydrofobowej C_h , całkowita pojemność membrany zależy głównie od pojemności warstwy hydrofobowej:

$$C = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot S}{d_h} \quad (6.2)$$

gdzie: d_h - grubość warstwy hydrofobowej membrany

W tabeli 6.1 podana jest charakterystyka poszczególnych parametrów określających pojemność membran lipidowych.

Tab. 6.1. Parametry określające pojemność membran lipidowych.

Parametr		Charakterystyka
ε	przenikalność elektryczna	Warstwy hydrofobowe membran posiadają przenikalność elektryczną $\varepsilon = 2.0-2.2$. Obecność substancji zawierających inne atomy np. tlenu, azotu, chloru, może zwiększać przenikalność elektryczną membrany. W błonach biologicznych występuje duża ilość białek zwiększających ich przenikalność elektryczną.
S	pole powierzchni dwuwarstwy	Pole powierzchni dwuwarstwy zmieniać się może w wyniku zmiany wielkości obrzeża Plateau-Gibbsa. Płaska membrana lipidowa może zwiększać pole powierzchni w wyniku wybrzuszania się, które powstaje pod wpływem różnicy ciśnień po obu stronach membrany [159].
d	grubość membrany	Na grubość membrany wpływa wiele czynników: rodzaj lipidów, metoda formowania membran, stosowane rozpuszczalniki, temperatura, napięcie przyłożone do membrany, skład elektrolitu.

Obszerne badania zależności pojemności membran lipidowych od rodzaju stosowanych lipidów i rozpuszczalników prowadzone były przez wielu autorów [50,62-64,160-168].

Badania impedancji membran pozwoliły na określenie pojemności poszczególnych warstw [66,67,88,90,91,169]. Pojemności warstw polarnych membran wynoszą od 18 do 60 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Niektórzy autorzy rozpatrują membranę jako 5-warstwowy układ: warstwa hydrofobowa, warstwy wiązań estrowych i warstwy grup polarnych [66,67]. Właściwości dielektryczne poszczególnych warstw w modelu 5-warstwowym przedstawione są w tabeli 6.2.

Tab. 6.2. Właściwości dielektryczne membran lipidowych formowanych techniką Muellera-Rudina z mieszaniny lecytyna-cholesterol (stosunek molowy 5:1). Rozpuszczalnik: n-tetradekan, elektrolit: 1 mM KCl. Współczynniki przenikalności elektrycznej szacowane były na podstawie podobnych, niewodnych faz [66].

Parametr	Warstwa		
	hydrofobowa	wiązań estrowych	polarna
Pojemność [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	0.566	19.5	60
Przewodnictwo [$\mu\text{S}/\text{cm}^2$]	0.02	21	2900
Przenikalność elektryczna	2.13	10-40	10-40
Grubość [nm]	3.3	0.5-2	0.15-0.6

6.1. Zmiany pojemności w czasie

Pojemność membran zależy od wielu czynników, np. od starzenia się roztworu formującego [163]. Roztwór formujący składający się z utlenionego cholesterolu rozpuszczonego w n-dekanie po tygodniu daje membrany o pojemności 0.402 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, natomiast po 6 tygodniach pojemność tworzonych membran wynosi 0.444 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Benz i Janko [168] badali zmiany pojemności membran w funkcji czasu. Membrany formowane były z różnych lipidów rozpuszczonych w n-dekanie. Pomiar prowadzone były w ciągu 2 godzin. Zmiany pojemności dochodziły do 9 %/h.

Membrany formowane z utlenionego cholesterolu rozpuszczonego w n-dekanie świeżo po uformowaniu zwiększały swoją pojemność 10-20 % w ciągu godziny. Membrany formowane z lecytyny rozpuszczonej w n-dekanie w tych samych warunkach wykazywały różnice do 20 % [63].

6.2. Rodzaj lipidów

Grubość poszczególnych warstw membran lipidowych zależy od rodzaju lipidów tworzących membranę. Wydaje się rzeczą oczywistą, że długość łańcuchów węglowych cząsteczek lipidów wpływa na grubość membran, a tym samym na ich pojemność. Zostało to potwierdzone doświadczalnie (Tab. 6.3).

Tab. 6.3. Pojemność specyficzna membran formowanych z monoglicerydów i lecytyn o różnej długości łańcuchów węglowych w cząsteczkach. Membrany tworzone były poprzez łączenie monowarstw [160].

Liczba atomów węgla w łańcuchu	Pojemność specyficzna [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Grubość membrany [nm]
Monoglicerydy		
14	0.912	2.04
16	0.847	2.19
18	0.745	2.50
20	0.657	2.83
22	0.590	3.15
24	0.538	3.46
Lecytyny		
18	0.721	2.58
22	0.569	3.27
24	0.481	3.86

Na pojemność i grubość membran ma wpływ nie tylko długość łańcuchów w cząsteczkach lipidów, lecz także ilość wiązań podwójnych w łańcuchach (Tab. 6.4). Im więcej jest wiązań podwójnych, tym mniejsza jest grubość, a większa pojemność membrany. Wzrost liczby wiązań podwójnych w łańcuchach powoduje zwiększenie przenikalności elektrycznej warstwy hydrofobowej. Wartości ϵ wynoszą od 2.20 dla

łańcuchów z jednym wiązaniem podwójnym do 2.61 dla 6 wiązań [167]. Zmniejszenie grubości membran w obecności lipidów z podwójnymi wiązaniami w łańcuchach węglowych związane jest z wyginaniem tych łańcuchów.

Tab. 6.4. Pojemność specyficzna i grubość membran formowanych z lecytyn o różnej długości i ilości wiązań podwójnych w łańcuchach węglowych. Membrany formowane były techniką Muellera-Rudina z lipidów rozpuszczonych w n-dekanie [168].

Grupy acylowe fosfolipidu	Długość łańcucha	Położenie wiązań podwójnych	Pojemność specyficzna [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Grubość membrany [nm]
oleilowe	18	9	0.374	4.97
linoleoilowe	18	9,12	0.416	4.47
linolenoilowe	18	9,12,15	0.582	3.19
eikozenoilowe	20	11	0.358	5.19
arachidonoilowe	20	5,8,11,14	0.443	4.20

Przy badaniach zjawisk membranowych wykorzystywane są znaczniki fluorescencyjne, wbudowywane w membranę. Ashcroft i współpracownicy [66] badali pojemności poszczególnych warstw membran tworzonych z lecytyny z cholesterolem z dodatkami takich znaczników. Były to pochodne kwasu stearynowego i palmitynowego. Nawet niewielka ich ilość (0.01%) powodowała zmiany organizacji lipidów w warstwie hydrofobowej i zmiany jej pojemności. Przy stężeniu znacznika 0.1% zmiany pojemności specyficznej membran dochodziły do ponad 30%.

6.3. Sposób tworzenia membran

Membrany tworzone metodą Muellera-Rudina [170] posiadają zwykle pojemność mniejszą niż membrany powstałe z łączenia monowarstw (Tab. 6.5). W warstwie hydrofobowej pozostaje pewna ilość rozpuszczalnika, powodująca zwiększenie grubości membrany. Membrany tworzone z monowarstw (metoda Montala-Muellera [171,172]) wolne są od rozpuszczalnika i mają grubość błon biologicznych.

6.4. Rozpuszczalniki

Membrany formowane metodą Muellera-Rudina posiadają pojemność i grubość zależną od rozpuszczalnika, w którym rozpuszczone były lipidy. Węglowodory o mniejszej długości łańcuchów powodują zwiększenie grubości membran (Tab. 6.5). Węglowodory o długich łańcuchach (np. n-oktadekan, skwalen) umożliwiają uzyskanie membran o pojemności i grubości zbliżonej do membran tworzonych z monowarstw.

Tab. 6.5. Pojemność specyficzna i grubość warstwy hydrofobowej membran formowanych metodą Muellera-Rudina z monooleinianu 1-glicerolu rozpuszczonego w różnych rozpuszczalnikach. Elektrolit 0.1M KCl. Grubość warstwy hydrofobowej obliczano na podstawie pojemności specyficznej membran. Dla porównania podana jest pojemność specyficzna i grubość membran tworzonych poprzez łączenie monowarstw [64,160].

Rozpuszczalnik	Pojemność specyficzna [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Grubość membran [nm]
n-heksan	0.380	4.89
n-oktan	0.394	4.72
n-dekan	0.390	4.77
n-dodekan	0.416	4.47
n-tetradekan	0.469	3.96
n-heksadekan	0.585	3.18
n-oktadekan	0.705	2.64
skwalen	0.750	2.5
triolein	0.850	2.4
1-chlorodekan	0.850	3.0
1-bromodekan	0.840	3.0
tworzone z monowarstw	0.750	2.5

Tab. 6.6. Pojemność specyficzna membran lipidowych formowanych metodą Muellera-Rudina z monoglicerydów rozpuszczonych w n-dekanie i n-heksadekanie, elektrolit 0.1M KCl [160].

Liczba atomów węgla w łańcuchu węglowym	Pojemność specyficzna [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	
	n-dekan	n-heksadekan
14	0.485	0.772

16	0.445	0.661
18	0.390	0.585
20	0.345	0.498
22	0.318	0.383
24	0.275	0.271

Gdy membrany zbudowane są z lipidów zawierających długie łańcuchy węglowe w cząsteczkach, wtedy rodzaj stosowanego rozpuszczalnika w małym stopniu wpływa na pojemność membran (Tab. 6.6).

6.5. Skład roztworu elektrolitu

Pojemność membran lipidowych zależy od stężenia elektrolitu [35,67,161,169]. W zależności od składu roztworu elektrolitu pojemność membran może wzrastać lub maleć w funkcji stężenia. Tien [35] podaje, że pojemność membran formowanych z cholesterolu w obecności bromku heksadecylotrimetyloamoniowego zmniejsza się ze wzrostem stężenia elektrolitu. Jako elektrolit stosowane były roztwory NaF, NaCl, KCl, CaCl₂, Na₂SO₄. Inne wyniki uzyskał White [161]. W tabeli 6.7 przedstawiono pojemność membran przy różnych stężeniach elektrolitu. Wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu wzrasta pojemność membran. Gdy w roztworze obecny jest 2,4-dinitrofenol, pojemność membrany w mniejszym stopniu zależy od stężenia elektrolitu. 2,4-dinitrofenol adsorbuje się na powierzchni membrany i zmienia powierzchniową gęstość ładunku w podwójnej warstwie elektrycznej. Skład elektrolitu wpływa również na grubość warstwy hydrofobowej membrany.

Tab. 6.7. Pojemność membran formowanych metodą Muellera-Rudina z monooleinianu 1-glicerolu rozpuszczonego w n-dekanie przy różnych stężeniach elektrolitu [161].

Stężenie NaCl [mol/dm ³]	Pojemność specyficzna [μ F/cm ²]	
	bez 2,4-dinitrofenolu	z 2,4-dinitrofenolem
10 ⁻⁴	0.3142	0.3516
10 ⁻³	0.3631	0.3654
10 ⁻²	0.3964	0.3770
10 ⁻¹	0.3968	0.4028
10 ⁰	0.4348	

Zimmermann i współpracownicy [90] badali wpływ kwasu indolooctowego na parametry elektryczne membran formowanych z lecytyny metodą Muellera-Rudina. Poprzez pomiary impedancji określone zostały pojemności i przewodnictwa warstw hydrofilowych i warstwy hydrofobowej membrany. Od stężenia KCl zależy dystrybucja kwasu indolooctowego w membranie. Przy stężeniu KCl 1 mM kwas ten zaadsorbowany był na powierzchni membrany i w warstwie hydrofilowej. Większe stężenia KCl (do 1M) powodowały adsorpcję kwasu również w warstwie hydrofobowej membrany.

Dodatek alkoholu benzyłowego do roztworu wodnego powodował zmniejszenie pojemności membran i zwiększenie ich przewodnictwa [91]. Membrany formowane były z lecytyny rozpuszczonej w n-tetradekanie. Zmniejszenie pojemności membran (o 25% przy stężeniu alkoholu 7.5 mM) związane jest ze wzrostem grubości membran. Alkohol benzyłowy zwiększa płynność membran.

Elliot i Haydon [165] badali wpływ n-oktanolu na pojemność membran. Stężenie n-oktanolu w roztworze wodnym wynosiło do 1.5 mM. Membrany formowane były monooleinianu 1-glicerolu rozpuszczonego w skwalanie lub w heksadekanie. Gdy membrany formowane były przy użyciu skwalanu, n-oktanol powodował zwiększenie pojemności z 0.76 do 0.81 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ przy stężeniu 1.5 mM. Membrany formowane przy użyciu heksadekanu wykazały spadek pojemności do 0.50 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ przy stężeniu n-heksadekanu 0.9 mM. Obecność n-oktanolu w fazie wodnej (stężenie alkoholu 1.6 mM) powodowała wzrost napięcia międzyfazowego granicy faz roztwór formujący-roztwór wodny (0.1M NaCl) o około 1 dynę/cm.

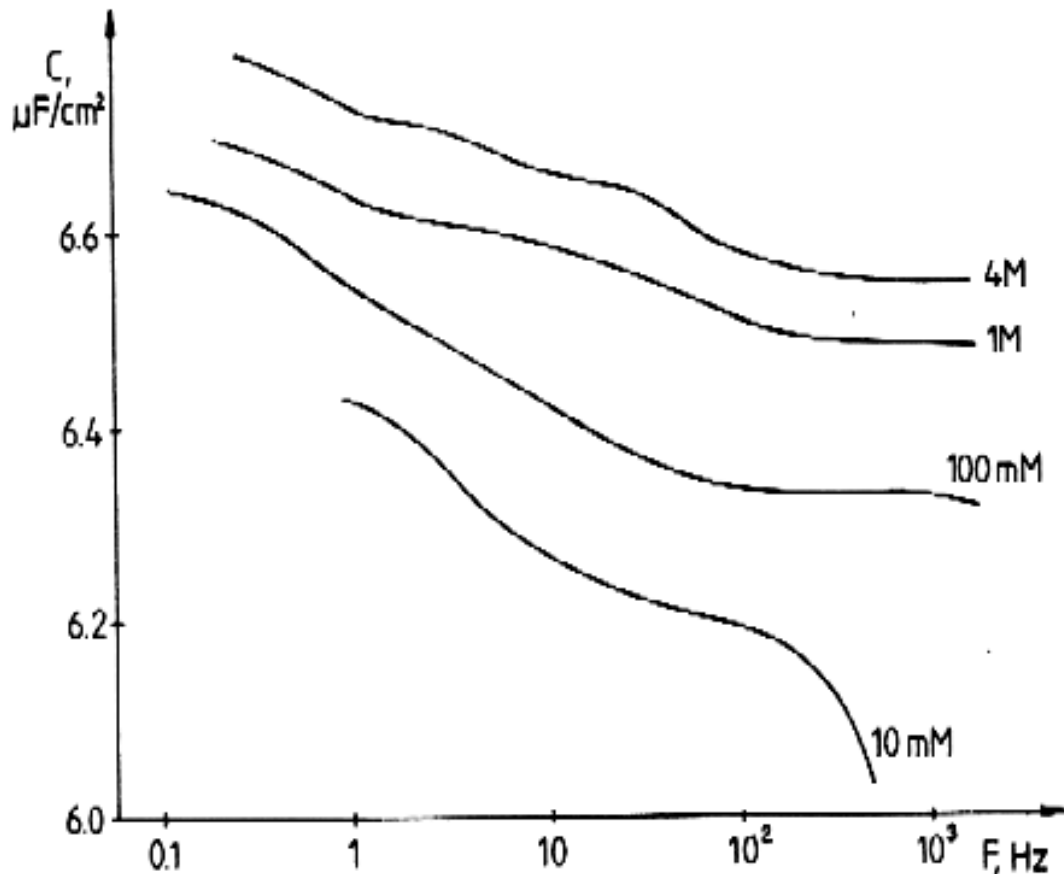
6.6. Temperatura

Pojemność membran lipidowych maleje ze wzrostem temperatury [163,173]. Zmiana temperatury zmienia równowagę rozkładu rozpuszczalnika pomiędzy wnętrzem membrany a obrzeżem, powodując zmiany grubości membrany. Dla membran tworzonych z utlenionego cholesterolu rozpuszczonego w n-dekanie pojemność specyficzna spada z 0.56 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ w temperaturze 20°C do 0.47 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ w temperaturze 34°C. Pojemność membran zależna jest od przyłożonego napięcia. Wzrost temperatury zwiększa podatność membran na zmiany pojemności wywołane napięciem (parametr β w równ. 6.2, str. 38).

White [162] badał pojemność membran w funkcji temperatury. Membrany formowane były z monooleinianu 1-glicerolu rozpuszczonego w n-heksadekanie. Przy temperaturze krzepnięcia n-heksadekanu występuje gwałtowna zmiana pojemności. Pojemność wynosi ok. $0.73 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ przy 12°C , a $0.62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ przy 25°C . Przy ochładzaniu membrany w temperaturze ok. 15°C występuje "wymrażanie" rozpuszczalnika z membrany, który ulega krystalizacji.

6.7. Częstotliwość

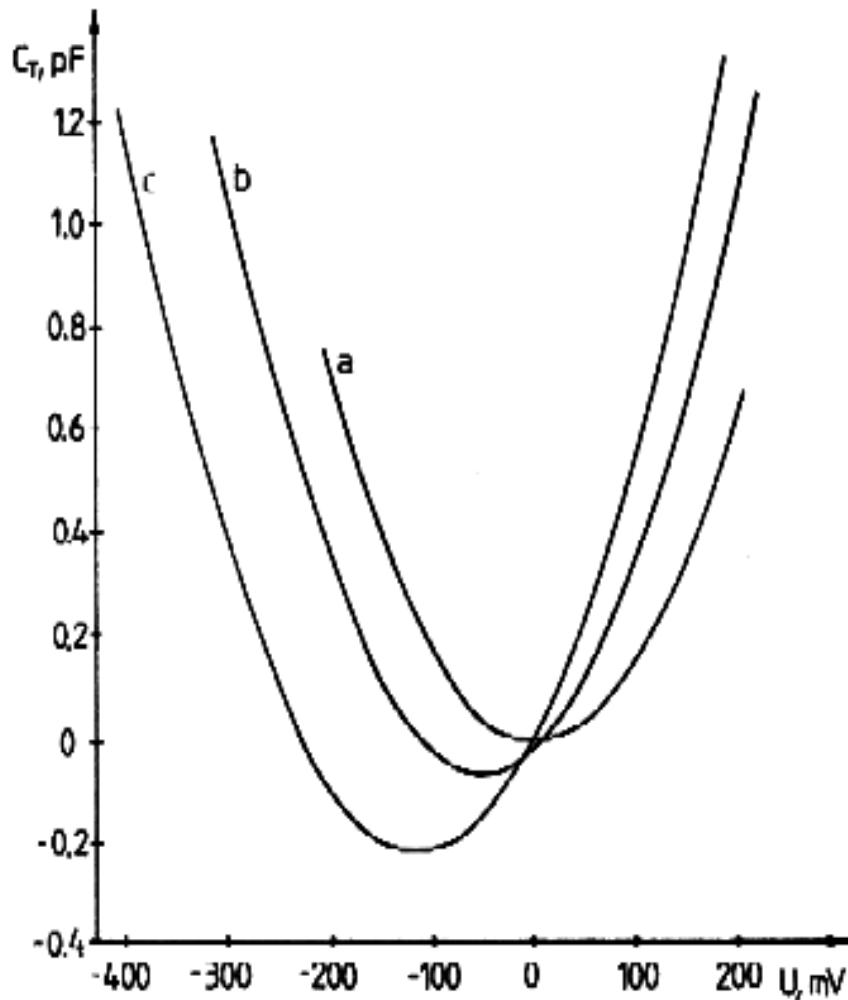
Wyniki badań dotyczące wpływu częstotliwości sygnału pomiarowego na pojemność membran znacznie różnią się pomiędzy sobą. Tien [35] podaje, że pojemność membran jest niezależna od stosowanej częstotliwości w zakresie od 10^{-3} do 10^6 Hz. Laver i współpracownicy [67] badali zależność pojemności membran od częstotliwości dla elektrolitów o różnych stężeniach (Rys. 6.1). Przy niskim stężeniu elektrolitu pojemność membran w większym stopniu zależy od stosowanej do pomiaru częstotliwości. Autorzy innych prac również stwierdzają zależność pojemności od częstotliwości [66,88,90,91,169]. Ze wzrostem częstotliwości sygnału pomiarowego mierzona pojemność membran przyjmuje mniejsze wartości.



Rys. 6.1. Zależność pojemności membran od częstotliwości. Membrany formowane były techniką Muellera-Rudina z monooleinianu 1-glicerolu rozpuszczonego w n-heksadecanie. Pomiary wykonane były dla roztworów KCl o różnych stężeniach [67].

6.8. Napięcie

Pierwsze doniesienie o wpływie napięcia przyłożonego do membrany na pojemność ukazało się w 1966 roku [2]. Efekt ten opisywany był później w wielu innych pracach [61,63,89,163,168,173-178]. Efekt ten zależy od potencjałów powierzchniowych membran [61,118,179-182]. Przykład zależności pojemności membran od przyłożonego potencjału przedstawiony jest na rysunku 6.2.



Rys. 6.2. Zależność pojemności od napięcia przyłożonego do membrany, a) symetryczna membrana formowana z fosfatydyloetanolaminy, elektrolit 1M KCl, b) membrana złożona z monowarstw z fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy, elektrolit 1M KCl, c) membrana złożona z monowarstw z fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy, elektrolit 0.1M KCl [61].

Babakov i współpracownicy stwierdzili, że przyłożenie napięcia do membrany powoduje wzrost pojemności [2]. Zależność tę opisali równaniem:

$$\frac{\Delta C}{C_0} = K \frac{(\Delta U)^2}{\sigma} \quad (6.1)$$

gdzie: ΔC - zmiana pojemności membrany

C_0 - pojemność membrany przy napięciu 0

ΔU - przyłożone napięcie

σ - współczynnik napięcia powierzchniowego

K - stała zależna od parametrów geometrycznych membrany i obrzeża

Równanie 6.1 przez innych autorów przedstawiane jest w prostszej postaci [63]:

$$C_m = C_0 + \beta U^2 \quad (6.2)$$

gdzie: C_M - pojemność membrany przy napięciu U

β - parametr

Zwiększanie pojemności membrany związane jest ze zjawiskiem elektrokompresji [177]. Powierzchnie membrany przyciągają się wskutek oddziaływań elektrostatycznych z siłą:

$$F_E = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{2d_m^2} U^2 \quad (6.3)$$

gdzie: F_E - siła przyciągania się powierzchni membrany na jednostkę powierzchni

d_m - grubość membrany przy napięciu U

Membrana jest elastyczna i wskutek przyciągania się powierzchni membrany, maleje jej grubość. Elastyczność układu opisuje moduł Younga Y_{BL} :

$$\frac{\Delta d}{d_0} = \frac{F_E}{Y_{BL}} \quad (6.4)$$

gdzie: d_0 - grubość membrany przy napięciu $U = 0$

Po połączeniu równań 6.3 i 6.4 otrzymuje się:

$$\frac{\Delta d}{d_0} = \frac{1}{Y_{BL}} \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{2d_0^2} U^2 \right) \quad (6.5)$$

Pojemność specyficzna membran lipidowych po uwzględnieniu zmiany grubości membrany opisana jest równaniem:

$$C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{d_0} \left(1 + \frac{\Delta d}{d_0} \right) \quad (6.6)$$

Po połączeniu równań 6.5 i 6.6 otrzymuje się:

$$C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{d_0} + \frac{1}{Y_{BL}} \left(\frac{\varepsilon_0^2 \varepsilon^2 U^2}{2d_0^3} \right) \quad (6.7)$$

Po porównaniu równania 6.7 z równaniem 6.2 i uwzględnieniu, że

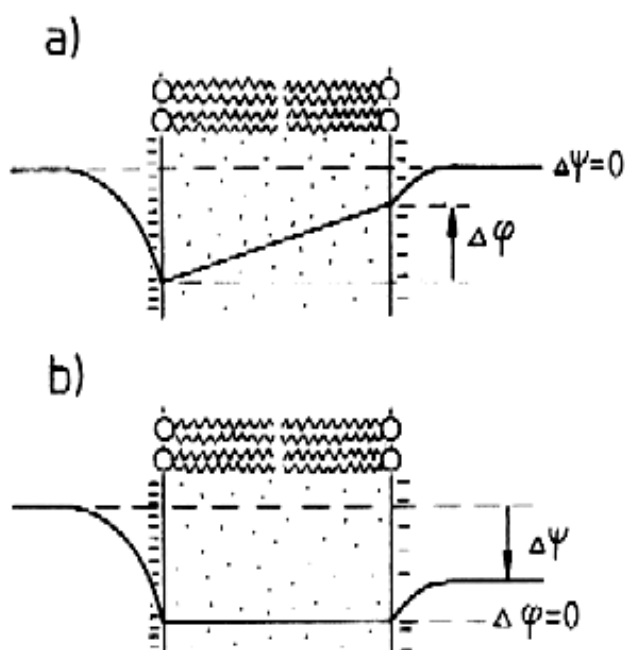
$$C_0 = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{d_0} \quad (6.8)$$

Otrzymuje się równanie łączące parametr β z elastycznością membrany:

$$\beta = \frac{1}{Y_{BL}} \left(\frac{\varepsilon_0^2 \varepsilon^2}{2d_0^3} \right) = \frac{1}{Y_{BL}} \left(\frac{C_0^2}{2d_0} \right) \quad (6.9)$$

Równanie 6.2 jest prawdziwe dla membran symetrycznych, gdzie monowarstwy tworzące membranę mają ten sam skład i roztwory elektrolitów po obu stronach membrany są jednakowe. W przypadku membran asymetrycznych konieczne jest uwzględnienie różnic w potencjałach powierzchniowych membrany. W tej sytuacji równanie 6.2 przyjmuje postać, w której uwzględniony jest potencjał $\Delta\Psi$, konieczny do skompensowania wewnętrznego skoku potencjału w membranie:

$$C_m = C_0 + \beta(U + \Delta\Psi)^2 \quad (6.10)$$

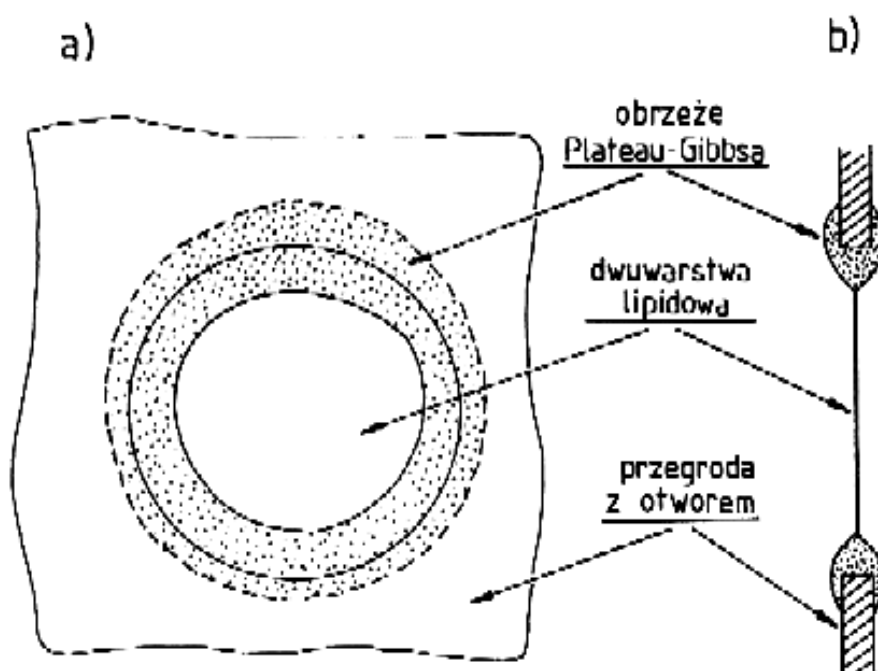


Rys. 6.3. Potencjały membranowe przy asymetrycznej membranie. Po lewej stronie membrany jest większa powierzchniowa gęstość ładunku niż po prawej stronie. Gdy potencjał transmembranowy $\Delta\Psi$ jest równy 0, wewnątrz membrany występuje skok potencjału $\Delta\phi$ (a). Przyłożenie zewnętrznego potencjału $\Delta\Psi$ o przeciwnej wartości niż $\Delta\phi$ powoduje kompensację wewnętrznego skoku potencjału (b). Na rysunku nie uwzględniono potencjału dipolowego.

Zależność pojemności od przyłożonego potencjału jest parabolą, która dla membran symetrycznych posiada minimum przy potencjale polaryzującym równym zero (Rys. 6.2,a). Gdy występują różnice w potencjałach powierzchniowych membrany, potencjał minimalnej pojemności jest przesunięty (Rys. 6.2,b,c). Rozkład potencjałów podczas polaryzowania asymetrycznej membrany przedstawiony jest na rysunku 6.3.

6.9. Obrzeże Plateau-Gibbsa

Warunkiem utworzenia się i istnienia płaskich dwuwarstwowych membran lipidowych jest obecność strefy łączącej dwuwarstwę z krawędzią otworu, w którym tworzona jest membrana (Rys. 6.4). Strefa ta nosi nazwę obrzeża Plateau-Gibbsa. Gdy membrany formowane są metodą Muellera-Rudina [170], obrzeże to utworzone jest z roztworu formującego. Gdy membrany tworzone są poprzez łączenie monowarstw (metoda Montala-Muellera) [1,171,172], krawędź otworu musi być wcześniej zwilżona niepolarnym rozpuszczalnikiem np. skwalenem, heksadekanem.



Rys. 6.4. Płaska dwuwarstwowa membrana lipidowa utworzona w otworze wykonanym w hydrofobowej przegrodzie.

Wielkość obrzeża Plateau-Gibbsa zależna jest od grubości przegrody używanej do tworzenia membran. Brullemans i Tancrede [183] badali wpływ grubości przegrody na pojemność membran tworzonych poprzez łączenie monowarstw. Stosowali folie teflonowe o grubościach od 6 do 25 μm . Pojemność specyficzna membran wynosiła od 0.661 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ dla folii o grubości 6 μm do 0.724 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ dla folii 25.4 μm . Wzrost grubości przegrody powodował wzrost pojemności specyficznej membran. Zmiana grubości przegrody zmieniała właściwości obszaru

przejsiowego pomiędzy dwuwarstwą a obrzeżem, które wpływają na boczne napięcie membrany. Zmieniało się pole powierzchni zajmowane przez pojedynczą molekułę w membranie.

7. Metody pomiaru pojemności membran lipidowych

Do pomiarów pojemności membran lipidowych opracowano kilka metod. W porównaniu z pomiarem pojemności zwykłych kondensatorów, pomiar pojemności membran lipidowych jest znacznie trudniejszy. Czynnikiem komplikującym pomiary jest rezystancja elektrod i rezystancja membrany. Dodatkowym problemem jest mała trwałość membran i niestabilność ich parametrów w czasie. W tabeli 7.1 przedstawiona jest charakterystyka czynników wpływających na pomiar pojemności.

Tab. 7.1. Czynniki wpływające na pomiar pojemności membran

Parametr	Charakterystyka
Amplituda sygnału pomiarowego	Pojemność membran lipidowych zależna jest od napięcia przyłożonego do membrany. Amplituda sygnału pomiarowego powinna więc być możliwie mała. Zwykle stosuje się sygnał o amplitudzie od kilku do kilkudziesięciu miliwoltów.
Impedancja elektrod	Należy stosować elektrody o możliwie małej impedancji. W niektórych metodach pomiarowych stosuje się kompensację rezystancji elektrod. Zwykle stosowane są elektrody o rezystancjach rzędu kilkuset omów.
Rezystancja membrany	Całkowity prąd przepływający przez membranę posiada dwie składowe: prąd rezystancyjny i prąd pojemnościowy. Gdy prąd rezystancyjny jest porównywalny z prądem pojemnościowym, należy uwzględnić jego wartość podczas pomiarów.

Do pomiarów pojemności wykorzystywanych jest kilka metod. Różnią się one sposobem wyznaczania pojemności i rodzajem stosowanego sygnału pomiarowego. W tabeli 7.2 przedstawione są charakterystyczne cechy tego typu metod stosowanych w pomiarach.

Tab. 7.2. Charakterystyka metod stosowanych w pomiarach pojemności membran.

Rodzaj	Charakterystyka
Sposób wyznaczenia pojemności	
Metody kompensacyjne	W metodach kompensacyjnych stosowany jest wzorcowy układ kondensatorów i rezystorów, modelujący badany układ. Sygnał elektryczny doprowadzany jest do badanej membrany i do układu wzorcowego. Dobiera się wartości elementów w układzie wzorcowym. Układy detekcji wykrywają stan, w którym parametry badanego układu i wzorcowego są sobie równe.
Metody parametryczne	W metodach parametrycznych wartość pojemności wyliczana jest na podstawie sygnału elektrycznego zależnego od pojemności membrany. Stosuje się np. pomiar prądu pojemnościowego, analizuje się krzywą napięcia rozładowania membrany.
Rodzaj sygnału pomiarowego	
Sinusoidalny	Stosowany przy pomiarach impedancji i w metodach mostkowych.
Trójkątny	Stosowany przy pomiarach prądu pojemnościowego. Przy stałej pojemności prąd ma przebieg prostokątny.
Prostokątny	Stosowany głównie w metodach impulsowych, analizowana jest charakterystyka ładowania lub rozładowania membrany.

7.1. Pomiary prądu pojemnościowego

Do pomiaru prądu pojemnościowego stosowany jest zwykle sygnał pomiarowy o przebiegu sinusoidalnym lub trójkątnym. W obu przypadkach stosowane są odmienne metody detekcji prądu pojemnościowego.

7.1.1. Pomiary przy użyciu sygnału sinusoidalnego

Gdy do kondensatora przyłożone jest napięcie zmienne o przebiegu sinusoidalnym, napięcie i natężenie prądu płynącego przez kondensator opisane są równaniami:

$$U(t) = U_0 \sin \omega t \quad (7.1)$$

$$I(t) = C \frac{dU}{dt} = C\omega U_0 \cos\omega t \quad (7.2)$$

gdzie: U_0 - amplituda napięcia na kondensatorze

ω - częstość kątowna = $2\pi f$

Równania 7.1 i 7.2 wskazują, że prąd płynący w obwodzie wyprzedza o 90° napięcie. Gdy rozważa się tylko amplitudy, prąd płynący w obwodzie jest równy:

$$I = U\omega C \quad (7.3)$$

Kondensator zachowuje się tak, jak byśmy mieli do czynienia z rezystancją zależną od częstotliwości:

$$R = \frac{1}{\omega C} \quad (7.4)$$

Stosując algebrę liczb zespolonych możliwe jest rozpatrywanie napięć, prądów i przesunięć fazowych w układach zawierających pojemności. Pozorna oporność kondensatora, zwana reaktancją, określona jest równaniem:

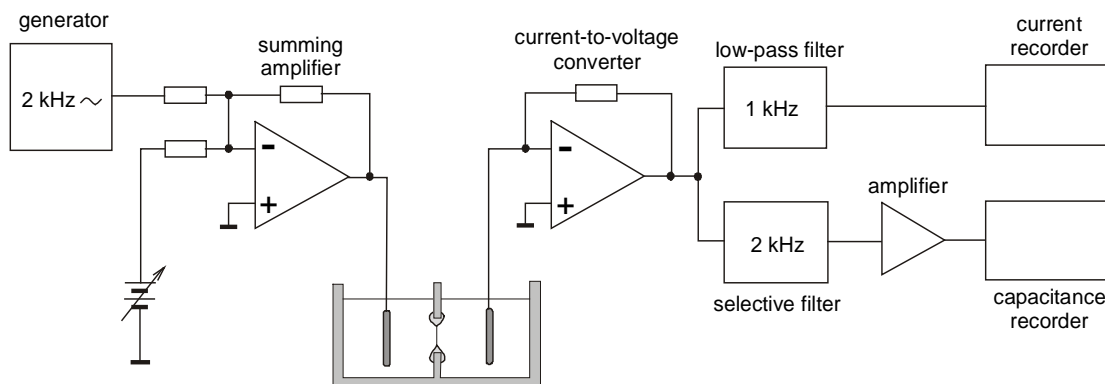
$$Z_c = \frac{-j}{\omega C} \quad (7.5)$$

gdzie: j - liczba urojona $\sqrt{-1}$

Membrana wraz z elektrolitami i elektrodami stanowi złożony układ rezystancji i pojemności. Pomiar impedancji przeprowadzone przy różnych częstotliwościach i matematyczna analiza otrzymanych wyników pozwalają na wyznaczenie wartości poszczególnych elementów badanego układu: pojemności i rezystancji membrany, rezystancji elektrod i elektrolitów. Dokładniejsza analiza pozwala na wyznaczenie poszczególnych pojemności i rezystancji w trójwarstwowym modelu membrany [66,67,90,91,169]. Pomiar oparte na pomiarach prądu pojemnościowego opisane są w wielu pracach [35,93,167,179,184,185].

Hanke i Schlue [185] opisują układ do badań właściwości membran, który separuje prąd pojemnościowy i rezystancyjny (Rys. 7.1). Sygnał stałoprądowy sumowany jest z napięciem zmiennym i doprowadzany do elektrody. Konwerter prąd-napięcie daje na wyjściu napięcie proporcjonalne do natężenia prądu płynącego przez elektrody. Sygnał ten jest rozdzielany na dwie składowe. Filtr dolnoprzepustowy zatrzymuje sygnał zmiennoprądowy, a przepuszcza jedynie składową stałoprądową, zależną od przewodnictwa membrany. Drugim torem, poprzez filtr selektywny przepuszczany jest sygnał zmiennoprądowy, którego

amplituda zależna jest od pojemności membrany. Sygnał ten doprowadzany jest do rejestratora pojemności.



Rys. 7.1. Układ do badań pojemności oparty na pomiarze prądu pojemnościowego membrany [185].

7.1.2. Pomiary z użyciem sygnału o przebiegu trójkątnym

Do pomiarów pojemności membran wykorzystywany jest sygnał o przebiegu trójkątnym. Zaletą takiego sygnału jest to, że natężenie prądu pojemnościowego jest falą prostokątną o amplitudzie proporcjonalnej do pojemności. Sygnał taki jest przetwarzany na napięcie. Może być odczytywany za pomocą oscyloskopu cyfrowego. Może być również prostowany i wtedy mierzony.

Przyłożenie do kondensatora liniowo zmieniającego się napięcia powoduje przepływ przez kondensator prądu o natężeniu:

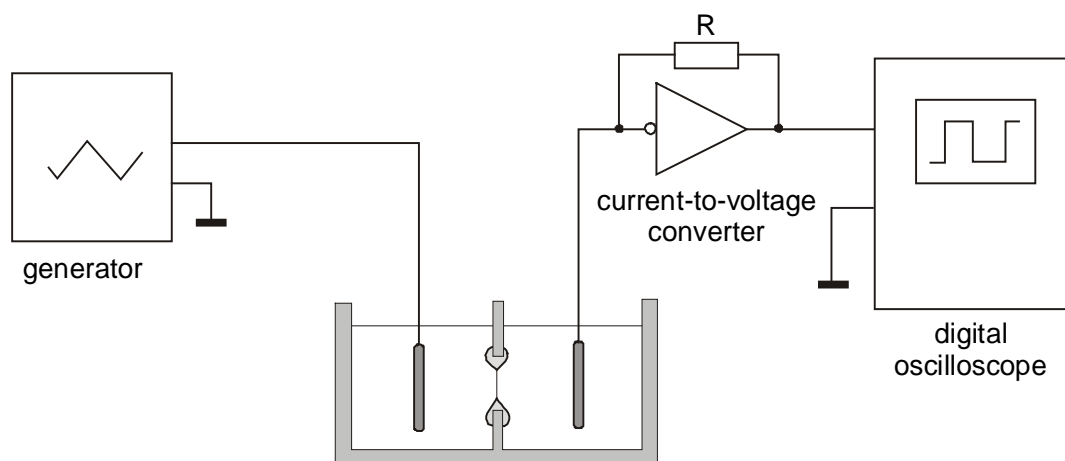
$$i = V \cdot C \quad (7.6)$$

gdzie: C - pojemność kondensatora

V - szybkość zmian napięcia

Metoda ta wykorzystywana jest w wielu pracach [61,182,186-188]. Pomiary z użyciem przebiegu trójkątnego wykorzystywane są również przy badaniach pojemności w funkcji przyłożonego do membrany napięcia. Membrana jest polaryzowana liniowo zmieniającym się napięciem w pożądanym zakresie napięć. Schemat sprzętu do pomiaru prądu pojemnościowego przedstawiony jest na

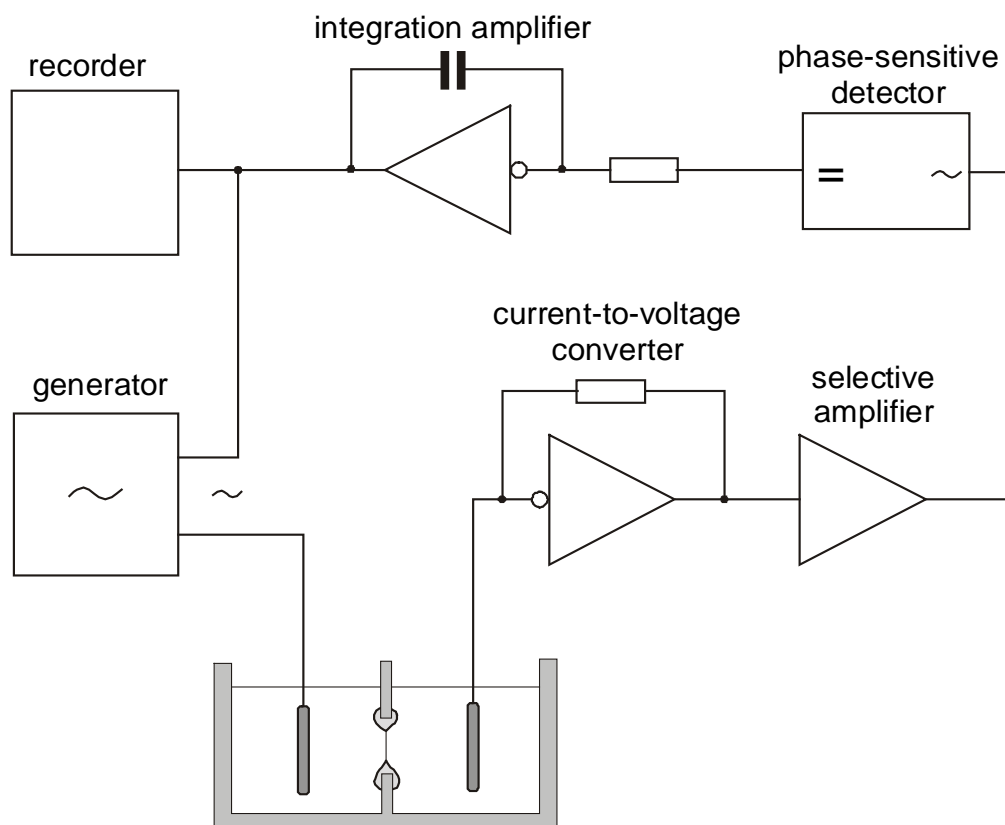
rysunku 7.2. Do membrany doprowadzony był z generatora sygnał o przebiegu trójkątnym. Sygnał pomiarowy posiadał amplitudę ± 200 mV i szybkość 100-500 V/s. Przetwornik zamieniał sygnał prądowy na sygnał napięciowy, który był rejestrowany przez oscyloskop cyfrowy.



Rys. 7.2. Schemat układu do pomiaru pojemności membran. Wykorzystywany jest pomiar prądu pojemnościowego membrany [182].

7.1.3. Pomiar potencjału minimalnej pojemności

Układy pomiarowe oparte na pomiarze prądu pojemnościowego wykorzystywane są do automatycznego pomiaru potencjału minimalnej pojemności [179-182]. Schemat układu pomiarowego przedstawiony jest na rysunku 8.3. Detektor fazoczuły izoluje z sygnału wychodzącego z konwertera prąd-napięcie składową przesuniętą w fazie o 90° (prąd pojemnościowy). Napięcie z detektora doprowadzane jest do układu całkującego. Do wyjścia układu całkującego dołączony jest rejestrator. Napięcie z układu całkującego sumowane jest z sygnałem sinusoidalnym i doprowadzane do elektrody. Układ automatycznie kompensuje napięcie, przy którym występuje minimalna wartość pojemności.



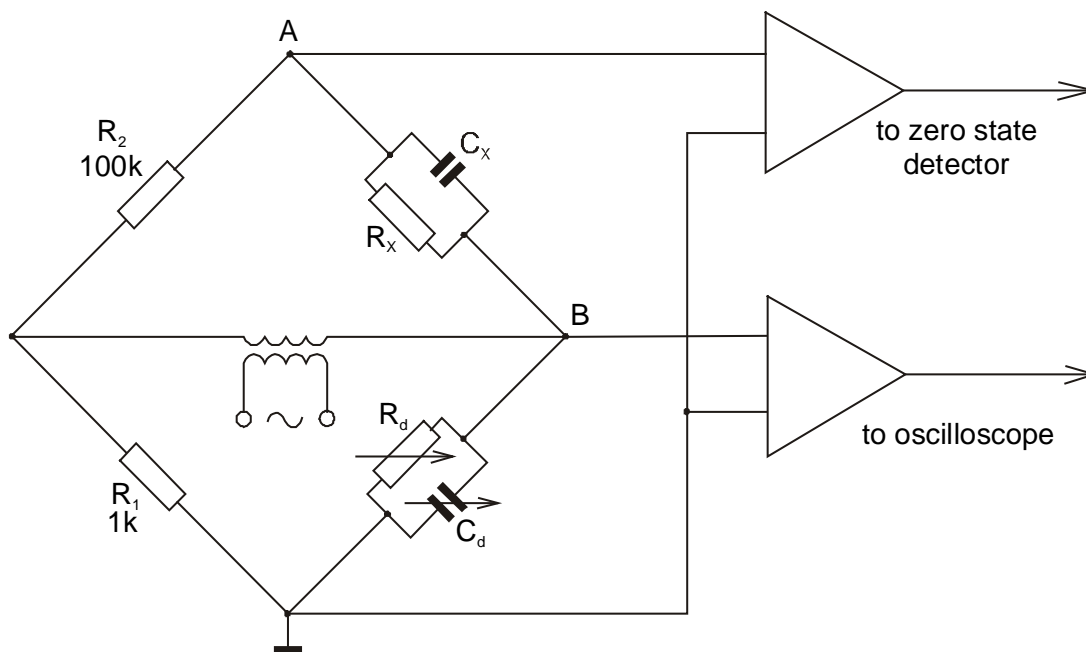
Rys. 7.3. Schemat układu do pomiaru potencjału minimalnej pojemności [182].

7.2. Metody mostkowe

Metody mostkowe należą do metod kompensacyjnych. Są one często wykorzystywane do pomiarów pojemności membran. Pozwalają na pomiar z dużą dokładnością. Ich wadą jest duża czasochłonność pomiarów, natomiast zaletą bezpośredni odczyt pojemności.

Precyzyjny mostek opracowany został przez White'a [35,163,189]. Uproszczony schemat mostka przedstawiony został na rysunku 7.4. Rezystancje rezystorów R_1 i R_2 różnią się między sobą 100-krotnie. Dzięki temu natężenie prądu przepływającego przez dolną gałąź mostka jest 100-krotnie większe od prądu płynącego przez membranę. Układ jest mniej wrażliwy na zakłócenia i na pojemności przewodów łączących kondensator i rezystor dekadowy do mostka. Mostek zasilany jest z zewnętrznego generatora poprzez sprzężenie indukcyjne lub łącze optoelektroniczne. Do wyjścia mostka (punkt A) dołączony jest detektor zera służący do wykrycia stanu zrównoważenia mostka. Do punktu B poprzez

wzmacniacz dołączony jest oscyloskop, który służy do pomiaru amplitudy napięcia na membranie.

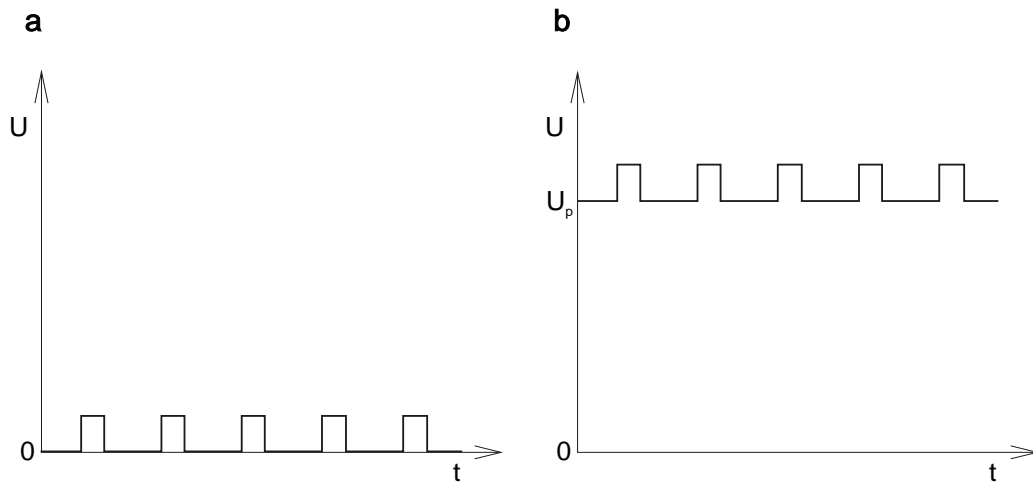


Rys. 7.4. Mostek do pomiarów pojemności stosowany przez White'a [189].

Mostek ten stosowany był przez White'a w jego wielu pracach [62,63,161-163, 173,177,189]. Metoda mostkowa stosowana była również przez innych [2,50,64,89, 160,167,169,174,190]. Mostki sterowane były zwykle napięciem sinusoidalnym o amplitudzie od kilku do kilkudziesięciu miliwoltów i częstotliwości 500 Hz - 5 kHz.

7.3. Metody impulsowe

Metody impulsowe stosowane do pomiarów pojemności posiadają wiele odmian. Są one proste w realizacji i opisane są w wielu pracach [35,61,73-75,93,118, 124,160,166-168,178,185,191-197]. Autorzy stosują trzy zasadnicze typy układów pomiarowych: układy całkujące, układy różniczkujące i układy z ładowaniem impulsowym. Metody impulsowe przydatne są przy pomiarach pojemności membran z narzuconym potencjałem. Impulsy pomiarowe nałożone są na potencjał polaryzujący (Rys. 7.5b).



Rys. 7.5. Przebieg napięciowy podczas impulsowych pomiarów pojemności membran, a) przy potencjale polaryzującym $U_p = 0$, b) przy narzuconym potencjale polaryzującym U_p .

7.3.1. Układy całkujące

Schemat układu i przebiegi napięciowe w układzie przedstawione są na rys. 7.6a i 7.6b. Skok napięcia na wejściu układu powoduje przepływ przez rezystor i kondensator prądu o natężeniu:

$$i = C \frac{dU}{dt} = \frac{U_{we} - U_{wy}}{R} \quad (7.7)$$

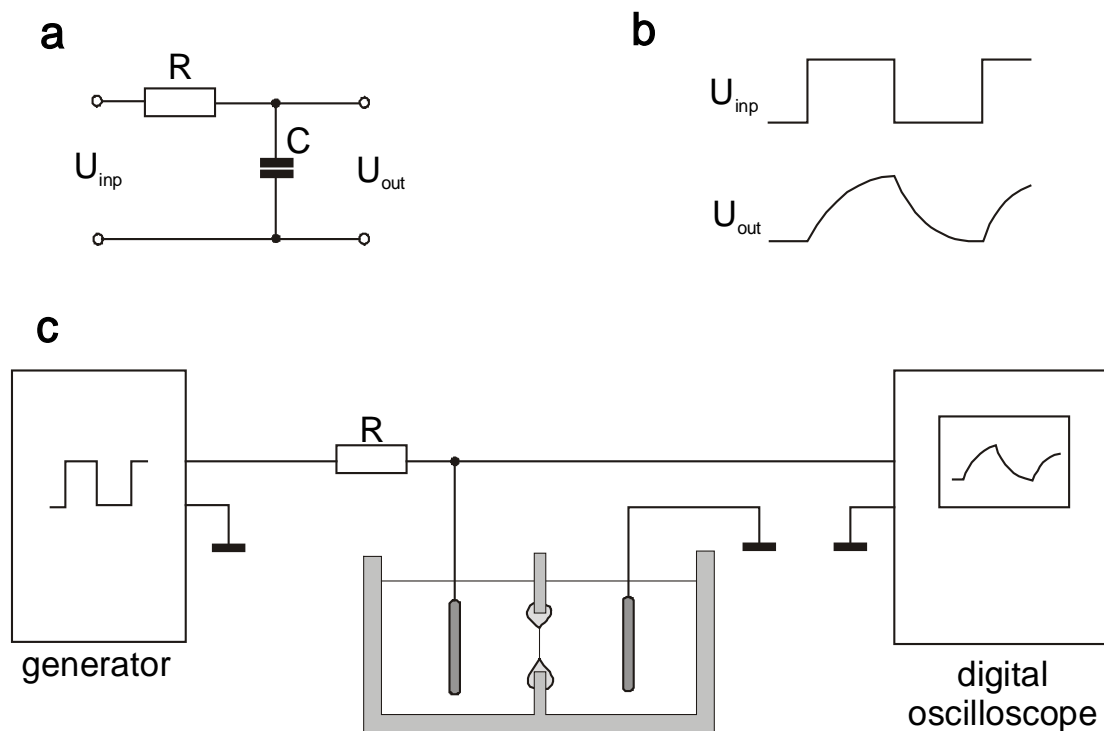
Równanie (7.7) po rozwiązaniu przyjmuje postać:

$$U_{wy} = U_{we} + A \cdot e^{-\frac{t}{RC}} \quad (7.8)$$

Po uwzględnieniu warunków początkowych $A = -U_{we}$ napięcie na wyjściu układu jest równe:

$$U_{wy} = U_{we} \cdot (1 - e^{-\frac{t}{RC}}) \quad (7.9)$$

Przykład praktycznej realizacji zestawu pomiarowego przedstawiony jest na rys. 7.6. Źródłem sygnału pomiarowego jest generator przebiegu prostokątnego.



Rys. 7.6. Pomiar pojemności membran przy połączeniach w układzie całkującym, a) schemat elektryczny, b) przebiegi napięciowe w układzie, c) sprzęt pomiarowy.

7.3.2. Układy różniczkujące

Schemat układu elektrycznego i przebiegi napięciowe w układzie przedstawione są na rys. 7.7a i 7.7b. Gdy pojawia się na wejściu skok napięcia U_{we} , przez układ przepływa prąd, który opisany jest równaniem:

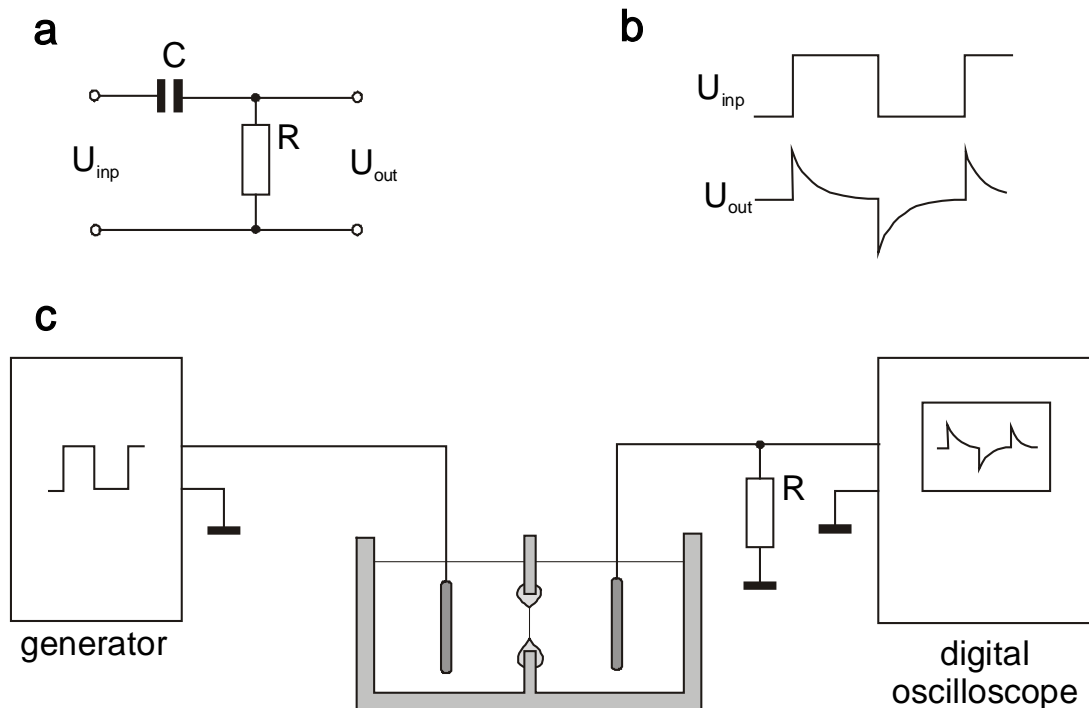
$$i = C \frac{d}{dt} (U_{we} - U_{wy}) = \frac{U_{wy}}{R} \quad (7.10)$$

Równanie 7.10 po rozwiązaniu i uwzględnieniu warunków brzegowych opisuje przebieg napięcia wyjściowego U_{wy} po pojawieniu się skoku napięcia:

$$U_{wy} = U_{we} \cdot e^{-\frac{t}{RC}} \quad (7.11)$$

Na wyjściu pojawi się skok napięcia, które następnie eksponencjalnie opada do zera.

Przykład praktycznej realizacji zestawu pomiarowego przedstawiony jest na rys. 7.7c. Źródłem sygnału pomiarowego jest generator przebiegu prostokątnego.

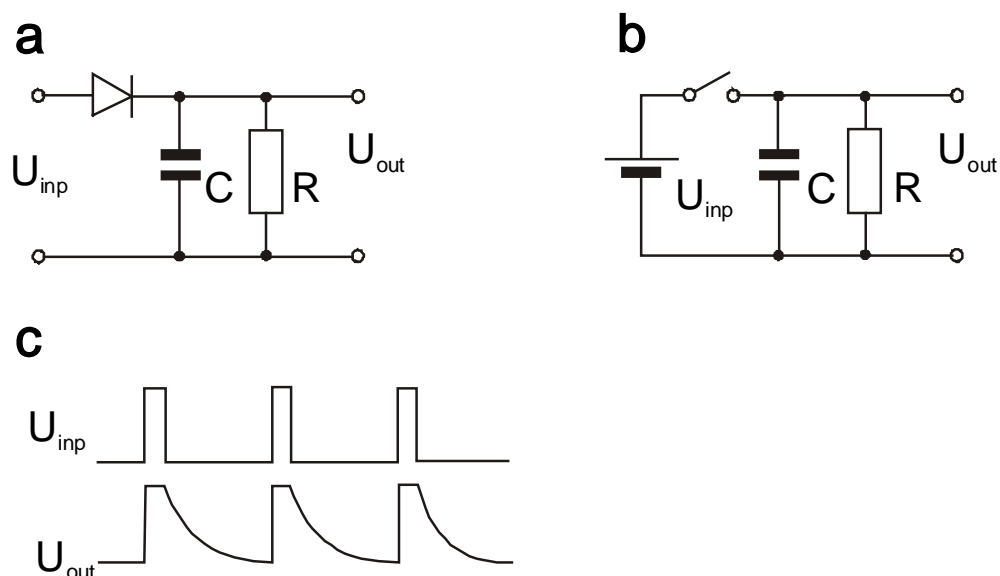


Rys. 7.7. Pomiar pojemności membran przy połączeniach w układzie różniczkującym, a) schemat elektryczny, b) przebiegi czasowe w układzie, c) sprzęt pomiarowy.

7.3.3. Układy z ładowaniem impulsowym

Schematy elektryczne układów do pomiarów pojemności membran przedstawione są na rysunku 7.8. Stosowane są dwa sposoby ładowania membrany. Membrana ładowana jest krótkim impulsem napięciowym podawanym z generatora poprzez szybką diodę przełączającą (Rys. 7.8a) lub poprzez przełącznik elektroniczny sterowany z generatora impulsów (Rys. 7.8b). Membrana w ciągu krótkiego czasu ładowana jest do napięcia U_{we} . Po zaniku napięcia ładującego membrana rozładowuje się poprzez rezystor R . Przebiegi napięciowe w układzie przedstawione są na rysunku 7.8c. Napięcie na membranie podczas rozładowania opada eksponencjalnie:

$$U_{wy} = U_B \cdot e^{-\frac{t}{RC}} \quad (7.12)$$

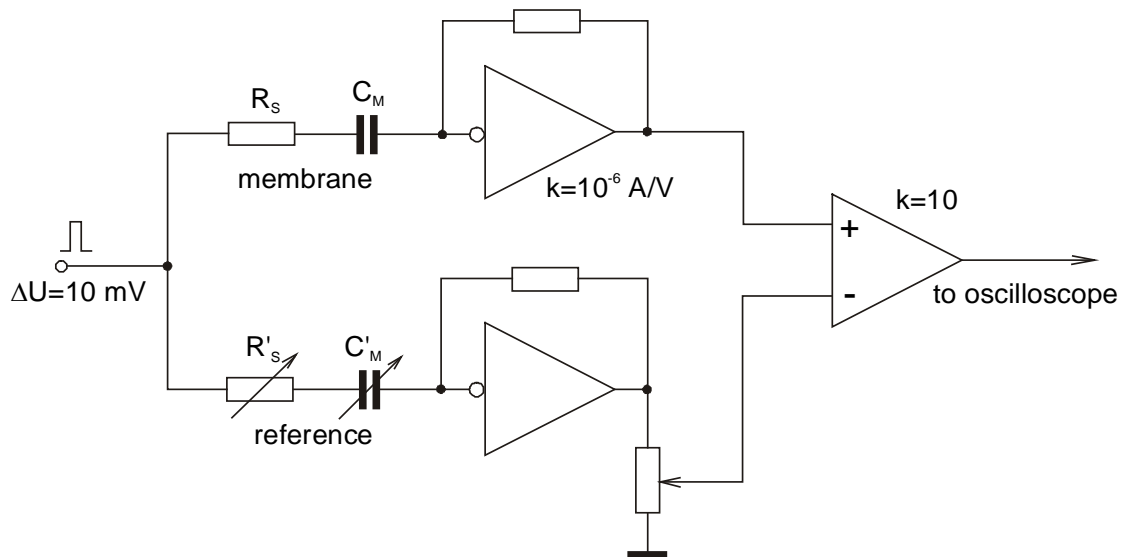


Rys. 7.8. Schemat elektryczny układu pomiarowego z impulsowym ładowaniem membrany, a) układ z diodą, b) układ z przełącznikiem elektronicznym, c) przebiegi napięciowe w układzie.

7.3.4. Metoda kompensacyjna

Alvarez i Latorre [61] zastosowali połączenie metody kompensacyjnej z impulsowym pobudzaniem membrany i wzorca. Schemat układu pomiarowego przedstawiony jest na rysunku 7.9.

Prostokątny impuls pobudzający doprowadzany jest do badanej membrany i do wzorcowego układu RC. Konwertery I/U przetwarzają prądy płynące przez membranę i przez układ wzorcowy na napięcia. Od sygnału powstającego w membranie odejmowany jest sygnał z układu wzorcowego i różnica jest wzmacniana. Podczas pomiaru dobierane są wartości elementów C_M' i R_S' tak, aby sygnał wyjściowy był równy 0. Wartości C_M' i R_S' równe są wtedy pojemności membrany C_M oraz rezystancji elektrod i elektrolitów R_S .



Rys. 7.9. Układ pomiarowy stosowany przez Alvareza i Latorre [61].

8. Zastosowanie badań pojemności membran lipidowych

Pojemność membran lipidowych może być wykorzystywana jako główny parametr dostarczający informacji o grubości membrany, jej stabilności, przebiegu procesu formowania. Pojemność membran jest wykorzystywana również jako parametr pomocniczy, użyteczny przy badaniach potencjałów powierzchniowych, kinetyki transportu przez membrany, elektroporacji.

8.1 Badanie procesów formowania i stabilności membran

Płaskie membrany lipidowe oprócz wielu zalet posiadają również istotną wadę. Jest nią mała stabilność membran. W miarę upływu czasu zmienia się ich pole powierzchni i grubość [63,163]. Dzięki rejestracji pojemności możliwe jest określenie czasu, po którym proces formowania membrany można uznać za zakończony. Na podstawie badań pojemności membran można również oszacować ich stabilność.

Badania pojemności membran podczas formowania prowadzili Coster i Smith [88]. Po 15 minutach od momentu poczernienia membrana była uformowana i dalszy

wzrost pojemności był nieznaczny. Membrany otrzymane przez nich były stabilne przez 2-4 godziny.

Tien i Salamon [198] badali proces polimeryzacji pirolu w membranie poprzez pomiary pojemności. Pomiary pojemności są również wykorzystywane przy badaniach procesu formowania się dwuwarstwy lipidowej na stałym podłożu, np. na platynie [199].

8.2. Pomiary grubości membran

Pomiary pojemności pozwalają na prosty pomiar grubości warstwy hydrofobowej membrany. (Równ. 6.2). Przenikalność elektryczna warstwy hydrofobowej szacowana jest na podstawie przenikalności związków chemicznych, które posiadają budowę podobną do fragmentów lipidów tworzących tę warstwę [167]. Przenikalność elektryczna warstwy hydrofobowej może być również wyznaczana teoretycznie [65].

8.3. Badanie procesów transportu przez membrany

Pomiary pojemności wykorzystywane były przy badaniach transportu przez membrany metodami impulsowymi [73-75,93,195]. Prowadzone były badania transportu jonów lipofilowych przez membrany. Pojemność membran w tym wypadku jest tylko wartością pomocniczą. Charakterystyka rozładowania pojemności membrany dostarcza informacji o kinetyce transportu. Pozwala wyznaczyć stałe szybkości poszczególnych etapów transportu: adsorpcję jonów na powierzchni membrany, dyfuzję przez membranę i desorpcję po drugiej stronie membrany.

8.4. Badania potencjałów membranowych

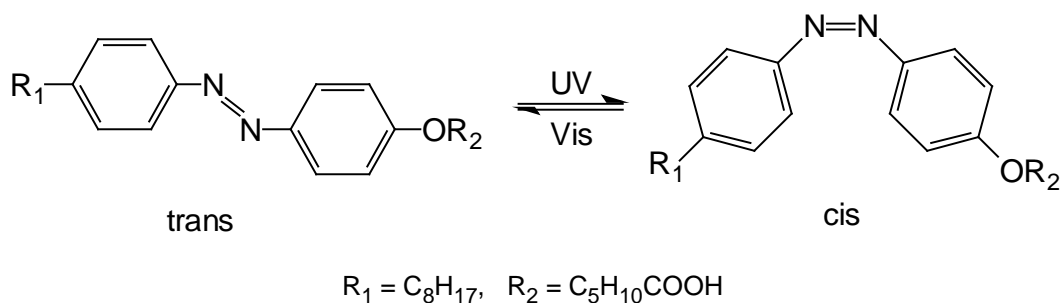
Zastosowanie pomiarów pojemności do badań potencjałów powierzchniowych opisane jest w kilku pracach [61,179-181]. Pomiary oparte są na zjawisku elektrokompresji (Rozdz. 6.8). Potencjały powierzchniowe po obu stronach membrany mogą mieć różne wartości. W tej sytuacji konieczne jest przyłożenie zewnętrznego napięcia, aby skok napięcia wewnątrz membrany był równy 0 i pojemność membrany przyjęła minimalną wartość (Rys. 6.3). Wartość tego napięcia

równa jest różnicy potencjałów powierzchniowych. Metoda ta nazywana jest metodą minimalizacji pojemności.

Alvarez i Latorre [61] badali potencjał minimalnej pojemności membran tworzonych poprzez łączenie monowarstw o różnym składzie lipidów. Dla membran, w których jedna monowarstwa składała się z fosfatydyloetanolaminy, a druga z fosfatydyloseryny, różnica potencjałów powierzchniowych dochodziła do 122 mV. Inni autorzy badali zmiany potencjałów spowodowane obecnością dużych dwuwartościowych kationów [118], substancji powierzchniowo czynnych [180], składu elektrolitów [182].

8.5. Badanie efektów fotoelektrycznych

Membrany zawierające amfofilowe pochodne azobenzenu zmieniają swoją pojemność po oświetleniu ich światłem widzialnym lub ultrafioletowym [134-137]. Zmiana długości fali światła padającego na membranę powodowała zmiany izomeryzacji *cis-trans*:



Przejścia *cis-trans* w konfiguracji pochodnej azobenzenu powodują zmiany struktury membrany, których efektem są zmiany przenikalności elektrycznej i grubości membrany.

Znaczne zmiany przenikalności elektrycznej pod wpływem światła zachodzą w membranach ciekłokrystalicznych zawierających tetracyjanochinodimetan (TCNQ). Membrany takie zmieniały swoją pojemność po oświetleniu z 24 do 14 nF [200]. W membranach tych prawdopodobnie powstają kompleksy z przeniesieniem ładunku, którego rozkład zależy od światła.

8.6. Badanie tworzenia porów w membranach

Membrany lipidowe ulegają przebiciu pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego. W membranie powstają pory, które mogą doprowadzić do zniszczenia membrany. Gdy membrana poddana była działaniu krótkotrwałego impulsu napięciowego, powstałe pory mogą zamknąć się. Zjawisko to nazywane jest odwracalnym przebiciem elektrycznym. Do badania tego zjawiska wykorzystywana jest metoda impulsowego ładowania membrany [154]. Rozładowanie membrany następuje poprzez powstające pory. Znajomość pojemności membrany i charakterystyka jej rozładowania pozwala na badania kinetyki i termodynamiki tego zjawiska. Badania potencjału minimalnej pojemności wykorzystywane są również w badaniach wewnętrznego skoku potencjału w asymetrycznych membranach, który ma wpływ na potencjał, przy którym zachodzi elektroporacja [201].

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

9. Cele i struktura pracy

Ogrom problemów pojawiających się przy badaniach mających na celu zrozumienie funkcjonowania błon biologicznych wymaga rozwoju metod badawczych i technik pomiarowych. Nawet stosunkowo prosty układ, jakim są sztuczne dwuwarstwowe membrany lipidowe, kryje ciągle jeszcze wiele nierozwiązanych zagadnień dotyczących struktury membran, transportu przez membrany, właściwości elektrycznych membran. Próby matematycznego opisu wielu procesów związanych z membranami prowadzą do bardzo złożonych równań. Duża zmienność parametrów membran i trudności w jednoznacznym określeniu ich współzależności (np. potencjały membranowe) wymagają stosowania bardzo uproszczonych modeli.

Pojemność - jako jeden z parametrów charakteryzujących dwuwarstwowe membrany lipidowe - jest w znikomym stopniu wykorzystywana w badaniach membran. Wyniki przedstawione w tej pracy uzyskane są poprzez ciągłą rejestrację pojemności podczas polaryzowania membrany. W zależności od rodzaju eksperymentu stosowano odpowiednio zaprogramowany przebieg napięciowy, składający się z kombinacji stałych poziomów napięciowych i/lub liniowych przebiegów napięciowych.

Głównym celem tej pracy jest rozwój metod badania zjawisk membranowych bazujących na pomiarach pojemności oraz wykorzystanie ich w analizie podstawowych właściwości fizykochemicznych membran. Pojemność może być traktowana jako samodzielny parametr charakteryzujący membrany, ale może być traktowana również jako wartość pomocnicza, umożliwiająca badania innych parametrów membran np. potencjałów, przewodnictwa. W pracy omówione są zalety i ograniczenia stosowania pomiarów pojemności w badaniach zjawisk membranowych.

Część eksperymentalna tej pracy zawiera rozbudowany rozdział opisujący sprzęt pomiarowy zaprojektowany i zbudowany do badań zjawisk membranowych (rozdział 10). Do pomiarów pojemności wykorzystano sposób odmienny od dotychczas stosowanych. Do badań właściwości elektrycznych membran w

warunkach kontrolowanego potencjału i prądu opracowano 4-elektrodowy potencjostat-galwanostat o konstrukcji i zasadzie działania innej niż dotychczas stosowane.

Badania wstępne dotyczą pojemności membran podczas procesu formowania. Każdy eksperyment prowadzony na dwuwarstwowych membranach lipidowych poprzedzony jest etapem tworzenia membrany. Szereg obserwacji dokonanych podczas tego etapu zebrany jest w rozdziale 13. Usystematyzowanie zaobserwowanych prawidłowości umożliwi skrócenie i usprawnienie procesu formowania membran.

Dodatkowym efektem zaobserwowanym podczas badań jest zależność pojemności specyficznej dwuwarstw lipidowych od wielkości obrzeża Plateau-Gibbsa, która jest opisana w rozdziale 14.

Głównym tematem pracy są badania wpływu potencjału polaryzującego na pojemność membran. Zagadnienia te podzielone są na dwie części. Pierwsza z nich (rozdział 15) opisuje badania pojemności membran jako głównego parametru charakteryzującego membrany. Następny rozdział dotyczy badań potencjałów membranowych wykorzystujących metodę minimalizacji pojemności [181]. W rozdziale tym podana jest analiza możliwych zmian struktury membran wywołanych zmianami potencjału polaryzującego. Część z opisanych badań jest powtórzeniem badań przeprowadzonych wcześniej przez innych przy użyciu innych technik pomiarowych. Badania te miały na celu przetestowanie aparatury pomiarowej i porównanie ich z wynikami uzyskanymi przez innych.

W końcowej części pracy (rozdział 17) przedstawiono możliwości zastosowania chronopotencjometrii w badaniach pojemności membran. Przedstawiono również chronopotencjometryczne badania zjawiska elektroporacji membran, w których pojemność traktowana jest jako parametr pomocniczy, umożliwiający wyznaczanie przewodnictwa powstających porów.

W podsumowaniu omówione zostały wyniki badań zjawiska zmiany pojemności membran pod wpływem potencjału polaryzującego - mechanizm zjawiska i zmiany struktury membran. Omówiono również wyniki badań elektroporcji membran. Poddano ocenie zastosowane nowe metody badań membran - ich możliwości i ograniczenia. W rozdziale 19 wskazane są kierunki i perspektywy dalszych badań, bazujących na wynikach przedstawionych w tej pracy.

10. Aparatura pomiarowa

Płaskie membrany lipidowe są obiektem badań od ponad 30 lat. Pomimo tak długiego czasu ciągle niedostatecznie rozwinięta jest metodyka pomiarów elektrycznych w membranach. Gwałtowny rozwój technik komputerowych stworzył nowe możliwości rozwoju aparatury do badań zjawisk membranowych. W rozdziale tym przedstawiony jest opis i charakterystyka systemu pomiarowego stworzonego do przeprowadzenia badań pojemności membran lipidowych.

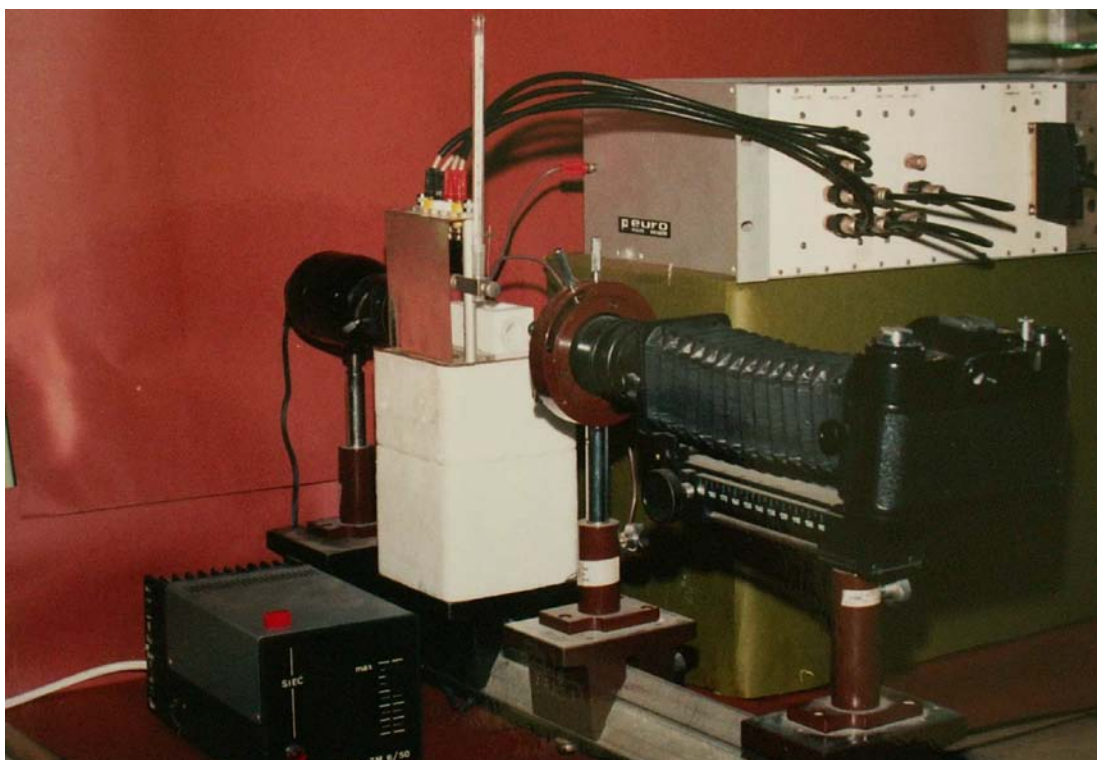
10.1. Struktura systemu pomiarowego.

Opisywany zestaw pomiarowy oparty jest na koncepcji otwartej architektury. Zestaw sterowany jest przy użyciu mikrokomputerów PC/AT/386/486/Pentium. Koncepcja otwartej architektury oparta została o strukturę mikrokomputerów IBM PC, których funkcje i możliwości zależą od rodzaju umieszczonych w nich interfejsów. Zestaw wykorzystywany do badań membran lipidowych składał się z naczynia pomiarowego, układu optycznego i mikrokomputera PC/AT, do którego podłączona była kasetta zawierająca zasilacz i moduły pomiarowe. Możliwości pomiarowe zestawu zależały od rodzaju umieszczonych w kasecie modułów pomiarowych, które w miarę potrzeb były uzupełniane lub zastępowane innymi. Do sterowania zestawem pomiarowym wykorzystywane było oprogramowanie pracujące w środowisku *Windows 3.1* (Microsoft). Mierzone wielkości elektryczne (potencjał, natężenie prądu, pojemność) przetwarzane były na sygnały cyfrowe, które poddawano dalszym procesom.

Rysunek 10.1 przedstawia fotografię zestawu pomiarowego. Kasetta połączona jest z komputerem kablem, którym przesyłane są sygnały cyfrowe (linie adresowe, linie danych, sygnały sterujące). Dane pomiarowe przechowywane były na dyskach. Raport z pomiarów drukowany był na drukarce lub rysowany na ploterze. Pliki z danymi zapisanymi w postaci tekstowej wykorzystywane były przy obliczeniach wykonywanych przy pomocy arkusza kalkulacyjnego *Excel* (Microsoft).

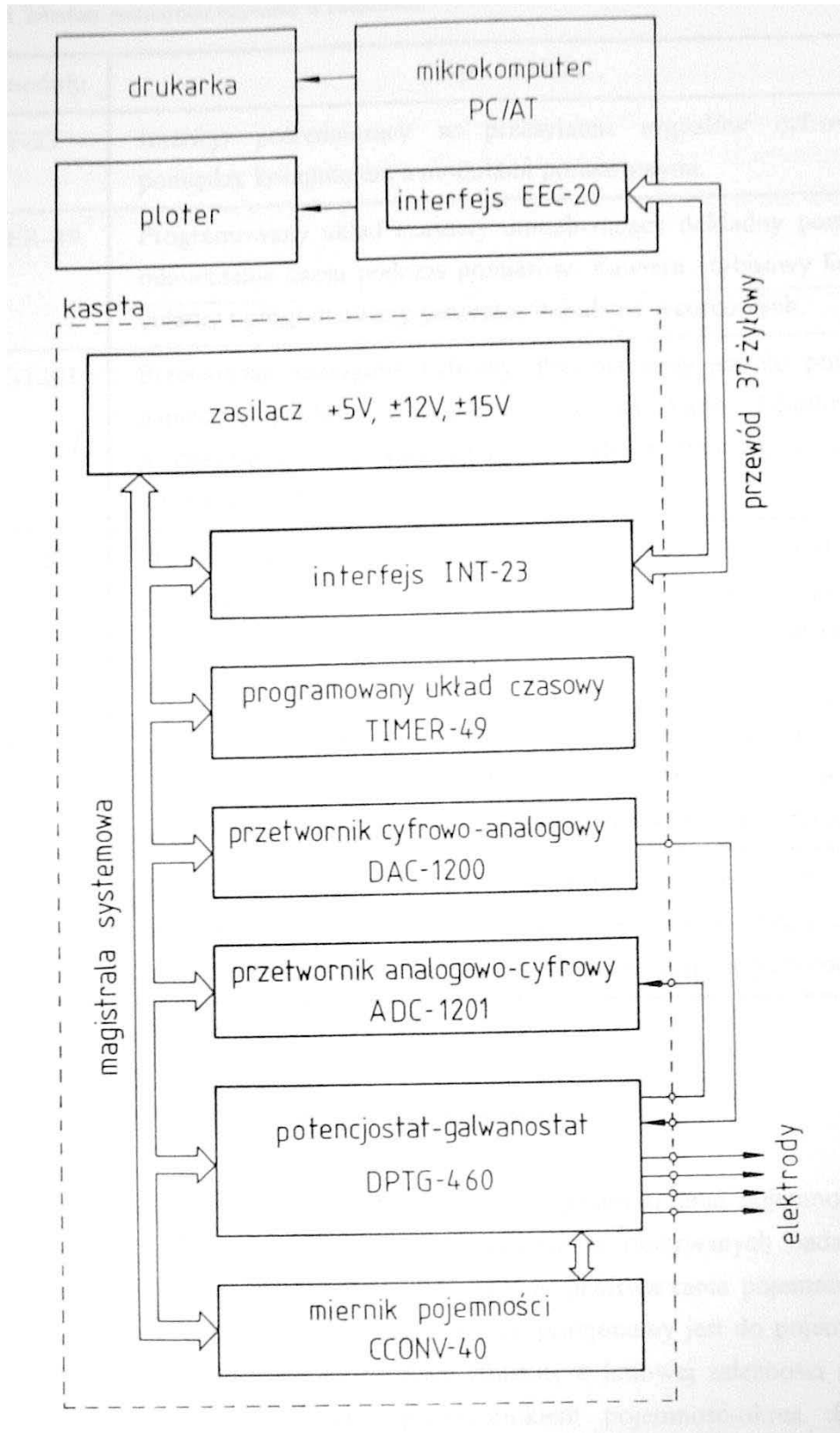
Moduły pomiarowe umieszczone są w kasecie, która zawiera magistralę systemową i zasilacz. Magistralą systemową przesyłane są napięcia zasilające i sygnały cyfrowe (Rys. 10.2). Magistrala stanowi przedłużenie niektórych linii sygnałowych mikrokomputera (linie adresowe A0-A7, linie danych D0-D15, sygnały zapisu i odczytu i inne sygnały sterujące). Moduły pomiarowe umieszczone w

kasce znajdują się bezpośrednio w przestrzeni adresowej wejść-wyjść mikroprocesora. Zapewnia to bezpośredni nadzór nad modułami przez mikroprocesor oraz bardzo dużą szybkość przesyłania danych (do 1MB/s). Do umożliwienia komunikacji komputera z modułami w kasce zbudowany został interfejs EEC-20, który wyprowadza z komputera na zewnątrz odpowiednie sygnały. Funkcje poszczególnych modułów pomiarowych opisane są w tabeli 10.1.



Rys. 10.1. Fotografia zestawu pomiarowego używanego do badań membran lipidowych.

Do przeprowadzenia badań w membranach zostały zaprojektowane 4-elektrodowe układy pomiarowe: układ do pomiaru pojemności membran i potencjostat-galwanostat. Dzięki nim zmniejszone są błędy związane z rezystancją elektrod i elektrolitów. Układy 4-elektrodowe stosowane są w badaniach elektrochemicznych od dawna. Stosowano je w elektroforezie [202], miareczkowaniu kulometrycznym [203], badaniach na granicach faz dwóch elektrolitów nie mieszających się [204-207]. Również w badaniach membran lipidowych stosowane są układy 4-elektrodowe [35,88,197,208-214]. Rozwój mikroelektroniki umożliwił budowę prostych 4-elektrodowych potencjostatów [204,206].



Rys. 10.2. Schemat blokowy systemu pomiarowego.

Tab. 10.1. Moduły pomiarowe używane w badaniach.

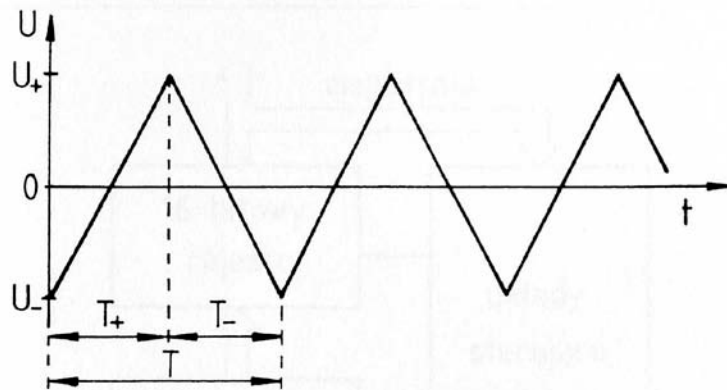
Typ modułu	Opis modułu
INT-23	Interfejs pośredniczący w przesyłaniu sygnałów cyfrowych pomiędzy komputerem a modułami pomiarowymi.
TIMER-49	Programowany układ czasowy umożliwiający dokładny pomiar i odmierzanie czasu podczas pomiarów. Zawiera 16-bitowy licznik binarny i programowany generator impulsów wzorcowych.
ADC-1201	Przetwornik analogowo-cyfrowy. Przeznaczony jest do pomiaru napięć i prądów. Zbudowany jest na bazie 12-bitowego przetwornika A/C typu ADC574A (Burr Brown), o czasie konwersji 20 μ s.
DAC-1201	Przetwornik cyfrowo-analogowy. Przeznaczony jest do programowego ustawiania potencjałów i prądów podczas pomiarów. Zbudowany jest na bazie 12-bitowego przetwornika C/A typu DAC85 (Burr Brown).
DPTG-460	Cyfrowo programowany potencjostat-galwanostat o dużej czułości, pracujący w układzie 2-, 3- lub 4-elektrodowym. Umożliwia pomiar prądów z rozdzielczością kilku pikoamperów.
CCONV-40	Moduł przeznaczony do pomiaru pojemności membran lipidowych. Pozwala na pomiar w układzie 2- lub 4-elektrodowym. Umożliwia polaryzację membran podczas pomiaru pojemności.

10.2. Opis metody pomiaru pojemności.

Jednym ze sposobów pomiaru pojemności jest przetwarzanie pojemności na częstotliwość [215]. Metoda ta została wykorzystana w opisywanych badaniach. Pomiary pojemności przeprowadzane były na drodze przetwarzania pojemności na sygnał o przebiegu prostokątnym, którego okres proporcjonalny jest do pojemności. Układ przetwarzający pojemność na przebieg zmienny o liniowej zależności okresu od pojemności nazywany jest dalej przetwornikiem pojemność-okres. Odczyt pojemności sprowadzał się do pomiaru okresu uzyskanego sygnału i przeliczenia go na wartość pojemności. Czynności te wykonywane były przez układy cyfrowe

zawarte w module pomiarowym. Wartość pojemności odczytywana była przez komputer bezpośrednio z modułu pomiarowego.

Przetwarzanie pojemności na sygnał zmienny polega na cyklicznym ładowaniu i rozładowywaniu mierzonego kondensatora prądem o stałym natężeniu, lecz zmieniającym się kierunku przepływu prądu. Przebieg napięcia na kondensatorze jest piłokształtny (Rys. 10.3). Kierunek przepływu prądu zmieniany jest przez układy elektroniczne przy napięciach U_1 i U_2 .



Rys. 10.3. Przebieg napięciowy na mierzonym kondensatorze.

Szybkość zmian napięcia V na mierzonym kondensatorze zależy jest od natężenia prądu i oraz od pojemności C :

$$V = \frac{U_1 - U_2}{T_+} = \frac{i}{C} \quad (10.1)$$

stąd czas trwania ładowania kondensatora od napięcia U_2 do U_1 opisany jest równaniem:

$$T_+ = C \cdot \frac{U_1 - U_2}{i} \quad (10.2)$$

Jeżeli natężenie prądu w obu kierunkach jest jednakowe, uzyskuje się symetryczny przebieg piłokształtny i półokresy T_+ i T_- są sobie równe. Okres uzyskanego przebiegu można więc opisać równaniem:

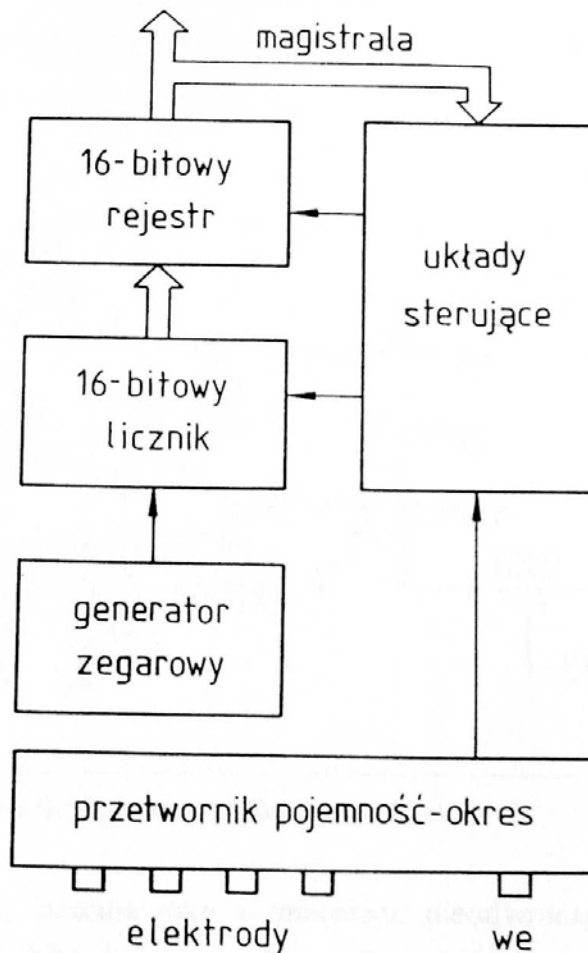
$$T = 2 \cdot C \cdot \frac{U_1 - U_2}{i} = 2 \cdot C \cdot \frac{\Delta U}{i} \quad (10.3)$$

gdzie $\Delta U = U_1 - U_2$ - wartość międzyszczytowa napięcia na kondensatorze.

Stąd pojemność C równa jest:

$$C = T \cdot \frac{i}{2 \cdot \Delta U} \quad (10.4)$$

Wartości napięć U_1 i U_2 nie wpływają na wyznaczoną wartość pojemności, a jedynie istotna jest ich różnica. Wartości tych napięć określają jednak średnie napięcie przyłożone do kondensatora podczas pomiaru. Przesuwanie poziomów napięć U_1 i U_2 przy zachowaniu ich stałej różnicy ΔU , pozwala na pomiar pojemności z określonym potencjałem polaryzującym.



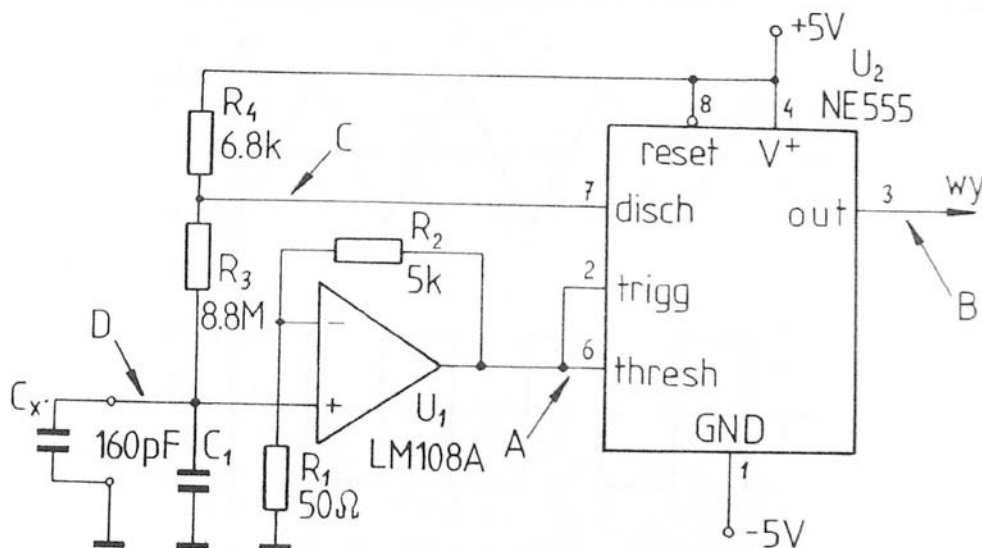
Rys. 10.4. Schemat blokowy modułu do pomiaru pojemności.

Schemat blokowy modułu do pomiaru pojemności przedstawiony jest na rysunku 10.4. Głównym elementem modułu jest przetwornik pojemność-okres. Na jego wyjściu jest przebieg prostokątny o okresie proporcjonalnym do mierzonej pojemności. Sygnał ten steruje 16-bitowym licznikiem binarnym liczącym impulsy z generatora wzorcowego. Liczba zliczonych impulsów proporcjonalna jest do okresu

sygnału sterującego z przetwornika, a tym samym do pojemności mierzonej. Po etapie liczenia impulsów wzorcowych zawartość licznika wpisywana jest do rejestru, następnie licznik jest zerowany i zliczanie impulsów wzorcowych jest powtarzane. Zawartość rejestru odczytywana jest programowo przez komputer.

10.3. 2-elektrodowy układ do pomiaru pojemności

Schemat prostego układu przetwarzającego pojemność na okres przedstawiony jest na rysunku 10.5. Zbudowany jest w oparciu o układ czasowy typu NE555 (Signetics) i wzmacniacz operacyjny typu LM108A (National Semiconductor).

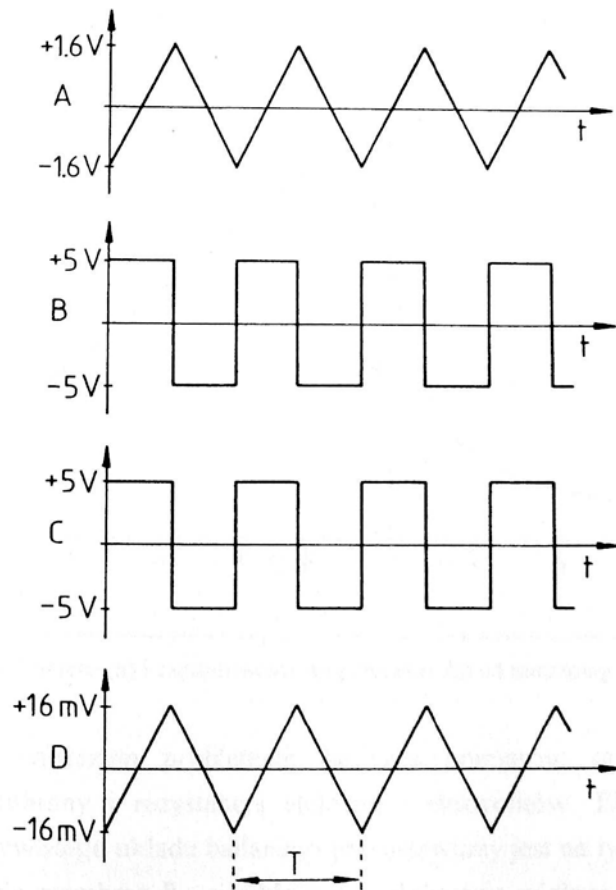


Rys. 10.5. Schemat 2-elektrodowego przetwornika pojemność-okres.

Wzmacniacz U_1 pracuje jako wzmacniacz nieodwracający o wzmacnieniu napięciowym ok. 100. Układ czasowy U_2 zasilany jest niestandardowo, napięciem symetrycznym +5 i -5V. Przy takim zasilaniu przełączanie układu następuje przy napięciach $1/3V^+$ i $1/3V^-$ na wejściach *threshold* (nóżka 6) i *trigg* (nóżka 2). Ponieważ do tych wejść doprowadzone jest wzmacnione napięcie z mierzonego kondensatora (punkt D), napięcie na kondensatorze oscyluje w granicach ok $\pm 16\text{mV}$.

Gdy na wyjściu *output* (nóżka 3) układu 555 jest wysoki poziom napięcia (ok. +5V), wyjście *discharge* (nóżka 7) jest rozwarte. Pojemności wejściowe C_x i C_1 są ładowane poprzez rezystory R_3 i R_4 . Napięcie na kondensatorach wzrasta i jest

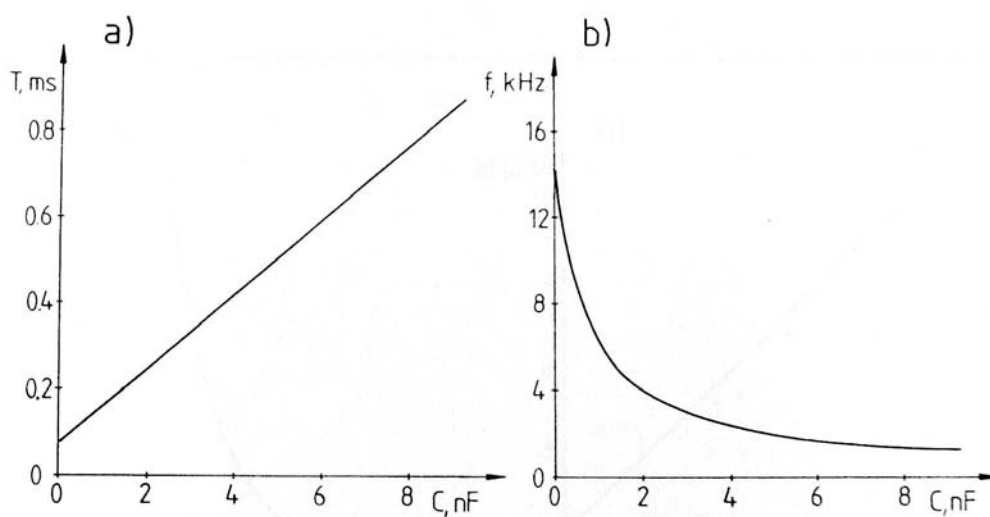
wzmacniane 100-krotnie przez układ U_1 . Gdy napięcie na wejściu *threshold* układu U_2 osiągnie wartość $1/3V^+$, nastąpi zmiana stanu układu U_2 . Na wyjściu *output* pojawi się niski poziom napięcia (ok. $-5V$). Wyjście *discharge* zostaje zwarte z *GND* (nóżka 1). Kondensatory na wejściu zostają rozładowywane poprzez rezystor połączony przez wyjście *discharge* z ujemnym napięciem zasilania. Napięcie na kondensatorach zmienia się w kierunku wartości ujemnych. Gdy napięcie na wejściu *trigger* osiągnie wartość $1/3V^-$, ponownie nastąpi zmiana stanu układu U_2 i napięcie na kondensatorach C_x i C_1 znów zmienia się w kierunku wartości dodatnich. Przebiegi napięciowe w ważniejszych punktach układu przedstawione są na rysunku 10.6. Napięcie o przebiegu prostokątnym z wyjścia *output* o amplitudzie $\pm 5V$ przekształcane jest na sygnał o poziomach cyfrowych TTL, który doprowadzony jest do układów cyfrowych dokonujących pomiaru pojemności membrany C_x .



Rys. 10.6. Przebiegi napięciowe w 2-elektrodowym przetworniku pojemność-okres.

Jedna z okładek mierzonej pojemności C_X połączona jest z masą. Napięcie podczas pomiaru oscyluje wokół zerowej wartości napięcia. Połączenie tej okładki z innym potencjałem niż potencjał masy spowoduje, że napięcie na mierzonym kondensatorze będzie oscylować wokół innej wartości. Pomiar pojemności z narzuconym potencjałem polega więc na połączeniu "zimnej" okładki mierzonego kondensatora z określonym potencjałem, którego źródłem może być np. generator przebiegu liniowego, generator impulsowy.

Mierzona pojemność C_X dołączona do wejścia przetwornika zmienia częstotliwość jego pracy (Rys. 10.7). Prace kilku autorów [35,66,67,88,90,91,168] wskazują na wpływ częstotliwości używanej podczas pomiarów metodą mostkową na wyznaczoną pojemność membran. Jednak zakres zmiany częstotliwości opisywanego przetwornika pojemność-okres przy pojemnościach, jakie uzyskują membrany w nikłym stopniu wpływa na opisany efekt.

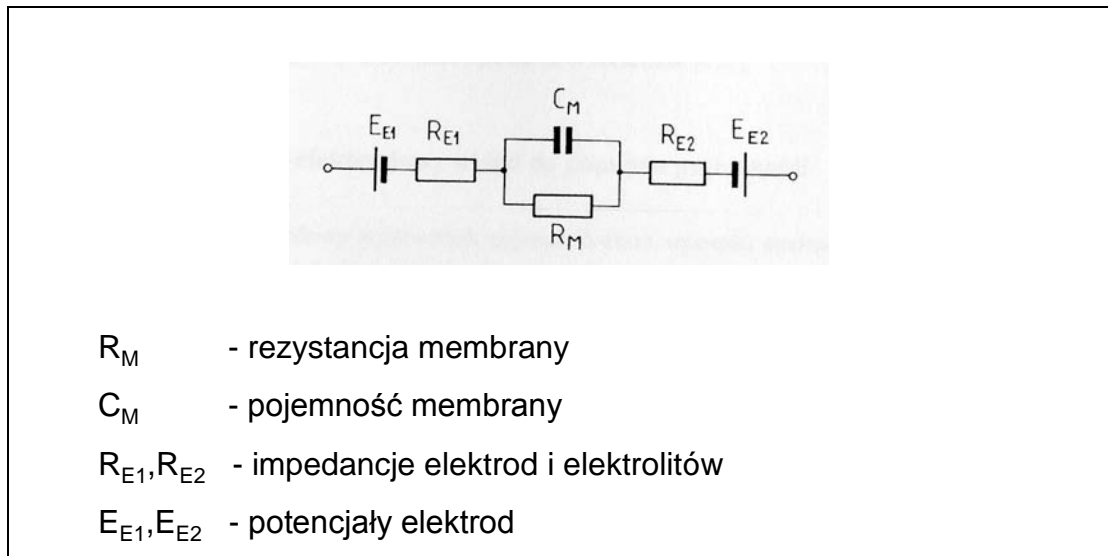


Rys. 10.7. Zależność okresu (a) i częstotliwości (b) przetwornika od mierzonej pojemności C_X .

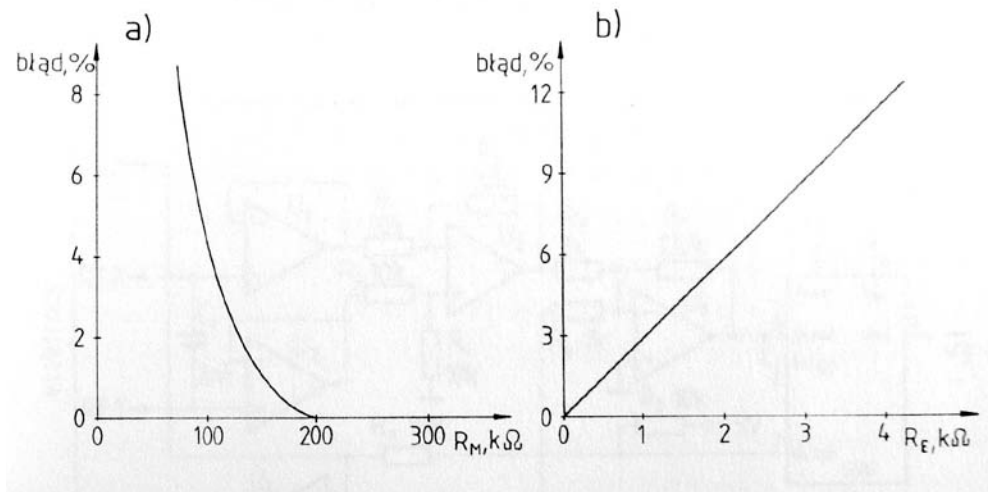
Znacznie większym problemem podczas pomiarów są błędy wywołane rezystancją membrany i rezystancją elektrod i elektrolitów. Elektryczny schemat zastępczy rzeczywistego układu badanego przedstawiony jest na rysunku 10.8.

Rezystancja membran R_M zwykle jest wielokrotnie większa od tej, która może powodować błędy podczas pomiaru pojemności (Rys. 10.9a). Jednak pomiar pojemności membran z narzuconym potencjałem membranowym zmniejsza

odporność przetwornika na rezystancję membrany i błędy powstają już przy wyższych rezystancjach.



Rys. 10.8. Elektryczny schemat zastępczy badanego układu (membrana, elektrolity, elektrody).



Rys. 10.9. Wpływ rezystancji membrany (a) oraz rezystancji elektrod i elektrolitów (b) na błąd w pomiarze pojemności.

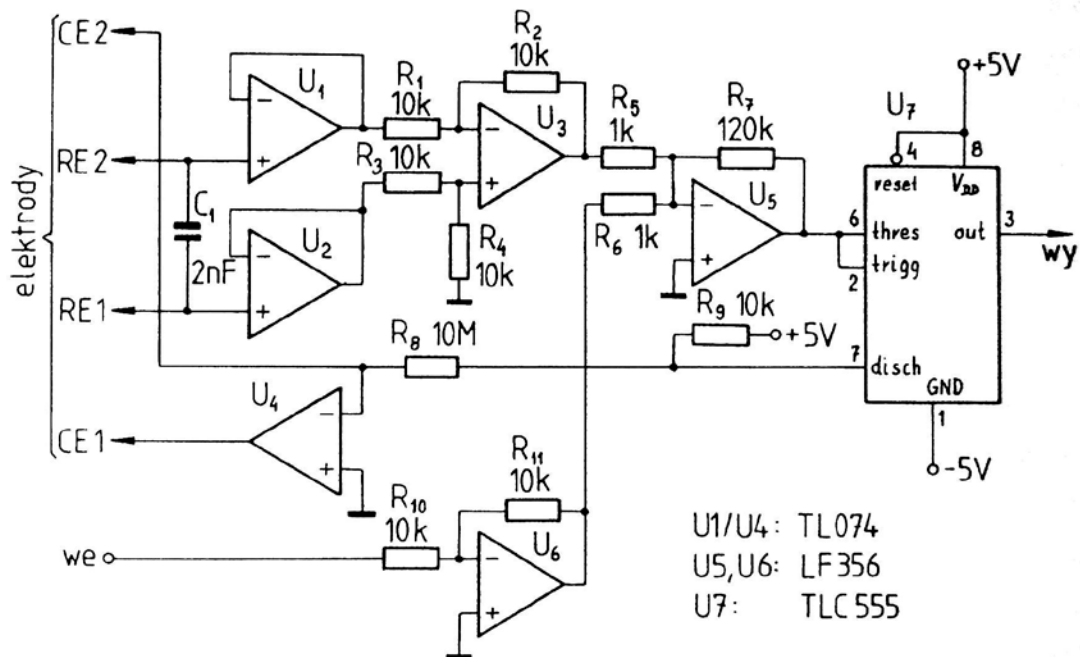
Dużo większym problemem jest utrzymanie niskiego błędności związanego z impedancją elektrod i elektrolitów R_{E1} i R_{E2} (Rys. 10.9b). Należy stosować elektrody o możliwie niskim oporze, co powoduje, że należy stosować elektrody o dużej powierzchni i bez porowatej przegrody np. elektrody chlorosrebrkowe umieszczone

bezpośrednio w elektrolitach w naczyniu pomiarowym. Rozwiązaniem tego problemu może być stosowanie układu 4-elektrodowego.

Szczegóły dotyczące budowy 2-elektrodowego przetwornika pojemność-okres i możliwości jego wykorzystania opisane są w literaturze [216].

10.4. 4-elektrodowy układ do pomiaru pojemności

2-elektrodowy przetwornik pojemność-okres wymusza stosowanie elektrod o małej impedancji. Nie zawsze jest to możliwe. Miniaturowe elektrody posiadają wysokie wartości rezystancji, również stosowanie porowatych przegród oddzielających elektrody od elektrolitów jest źródłem dodatkowych rezystancji. Problemy te były przyczyną opracowania 4-elektrodowego przetwornika pojemność-okres. Podczas pomiarów stosowane są dwie elektrody prądowe CE1, CE2 i dwie elektrody kontrolne RE1, RE2. Pomiędzy elektrodami wymuszany jest przepływ prądu ładującego mierzoną pojemność, natomiast pomiędzy elektrodami kontrolnymi RE1 i RE2 mierzy się różnicę potencjałów. Ponieważ elektrody kontrolne pracują bezprądowo, spadki napięć na nich są pomijalnie małe.



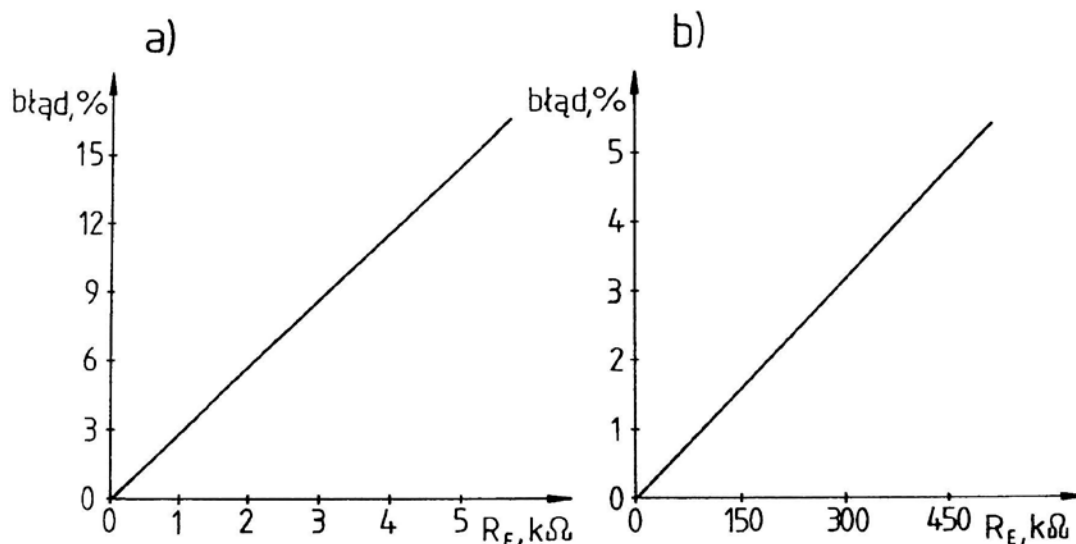
Rys. 10.10. Schemat 4-elektrodowego przetwornika pojemność-okres.

Schemat 4-elektrodowego przetwornika pojemność-okres przedstawiony jest na rysunku 10.10. Zbudowany jest on na bazie scalonego układu czasowego typu TLC555 (Texas Instruments), wykonanego w technologii CMOS. Wzmacniacze operacyjne U_1 - U_3 tworzą wzmacniacz różnicowy do kontroli napięcia między elektrodami RE1 i RE2. Wzmacniacz operacyjny U_4 pracuje jako źródło stałoprądowe, wymuszające przepływ prądu między elektrodami CE1 i CE2. Kierunek przepływu prądu sterowany jest przez wyjście *discharge* (nóżka 7) układu TLC555. Natężenie tego prądu określone jest przez wartość rezystora R_g . Wzmacniacz operacyjny U_5 pracuje jako sumator napięcia ze wzmacniacza różnicowego i napięcia polaryzującego. Suma napięć jest wzmacniana i doprowadzona do wejść sterujących *threshold* (nóżka 6) i *trigger* (nóżka 2) układu TLC555. Układ U_6 pracuje jako wzmacniacz separujący i odwracający znak napięcia z wejścia *we*.

Doprowadzenie do wejścia *we* napięcia powoduje przesunięcie wartości, wokół której oscyluje napięcie na mierzonym kondensatorze. Przy napięciu wejściowym równym 0, napięcie to zmienia się w zakresie ± 15 mV, natomiast po doprowadzeniu do wejścia napięcia np. +200 mV, napięcie na kondensatorze oscyluje w granicach od +185 do +215 mV. Właściwość ta wykorzystywana jest do pomiaru pojemności membran z narzuconym potencjałem polaryzującym. Wartość napięcia doprowadzonego do wejścia *we* jest traktowana jako wartość potencjału polaryzującego.

Pomiędzy wejścia RE1 i RE2 włączony jest kondensator C_1 o wartości 2 nF. Dzięki niemu częstotliwość własna przetwornika, bez zewnętrznej pojemności wynosi ok. 5 kHz. Zmiany pojemności zewnętrznej powodują niewielkie zmiany częstotliwości pracy przetwornika, a tym samym następuje dalsza eliminacja wpływu częstotliwości na mierzoną wartość pojemności membrany. Poza tym kondensator C_1 poprawia stabilność pracy przetwornika przy mierzonych pojemnościach o małych wartościach.

4-elektrodowy układ jest znacznie bardziej odporny na powstawanie błędów spowodowanych dużą wartością impedancji elektrod i elektrolitów. Na rysunku 10.11 przedstawiono odchylenia zmierzonej wartości od rzeczywistej, spowodowane rezystancją połączoną szeregowo z pojemnością przy pracy przetwornika w układzie 2-elektrodowym i 4-elektrodowym. Pomiary zostały wykonane dla kondensatora o pojemności 3 nF i połączonych z nim szeregowo rezystorów symulujących rezystancje elektrod i elektrolitów (Rys. 10.8). Wartości rezystancji na wykresie są sumą rezystancji obu elektrod i elektrolitów.



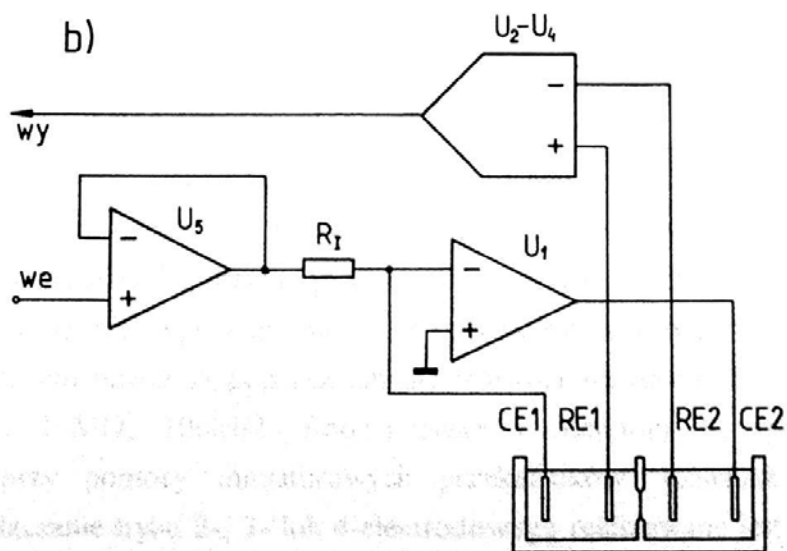
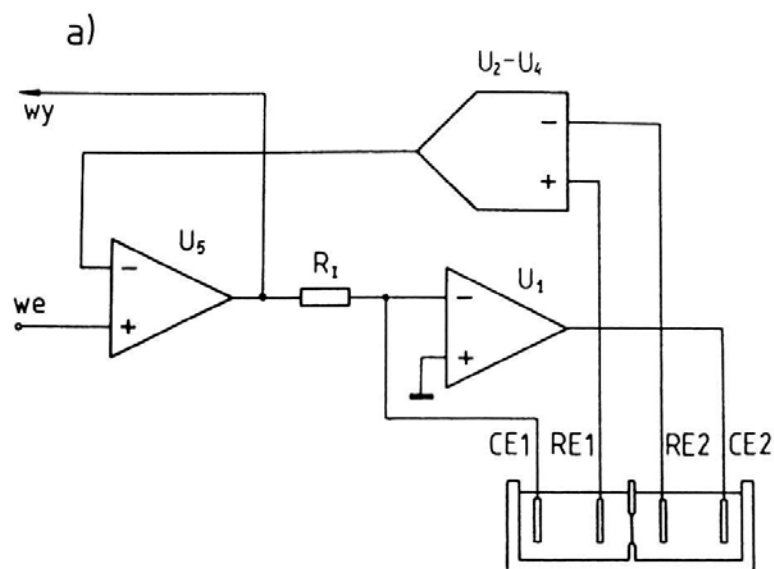
Rys. 10.11. Błędy pomiarowe wywołane rezystancją elektrod i elektrolitów w układzie a) 2-elektrodowym, b) 4-elektrodowym.

Przy pracy przetwornika w układzie 2-elektrodowym, zwarte są wejścia CE1 z RE1 i CE2 z RE2, a obwód zastępujący badany układ połączony jest do CE1 i CE2. Przy pracy w układzie 4-elektrodowym, wejścia RE1 i RE2 połączone są bezpośrednio do kondensatora, natomiast CE1 i CE2 do rezystorów połączonych z kondensatorem.

Na podstawie rysunku 10.11 można stwierdzić, że przy pracy w układzie 4-elektrodowym możliwe jest stosowanie mikroelektrod posiadających dużą rezystancję. Szczegóły dotyczące budowy, właściwości i wykorzystania 4-elektrodowego przetwornika pojemność-okres opisane są w literaturze [217].

10.5. Potencjostat-galwanostat

Do badań membran w warunkach kontrolowanego potencjału lub prądu skonstruowany został 4-elektrodowy potencjostat-galwanostat. Zbudowany jest on na bazie sześciu wzmacniaczy operacyjnych. Od sposobu utworzenia ujemnego sprzężenia zwrotnego zależy sposób pracy układu. Utrzymywane jest określone napięcie między elektrodami RE1 i RE2 (potencjostat) lub wymuszany jest przepływ prądu o ustalonym natężeniu przez elektrody CE1 i CE2 (galwanostat).



Rys. 10.12. Konfiguracje pracy układu: a) potencjostat, b) galwanostat.

Rysunek 10.12a przedstawia połączenia układu, które tworzą potencjostat. Wzmacniacz operacyjny U_1 i rezystor R_1 tworzą źródło prądowe, które wymusza przepływ prądu przez elektrody CE1 i CE2. Sterowane jest ono przez wzmacniacz operacyjny U_5 , który jest głównym wzmacniaczem potencjostatu. Do wejścia nieodwracającego doprowadzony jest sygnał sterujący U_{we} , natomiast do odwracającego doprowadzony jest sygnał ze wzmacniacza różnicowego, zbudowanego na wzmacniaczach operacyjnych U_2-U_4 . Tworzy to układ ujemnego sprzężenia zwrotnego, dzięki któremu układ dąży do wyrównania napięć na

wejściach wzmacniacza operacyjnego U_5 . Powoduje to, że różnica potencjałów między elektrodami RE1 i RE2 równa jest napięciu wejściowemu U_{we} . Natężenie prądu przepływającego przez elektrody prądowe równe jest natężeniu prądu płynącego przez rezystor R_1 . Potencjał końcówki rezystora połączonego z wejściem odwracającym wzmacniacza operacyjnego U_1 równy jest potencjałowi masy. Napięcie wyjściowe U_{wy} zależne jest od wartości rezystora R_1 oraz natężenia prądu i przepływającego przez elektrody prądowe i rezystor R_1 :

$$U_{wy} = i \cdot R_1 \quad (10.5)$$

Konfiguracja układu pracującego w charakterze galwanostatu przedstawiona jest na rysunku 10.12b. Jest to typowe rozwiązanie, spotykane w literaturze [207]. Źródło prądowe zbudowane na bazie wzmacniacza operacyjnego U_1 wymusza przepływ przez elektrody CE1 i CE2 prądu o natężeniu:

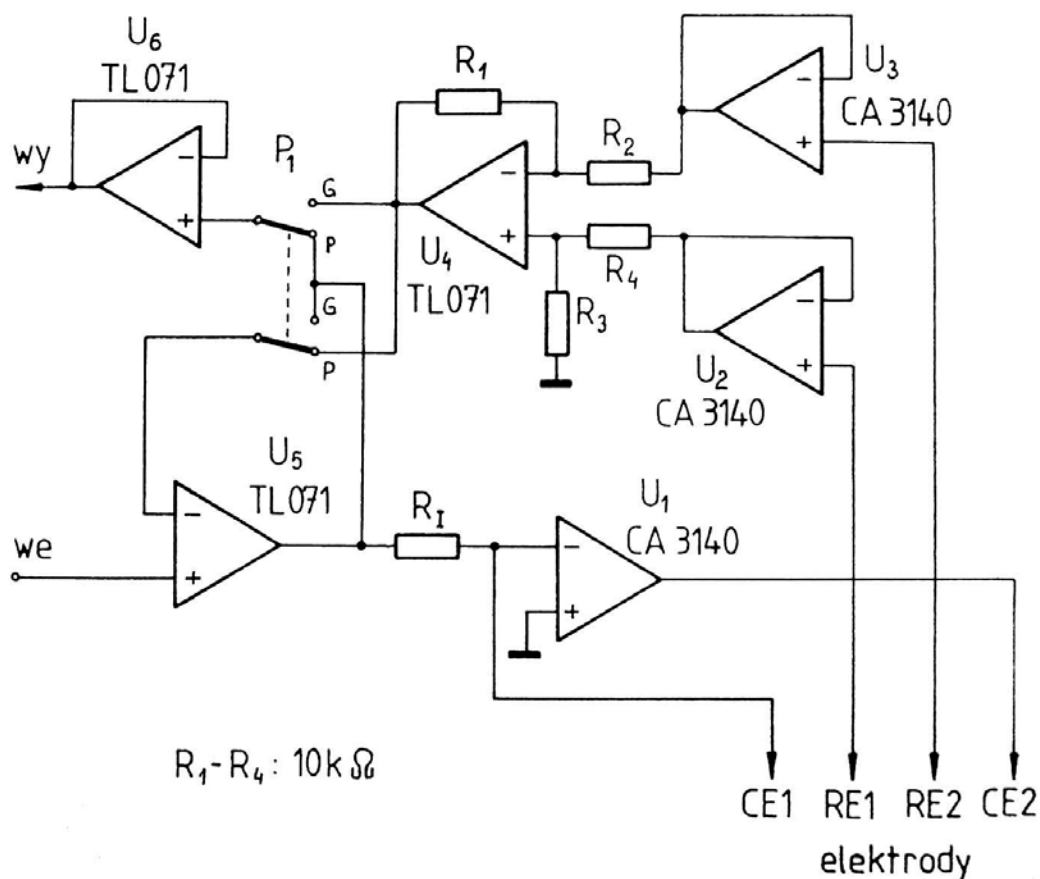
$$i = \frac{U_{we}}{R_1} \quad (10.6)$$

Wzmacniacz różnicowy daje na wyjściu napięcie równe różnicy potencjałów elektrod RE1 i RE2.

Uproszczony schemat potencjostatu-galwanostatu przedstawiony jest na rysunku 10.13. Przełącznik P_1 zmienia rodzaj pracy układu: potencjostat lub galwanostat. Wzmacniacz U_6 pracuje jako wtórnik napięciowy. Dzięki temu obwody obciążające wyjście nie wpływają na pracę potencjostatu-galwanostatu. Zakresy prądowe układu zmieniane są poprzez zmianę wartości rezystora R_1 : 1k Ω , 10k Ω , 100k Ω , 1M Ω , 10M Ω , 100M Ω . Rodzaj pracy i rezystory R_1 zmieniane są programowo przy pomocy miniaturowych przełączników. Również załączanie elektrod i przełączanie trybu 2-, 3- lub 4-elektrodowego realizowane jest za pomocą przełączników. Przy pracy 3-elektrodowej zwarte są wejścia RE1 i CE1. Pracują wtedy jako elektroda robocza, RE2 jako elektroda odniesienia, natomiast CE2 jako elektroda pomocnicza. Przy pracy 2-elektrodowej dodatkowo zwarte są wejścia RE2 i CE2, które pracują jako elektroda odniesienia. Gdy układ wykorzystywany jest do pomiaru potencjału, ustawiony jest jako galwanostat i odłączone jest wejście CE1. Brak jest wtedy przepływu prądu przez elektrody. Napięcie na wyjściu równe jest różnicy potencjałów elektrod RE1 i RE2.

W opisywanym układzie zastosowano wzmacniacze operacyjne typu CA3140 (Signetics), wykonane w technologii BiMOS oraz niskoszumowe wzmacniacze typu TL071 (SGS-Thomson), wykonane w technologii BiFET. Wzmacniacze te posiadają dość dużą częstotliwość graniczną, konieczną ze względu na sposób pracy

potencjostatu (cztery wzmacniacze objęte pętlą sprzężenia zwrotnego U_1 , U_2/U_3 , U_4 , U_5). Wzmacniacze CA3140 zastosowano do pomiaru potencjału elektrod ze względu na bardzo małe wejściowe prądy polaryzujące i niezrównoważenia (poniżej 1pA). Tam, gdzie wartości prądów wejściowych były nieistotne, zastosowano wzmacniacze niskoszumowe TL071.



Rys. 10.13. Uproszczony schemat części analogowej potencjostatu-galwanostatu.

Potencjostat-galwanostat wymaga doprowadzenia sygnału sterującego i układów odczytujących wartość prądu lub potencjału. W pomiarach wykonywanych w ramach tej pracy źródłem sygnału był moduł przetwornika cyfrowo-analogowego DAC-1200, natomiast odczyt prądu lub potencjału realizowany był przy pomocy modułu przetwornika analogowo-cyfrowego ADC-1201. Techniki pomiarowe zrealizowane przy pomocy potencjostatu-galwanostatu, które zastosowano w pracy wymienione są w tabeli 10.2. Szczegóły dotyczące 4-elektrodowego potencjostatu-galwanostatu opisane są w literaturze [218].

Dane techniczne potencjostatu-galwanostatu

- Rodzaje pracy: potencjostat, galwanostat, pomiar potencjału
- Liczba elektrod: 2, 3 lub 4
- Zakresy prądowe: 10nA, 100nA, 1μA, 10μA, 100μA, 1mA
- Poziom szumów potencjostatu na najczulszym zakresie: 50pA
- Programowe przełączanie zakresów prądowych
- Programowo przełączany rodzaj pracy
- Programowe załączanie/odłączanie elektrod
- Sygnalizacja przesterowania układu

10.6. Oprogramowanie

Sterowanie aparaturą pomiarową i pomiary wykonywane były przy pomocy mikrokomputera PC/AT pracującego pod kontrolą programów pracujących w środowisku Windows. Programy zostały napisane w języku *Turbo Pascal for Windows v.1.5* (Borland). Praca w środowisku Windows posiadała wiele zalet:

- praca z dowolnymi sterownikami graficznymi,
- obsługa dowolnych typów urządzeń wyjściowych (drukarki, plotery),
- praca wieloprogramowa i wielozadaniowa,
- zunifikowany sposób obsługi programów.

Możliwość pracy wieloprogramowej w środowisku Windows pozwoliła na pisanie prostych programów, wykonujących jeden rodzaj pomiarów. Dzięki temu programy były proste w obsłudze i niezawodne. Zmiana rodzaju wykonywanych pomiarów polegała jedynie na przejściu za pomocą myszy lub klawiatury do okna innego programu. W ten sposób na jednej membranie można było wykonać szereg pomiarów np. rejestracja pojemności membrany podczas formowania, rejestracja krzywych chronovoltamperometrycznych i chronopotencjometrycznych. Programy wykorzystywane podczas pomiarów opisane są w tabeli 10.2.

Wymienione programy posiadają zunifikowany sposób obsługi: zapis, odczyt, drukowanie, uruchomienie i zatrzymanie pomiarów itd. Jednakowe są rozwiązania graficzne, podobne menu. Różnią się między sobą jedynie szczegółami dotyczącymi ustawiania niektórych parametrów i sposobem kalibracji. Przykładowe okno programu przedstawione jest na rysunku 10.14. Pod paskiem menu znajduje się listwa z przyciskami sterującymi uruchomieniem i zatrzymaniem pomiarów, wywołaniem okna informacyjnego i opisu eksperymentu oraz okienka, w których są

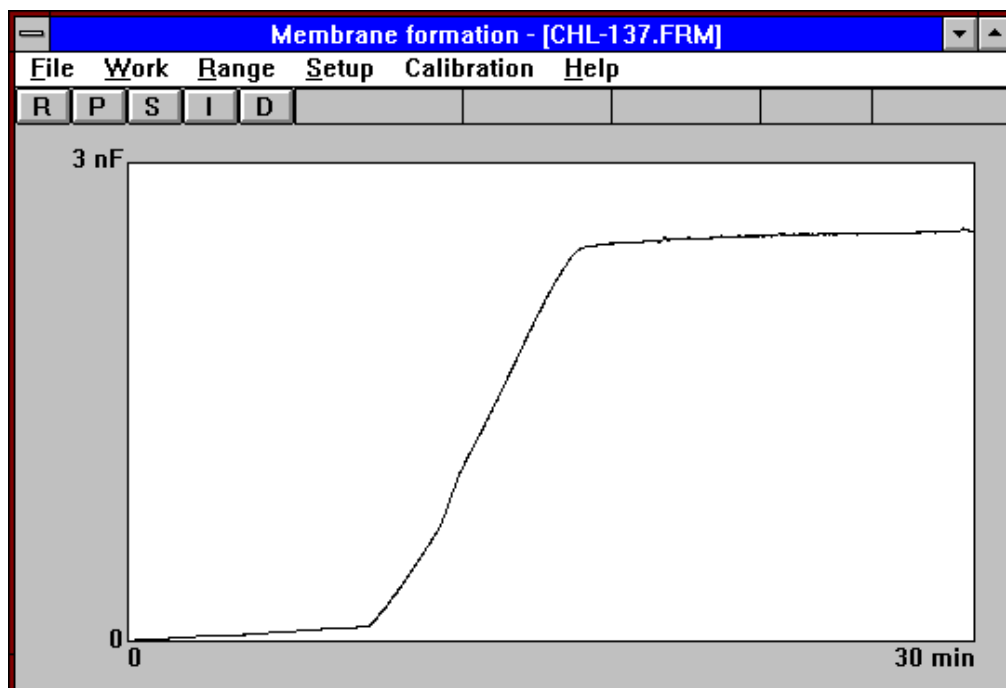
wyświetlane aktualne parametry podczas pomiaru (np. czas, pojemność, liczba zarejestrowanych punktów).

Programy umożliwiają prowadzenie pomiarów, zapis danych na dysk i ich odczyt, zapis danych w postaci tekstowej (możliwość odczytu przez arkusze kalkulacyjne i programy graficzne), drukowanie na drukarce lub rysowanie na ploterze, dowolne zmiany parametrów osi X i Y, kalibracja wartości zerowych parametrów i zakresów pomiarowych (np. potencjał, natężenie prądu, pojemność).

Oprócz wymienionych programów, wykorzystywanych przy badaniach zjawisk membranowych, stworzony został szereg programów umożliwiających wykorzystanie opisanej aparatury do innych celów: rejestrator Y-t, pomiar pH, rejestracja pH, chronoamperometria z programowanym potencjałem, analityczne techniki przepływowo-wstrzykowe (FIA) z detekcją prądową i potencjałową, elektroliza, pomiar napięcia.

Tab. 10.2. Programy wykorzystywane do obsługi zestawu pomiarowego.

Nazwa programu	Funkcje programu
Formowanie membran	Rejestracja pojemności membran podczas procesu formowania
Napięcie-pojemność	Rejestracja pojemności membran przy zaprogramowanym przebiegu potencjału polaryzującego będącego dowolną kombinacją stałych poziomów napięciowych i/lub liniowych przebiegów napięciowych.
Potencjometria	Rejestracja potencjału transmembranowego przy braku przepływu prądu przez membranę.
Chronoamperometria	Rejestracja prądu płynącego przez membranę przy stałym potencjale polaryzującym.
Chronopotencjometria	Rejestracja potencjału membranowego przy przepływie przez membranę prądu o stałym natężeniu.
Chronowoltamperometria	Rejestracja prądu płynącego przez membranę przy liniowo zmieniającym się potencjale.

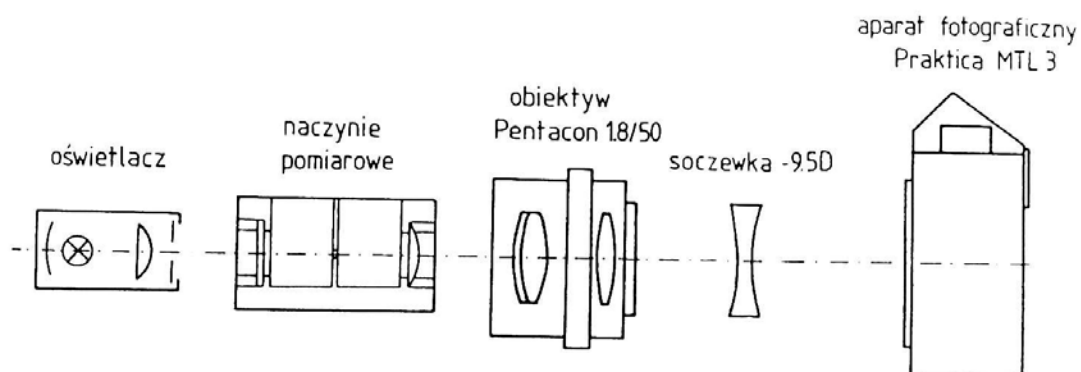


Rys. 10.14. Okno programu rejestrującego pojemność membran podczas procesu formowania.

10.7. Układ optyczny

Do wyznaczenia pojemności specyficznej membran konieczna jest znajomość ich pola powierzchni. Ponieważ dwuwarstwa lipidowa zajmuje tylko część powierzchni otworu, w którym jest formowana, potrzebny jest pomiar jej pola powierzchni. Do tego celu zestawiony został układ umożliwiający obserwację membran na matówce aparatu fotograficznego i fotografowanie ich w świetle przechodzącym (Rys. 10.15).

Układ do optycznej obserwacji i fotografowania membran umieszczony był na trójkątnej ławie optycznej. Poszczególne elementy układu: oświetlacz, naczynie pomiarowe, obiektyw i aparat fotograficzny umieszczone były na wspornikach i miały możliwość regulacji położenia. Umożliwiło to ustawienie wszystkich elementów w osi optycznej. Obiektyw *Pentacoon 1.8/50* połączony był z aparatem fotograficznym *Practica MTL3* poprzez pierścienie przedłużające i mieszek, co pozwoliło na regulację odległości obiektywu od aparatu, a tym samym regulację powiększenia. Pomiędzy obiektywem a aparatem fotograficznym umieszczona była dwuwklęsła soczewka -9.5 dioptrii. Dzięki niej możliwe było ustawienie ostrości na otwór z membraną znajdujący się w głębi naczynia. Soczewka ta również powodowała dodatkowe powiększenie.



Rys. 10.15. Schemat układu optycznego do obserwacji i fotografowania membran w świetle przechodzącym.

Do oświetlania naczynia wykorzystywana była lampa mikroskopowa zasilana z zasilacza, który umożliwiał regulację napięcia doprowadzanego do żarówki. Pomiedzy lampą a naczyniem pomiarowym umieszczony był filtr zatrzymujący promieniowanie podczerwone, zabezpieczający naczynie przed nagrzewaniem.

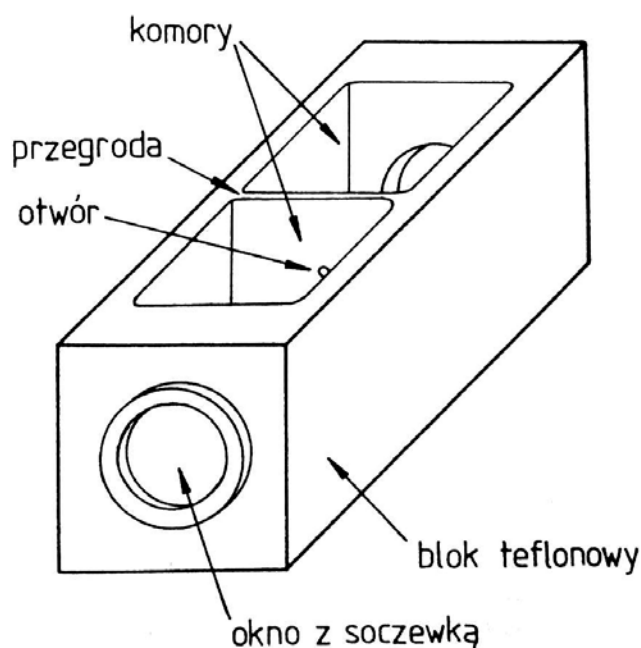
Aparat fotograficzny *Practica MTL3* jest lustrzanką z wewnętrznym pomiarem światła. Pozwoliło to na wykonywanie fotografii o dobrej ostrości i prawidłowym naświetleniu. Fotografie wykonywane były na filmach *Fujicolor HG100*. Obróbka filmów i wywoływanie zdjęć wykonywane było w autoryzowanym zakładzie *Fuji*. Fotografie wywoływane były w automacie *FUJI Minilab SFA-250* z podglądem monitorowym. Uzyskane w ten sposób odbitki były powtarzalne i tak samo wykadrowane. Dzięki temu przydatne były do wyznaczania pola powierzchni dwuwarstw lipidowych.

Fotografie membran wykonane na papierze o formacie 9×13 cm dawały około 50-krotne powiększenie. Przy wykonywaniu serii fotografii membran fotografowany był również wzorec długości umieszczony w naczyniu, który umożliwiał wyskalowanie fotografii. Pole powierzchni dwuwarstw lipidowych wyznaczane było poprzez porównanie ciężarów wyciętych fragmentów fotografii z ciężarem wzorca, który odpowiadał polu powierzchni 1 mm². Wzorec fotografowany był w naczyniu wypełnionym wodą. Podczas wykonywania fotografii wzorec znajdował się w odległości 0.5 mm od krawędzi otworu. Powodowało to konieczność uwzględnienia poprawki związanej z różnicami w uzyskiwanych powiększeniach wzorca i otworu.

Fotografowanie membran i wyznaczenie pola powierzchni dwuwarstwy możliwe było dzięki zjawisku załamania światła w miejscu styku dwuwarstwy z obrzeżem Plateau-Gibbsa. Krawędź obrzeża ma właściwości pryzmatu, który załamuje światło i w miejscu styku dwuwarstwy z obrzeżem obserwuje się ciemną linię.

10.8. Naczynie pomiarowe

Naczynie, w którym przeprowadzane było formowanie i pomiary właściwości elektrycznych membran przedstawione jest na rysunku 10.16. Wykonane jest z jednego bloku teflonowego o wymiarach $60 \times 30 \times 30$ mm. Wyfrezowane są w nim dwie komory o pojemności 10 cm^3 . W czołowych ściankach naczynia wykonane są okienka, z których jedno zamknięte jest płaskim szkłem, natomiast drugie płasko-wypukłą soczewką, która umożliwia optyczną obserwację otworu z membraną w powiększeniu. W przegrodzie pomiędzy komorami wywiercony jest otwór. Stosowane były naczynia z otworami o średnicach 1-1.1 mm. Przegroda w pobliżu otworu miała grubość około 0.3 mm.



Rys. 10.16. Naczynie pomiarowe używane do badań membran lipidowych.

11. Odczynniki i roztwory

W tabeli 11.1 zawarte są informacje dotyczące odczynników wykorzystywanych w badaniach i ich charakterystyka.

Tab. 11.1. Wykaz odczynników używanych podczas eksperymentów.

Odczynnik	Producent	Czystość	Uwagi
3-sn-fosfatydylocholina (lecytyna)	Fluka	99%	Izolowana z żółtek jaj kurzych. Skład kwasów tłuszczowych: 16:0 ~33%, 18:0 ~4%, 18:1 ~30%, 18:2 ~14%, 20:4 ~4%
3-sn-fosfatydylocholina (lecytyna)	Fluka	60%	Izolowana z żółtek jaj kurzych. Używana do wstępnych badań
azolektyna	Fluka		Mieszanina fosfolipidów z soi, zawiera lecytyny, kefaliny i inozytol. Lipidy zawierają 24% nasyconych, 14% jedno-nienasyconych i 62% wielo-nienasyconych łańcuchów węglowych
fosfatydyloseryna	BDH		Izolowana z mózgow wołowych.
fosfatydyloetanolamina	Sigma	98%	Izolowana z soi, zawiera głównie nienasycone łańcuchy węglowe C-18
cholesterol	Sigma	99%	Używany bez dodatkowego oczyszczania
heksan	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację, $\varepsilon = 1.890$ (20°C)
heptan	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację, $\varepsilon = 1.924$ (20°C)
oktan	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację, $\varepsilon = 1.948$ (20°C)

Tab. 11.1. ciąg dalszy.

Odczynnik	Producent	Czystość	Uwagi
nonan	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację, $\varepsilon = 1.972$ (20°C)
dekan	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację, $\varepsilon = 1.991$ (20°C)
chloroform	POCh	czysty	Oczyszczany dodatkowo przez destylację
propanol	POCh	czda	Oczyszczany dodatkowo przez destylację. Stała dielektryczna $\varepsilon = 20.44$
izopropanol	POCh	czda	Oczyszczany dodatkowo przez destylację. Stała dielektryczna $\varepsilon = 19.92$
butanol	POCh	czda	Oczyszczany dodatkowo przez destylację. Stała dielektryczna $\varepsilon = 17.51$
izobutanol	POCh	czda	Oczyszczany dodatkowo przez destylację
KCl	POCh	czda	Prażony 2 godziny w temp. 600°C w celu usunięcia zanieczyszczeń organicznych
KBr	POCh	czda	Używany bez dodatkowego oczyszczania
KJ	POCh	czda	Używany bez dodatkowego oczyszczania
CaCl ₂	POCh	czda	Używany bez dodatkowego oczyszczania
HEPES	Sigma	99.5%	Używany bez dodatkowego oczyszczania
KOH	POCh	czda	Używany bez dodatkowego oczyszczania
promazyna·HCl	ZFP*	99.8%	Używana bez dodatkowego oczyszczania, $pK_a=9.42$ [219]
chloropromazyna·HCl	ZFP*	99.8%	Używana bez dodatkowego oczyszczania, $pK_a=9.36$ [219]

Tab. 11.1. ciąg dalszy.

Odczynnik	Producent	Czystość	Uwagi
tiorydazyna-HCl	Spofa, Praga	99.8%	Używana bez dodatkowego oczyszczania, $pK_a=9.50$ [219]
cytochrom C	POCh**	90-100%	Z serc wieprzowych, wolny od soli, liofilizowany
gramicydyna D	Sigma		Izolowana z <i>Bacillus brevis</i>
woda			Dwukrotnie destylowana, a następnie oczyszczana w filtrach Millipore <i>Milli-Q</i>

* - Zakłady Farmaceutyczne Polfa, Jelenia Góra

** - produkowany przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Karkowie

11.1. Roztwory elektrolitów

Do większości pomiarów stosowany był roztwór KCl o stężeniu 0.1 M. Roztwory elektrolitów przechowywane były w lodówce w celu zabezpieczenia ich przed rozwojem w nich mikroorganizmów. Właściwą kwasowość roztworów utrzymywano przy pomocy roztworu buforowego HEPES. Roztwór buforowy sporządzano dodając do roztworu HEPES odpowiednią ilość roztworu KOH. Roztwory pochodnych fenotiazyny przechowywane były bez dostępu światła, nie dłużej niż trzy dni.

11.2. Roztwory formujące

Roztwory formujące składały się z lipidów rozpuszczonych w węglowodorach lub mieszanach węglowodorów z alkoholami. Roztwory formujące sporządzano z wyjściowych roztworów lipidów w chloroformie o stężeniu 100 mg/ml. Odmierzano odpowiednią ilość roztworu wyjściowego, usuwano z niego chloroform i dodawano pożądaną rozpuszczalnik. Chloroform usuwany był poprzez przedmuchiwanie roztworu strumieniem argonu, który nie dopuszczał do utlenienia lipidów tlenem atmosferycznym. Gotowe roztwory formujące przechowywane były w lodówce w temperaturze około 4°C, nie dłużej niż tydzień.

Do wstępnych badań wykorzystywano lecytynę z kilku źródeł i o różnej czystości. Roztwory lecytyny o czystości 99% i stężeniu 20 mg/ml w dekanie na drugi dzień po sporządzeniu ulegały rozwarstwieniu. Na dnie tworzyła się warstwa żelu, która była nieprzydatna do tworzenia membran. Żel tworzył się przy przechowywaniu roztworu zarówno w lodówce jak i w temperaturze pokojowej. Roztwór formujący z lecytyny o czystości 60% był bardziej stabilny w czasie niezależnie od warunków, w jakich był przechowywany.

11.3. Elektrody

W pomiarach stosowane były elektrody chlorosrebrowe. Wykonane były z drutu srebrnego o długości 10 cm, zwiniętego w spiralę i elektrolitycznie pokrytego chlorkiem srebrnym. Elektrody umieszczone były bezpośrednio w roztworach elektrolitów w naczyniu. Gdy stosowano roztwory KBr lub KJ, drut srebrny pokrywany był odpowiednim halogenkiem. Różnice w potencjałach elektrod przy braku membrany wynosiły nie więcej niż 2 mV. Elektrody zwarte ze sobą nawzajem przechowywane były w roztworach odpowiednich halogenków. Zapewniało to wyrównywanie się potencjałów elektrod podczas ich przechowywania. Szczególną uwagę zwracano na jednakową wartość potencjałów elektrod przy badaniach potencjału minimalnej pojemności (rozdział 16). W tym wypadku stosowane były elektrody, których różnica potencjałów była niższa od 0.5 mV.

Gdy w roztworze znajdowały się substancje mogące powodować zakłócenia w pracy elektrod, stosowane były elektrody chlorosrebrowe, oddzielone od roztworów w naczyniu przegrodą porowatą.

Tab. 11.2. Rezystancje elektrod i elektrolitów w naczyniu pomiarowym przy braku membrany.

Roztwór	Rezystancja [k Ω]
0.001 M KCl	71.5
0.01 M KCl	21.7
0.1 M KCl	1.7
1 M KCl	0.25

Przeprowadzone zostały pomiary rezystancji elektrod umieszczonych w naczyniu pomiarowym w roztworach elektrolitów stosowanych w pomiarach. Rezystancja wyznaczana była na podstawie krzywych chronowoltamperometrycznych zarejestrowanych w układzie 2-elektrodowym. Krzywe rejestrowane były w zakresie od -50 do 50 mV z szybkością 100 mV/s. Rezystancja liczona była z nachylenia stycznej do krzywej I/U przy potencjale 0 mV. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 11.2.

Wartości rezystancji z tabeli 11.2 wskazują, że w większości przypadków konieczne jest prowadzenie pomiarów pojemności w układzie 4-elektrodowym. Stosowanie porowatej przegrody oddziałującej elektrodę od elektrolitu w naczyniu powodowało dodatkowy wzrost rezystancji badanego układu. Pomiary w układzie 2-elektrodowym powodowałyby powstawanie zbyt dużych błędów (Rys. 10.11).

12. Metoda formowania membran lipidowych

Membrany formowne były metodą Muellera-Rudina [170]. W metodzie tej wykorzystywane jest zjawisko samoorganizacji lipidów w dwuwarstwą. Kropla roztworu formującego umieszczana była w otworze w naczyniu pomiarowym przy pomocy mikropipety 5 μ l lub mikrostrzykawki Hamilton 5 μ l. Po umieszczeniu kropli w otworze uruchamiana była rejestracja pojemności membrany. Po wartości pojemności membrany i jej stabilności oceniano, czy membrana jest gotowa do prowadzenia na niej badań. Podczas formowania membrany prowadzona była również wzrokowa obserwacja membrany w świetle przechodzącym. W przypadku obecności na membranie pęcherzyków gazu lub innych wtrąceń, membranę przerywano i formowano następną.

Przed rozpoczęciem formowania membran powierzchnię przegrody wokół otworu dokładnie zwilżano roztworem formującym. Ułatwiało to rozpoczęcie procesu formowania się dwuwarstwy. Obecność obrzeża z roztworu formującego, zwanego obrzeżem Plateau-Gibbsa jest warunkiem utworzenia się dwuwarstwy lipidowej. Obrzeże "wysysa" rozpuszczalnik z membrany powodując w efekcie końcowym powstanie dwuwarstwy lipidowej [220].

13. Badania procesu formowania i stabilności membran

Proces samorzutnego formowania się dwuwarstwowych płaskich membran lipidowych znany jest już od około 30 lat. Ciągłe jednak kinetyka i termodynamika tego procesu nie jest w pełni wyjaśniona [221]. Pomimo tego samorzutne formowanie się dwuwarstw lipidowych jest procesem powszechnie wykorzystywanym do tworzenia płaskich membran lipidowych, jak też i liposomów.

Proces formowania dwuwarstw lipidowych jest wstępnym etapem właściwych badań membran. Jednak od tego etapu w dużym stopniu zależy powodzenie i wiarygodność uzyskanych wyników. Membrany lipidowe są jednak układem mało stabilnym. Nie ma dotąd wyraźnych reguł, dzięki którym można tworzyć stabilne i powtarzalne membrany. We wszystkich laboratoriach, których obiektem badań są płaskie membrany lipidowe, warunki tworzenia membran dobierane są metodą prób i błędów. Rejestracja pojemności membran podczas ich spontanicznego formowania się jest metodą, która pozwala na badanie kinetyki ich formowania. Również rejestracja pojemności membran podczas ich tworzenia pozwala na łatwiejszą i pewniejszą interpretację wyników dalszych badań prowadzonych na membranach.

Optyczna obserwacja membran jest najczęściej wykorzystywaną metodą oceny stopnia uformowania membrany. Nie pozwala ona jednak na dokładną ocenę stabilności membrany i dokładne określenie jej grubości. Rejestracja pojemności formujących się membran i pomiar pola powierzchni dwuwarstwy stworzyły możliwość prześledzenia historii "życia" membrany. Badania, których wyniki zawarte są w tym rozdziale, miały na celu rozwiązanie kilku zagadnień:

- etapy i mechanizm tworzenia się membran,
- rola obrzeża Plateau-Gibbsa w formowaniu membran,
- czynniki wpływające na szybkość i stabilność procesu formowania się membran,
- czynniki wpływające na stabilność i żywotność membran,
- sposoby zwiększenia trwałości i stabilności membran.

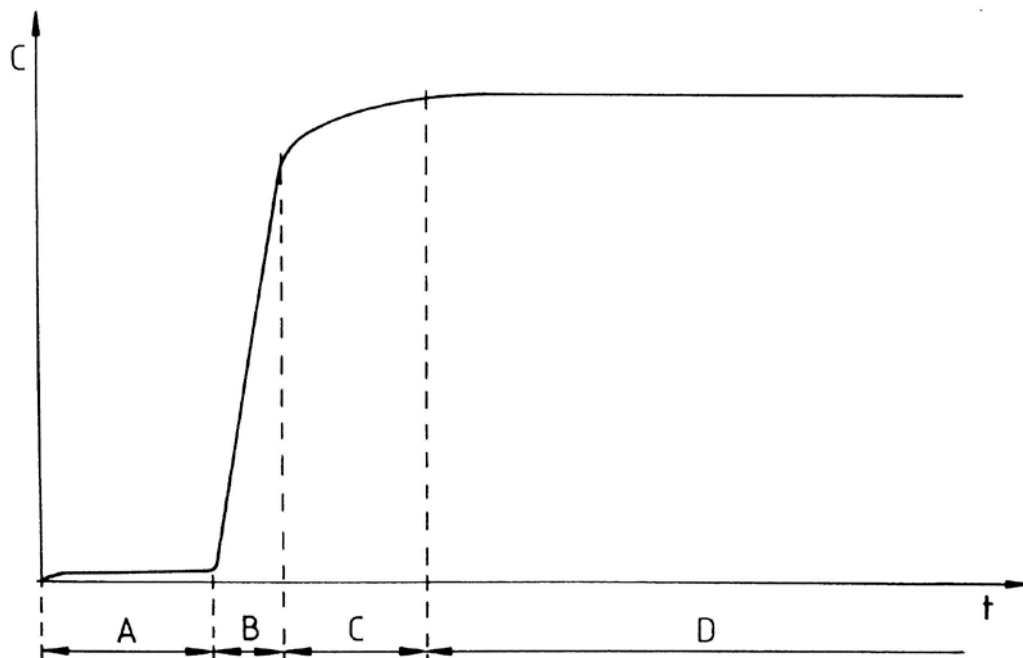
W dalszej części rozdziału przedstawione są wyniki pomiarów rezystancji i napięcia przebicia membran. Pomiary te stanowią uzupełnienie ułatwiające interpretację wyników pomiarów pojemności membran.

13.1. Etapy formowania się dwuwarstw lipidowych

Analiza wielu krzywych pojemności dla membran formowanych w różnych warunkach pozwoliła na wyróżnienie czterech charakterystycznych etapów podczas

tworzenia się dwuwarstwy. Typowa krzywa pojemności formującej się dwuwarstwowej membrany lipidowej przedstawiona jest na rysunku 13.1.

Początkowo, po umieszczeniu kropli roztworu formującego w otworze w przegrodzie, membrana ma małą pojemność i w miarę upływu czasu w niewielkim stopniu wzrasta. W zależności od składu roztworu formującego pojemność ta wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu pikofaradów. Na rysunku 13.1 etap ten oznaczony jest literą A. Następnym etapem (B) jest szybki wzrost pojemności. Zwykle pomiędzy etapem A i B jest wyraźna granica i można dokładnie określić moment, w którym pojemność zaczyna gwałtownie wzrastać. Często wzrost ten ma charakter niemal liniowy. Po okresie szybkiego wzrostu pojemności następuje zwolnienie szybkości i przyrosty pojemności w czasie są coraz mniejsze (etap C). Podczas tego etapu mogą występować również spadki pojemności. Czas, po którym pojemność membrany ulega stabilizacji oznaczony jest jako etap D. Podczas tego etapu występują niewielkie fluktuacje lub dryft pojemności.



Rys. 13.1. Pojemność membran lipidowych podczas procesu formowania. A - początkowo membrana jest gruba i posiada niewielką pojemność, B - szybki wzrost pojemności wywołany powstaniem dwuwarstwy, powiększaniem się jej pola powierzchni i zmniejszaniem grubości, C - powolny wzrost i stabilizowanie się pojemności, D - zakres stabilnej pojemności membrany, w którym membranę można wykorzystywać do dalszych badań.

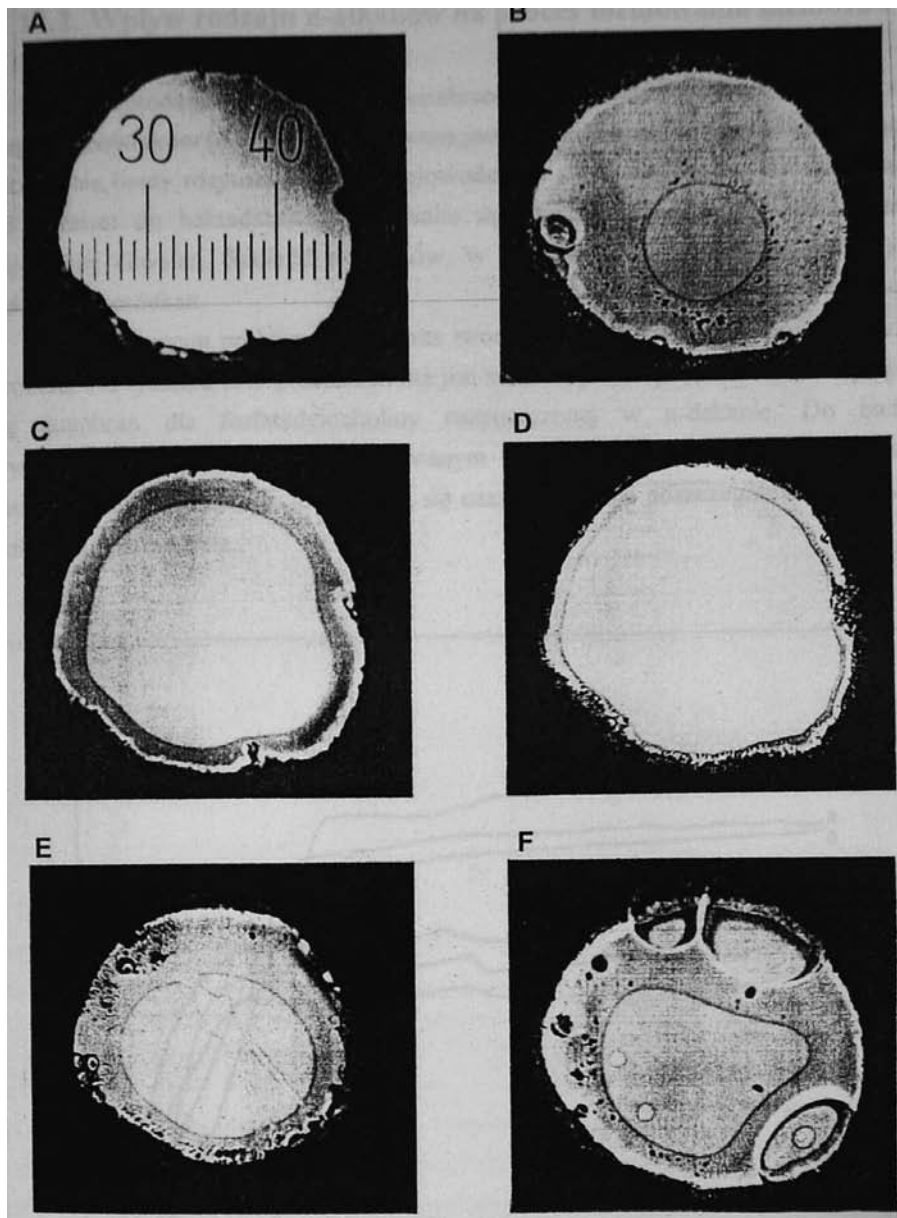
Membrana uważana była za uformowaną i gotową do dalszych badań, gdy dryft pojemności był mniejszy niż 10 pF/min (koniec etapu C). Przy niektórych membranach, które były mało stabilne, określenie granicy pomiędzy etapami C i D było trudne. W warunkach, w których prowadzono badania, membrany po uformowaniu zwykle miały pojemność 1.2 - 2.5 nF (otwór o średnicy 1-1.1 mm).

Przy opisach procesów formowania membran przedstawionych w dalszej części rozdziału podane są czasy trwania poszczególnych etapów (A-C). Z punktu widzenia osoby wykorzystującej membrany do badań pożądanym jest, aby etapy A-C trwały jak najkrócej, natomiast trwałość i żywotność membrany była możliwie wysoka (jak najdłuższy etap D). Pożądanym jest także, aby jej pojemność była stabilna. Zwykle najbardziej czasochłonnym etapem badań, których obiektem są membrany lipidowe, jest proces ich tworzenia. W wielu przypadkach czas formowania membrany może trwać nawet godzinę. Zwiększenie efektywności badań można więc osiągnąć skracając czas tworzenia membran.

Na rysunku 13.2 przedstawione są przykładowe fotografie membran wykonane w świetle przechodzącym. Fotografia A na rysunku 13.2 przedstawia wzorec długości umieszczony przy otworze. Wzorec ten umożliwia wyskalowanie fotografii, dzięki czemu możliwe jest wyznaczenie pola powierzchni membran.

Fotografie B, C i D przedstawiają membrany tworzone z lecytyny rozpuszczonej w dekanie. W środkowej części otworu jest cienka membrana, otoczona obrzeżem Plateau-Gibbsa. Pomiędzy strefami widoczna jest rozdzielająca je granica. Membrany te różnią się polem powierzchni zajmowanym przez dwuwarstwę. Tak duże różnice spowodowane są umieszczeniem różnych ilości roztworu formującego w otworze oraz stopniem zwilżenia przegrody i krawędzi otworu przez roztwór formujący. Również temperatura wpływa na wielkość tworzącej się dwuwarstwy. Przy tworzeniu membran dąży się do tego, aby uzyskiwać membrany takie jak na fotografii D, zajmujące możliwie dużą część powierzchni otworu. Zwykle jednak tworzone dwuwarstwy lipidowe osiągają rozmiary takie jak na fotografii C. W niektórych przypadkach, zależnie od składu roztworu formującego, uzyskanie membran takich jak na fotografii C lub D bywa niemożliwe. Na fotografii E przedstawiona jest membrana formowana w obecności elektrolitu zawierającego $10^{-5}M$ chloropromazyny. Dwuwarstwy tworzone w obecności pochodnych fenotiazyny zawierają wtrącenia roztworu formującego w postaci smug i wysepek, a także zanieczyszczenia w postaci wykrystalizowanych składników roztworów. Fotografia E przedstawia membranę, do której przyłączone

są również pęcherzyki gazu. Membrany takie nie były wykorzystywane w dalszych badaniach.

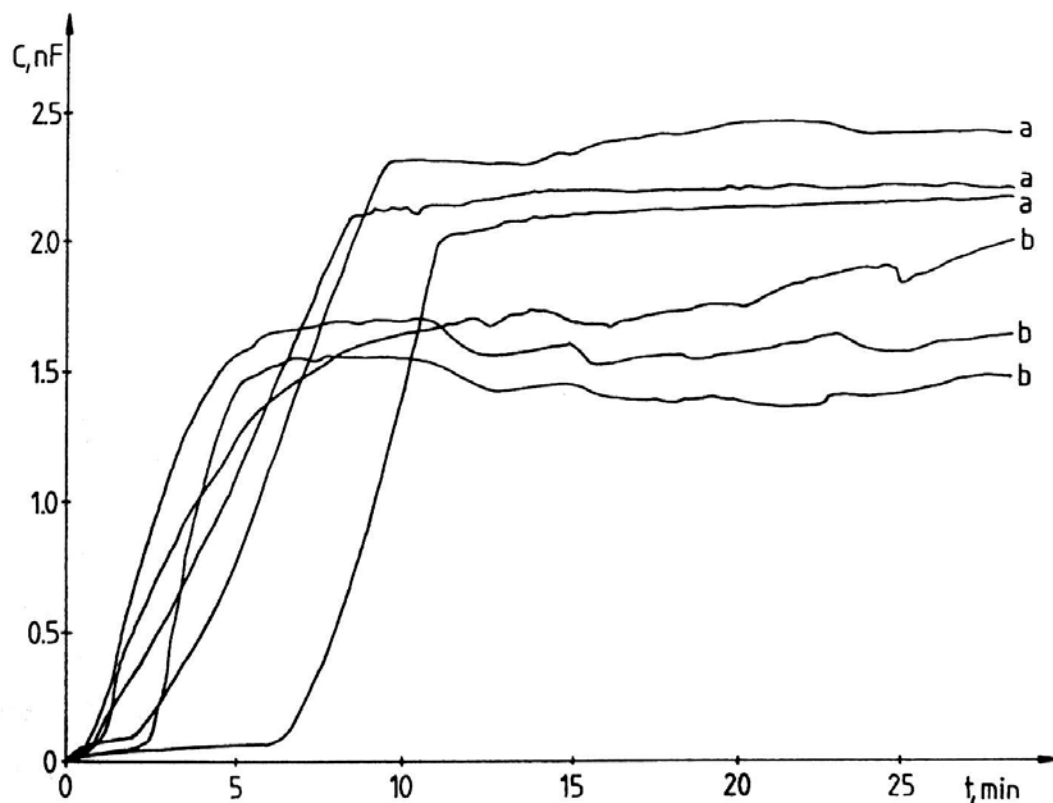


Rys. 13.2. Fotografie membran lipidowych: a) fotografia wzorca umożliwiająca wyznaczenie pola powierzchni dwuwarstwy, b,c,d) membrany utworzone z lecytyny w dekanie, 20 mg/ml, elektrolit 0.1M KCl, różnią się polem powierzchni zajmowanym przez dwuwarstwę, e) membrana utworzona z lecytyny w dekanie, 20 mg/ml, elektrolit 0.1M KCl, 10^{-5} M chloropromazyna, dwuwarstwa zawiera wtrącenia rozprószonego w postaci smug, f) przykład utworzonej membrany, nie wykorzystywanej w dalszych badaniach, dwuwarstwa zawiera wtrącenia w postaci wysepki rozprószonego wtrącenia w postaci wykrystalizowanych lipidów i pęcherzyki gazu połączone z obrzeżem.

13.2. Wpływ rodzaju n-alkanów na proces formowania membran

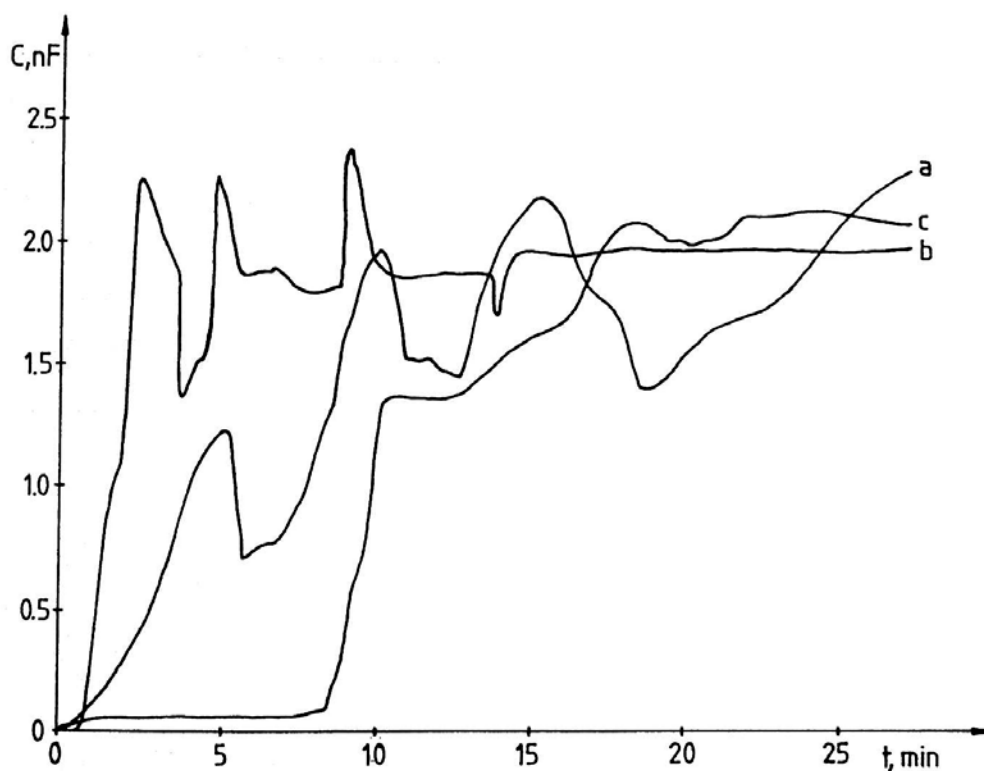
W metodzie formowania membran opracowanej przez Muellera i współpracowników [170] wykorzystywana jest zdolność lipidów do samoorganizacji. Stosuje się lipidy rozpuszczone w węglowodorach alifatycznych, zwykle n-alkanach od heksanu do heksadekanu. Stosowane są również węglowodory nienasycone, najczęściej skwalen. Spośród n-alkanów, w publikacjach zwykle wymieniany jest dekan i heksadekan.

Podstawowym problemem podczas tworzenia się membran jest powtarzalność procesu. Na rysunku 13.3 przedstawiona jest seria krzywych pojemności formujących się membran dla fosfatydylocholiny rozpuszczonej w n-dekanie. Do badań wykorzystano fosfatydylocholiny o różnym stopniu czystości. Krzywe posiadają podobny kształt i przebieg, lecz różnią się czasami trwania poszczególnych etapów i końcową pojemnością.



Rys. 13.3. Seria krzywych pojemności formujących się dwuwarstw lipidowych. Roztwór formujący: fosfatydylocholiny w dekanie 10 mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl. Do formowania membran wykorzystano fosfatydylocholiny o czystości: a) 60%, b) 99%.

Gdy stosowano lżejsze węglowodory do sporządzenia roztworów formujących, uzyskiwano krzywe pojemności formujących się membran mniej powtarzalne niż dla dekanu. Na rysunku 13.4 przedstawione zostały typowe krzywe pojemności dla membran formowanych z użyciem heksanu, heptanu i oktanu.



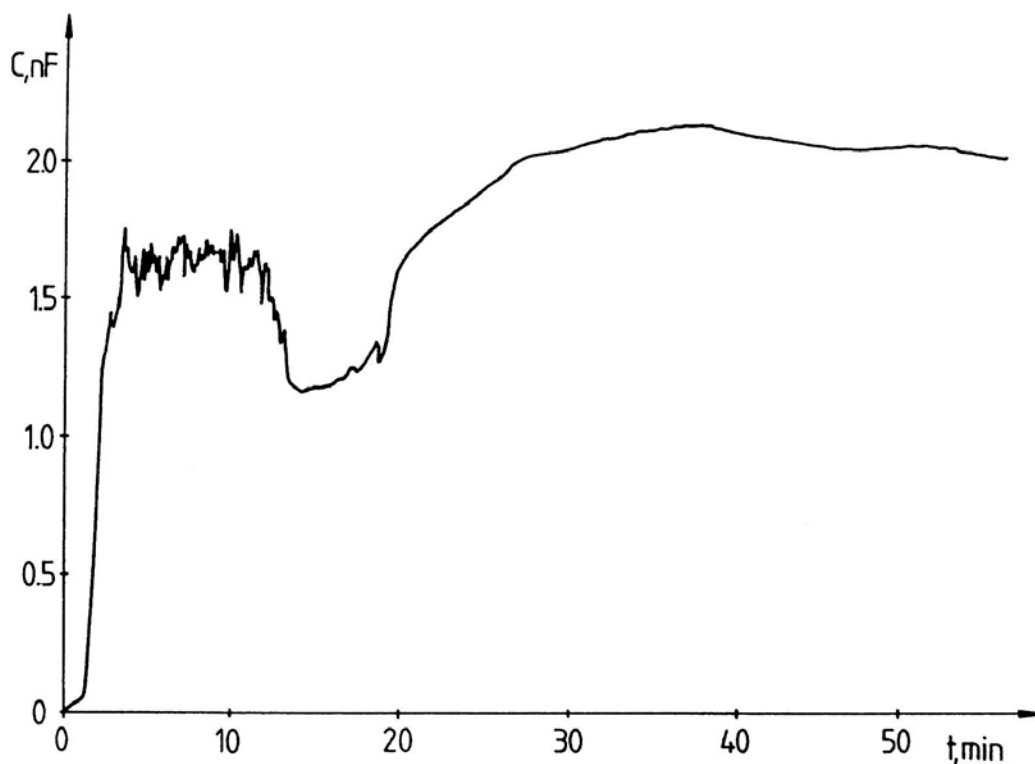
Rys. 13.4. Pojemności formujących się dwuwarstw lipidowych dla fosfatydylocholiny rozpuszczonej w różnych n-alkanach. Stężenie fosfatydylocholiny 10 mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl. Stosowany rozpuszczalnik: a) heksan, b) heptan, c) oktan.

Długość łańcuchów węglowych węglowodorów stosowanych do tworzenia roztworu formującego wyraźnie wpływała na przebieg procesu formowania dwuwarstw lipidowych. Membrany formowane przy użyciu lżejszych węglowodorów (heksan, heptan) były niestabilne. Proces formowania często zakłócany był przez powstające pęcherzyki parującego rozpuszczalnika, przylegające do membrany. Występowały gwałtowne wzrosty i spadki pojemności, szczególnie w początkowym okresie istnienia membrany. Wyróżnienie etapów B i C było trudne. Membrany wrażliwe były na drobne wstrząsy, które powodowały gwałtowne zmniejszanie się pojemności. Powrót pojemności do pierwotnej wartości był powolny. Czas życia membran był krótki, poniżej jednej godziny. Membrany

tworzone przy użyciu dekanu były znacznie stabilniejsze i trwalsze. Typowy czas życia membran tworzonych przy użyciu dekanu wynosił 2-4 godziny.

Gdy do sporządzenia roztworu formującego wykorzystywany był nonan, proces formowania membran był nietypowy. Po etapie szybkiego wzrostu pojemności (etap B) następował etap, w którym pojawiały się bardzo duże szumy pojemności membrany (Rys. 13.5). Następnie pojemność spadała i przez pewien czas utrzymywała się na niewielkiej wartości, po czym następował wzrost do wartości ok. 2 nF.

Porównując przebieg krzywych pojemności formujących się membran można zauważyć, że największe różnice występują w etapie C. Dla lekkich węglowodorów podczas tego etapu występują gwałtowne, nieregularne spadki i wzrosty pojemności. W miarę wzrostu długości łańcucha węglowodoru, etap C zmienia swój charakter. Dla nonanu zmiany te nie są już tak gwałtowne, a dla dekanu zanikają.



Rys. 13.5. Pojemność formującej się dwuwarstwy lipidowej dla fosfatydylocholiney rozpuszczonej w n-nonanie. Stężenie fosfatydylocholiney 10 mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl.

W tabeli 13.1 przedstawione są parametry formowania membran z fosfatydylocholiny rozpuszczonej w różnych n-alkanach. Podane są czasy trwania poszczególnych etapów oraz pojemność końcowa membran (po ustabilizowaniu się wartości pojemności - dryft poniżej 10 pF/min). Najmniej stabilne membrany tworzyły się, gdy wykorzystywane były lżejsze węglowodory. W miarę wzrostu długości łańcucha używanego węglowodoru wzrastała stabilność i mechaniczna odporność membran. Również zmniejszało się odchylenie standardowe pojemności uformowanych membran - uzyskiwano bardziej powtarzalne membrany.

Tab. 13.1. Charakterystyka procesu formowania dwuwarstwowych membran lipidowych z fosfatydylocholiny rozpuszczonej w n-alkanach. Stężenie lecytyny: 10 mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl. Temperatura: 25°C. W nawiasach podana jest rozpiętość czasów trwania poszczególnych etapów formowania membran.

Rozpuszczalnik	Średni czas trwania etapu [min]			Pojemność [nF]
	A	B	C	
n-heksan	1.7 (1..3)	1.5 (1..2)	22.4 (10..28)	2.14 ± 0.45
n-heptan	1.6 (1..3)	1.4 (1..2)	15.3 (12..20)	2.23 ± 0.39
n-oktan	2.3 (1..4)	1.6 (1..2)	10.6 (5..20)	1.55 ± 0.31
n-nonan	2.3 (1..6)	1.2 (1..2)	10.2 (5..18)	1.43 ± 0.28
n-dekan	3.2 (1..12)	1.8 (1..7)	12.4 (2..22)	1.88 ± 0.30

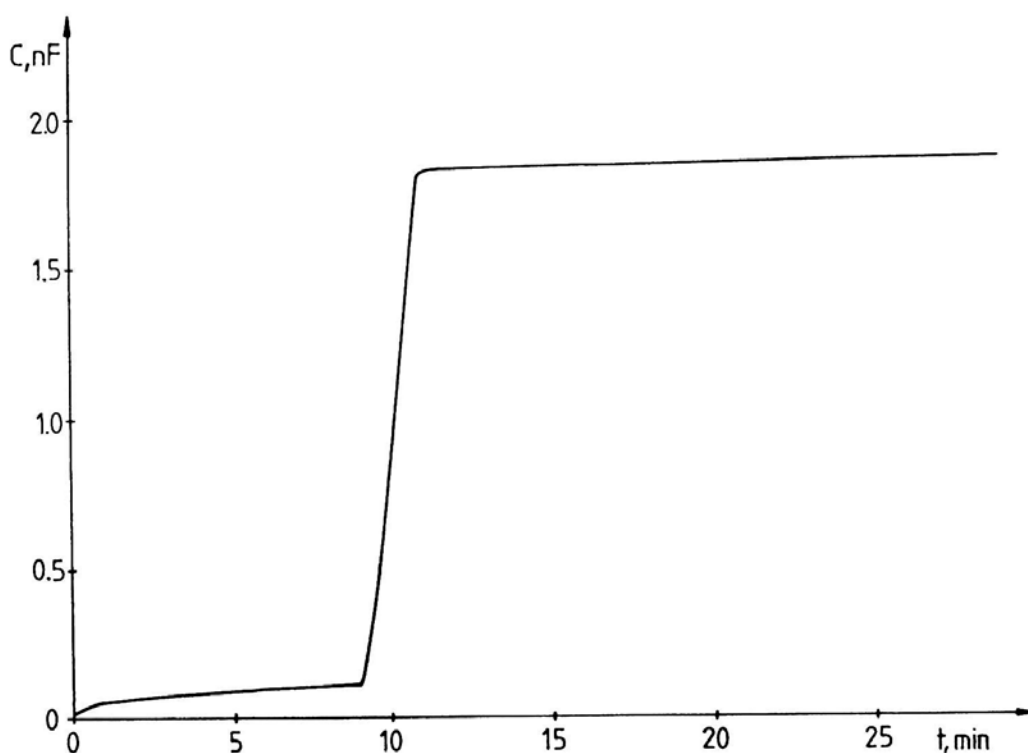
Wyniki podane w tabeli 13.1 dla dekanu są wartościami średnimi dla membran z fosfatydylocholiny o czystości 60 i 99%. Spośród rozpuszczalników wymienionych w tabeli 13.1 stosunkowo trwale membrany uzyskuje się stosując dekan. Gdy krzywa pojemności formującej się membrany znacznie różniła się od typowego przebiegu pojemności przy danym składzie roztworu formującego i elektrolitu, membrany takie nie były wykorzystane w dalszych badaniach.

13.3. Wpływ dodatku alkoholi na proces formowania membran

Węglowodory używane do formowania membran posiadają właściwości fizykochemiczne podobne do właściwości warstwy hydrofobowej membrany. Bardzo mała rozpuszczalność węglowodorów w wodzie powoduje, że praktycznie cała ilość rozpuszczalnika pozostaje wewnątrz obrzeża i dwuwarstwy. Membrana z

obrzeżem tworzy wyizolowany układ, którego granicę tworzą hydrofilowe grupy lipidów znajdujących się na granicy międzyfazowej. Proces formowania dwuwarstwy zależy przede wszystkim od ustalenia się równowagi termodynamicznej pomiędzy dwuwarstwą i obrzeżem.

Po zmianie polarności rozpuszczalnika w roztworze formującym można spodziewać się naruszenia termodynamiki tworzenia się dwuwarstwy. Wybrane zostały do tego celu alkohole o dość dobrej rozpuszczalności zarówno w wodzie jak i węglowodorach. Przenikalność elektryczna wykorzystywanych alkoholi jest około dziesięciokrotnie wyższa od przenikalności węglowodorów (Tab. 11.1). Do badań wykorzystano mieszaniny węglowodorów z propanolem, izopropanolem, butanolem i izobutanolem.



Rys. 13.6. Pojemność formującej się membrany lipidowej z dodatkiem alkoholu do roztworu formującego. Roztwór formujący: fosfatydylocholina 10 mg/ml w mieszaninie dekan-butanol 3:2. Elektrolit 0.1M KCl.

Dodatek alkoholu do roztworu formującego radykalnie zmienił przebieg procesu formowania membran. Pojemność membran wzrastała bardzo szybko i niemal liniowo (etap B). Etap C często był bardzo krótki, szybko ustalała się równowaga. Dla wielu membran etap C niemal zanikał. Na rysunku 13.6

przedstawiony jest przykład typowej krzywej pojemności membrany formowanej przy użyciu mieszaniny dekanu z butanolem. Podobny przebieg miała większość krzywych pojemności formowanych membran.

Parametry procesów formowania zostały przedstawione w tabeli 13.2. W porównaniu z wynikami uzyskanymi dla roztworów bez alkoholi zwraca uwagę bardzo krótki czas trwania etapu B. Średnie wartości czasu trwania etapu C również są mniejsze.

Podczas etapu A pojemność membran była stosunkowo wysoka. Bez alkoholu wartość ta wynosiła zwykle kilkanaście pikofaradów, natomiast w obecności alkoholu wynosiła 50-200 pF. Pojemności membran uformowanych z dodatkiem alkoholu wykazują duży rozrzut. Odchylenie standardowe wynosi 6-25%. Przy stosunku alkan:alkohol 3:2 pojemność membran jest wyższa, niż przy stosunku 4:1. W wielu przypadkach, przy tak dużym odchyleniu standardowym, uzyskane pojemności dla obu składów mieszczą się w granicach błędu.

Przy rozpatrywaniu zjawisk zachodzących podczas procesu formowania membran w obecności alkoholi należy brać pod uwagę kilka możliwych zjawisk:

- a) oddziaływania hydrofobowe wewnątrz dwuwarstwy - powodujące usuwanie cząsteczek zawierających polarne grupy -OH poza obręb membrany, do obrzeża,
- b) dyfuzja cząsteczek alkoholu do fazy wodnej i ustalanie się równowagi stężeń alkoholu wewnątrz dwuwarstwy, obrzeża i fazy wodnej,
- c) zmiany napięcia powierzchniowego membrany i obrzeża,
- d) zmiana zwilżalności przegrody przez roztwór formujący,
- e) wbudowywanie się cząsteczek alkoholu w dwuwarstwę - tworzenie wiązań wodorowych z grupami >CO wiązań estrowych lipidów, zwiększenie płynności membrany,
- f) ułatwienie rozpadu micel lipidowych wewnątrz membrany i wbudowywanie się ich w monowarstwę tworzącą membranę.

Wpływ alkoholi na właściwości błon lipidowych był szeroko badany ze względu na ich fizjologiczne oddziaływanie. Alkohole wpływają na funkcjonowanie układów enzymatycznych, posiadają właściwości anasteczne, zwiększają płynność membran. W większych stężeniach powodują denaturację białek. Większość prac koncentruje się na etanolu [222-225]. Są również prace dotyczące oddziaływania innych alkoholi z membranami [91,165,226].

Tab. 13.2. Charakterystyka procesów formowania dwuwarstwowych membran lipidowych z lecytyny rozpuszczonej w mieszaninach n-alkanów z alkoholami. Stężenie lecytyny 10 mg/ml. Elektrolit 0.1 M KCl. Temperatura $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. W nawiasach podana jest rozpiętość czasów trwania poszczególnych etapów formowania membran. Dla każdego rozpuszczalnika pomiary wykonano dla 8-30 membran.

Rozpuszczalnik	Średni czas trwania etapu [min]			Pojemność [nF]
	A	B	C	
heptan-propanol 4:1	2.2 (1..5)	0.2 (0.15..0.25)	2.5 (2..5)	1.58 \pm 0.27
heptan-propanol 3:2	0.8 (0.4..3)	0.2 (0.15..0.25)	2.8 (1..4)	2.42 \pm 0.33
heptan-izopropanol 4:1	1.0 (0.2..2.5)	0.3 (0.2..0.4)	5.5 (3..10)	1.64 \pm 0.41
heptan-izopropanol 3:2	0.6 (0.2..5)	0.3 (0.2..0.5)	2.1 (1..4)	2.23 \pm 0.38
heptan-butanol 4:1	1.5 (0.5..4)	0.2 (0.15..0.25)	3.3 (2..7)	1.80 \pm 0.35
heptan-butanol 3:2	4.2 (2..8)	0.3 (0.2..0.4)	3.4 (2..8)	2.41 \pm 0.15
heptan-izobutanol 4:1	3.6 (0.6..10)	0.2 (0.15..0.25)	2.9 (2..4)	1.73 \pm 0.44
heptan-izobutanol 3:2	1.1 (0.3..2.5)	0.3 (0.2..0.4)	4.4 (3..8)	2.44 \pm 0.32
oktan-propanol 4:1	1.3 (0.8..2.2)	0.2 (0.1..0.3)	3.2 (1..5)	1.76 \pm 0.36
oktan-propanol 3:2	2.4 (0.8..6)	0.8 (0.5..1)	2.9 (0.7)	2.21 \pm 0.20
oktan-izobutanol 4:1	1.2 (0.3..2.2)	0.3 (0.2..0.5)	4.5 (1..8)	1.88 \pm 0.42
oktan-izobutanol 3:2	1.3 (0.4..2.2)	0.3 (0.2..0.4)	5.5 (4..8)	2.36 \pm 0.36
oktan-izopropanol 4:1	0.4 (0.2..1.0)	0.3 (0.2..0.4)	1.5 (1..3)	1.80 \pm 0.20
oktan-izopropanol 3:2	0.3 (0.2..0.5)	0.2 (0.15..0.25)	2.2 (1..3)	2.03 \pm 0.17
oktan-butanol 4:1	0.7 (0.2..1.5)	0.4 (0.2..1.5)	4.7 (1..13)	1.67 \pm 0.29
oktan-butanol 3:2	1.5 (0.3..3)	0.4 (0.2..1)	5.2 (2..15)	2.33 \pm 0.21
dekan-propanol 4:1	5.0 (2..13)	1.6 (1.5..2)	3.8 (0..12)	1.58 \pm 0.38
dekan-propanol 3:2	5.3 (3..15)	1.1 (0.8..1.5)	9.5 (4..15)	2.15 \pm 0.30
dekan-butanol 4:1	4.0 (1..12)	1.1 (1..1.5)	4.3 (0..12)	1.88 \pm 0.29
dekan-butanol 3:2	7.4 (1..16)	1.5 (1..2)	2.5 (0..10)	1.95 \pm 0.21

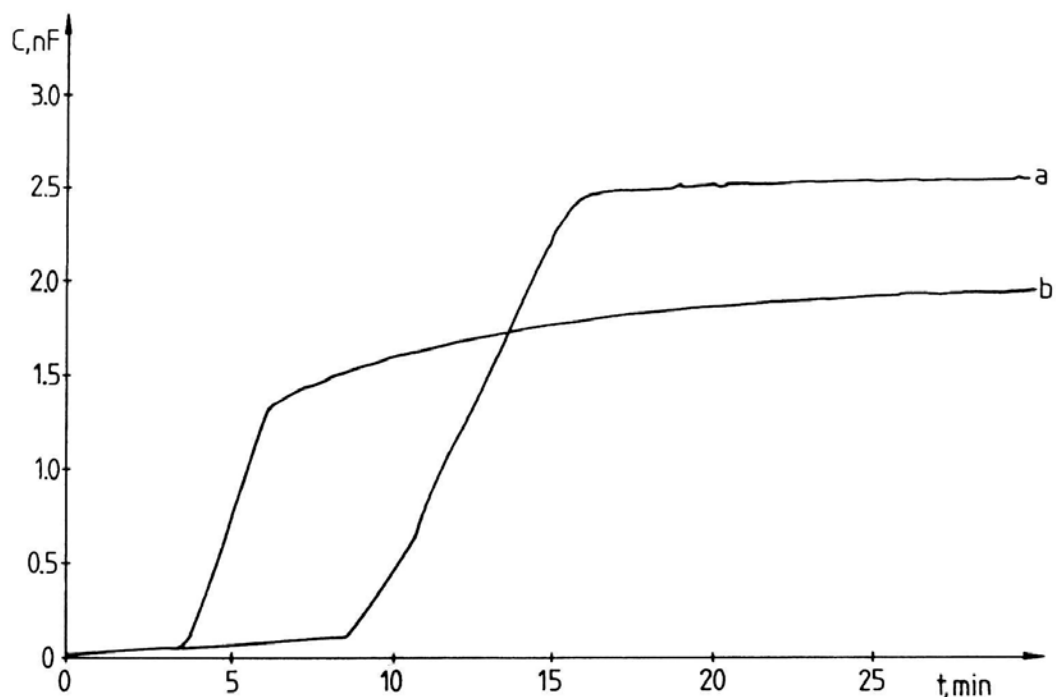
Dla porównania, przeprowadzono również próby formowania membran z fosfatydylocholiny rozpuszczonej w mieszaninach dekanu z chloroformem o składach 3:2 i 4:1, o stężeniu lipidu 10 mg/ml. Próby kończyły się najczęściej niepowodzeniem. Podczas powstawania dwuwarstwy (etap B) membrany pękały. Gdy jednak membrany tworzone w naczyniu z przegrodą wykonaną z octanu celulozy, dwuwarstwy lipidowe tworzyły się i były stosunkowo trwałe. Mieszanina dekanu z chloroformem bardzo dobrze zwilżała folię z octanu celulozy.

W przypadku stosowania przegrody z octanu celulozy było ryzyko rozpuszczania się jej w roztworze formującym i dodatkowych komplikacji badanego układu. Czysty chloroform powoduje bardzo szybkie rozpuszczenie octanu celulozy. W mieszaninie z dekanem powodował jedynie pęcznienie membrany. Próbką folii z octanu celulozy zwiększyła swoją masę z 51.8 mg do 78.0 mg po moczeniu jej przez dobę w 10 ml mieszaniny dekanu z chloroformem o składzie 1:1. Po 5-minutowym suszeniu jej w strumieniu ciepłego powietrza masa jej zmalała do 75.9 mg, a po 5 latach przechowywania jej masa zmniejszyła się do 62.7 mg. Brak zmniejszenia masy folii świadczy o niewielkim ryzyku dużego zanieczyszczenia roztworu formującego octanem celulozy.

13.4. Wpływ rodzaju lipidów na proces formowania membran

Głównym lipidowym składnikiem błon biologicznych są fosfolipidy. Wśród nich dominuje fosfatydylocholina. Inne lipidy występują w mniejszych ilościach. Fosfolipidy membranowe różnią się między sobą budową grupy polarnej. Fosfatydylocholina jest lipidem elektrycznie obojętnym, jednak grupa polarna jest jonem obojnaczym. Część lipidów membranowych występuje w postaci anionowej (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol). Istotnym składnikiem błon biologicznych są sterole. W błonach komórek zwierzęcych występuje duża ilość cholesterolu, który w przeciwieństwie do fosfolipidów, ma rozbudowaną część niepolarną.

Wyniki przedstawione w tym rozdziale mają na celu określenie, jak rodzaj stosowanych lipidów wpływa na proces ich samoorganizacji prowadzący do utworzenia dwuwarstwy. Zmieniając skład lipidowy można zmieniać właściwości warstwy polarnej membran używając obojętnych lipidów (fosfatydylocholina) i lipidów w formie zjonizowanej (fosfatydyloseryna). Można zmieniać również strukturę i właściwości warstwy hydrofobowej membrany wprowadzając do roztworu formującego cholesterol.



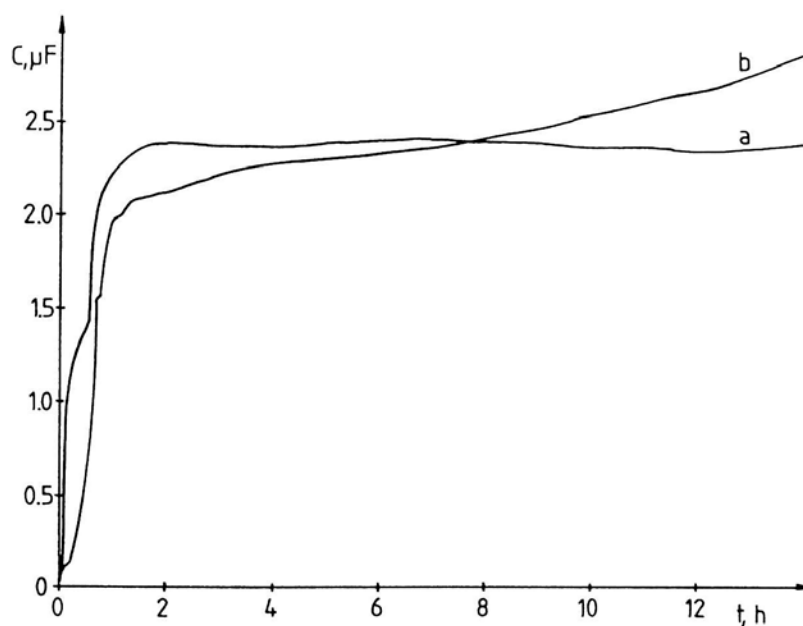
Rys. 13.7. Pojemność formujących się membran lipidowych. Elektrolit 0.1M KCl. Roztwór formujący: a) fosfatydylocholina-cholesterol 7:3 w dekanie 20 mg/ml, b) azolektyna w dekanie 20 mg/ml.

Przykłady przebiegu pojemności podczas formowania się membran z dodatkiem cholesterolu i membran z azolektyny przedstawione są na rysunku 13.7. Cholesterol samodzielnie nie jest zdolny do utworzenia dwuwarstwowej membrany. Dodany jednak do fosfatydylocholiny wyraźnie wpłynął na średni czas trwania etapu B, zwiększając go. Membrany z cholesterolem szybciej dochodziły do stanu równowagi (krótszy etap C), jak również były stabilniejsze i trwalsze po uformowaniu. Utworzone dwuwarstwy zajmowały większą część powierzchni otworu, w którym były tworzone i bardziej powtarzalna była ich pojemność.

Spośród wykorzystywanych do badań lipidów uwagę zwraca azolektyna izolowana z soi. Przebieg procesu formowania niemal dla wszystkich membran był bardzo stabilny i powtarzalny. Membrany po uformowaniu były stosunkowo trwałe. Cząsteczki lipidów azolektyny posiadają większą ilość wielonienasyconych łańcuchów węglowych w porównaniu ze stosowaną lecytyną (Tab. 11.1). W tej sytuacji membrany z azolektyny wykazują wyższą płynność niż membrany z lecytyny.

Tab. 13.3. Charakterystyka procesu formowania dwuwarstwowych membran lipidowych z różnych lipidów rozpuszczonych w n-dekanie. Elektrolit: 0.1 M KCl. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$. W nawiasach podana jest rozpiętość czasów trwania poszczególnych etapów formowania membran. Dla każdego składu wykonano pomiary co najmniej 6 membran.

Lipidy	Średni czas trwania etapu [min]			Pojemność [nF]
	A	B	C	
fosfatydylocholina 20 mg/ml	3.4 (1.5..12)	1.9 (1.2..6.5)	14.4 (2..22)	1.76 ± 0.29
azolektyna 20 mg/ml	3.0 (1.3..5.1)	3.2 (1.3..5.5)	18.8 (8..27)	1.92 ± 0.18
fosfatydylocholina -cholesterol 9:1 20 mg/ml	3.8 (1..11)	21.5 (8..30)	10.3 (1..39)	2.07 ± 0.14
fosfatydylocholina -cholesterol 8:2 20 mg/ml	2.3 (0.2..5.8)	5.5 (2.1..10.5)	6.6 (1..13)	2.39 ± 0.09
fosfatydylocholina -cholesterol 7:3 20 mg/ml	8.1 (3..14)	5.6 (1.9..12)	5.9 (0.9..16)	2.54 ± 0.30



Rys. 13.8. Przebieg pojemności formujących się membran lipidowych. Roztwór formujący: a) azolektyna w dekanie 20 mg/ml, b) fosfatydylocholina-fosfatydyloetanolamina-cholesterol 3:1:1 w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25°C . Otwór 1.1 mm.

Czas życia membran tworzonych z samej lecytyny zwykle nie przekraczał 3 godzin. Jednak stosując mieszaniny lipidów lub azolektynę, często uzyskiwało się membrany utrzymujące się 16-20 godzin, zanim uległy destrukcji. Przykłady takich krzywych przedstawione są na rysunku 13.8. Membrana, której pojemność przedstawiona jest na rysunku 13.8,b pękła dopiero po 22 godzinach, jednak jej pojemność po kilkunastu godzinach zaczęła gwałtownie wzrastać do wartości ponad 20 nF. Wartość ta nie była jednak rzeczywistą pojemnością membrany. Był to błąd pomiarowy spowodowany znacznym zmniejszeniem rezystancji membrany do wartości poniżej 100 k Ω . Po tak długim czasie mogły zajść znaczne zmiany struktury membrany, zmniejszające jej rezystancję. Możliwe jest także, że w membranę mogły wbudować się zanieczyszczenia zmniejszające jej rezystancję. Membrany tworzone z azolektyny stabilne były przez cały czas życia membrany (Rys. 13.8,a).

13.5. Wpływ składu elektrolitu na proces formowania membran

Podczas badań zjawisk membranowych stosowane są roztwory elektrolitów o różnym składzie i stężeniu. Powstaje więc pytanie, jakie składniki roztworu wodnego i w jaki sposób będą zmieniać proces formowania, jaki jest optymalny skład elektrolitu i dopuszczalne stężenia niektórych składników? Analizując dane literaturowe można zauważyć, że jako elektrolit podstawowy najczęściej stosowany jest roztwór NaCl lub KCl o stężeniu 0.1M. Membrany lipidowe są niemal nieprzepuszczalne dla jonów o małych rozmiarach, posiadających dużą powierzchniową gęstość ładunku [102]. Jony takie mogą więc oddziaływać jedynie na powierzchniową warstwę membran - na warstwę hydrofilową. Gdy w roztworze wodnym znajdują się cząsteczki o właściwościach lipofilowych, będą one wnikać do wnętrza membrany i tam oddziaływać na nią.

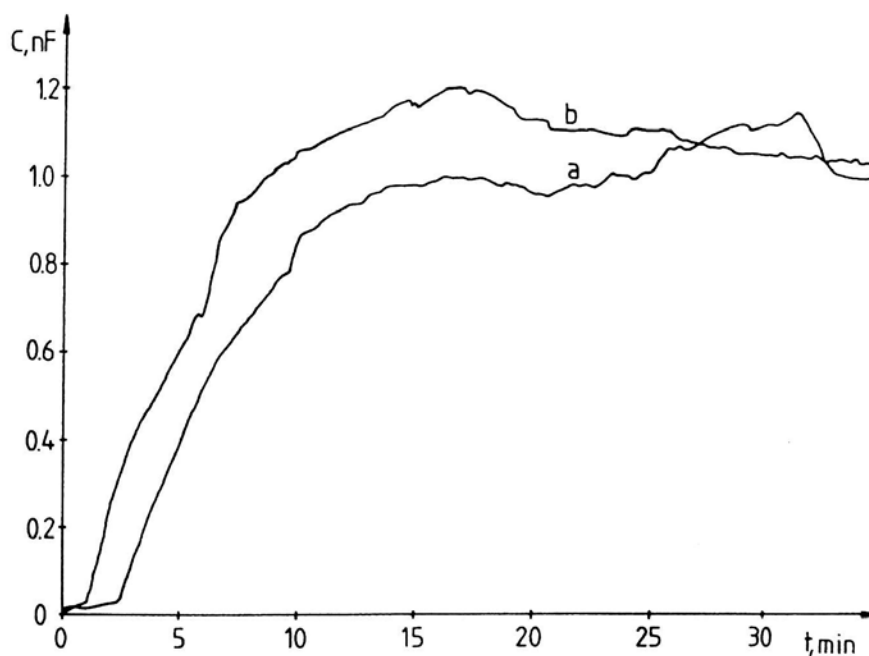
Do badań procesu formowania membran wybrano roztwory wodne zawierające proste jony (K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Br^- , J^-). Pomiary wykonano przy różnych stężeniach tych substancji, aby stwierdzić, czy ustawienie grup polarnych lipidów (rozdział 5.4) wpływa na przebieg procesu formowania membran. Wykorzystano również substancje lipofilowe o właściwościach słabych elektrolitów, mające bardzo duże znaczenie w medycynie - pochodne fenotiazyny [227-230]. Posiadają one zdolność swobodnego wnikania do wnętrza membrany, zmieniają płynność membran. Parametry opisujące proces formowania membran w obecności elektrolitów o różnym składzie przedstawione są w tabeli 13.4.

Tab. 13.4. Charakterystyka procesu formowania dwuwarstwowych membran lipidowych w obecności roztworu elektrolitu o różnym składzie. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$. W nawiasach podana jest rozpiętość czasów trwania poszczególnych etapów formowania membran. Dla każdego rozpuszczalnika wykonano pomiary co najmniej 8 membran.

Roztwór elektrolitu	Średni czas trwania etapu [min]			Pojemność [nF]
	A	B	C	
Roztwór formujący: fosfatydylocholina 10mg/ml, oktan:butanol 3:2				
KCl 0.02M	11.8 (3..18)	2.5 (0.4..6)	9.6 (7..12)	2.25 \pm 0.22
KCl 0.1M	1.5 (0.3..3)	0.4 (0.2..1)	5.2 (2..15)	2.33 \pm 0.21
KCl 0.5M	5.4 (0.2..17)	0.8 (0.3..1)	6.8 (2..15)	2.21 \pm 0.46
KBr 0.02M	10.5 (8.5..12)	0.9 (0.2..1.4)	9.1 (6..14)	2.03 \pm 0.34
KBr 0.1M	4.2 (0.1..10)	0.9 (0.3..1.3)	10.4 (3..20)	2.31 \pm 0.29
KBr 0.5M	1.7 (0.2..4.7)	1.4 (0.4..2.6)	13.1 (7..19)	2.39 \pm 0.27
KJ 0.1M	0.5 (0.1..1.4)	0.3 (0.2..0.4)	6.5 (1..17)	2.85 \pm 0.46
KJ 0.5M	0.6 (0.1..0.9)	0.34 (0.3..0.4)	9.3 (4..14)	2.74 \pm 0.22
Roztwór formujący: azolektyna 20 mg/ml w dekanie				
KCl 0.1M	3.0 (1.3..5.1)	3.2 (1.3..5.5)	18.8 (8..27)	1.92 \pm 0.18
KCl 1M	4.4 (2.1..7.7)	5.9 (3.7..9)	19.0 (9..25)	2.42 \pm 0.24
KCl 0.1M CaCl ₂ 10mM	5.3 (2.3..10)	3.5 (2.0..6.6)	20.2 (6..33)	1.99 \pm 0.23
KCl 0.1M CaCl ₂ 0.1M	2.8 (1.8..4.5)	3.9 (2.0..5.5)	13.6 (7..27)	1.95 \pm 0.12
Roztwór formujący: fosfatydylocholina 20 mg/ml w dekanie				
KCl 0.1M	3.4 (1.5..12)	1.9 (1.2..6.5)	14.4 (2..22)	1.76 \pm 0.29
KCl 0.1M promazyna 10 ⁻⁴ M	2.0 (0.6..2.9)	4.1 (1.4..6.6)	4.9 (2..6)	1.11 \pm 0.15
KCl 0.1M promazyna 2·10 ⁻⁴ M	1.3 (0.3..2.4)	3.2 (2.1..5.8)	6.4 (2..13)	1.25 \pm 0.12
KCl 0.1M promazyna 5·10 ⁻⁴ M	1.7 (0.4..2.6)	3.4 (2.2..5.6)	4.8 (2..10)	1.22 \pm 0.11
KCl 0.1M chloropromazyna 10 ⁻⁴ M	1.8 (0.9..2.9)	3.2 (1.6..5.1)	6.7 (2..13)	1.31 \pm 0.22
KCl 0.1M chloropromazyna 2·10 ⁻⁴ M	1.6 (1.1..2.2)	2.6 (1.6..4.7)	3.9 (1..12)	1.12 \pm 0.28
KCl 0.1M tiorydazyna 10 ⁻⁴ M	1.5 (0.9..4.9)	3.7 (2.4..6.3)	5.3 (2..14)	1.44 \pm 0.32

Gdy w roztworze wodnym obecne były tylko jony niezdolne do wnikania do wnętrza membrany, nie obserwowano wyraźnych zmian w procesie formowania. Czasy trwania poszczególnych etapów, pojemność uformowanych membran i ich stabilność nie ulegały istotnym zmianom. Dla membran formowanych w obecności jonów J , które mają zdolność do dyfuzji przez membranę, proces formowania również nie różnił się wyraźnie od innych. Jedynie pojemność uformowanych membran była wyższa. Pole powierzchni dwuwarstwy tych membran nie było jednak mierzone i nie można ocenić, czy spowodowane było to jedynie wzrostem pola powierzchni dwuwarstwy, czy wzrostem pojemności specyficznej.

Część badań wykonywano stosując roztwór wodny buforowany za pomocą HEPES, który jest stosowany do utrzymywania pH w badaniach biochemicznych na żywych komórkach. Roztwory HEPES o stężeniu 10 mM nie powodowały zmian w procesie formowania membran.



Rys. 13.9. Pojemność formujących się membran w obecności pochodnych fenotiazyny. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w n-dekanie 10 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, a) $2 \cdot 10^{-4}$ M promazyna, b) $2 \cdot 10^{-4}$ M chlorpromazyna. Otwór 1 mm. Temperatura 24 °C.

Gdy roztwór wodny zawierał pochodne fenotiazyny, proces formowania bardzo mocno zmieniał się. Pojemność uformowanych membran była znacznie niższa i mniej stabilna (Rys. 13.9). Membrany stały się bardziej wrażliwe na

wstrząsy. Pole powierzchni dwuwarstw było znacznie mniejsze, niż dla membran bez obecności fenotiazyn. Znacznie mniej wyraźna była granica pomiędzy dwuwarstwą a obrzeżem. W obszarze dwuwarstwy można było zaobserwować wiele wtrąceń roztworu formującego w postaci wysepek i smug. Dla stężeń pochodnych fenotiazyny 10^{-3}M membrany nie formowały się. W chwili rozpoczęcia się tworzenia dwuwarstwy (początek etapu B) membrany pękały.

Biorąc pod uwagę obserwacje dokonane podczas badań oraz analizując przebieg krzywych pojemności formujących się membran w obecności różnych elektrolitów i dane z tabeli 13.4 można zauważyć kilka prawidłowości:

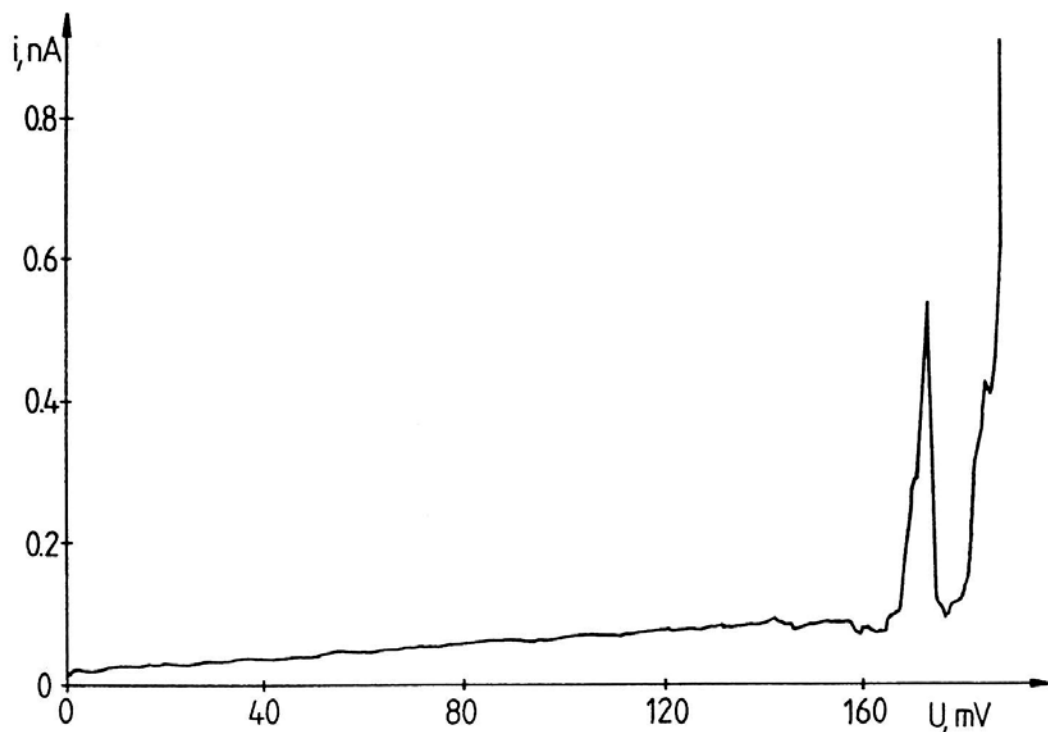
1. Jony o niewielkich rozmiarach, nie wnikające do wnętrza membrany nie wpływają na przebieg procesu formowania membran.
2. Siła jonowa roztworu nie wpływa na przebieg procesu formowania. Występują jednak ograniczenia stosowanych stężeń - dla elektrolitów o małym stężeniu ($>0.01\text{M}$) wzrastają błędy w pomiarze pojemności ze względu na rezystancję elektrod i elektrolitów. Duże stężenia elektrolitów ($>1\text{M}$) też nie są korzystne ze względu na wzrost gęstości elektrolitu, który powoduje trudności z umieszczeniem kropli roztworu formującego w otworze, silnie wypychanego ku powierzchni roztworu wodnego (duża różnica gęstości roztworu formującego i elektrolitu).
3. Jony jodkowe, wnikające do wnętrza membrany, nie zakłócają procesu formowania membran.
4. Pochodne fenotiazyny silnie zakłócają proces formowania dwuwarstw. Membrany tworzą się powoli, są niestabilne, łatwo pękają. Zajmują niewielką część pola powierzchni otworu. Już przy stosunkowo niewielkich stężeniach fenotiazyn (10^{-3}M) membrany nie dają się utworzyć.

13.6. Napięcie przebicia membran

Badania wpływu potencjału polaryzującego na pojemność wymagają tworzenia membran o możliwie dużej trwałości na przebicie elektryczne. Niskie napięcie przebicia ogranicza zakres stosowanych do badań potencjałów.

Informacji o napięciu przebicia dostarczają badania chronowoltamperometryczne lub chronopotencjometryczne. Krzywe rejestrowane były do momentu przebicia membrany. Typowa krzywa chronowoltamperometryczna przedstawiona jest na rys. 13.10. Na krzywych chronowoltamperometrycznych, tuż przed zniszczeniem membrany występują skoki prądu. Związane jest to z odwracalnym

przebicciem membrany. Powstające i zamykające się pory powodują zmiany przewodnictwa membrany i zmiany natężenia prądu. Dalszy wzrost potencjału powoduje nieodwracalne przebicie i zniszczenie membrany.



Rys. 13.10. Krzywa chronovoltamperometryczna dla membrany formowanej z fosfatydylocholiny rozpuszczonej w n-dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Szybkość polaryzacji 10 mV/s. Temperatura 25 °C. Otwór 1.1 mm.

W tabeli 13.5 przedstawiono wyniki pomiarów napięcia przebiccia dla roztworów formujących i roztworów elektrolitów o różnym składzie. Napięcie przebiccia membran zależy zarówno od rodzaju lipidów tworzących membranę, jak również od składu roztworu elektrolitu.

Uzyskane wyniki napięcia przebiccia dla tworzonych membran nie odbiegają wyraźnie od wyników podawanych w publikacjach [35,151-157]. Membrany z fosfatydylocholiny z dodatkiem cholesterolu są bardziej odporne na przebicie niż membrany z samej fosfatydylocholiny. Niektóre membrany zawierające cholesterol wytrzymywały napięcia powyżej 400 mV.

Wyniki zawarte w tabeli 13.5 wyraźnie wskazują na znaczne zmniejszenie odporności membran na przebicie elektryczne w obecności pochodnych fenotiazyny, które powodują również destabilizację procesu formowania membran.

Tab. 13.5. Napięcie przebicia membran. Dla każdego składu wykonano pomiary dla 8-30 membran.

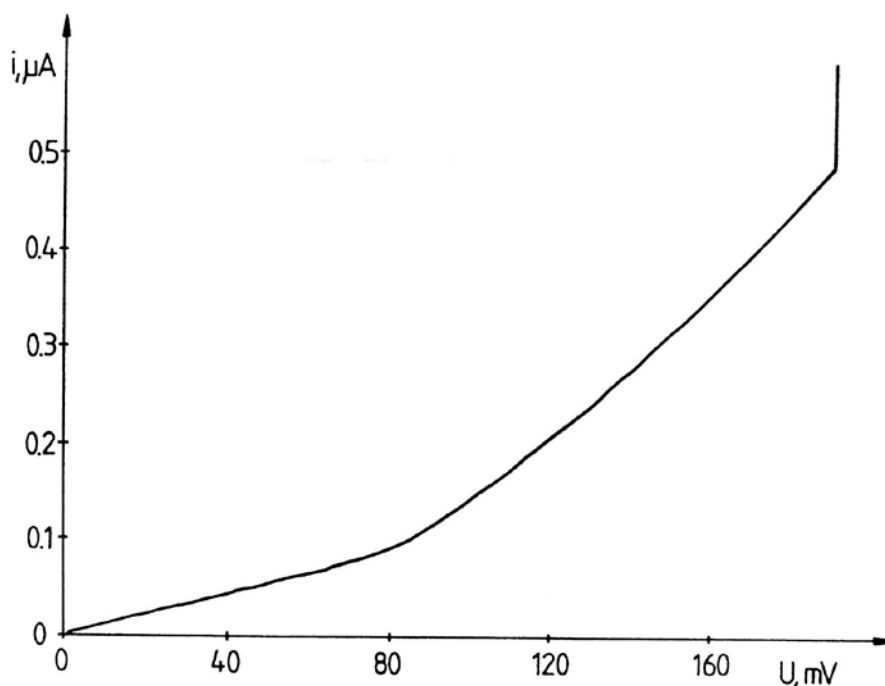
Skład roztworu formującego	Skład roztworu elektrolitu	Napięcie przebicia [mV]
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	194 ± 27
fosfatydylocholina-cholesterol 4:1 w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	241 ± 43
fosfatydylocholina-cholesterol 7:3 w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	225 ± 31
azolektyna w dekanie 20mg/ml	KCl 0.1M	209 ± 25
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M promazyna 10 ⁻⁴ M	141 ± 25
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M promazyna 2·10 ⁻⁴ M	107 ± 36
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M promazyna 5·10 ⁻⁴ M	103 ± 28
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M chloropromazyna 10 ⁻⁴ M	109 ± 28
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M chloropromazyna 2·10 ⁻⁴ M	113 ± 17
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M tiorydazyna 10 ⁻⁴ M	115 ± 28

13.7. Rezystancja membran

Przy badaniach pojemności membran, szczególnie membran z potencjałem polaryzującym dochodzącym do ponad 200 mV ważna jest rezystancja membran. Nie może ona przyjmować zbyt małych wartości ze względu na możliwość powstawania błędów w pomiarach pojemności.

Rezystancja membran wyznaczana była na podstawie krzywych chronowoltamperometrycznych. Zależność prądu płynącego przez membrany od przyłożonego potencjału dla początkowej części krzywej jest liniowa (Rys. 13.10). Rezystancję wyznaczano na podstawie nachylenia krzywej metodą najmniejszych kwadratów w zakresie od 0 do 100 mV. W niektórych układach występują jednak odchylenia liniowości krzywych chronowoltamperometrycznych (Rys. 13.11). Dla

membran formowanych w obecności gramicydyny D rezystancja wyznaczana była dla zakresu 0 - 75 mV. Wyniki przedstawione są w tabeli 13.6.



Rys. 13.11. Krzywa chronovoltamperometryczna dla membrany w obecności gramicydyny. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w n-dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, $33 \cdot 10^{-6}$ M gramicydyna D. Szybkość polaryzacji 10 mV/s. Temperatura 24 °C. Otwór 1 mm.

Jako membrany wzorcowe można potraktować membrany tworzone z fosfatydylocholino w obecności 0.1M KCl. Spośród danych prezentowanych w tabeli 13.6 uwagę zwracają dane dla membran tworzonych w obecności KJ i gramicydyny D, których rezystancje są wielokrotnie mniejsze niż dla pozostałych układów.

Pochodne fenotiazyny także mają wpływ na rezystancję membran - co najmniej kilkakrotnie ją zmniejszają. Przedstawione pomiary nie pozwalają jednak na stwierdzenie, czy spowodowane jest to przenoszeniem ładunków elektrycznych przez membranę przez dyfundujące jony fenotiazyn (są one słabymi zasadami), czy naruszeniem struktury membran.

Z drugiej strony, uwagę zwraca kilkakrotnie większa rezystancja membran formowanych z azolektyny. Również membrany zawierające cholesterol posiadają rezystancję nieco wyższą, niż membrany tworzone z samej fosfatydylocholino. Cholesterol powoduje gęstsze upakowanie wewnątrz części hydrofobowej

membrany, a jednocześnie zapewnia dużą płynność centralnej części membrany [16,17,231]. Grupa -OH cholesterolu tworzy wiązania wodorowe z grupami >CO wiązań estrowych fosfolipidów. Właściwość ta jest sprzyjająca w zmniejszaniu przepuszczalności membran, objawiająca się wzrostem ich rezystancji.

Tab. 13.6. Rezystancja membran. Dla każdego składu wykonano pomiary dla 6-16 membran.

Skład roztworu formującego	Skład roztworu elektrolitu	Rezystancja [MΩ·cm ²]
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M	16.4 ± 6.5
fosfatydylocholina 10 mg/ml dekan-butanol 3:2	KCl 0.1M	9.7 ± 3.1
fosfatydylocholina 10 mg/ml dekan-butanol 3:2	KBr 0.1M	3.4 ± 1.1
fosfatydylocholina 10 mg/ml dekan-butanol 3:2	KJ 0.1M	0.017 ± 0.006
fosfatydylocholina- cholesterol 4:1 20 mg/ml w dekanie	KCl 0.1M	47.4 ± 22.4
fosfatydylocholina- cholesterol 7:3 20 mg/ml w dekanie	KCl 0.1M	28.5 ± 8.0
azolektyna 20 mg/ml dekanie	KCl 0.1M	138 ± 38
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M promazyna 10 ⁻⁴ M	3.5 ± 0.9
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M promazyna 5·10 ⁻⁴ M	2.5 ± 0.4
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M chloropromazyna 10 ⁻⁴ M	1.5 ± 0.2
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M chloropromazyna 2·10 ⁻⁴ M	1.1 ± 0.2
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M tiorydazyna 10 ⁻⁴ M	2.3 ± 0.5
fosfatydylocholina 20 mg/ml dekan	KCl 0.1M gramicydyna 33·10 ⁻⁶ M	0.014 ± 0.006

13.8. Podsumowanie rozdziału

Proces formowania się dwuwarstwowych membran lipidowych, tak powszechnie wykorzystywany podczas badań zjawisk membranowych, jest

traktowany jako mało interesujący etap badań. Lepsze zrozumienie tego etapu pozwala jednak na głębsze spojrzenie na zjawiska membranowe, gdzie właściwości dwuwarstwy w dużym stopniu uzależnione są od jego przebiegu. Również obecność obrzeża Plateau-Gibbsa o masie o kilka rzędów wielkości większej od masy dwuwarstwy, pozostającego w równowadze z membraną, w znacznym stopniu decyduje o jej właściwościach. Obserwacje dokonane podczas badań pojemności formujących się membran zostały zebrane w trzech podrozdziałach.

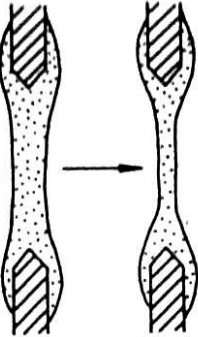
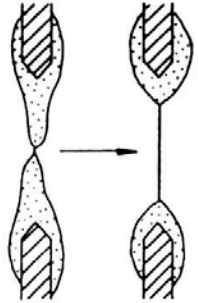
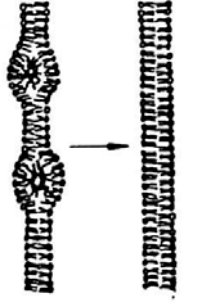
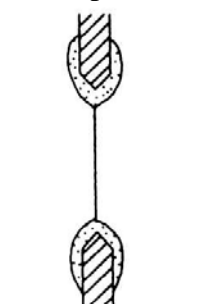
Przy badaniach sztucznych membran lipidowych dużą trudność sprawia wypracowanie metodyki tworzenia membran. Na proces formowania membran wpływa geometria otworu, w którym tworzona jest membrana, sposób umieszczania kropli roztworu formującego w otworze, ilość tego roztworu. Bardzo ważnym elementem decydującym o parametrach uzyskiwanych membran jest czystość naczyń i roztworów. Zdarza się, że rezystancje kolejno tworzonych membran mogą różnić się między sobą nawet 10-100 razy. Przyczyną takiej sytuacji mogły być zanieczyszczenia dostające się do roztworów np. z kurzu. Cząstki wbudowujące się w membranę mogą przewodzić prąd elektryczny lub tworzyć w membranie defekty umożliwiające przepływ jonów. Stosowane roztwory wodne musiały być przechowywane w lodówce, aby nie dopuścić do rozwoju w nich mikroorganizmów. Sposób mycia naczyń i stosowane do tego środki również wpływają na uzyskiwane wyniki. Użycie niektórych powszechnie stosowanych środków myjących może spowodować wielokrotne zmniejszenie rezystancji membran.

13.8.1. Proces tworzenia się dwuwarstwowych membran lipidowych

Na początku rozdziału przedstawiony został typowy przebieg pojemności podczas tworzenia się dwuwarstwy (Rys. 13.1). Wyróżnione zostały cztery etapy A-D podczas procesu formowania dwuwarstwy. Podczas każdego z tych etapów zachodzą charakterystyczne dla niego zjawiska fizykochemiczne. Zostały one opisane w tabeli 13.6.

Skład roztworu formującego i roztworu wodnego decyduje o przebiegu poszczególnych etapów. W pracy nie badano temperaturowych zależności. Pomiary wykonywane były w temperaturze pokojowej. Przy stosowaniu naturalnych lipidów, które są mieszaniną cząsteczek o łańcuchach węglowych o różnej długości i zawartości wiązań podwójnych brak jest wyraźnych przejść fazowych. W tej sytuacji dokładna stabilizacja temperatury nie była konieczna.

Tab. 13.6. Opis procesu formowania membran.

Etap	Opis
<p data-bbox="411 443 501 477">Etap A</p> 	<p data-bbox="639 450 1367 667">Po umieszczeniu kropli roztworu formującego w otworze pojemność membrany jest niewielka i powoli wzrasta. Roztwór formujący z wnętrza membrany przemieszcza się do obrzeża - grubość membrany zmniejsza się. Część rozpuszczalnika i lipidów rozpuszcza się w fazie wodnej.</p>
<p data-bbox="411 864 501 898">Etap B</p> 	<p data-bbox="639 871 1367 1122">Lipidy z przeciwległych monowarstw zbliżają się do siebie i tworzą dwuwarstwę, która szybko powiększa swoje pole powierzchni. Pojemność membrany szybko wzrasta. Obrzeża zaczyna przyjmować kształt torusa. Napięcie powierzchniowe obrzeża powoduje dążenie do zmniejszenia jego pola powierzchni - roztwór formujący wysysany jest z pomiędzy monowarstw.</p>
<p data-bbox="411 1249 501 1283">Etap C</p> 	<p data-bbox="639 1256 1367 1473">Pomiędzy monowarstwami pozostaje jeszcze rozpuszczalnik i micide utworzone z cząsteczek lipidów. Micide powoli ulegają rozpadowi i wbudowaniu w monowarstwy. Ustala się równowaga rozkładu wszystkich składników pomiędzy obrzeżem, roztworem wodnym i dwuwarstwą.</p>
<p data-bbox="411 1635 501 1668">Etap D</p> 	<p data-bbox="639 1641 1367 1821">Równowaga pomiędzy poszczególnymi składnikami układu jest ustalona. Przy braku czynników zakłócających równowagę pojemność membrany, a tym samym pole powierzchni dwuwarstwy i grubość membrany są stabilne.</p>

Substancje wykorzystywane w badaniach powodowały różnego rodzaju oddziaływania z membraną. Z charakterystycznych efektów należy wymienić wpływ alkoholi na przebieg procesu formowania i stabilność uzyskanych membran. Powodowały one znaczne skrócenie etapu rozrastania się powierzchni dwuwarstwy, a także w wielu przypadkach skrócenie etapu C niemal do zera.

13.8.2. Rola obrzeża w procesie formowania membran

Warunkiem tworzenia się i stabilności membran jest obrzeże dobrze zwilżające przegrodę. Stanowi ono element przejściowy pomiędzy przegrodą a dwuwarstwą. Jego elastyczność zapewnia stałe napinanie membrany i w miarę potrzeby umożliwia wzrost pola powierzchni dwuwarstwy, np. w wyniku odkształceń mechanicznych dwuwarstwy. Obrzeże, wskutek istnienia napięcia powierzchniowego, dąży do minimalizacji pola swojej powierzchni. Powoduje przy tym wysysanie roztworu formującego z wnętrza membrany. W stanie równowagi, gdy membrana jest uformowana, potencjały chemiczne poszczególnych składników układu wewnątrz dwuwarstwy i obrzeża są sobie równe. Grubość membrany, a tym samym jej pojemność specyficzna jest funkcją równowagi termodynamicznej pomiędzy obrzeżem a dwuwarstwą.

Oddziaływania hydrofobowe mogą być czynnikiem stabilizującym membrany. Obecność alkoholu w roztworze formującym poprawia stabilność membran. Dzięki istnieniu polarnej grupy -OH w cząsteczce alkoholu, cząsteczki roztworu formującego wymagają większej energii, aby przepłynąć z obrzeża do wnętrza membrany, pomiędzy monowarstwy. Jeżeli jako rozpuszczalnik stosuje się lekkie węglowodory, łatwo one wchodzi pomiędzy monowarstwy ze względu na podobieństwo oddziaływań pomiędzy łańcuchami węglowymi lipidów a oddziaływań łańcuchów z cząsteczkami węglowodorów.

Pochodne fenotiazyny, zakłócające przebieg procesu formowania się dwuwarstwy, z jednej strony zmieniają właściwości dwuwarstwy, z drugiej oddziałują na obrzeże. Podczas obserwacji membrany w świetle przechodzącym można zauważyć, że w stosunku do membran formowanych bez obecności pochodnych fenotiazyny, obserwowane połączenie dwuwarstwy z obrzeżem jest mniej ostre i mniej kontrastowe. Wskazuje to na zmniejszenie kąta kontaktu membrany z obrzeżem α , który jest funkcją napięcia powierzchniowego obrzeża. Zmniejszenie napięcia powierzchniowego objawia się również obecnością smug roztworu formującego w obszarze dwuwarstwy (Rys. 13.2, E) - mniejsza jest siła wysysająca nadmiar rozpuszczalnika z wnętrza membrany.

13.8.3. Dobór składu roztworu formującego i elektrolitu

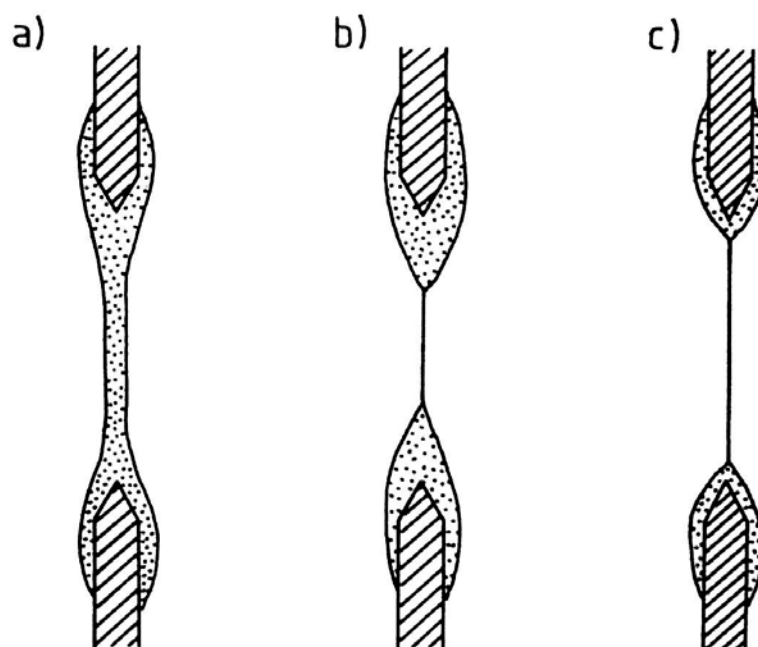
Wyniki badań procesu formowania pozwalają określić skład membran i roztworów, przy których możliwe jest uzyskanie korzystniejszych parametrów membran. Obserwacje dotyczące stabilności membran można zebrać w kilku punktach:

1. Spośród wykorzystywanych węglowodorów do tworzenia membran najbardziej odpowiedni jest dekan. Daje membrany o względnie dobrej stabilności i trwałości. Układ badany jest stosunkowo prosty, brak jest składników dodatkowo komplikujących układ.
2. Dodatek alkoholu powoduje zmiany procesu formowania dwuwarstw polegające na skróceniu etapów A-C. Szczególnie etap B jest zmieniony - wzrost pojemności jest bardzo szybki i niemal prostoliniowy. Dla wielu membran formowanych o obecności alkoholu etap C zanika. Równowaga ustala się niemal natychmiast po zakończeniu etapu B. Pojemność membran po uformowaniu jest bardzo stabilna. Dodatek alkoholu wpływa korzystnie na przebieg procesu formowania. Powoduje on jednak komplikację badanego układu, gdyż zwiększa się liczba składników membrany. Ilość alkoholu pozostającego w membranie jest nieokreślona, a także nieznanym jest sposób jego rozmieszczenia w membranie. Stężenie alkoholu wewnątrz membrany i wewnątrz obrzeża mogą być różne. Obecność alkoholu wewnątrz membrany może być nieistotna, gdy membrany wykorzystywane są do tworzenia czujników. Ważna jest w tym wypadku stabilność membrany i jej reakcja na określone czynniki zewnętrzne.
3. Bardziej stabilne membrany uzyskuje się stosując mieszaniny lipidów. Najmniej stabilne membrany uzyskuje się stosując fosfatydylocholinę o dużej czystości (99%). Fosfatydylocholina o czystości 60% tworzy membrany bardziej stabilne. Dodatek cholesterolu powoduje zwiększenie stabilności i powtarzalności membran. Wydłuża się jednak czas tworzenia membran. Trwałe i stabilne membrany uzyskuje się z azolektyny z soi, która jest mieszaniną fosfatydylocholiny, kefalin, inozytolu i innych lipidów.
4. Rodzaj i stężenie elektrolitu podstawowego nie zmienia w istotny sposób procesu formowania membran. Na proces formowania membran wpływają jednak substancje zdolne do wnikania do wnętrza membrany i zmieniające płynność membran (pochodne fenotiazyny). Powodują one zmniejszenie odporności membran na przebicie elektryczne i zmniejszają rezystancję membran.
5. Jony jodkowe pomimo wnikania do wnętrza membrany nie powodują zmian w przebiegu procesu formowania membran i ich stabilności. Powodują jednak tak

znaczące zmniejszenie rezystancji membran, że pomiary ich pojemności przy narzuconym potencjale polaryzującym są obciążone zbyt dużym błędem.

14. Wpływ wielkości obrzeża na pojemność specyficzną membran

Pojemność specyficzną membran jest jednym z najlepiej odtwarzalnych parametrów fizykochemicznych membran. Jednak mimo to wartości pojemności specyficznej podawane przez wielu autorów dla tych samych układów przyjmują wartości różniące się o kilkadziesiąt procent. W rozdziale 6 przedstawione zostały opisane w literaturze czynniki wpływające na pojemność specyficzną membran lipidowych. Wyniki przedstawione w tym rozdziale wskazują kolejny czynnik, od którego zależy pojemność specyficzną dwuwarstwowych membran lipidowych.



Rys. 14.1. Przekrój przez przegrodę z membraną lipidową. a) gruba membrana, bezpośrednio po umieszczeniu kropli roztworu formującego w otworze, b) membrana o małym polu powierzchni dwuwarstwy i dużym obrzeżu, c) dwuwarstwa lipidowa otoczona obrzeżem o małej objętości.

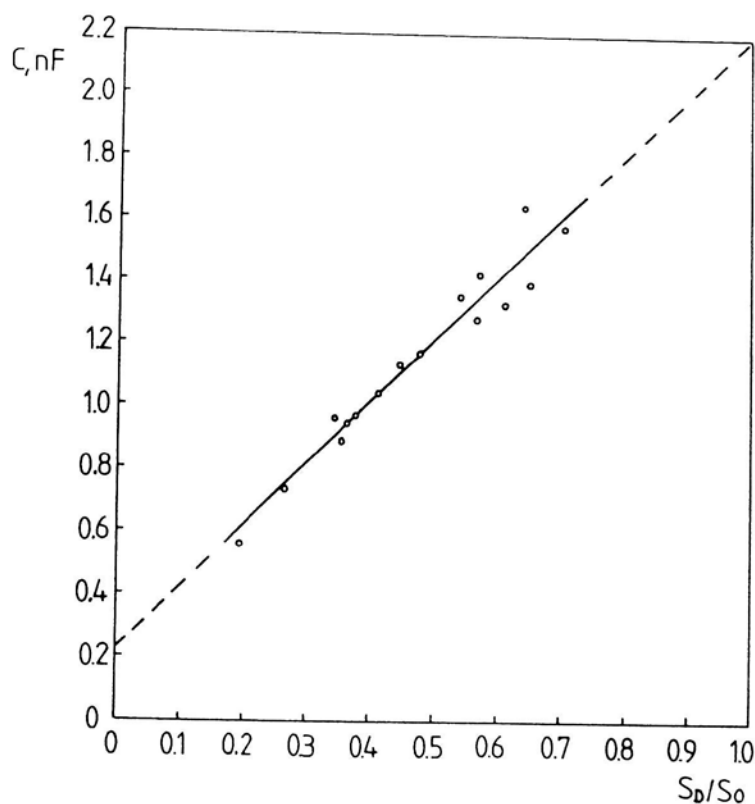
Po umieszczeniu kropli roztworu formującego w otworze, początkowa pojemność grubej membrany wynosi kilka do kilkunastu pikofaradów (Rys. 14.1a).

Grubość takiej membrany jest rzędu mikrometrów, jest więc o trzy rzędy wielkości większa od grubości dwuwarstwy [1,35,167]. Utworzenie się dwuwarstwy powoduje powstanie dwóch faz - obrzeża Plateau-Gibbsa i dwuwarstwy (Rys. 14,1b,c). W zależności od ilości roztworu formującego znajdującego się w otworze i powlekającego przegrodę można uzyskać membrany różniące się między sobą wielkością obrzeża otaczającego dwuwarstwę i polem powierzchni dwuwarstwy.

Całkowita pojemność membrany znajdującej się w otworze równa jest sumie pojemności dwuwarstwy i pojemności obrzeża:

$$C = C_M \cdot S_D + C_B \cdot S_B \quad (14.1)$$

gdzie: C_M - pojemność specyficzna membrany
 S_D - pole powierzchni dwuwarstwy
 C_B - pojemność specyficzna obrzeża
 S_B - pole powierzchni obrzeża



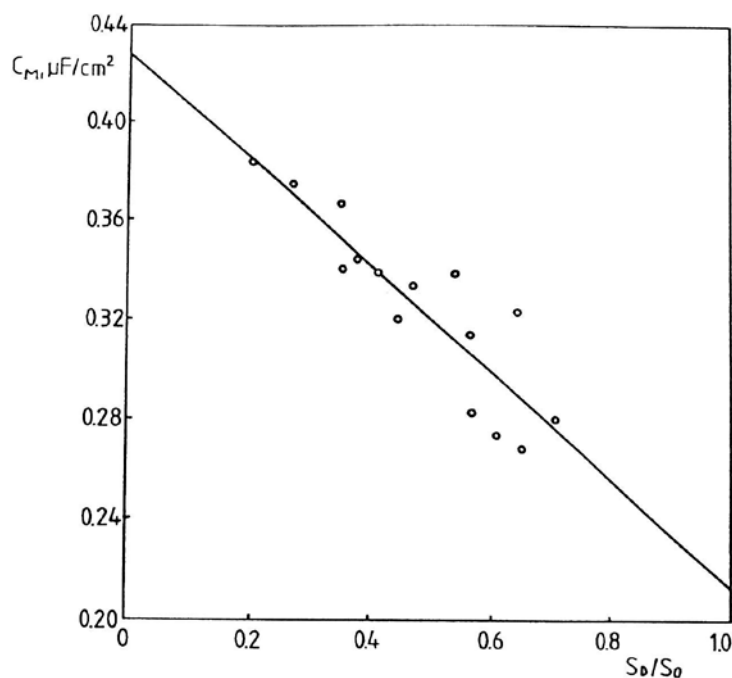
Rys. 14.2. Zależność pojemności membrany od stosunku pola powierzchni dwuwarstwy do pola powierzchni otworu S_D/S_0 . Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl. Temperatura pomiarów $25 \pm 1^\circ C$. Średnica otworu: 1mm.

Pojemność specyficzna obrzeża C_B z uwagi na jego geometrię i grubość [1,35,167] jest co najmniej kilkaset razy mniejsza od pojemności specyficznej dwuwarstwy. Z niewielkim błędem można więc przyjąć, że pojemność dwuwarstwy równa jest całkowitej pojemności membrany. Przy stałej wartości pojemności specyficznej membrany C_M można oczekiwać liniowej zależności pomiędzy polem powierzchni dwuwarstwy a całkowitą pojemnością membrany. Wykres taki przedstawiony jest na rysunku 14.2. Na wykresie na osi x podane jest względne pole powierzchni dwuwarstwy S_D/S_O - stosunek pola powierzchni dwuwarstwy do pola powierzchni otworu. Można oczekiwać, że ekstrapolacja do zerowej wartości pola powierzchni dwuwarstwy da wartość pojemności zbliżoną do pojemności grubej membrany, t.j. kilka do kilkunastu pikofaradów.

Przy pomocy metody najmniejszych kwadratów obliczono współczynniki równania opisującego prostą dopasowaną do punktów eksperymentalnych z rysunku 14.2. Dla zerowej wartości S_D/S_O obliczona pojemność równa jest 0.213 ± 0.060 nF. Jest to wartość ponad dziesięciokrotnie większa, niż ta, której można było oczekiwać. Analizując przyczyny takiej sytuacji, należy rozpatrywać następujące możliwości:

1. Pojemność specyficzna obrzeża posiada dużą wartość, około 1/10 pojemności specyficznej dwuwarstwy. W tej sytuacji obrzeże musiałoby mieć średnią grubość około dziesięciokrotnie większą od grubości membrany t.j. kilkadziesiąt nanometrów. Mniejsze wartości kąta kontaktu obrzeża z dwuwarstwą dawałyby mniejszą średnią grubość obrzeża, a przy tym większą jego pojemność. Minimalny zaobserwowany kąt kontaktu obrzeża z dwuwarstwą (Rys. 15.5) wynosi $1^\circ 53'$, jednak typowe wartości kąta kontaktu wynoszą $20-30^\circ$ [220]. Średnia grubość obrzeża dla najmniejszej wartości kąta kontaktu wynosiłaby kilkanaście mikrometrów, co by dało pojemność obrzeża rzędu kilku pikofaradów. W tej sytuacji należy wykluczyć możliwość istnienia obrzeża o dużej pojemności specyficznej, w istotny sposób wpływającej na całkowitą pojemność membrany.
2. Pojemność specyficzna dwuwarstwy C_M nie jest wartością stałą i zmienia się w zależności od wielkości obrzeża i dwuwarstwy. Należało więc sprawdzić, czy pojemność specyficzna dla wszystkich wykorzystanych do eksperymentu membran jest jednakowa. Wyznaczone wartości pojemności specyficznej w funkcji względnego pola powierzchni dwuwarstwy dla poszczególnych membran przedstawione zostały na rysunku 14.3. Pojemność specyficzna membran zmniejsza się przy wzroście pola powierzchni dwuwarstwy. Zależność ta może

tłumaczyć powstałe różnice pomiędzy wartością pojemności wynikającą z ekstrapolacji na rysunku 14.2 a wartością oczekiwaną.



Rys. 14.3. Wykres zależności pojemności specyficznej od względnego pola powierzchni dwuwarstwy. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Temperatura pomiarów $25 \pm 1^\circ C$. Średnica otworu: 1mm. Prosta dopasowana do punktów za pomocą metody najmniejszych kwadratów.

Do punktów przedstawionych na rysunku 14.3 została dopasowana prosta. Zastosowano metodę najmniejszych kwadratów. Współczynnik korelacji przyjął wartość 0.794. Wartość ta wskazuje na istnienie zależności pomiędzy pojemnością specyficzną a względnym polem powierzchni dwuwarstwy. Ekstrapolacja do wartości względnego pola powierzchni równego 0 i 100% daje wartości pojemności specyficznej 0.428 i 0.213 $\mu F/cm^2$. Różnice w uzyskanych pojemnościach specyficznych membran o różnym polu powierzchni są dość duże. Uzyskane wyniki wskazują na zależność grubości membrany od wielkości obrzeża. W wyniku zmiany wielkości obrzeża zmienia się stan równowagi dystrybucji rozpuszczalnika pomiędzy dwuwarstwą a obrzeżem, pole powierzchni dwuwarstwy i kąt kontaktu dwuwarstwy z obrzeżem α (Rys. 15.5, str 123). Analogiczne wyniki uzyskali Brullemans i Tancredi [183] dla membran tworzonych z monowarstw. W swoich badaniach geometrię obrzeża zmieniali stosując przegrody o różnej grubości. Dla grubszej przegrody uzyskiwali membrany o większej pojemności specyficznej.

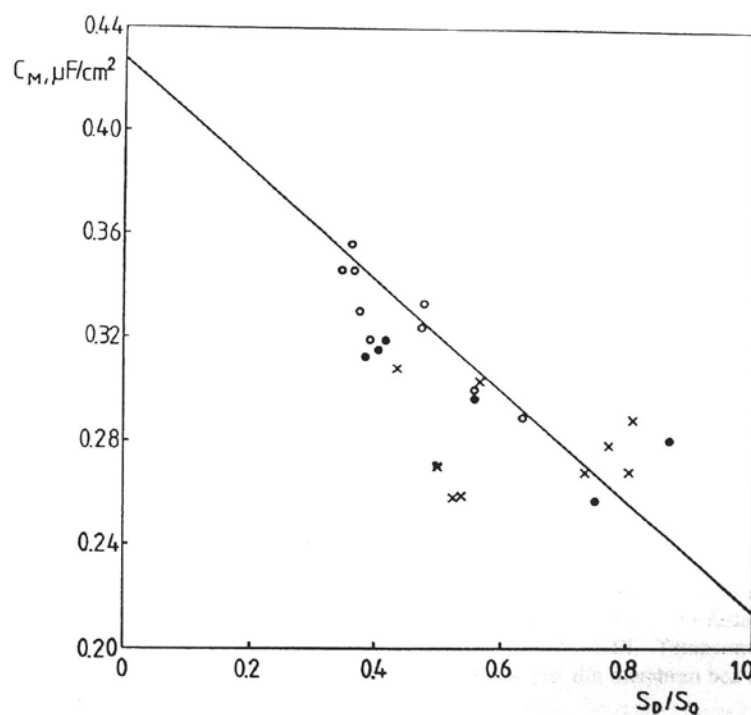
W tabeli 14.1 przedstawione są również wartości pojemności specyficznej dla membran formowanych w obecności pochodnych fenotiazyny i membran z dodatkiem cholesterolu. Na podstawie danych z tabeli można sądzić, że zarówno cholesterol, jak też pochodne fenotiazyny spowodowały zmniejszenie pojemności specyficznej membran. Jednak w porównaniu z membranami bez tych dodatków, zajmują one większe pole powierzchni. W tej sytuacji bardziej rozsądne wydaje się porównanie pojemności specyficznych membran przy uwzględnieniu pola powierzchni membran.

Tab. 14.1. Pojemność specyficzna membran i średnie względne pole powierzchni dwuwarstw lipidowych S_D/S_O . Dla każdego składu wykonano pomiary dla 6-16 membran.

Roztwór formujący	Skład roztworu elektrolitu	Pojemność specyficzna [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Względne pole powierzchni dwuwarstwy
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	0.327 ± 0.036	0.470 ± 0.148
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M promazyna 10^{-4}M	0.327 ± 0.022	0.444 ± 0.102
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M chloropromazyna 10^{-4}M	0.297 ± 0.024	0.557 ± 0.207
fosfatydylocholina w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M tiorydazyna 10^{-4}M	0.278 ± 0.019	0.630 ± 0.149
fosfatydylocholina-cholesterol 9:1 w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	0.308 ± 0.019	0.634 ± 0.121
fosfatydylocholina-cholesterol 4:1 w dekanie 20 mg/ml	KCl 0.1M	0.299 ± 0.020	0.758 ± 0.114

Pochodne fenotiazyny znane są jako środki miejscowo znieczulające. Z łatwością wnikają do wnętrza membran i zmieniają ich płynność [227-229]. Obecność atomów siarki, azotu i chloru w cząsteczkach pochodnych fenotiazyny powoduje zwiększenie ich przenikalności elektrycznej w stosunku do węglowodorów. Można więc oczekiwać, że cząsteczki fenotiazyn wnikające do wnętrza membrany będą zwiększać jej przenikalność elektryczną, a co za tym idzie, jej pojemność specyficzną. Eksperyment nie potwierdza tych przypuszczeń. Gdy w

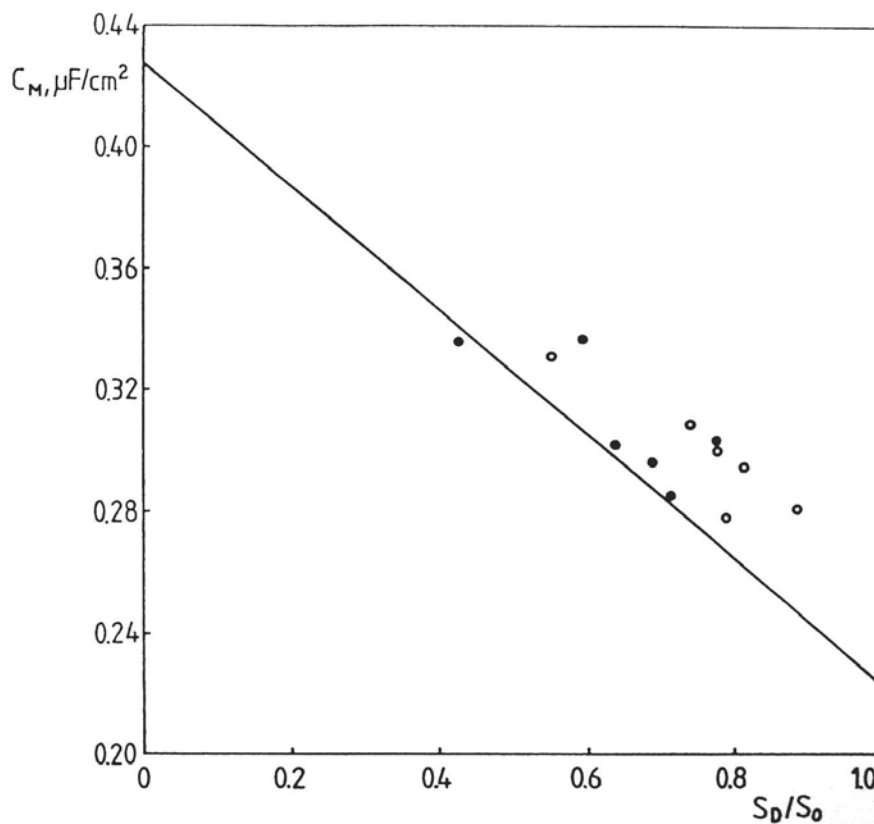
roztworze wodnym obecne są pochodne fenotiazyny, pojemność specyficzna membran jest mniejsza (Tab. 14.1). Gdy jednak punkty pomiarowe zostaną naniesione na wykres pojemności specyficznej w funkcji względnego pola powierzchni dwuwarstwy, nie odbiegają one w istotny sposób od prostej wyznaczonej bez obecności pochodnych fenotiazyny (Rys. 14.4). Rozrzut punktów jest jednak większy. Może to wynikać z większych błędów związanych z niejednorodnością dwuwarstwy. W obecności pochodnych fenotiazyny w dwuwarstwach występowały wtrącenia roztworu formującego w postaci wysepek i smug. Powodowało to zwiększenie błędów przy wyznaczaniu pola powierzchni dwuwarstwy, jak również zakłócało równowagę układu dwuwarstwa-obrzeże.



Rys. 14.4. Wykres zależności pojemności specyficznej od względnego pola powierzchni dwuwarstwy. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie, 20mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl z pochodnymi fenotiazyny o stężeniu $10^{-4}M$, o - promazyna, • - chloropromazyna, x - tiorydazyna. Temperatura pomiarów $25 \pm 1^\circ C$. Średnica otworu: 1mm. Narysowana prosta jest dla membran bez fenotiazyn (z rysunku 14.3).

Membrany formowane z mieszaniny fosfatydylocholiny z cholesterolem posiadają pojemność specyficzną niższą, niż membrany z samej fosfatydylocholiny (Tab. 14.1). Punkty pomiarowe umieszczone na wykresie na tle prostej otrzymanej dla samej fosfatydylocholiny leżą powyżej prostej (Rys. 14.5). Dla membran o tym

samym polu powierzchni pojemność specyficzna membran z cholesterolem przyjmuje wyższą wartość. Zmniejszenie pojemności specyficznej membran z dodatkiem cholesterolu jest więc tylko pozorne.



Rys. 14.5. Wykres zależności pojemności specyficznej od względnego pola powierzchni dwuwarstwy. Roztwór formujący: ◦ - fosfatydylocholina-cholesterol 4:1, • - fosfatydylocholina-cholesterol 9:1 w dekanie, 20mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Temperatura pomiarów $25 \pm 1^\circ C$. Średnica otworu: 1mm. Narysowana prosta jest dla membran bez cholesterolu (z rysunku 14.3).

Przy przedstawianiu wyników należało wybrać możliwie prosty parametr, liczbowo opisujący rozmiar dwuwarstwy i obrzeża. Wybrany został stosunek pomiędzy polem powierzchni dwuwarstwy a polem powierzchni otworu S_D/S_0 . Wyniki eksperymentów zaprezentowane w tym rozdziale wskazują na istnienie zależności pomiędzy wielkością obrzeża otaczającego dwuwarstwę a pojemnością specyficzną membrany. Wyniki te wskazują na konieczność uwzględniania wielkości dwuwarstwy przy badaniach, w których wykorzystuje się pomiary pojemności specyficznej membran i zmian tej pojemności.

Podczas tworzenia membran metodą Muellera-Rudina nie jest możliwe kontrolowanie wielkości i geometrii obrzeża. Część roztworu formującego natychmiast wypływa na powierzchnię roztworu wodnego, pozostała część rozplywa się po powierzchni przegrody. Resztki roztworu formującego pozostałe z wcześniej tworzonych membran również wpływają na ilość roztworu formującego otaczającego membranę.

Substancje obecne w roztworze formującym lub w roztworze wodnym zmieniają nie tylko właściwości samej membrany, ale także właściwości obrzeża Plateau-Gibbsa. Szczególnie ma to duże znaczenie w przypadku membran tworzonych metodą Muellera-Rudina. Wewnątrz membrany pozostaje pewna ilość rozpuszczalnika, powodując zwiększenie jej grubości. Ilość tego rozpuszczalnika zależy od równowagi, jaka ustali się pomiędzy membraną a obrzeżem. Zmiany napięcia powierzchniowego obrzeża powodują zmiany jego geometrii i zmiany siły wysysającej rozpuszczalnik z wnętrza membrany. Substancje mogące wnikać do wnętrza membrany i powodujące zmianę jej przenikalności elektrycznej mogą jednocześnie zmieniać właściwości obrzeża. W efekcie końcowym pojemność specyficzna może zmieniać się przeciwnie do spodziewanych zmian. Właściwości obrzeża pomijane są przez większość badaczy podczas interpretacji wyników. Jedynie niektórzy z nich podkreślają istotne znaczenie właściwości obrzeża i zmian jego parametrów [1,168,220,232].

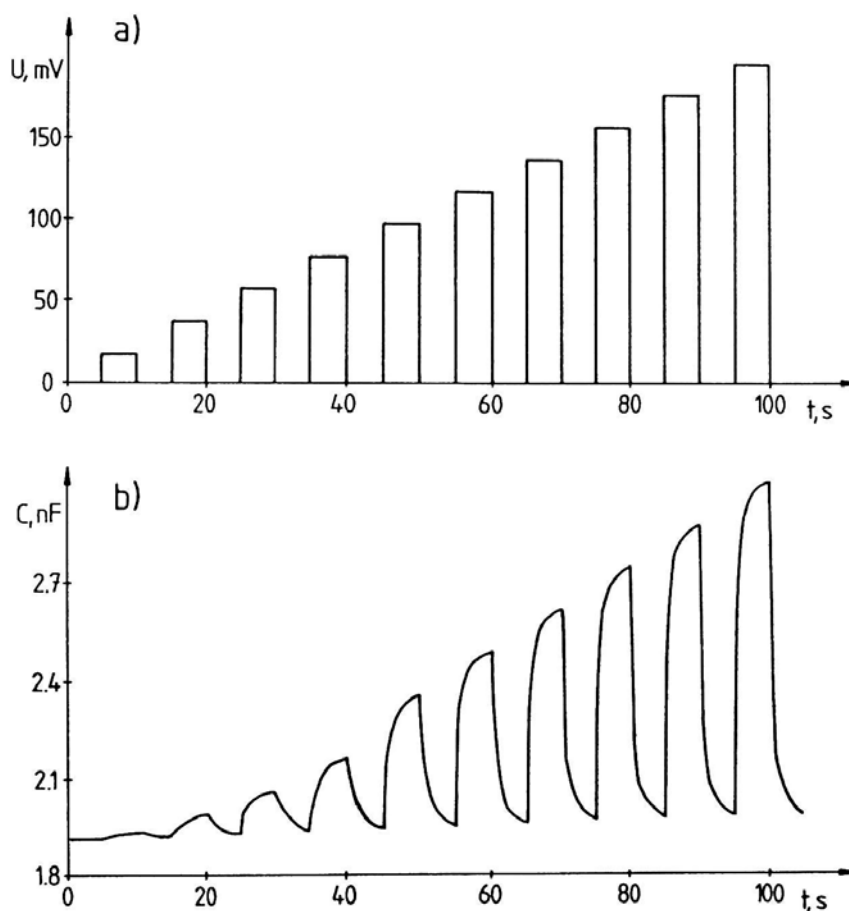
15. Badanie zmian pojemności pod wpływem potencjału polaryzującego

Wyniki badań zjawiska zmian pojemności pod wpływem potencjału przedstawione są w pracach wielu autorów [2,61,63,89,163,168,173-178]. Na podstawie analizy danych literaturowych nie udało się uzyskać precyzyjnych odpowiedzi na pytania:

- Czy tylko zjawisko elektrokompresji odpowiada za zmiany pojemności membran?
- Jakie są mechanizmy zmiany grubości membrany po przyłożeniu napięcia?
- Czy zmienia się przenikalność elektryczna membran po przyłożeniu napięcia?
- Jakie zmiany strukturalne zachodzą w warstwie hydrofobowej i hydrofilowej membrany po przyłożeniu napięcia?

Na podstawie ogólnego równania opisującego pojemność membrany (równanie 5.1) należy rozważyć zmianę trzech parametrów membrany: pola powierzchni dwuwarstwy, grubości i przenikalności elektrycznej membrany. Należy wziąć pod

uwagę, że pojemność membran zdeterminowana jest głównie przez pojemność warstwy hydrofobowej. Zmiany pojemności tej warstwy mogą być jednak tylko zmianami wtórnymi, mającymi swe źródło w zmianach parametrów warstw hydrofilowych i obrzeża. Przy badaniach zjawiska zmiany pojemności membran pod wpływem potencjału należy spodziewać się więc wielu równoległe zachodzących procesów.



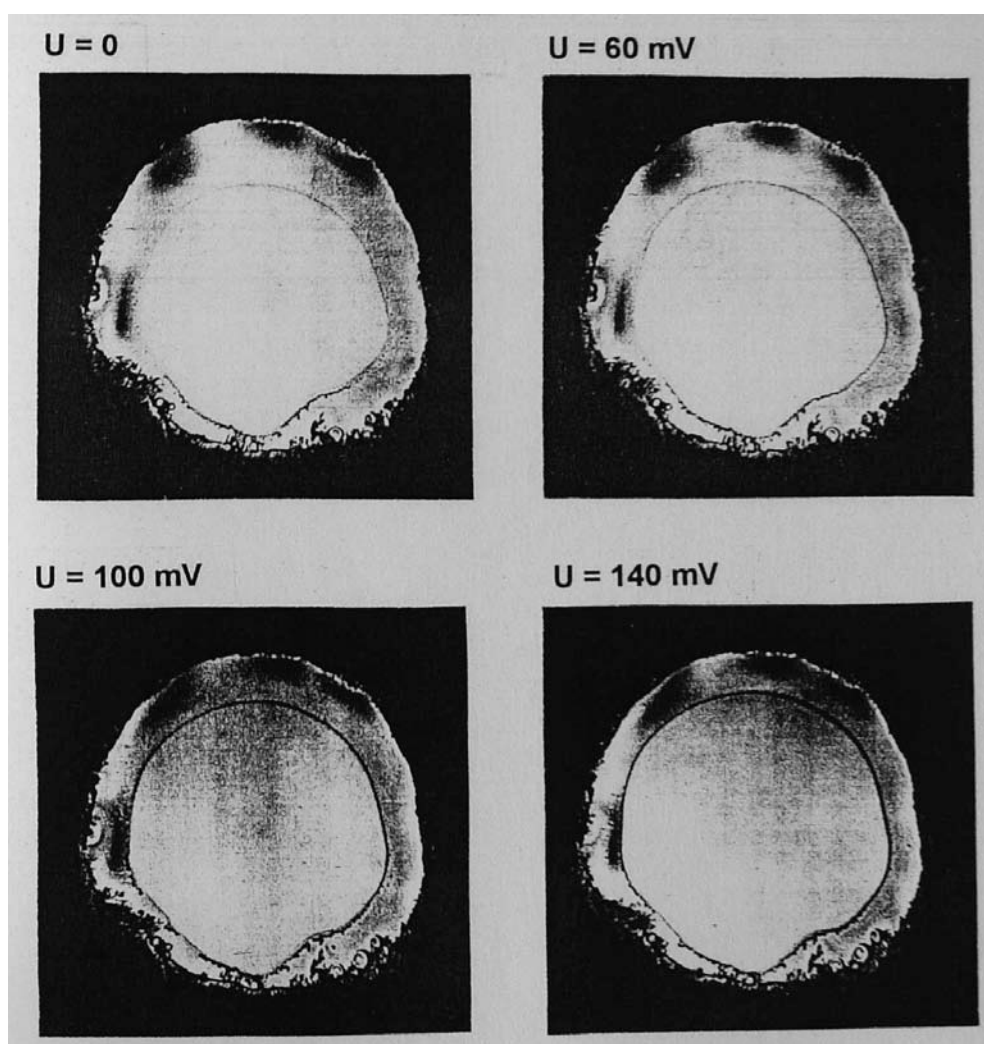
Rys. 15.1. Przebieg napięciowy (a) i pojemność membrany (b). Roztwór formujący: lecytyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

Wstępnych informacji o naturze zjawiska może dać pomiar pojemności membrany pobudzonej ciągiem prostokątnych impulsów elektrycznych (Rys. 15.1). Potencjał każdego kolejnego impulsu wyższy był od poprzedniego o 20 mV. Analiza przebiegu pojemności membrany z rysunku 15.1 pozwala na kilka wniosków:

- wzrost amplitudy potencjału powoduje wzrost pojemności,

- zmiany pojemności pod wpływem potencjału są odwracalne,
- zmiany pojemności po zmianie potencjału początkowo są szybkie, po czym następuje etap powolnego stabilizowania się pojemności.

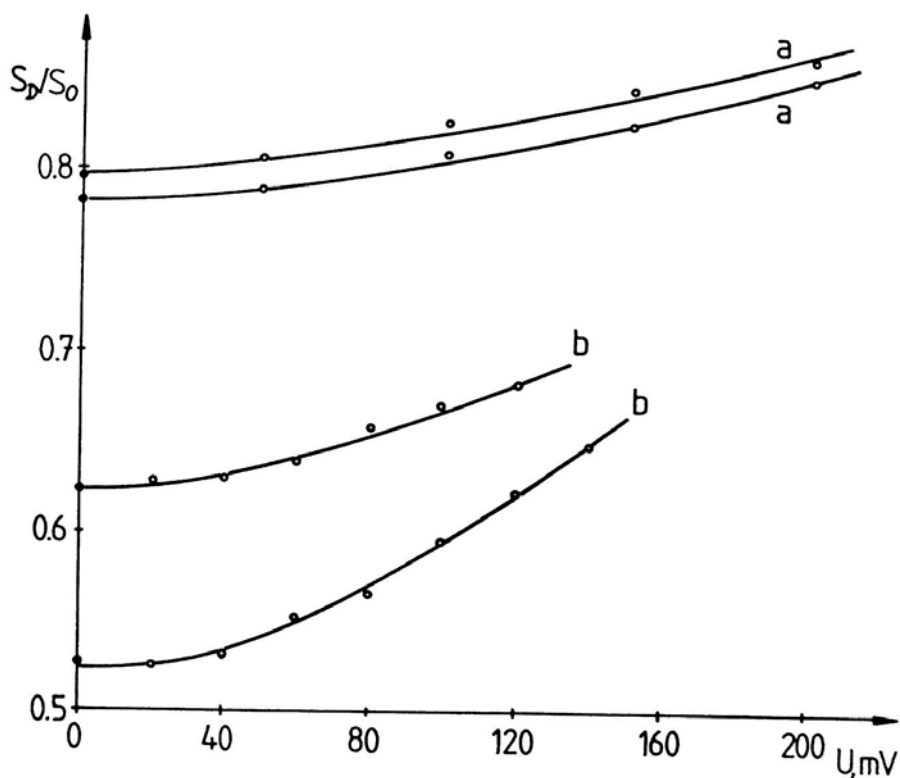
Obserwując membranę w świetle przechodzącym podczas jej polaryzowania można zauważyć, że w miarę wzrostu potencjału pole powierzchni dwuwarstwy powiększa się, a obrzeże kurczy. Krawędź rozdzielająca dwuwarstwę od obrzeża staje się wyraźniejsza (Rys. 15.2). Wizualna obserwacja membrany i pomiar jej pojemności wskazują na konieczność sprawdzenia, jak zmienia się pole powierzchni membrany w funkcji potencjału polaryzującego.



Rys. 15.2. Fotografie membrany przy różnych potencjałach. Przebieg napięciowy był podobny do przebiegu z rysunku 15.1, impulsy napięciowe i przerwy między nimi trwały po 10 s. Fotografie wykonane były po 9 s od przyłożeniu napięcia. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 23 °C.

15.1. Zmiany pola powierzchni dwuwarstwy

Na rysunku 15.3 przedstawione są wyniki pomiaru pola powierzchni membran przy różnych potencjałach. Na osi Y podane jest względne pole powierzchni dwuwarstwy t.j. stosunek pola powierzchni dwuwarstwy do pola powierzchni otworu (S_D/S_0), w którym membrana była tworzona. Dla membran tworzonych z tych samych składników początkowe pola powierzchni dwuwarstw poszczególnych membran różniły się między sobą. Przy wzroście potencjału różnice w polach powierzchni dwuwarstw zmniejszały się. W tabeli 15.1 przedstawione są wartości przyrostu pola powierzchni dwuwarstw w zależności od początkowego pola powierzchni.



Rys. 15.3. Zależność względnego pola powierzchni dwuwarstwy od potencjału przyłożonego do membrany. Roztwór formujący: a) lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie, 20 mg/ml, b) azolektyna w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl.

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że pole powierzchni dwuwarstw wzrasta przy polaryzacji membran. Zmiany są tym większe,

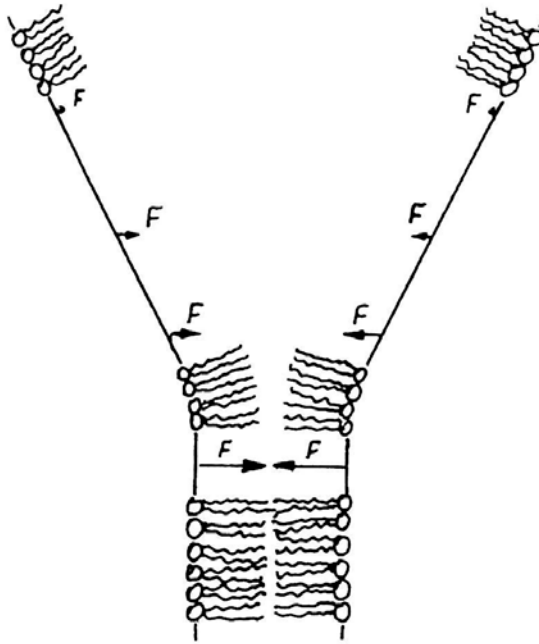
im mniejsze jest początkowe pole powierzchni dwuwarstwy (Tab. 15.1). Obserwowane zmiany pola powierzchni dwuwarstwy dochodziły do kilkunastu procent.

Tab. 15.1. Przyrost względnego pola powierzchni dwuwarstw lipidowych przy potencjale 100 mV.

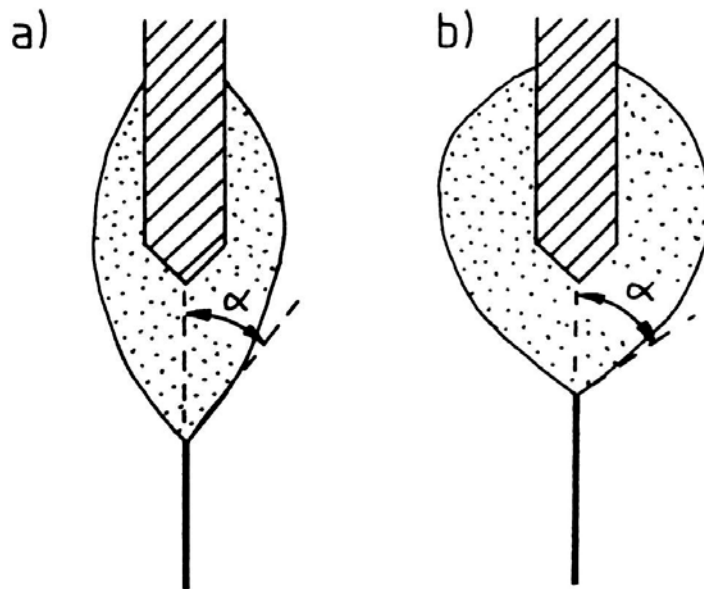
Roztwór formujący	Elektrolit	Początkowe pole pow. [%]	Przyrost pola pow. [%]
Lecytyna 20 mg/ml w dekanie	0.1M KCl	64.4	6.6
Lecytyna-cholesterol 7:3 20 mg/ml w dekanie	0.1M KCl	69.8	4.1
Lecytyna-cholesterol 7:3 20 mg/ml w dekanie	0.1M KCl	79.6	3.1
Azolektyna 20 mg/ml w dekanie	0.1M KCl	52.7	7.0
Azolektyna 20 mg/ml w dekanie	0.1M KCl	62.2	4.9

Przyrost pola powierzchni dwuwarstwy kosztem zmniejszania się rozmiarów obrzeża może być spowodowany dwoma czynnikami. Pierwszym z nich jest elektrokompresja, która powoduje ściskanie krawędzi obrzeża połączonej z dwuwarstwą i przejście jej w dwuwarstwę (Rys. 15.4). Drugim czynnikiem jest zmiana napięcia międzyfazowego na granicy obrzeże/roztwór wodny. Powstanie różnicy potencjałów pomiędzy roztworami wodnymi może powodować zwiększenie napięcia międzyfazowego, które powoduje dążenie do zmniejszania pola powierzchni granicy międzyfazowej. Związana jest z tym zmiana kształtu obrzeża (Rys. 15.5).

Strzałki na rysunku 15.4 przedstawiają graficznie siły elektrostatyczne pomiędzy powierzchniami membrany. Przy przejściu z dwuwarstwy w głąb obrzeża, siły elektrostatyczne szybko maleją, zgodnie z odwrotnością kwadratu odległości oddziałujących powierzchni. Posuwając się w głąb obrzeża, oddziaływania elektrostatyczne przeciwnych powierzchni przestają odgrywać rolę.



Rys. 15.4. Siły elektrostatyczne F działające w miejscu połączenia dwuwarstwy z obrzeżem.



Rys. 15.5. Zmiana kształtu obrzeża w wyniku polaryzowania membrany.

Mechanizm zmiany pola powierzchni dwuwarstwy można rozpatrywać na bazie dwóch wymienionych zjawisk. Jednak wkład każdego z tych zjawisk w badany efekt może być mniej lub bardziej znaczący. Przy próbie oszacowania tego można zwrócić uwagę na zjawisko opisywane przez White'a przy tworzeniu membrany z

użyciem skwalenu [62]. Proces rozpoczęcia tworzenia dwuwarstwy (etap B) można wywołać poprzez przyłożenie napięcia do membrany np. o wartości 100 mV. Często przyłożenie napięcia do membran ze skwalenem było konieczne, aby utworzenie dwuwarstwy było w ogóle możliwe.

Efekt ten również obserwowany był wielokrotnie podczas prowadzenia badań opisywanych w tej pracy. Podczas etapu A wystarczyło krótkie, kilkusekundowe przyłożenie napięcia, aby zapoczątkować proces powstawania dwuwarstwy. Czy siły elektrokompresji odgrywają rolę w tym efekcie? Można je oszacować korzystając z równania opisującego siły elektrostatycznego przyciągania się powierzchni membrany [63]:

$$F_E = \frac{\epsilon_0 \epsilon}{2d_m^2} U^2 \quad (15.1)$$

Na podstawie równania 15.1 otrzymuje się wartość siły działającą na jednostkę powierzchni, czyli ciśnienie. Obliczona wartość tego ciśnienia wynosi 0.07 atm dla membrany o pojemności specyficznej 0.524 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ i napięcia 100 mV przyłożonego do membrany [163]. Biorąc pod uwagę, że grubość membrany przed rozpoczęciem tworzenia dwuwarstwy jest rzędu mikrometrów, siła elektrokompresji jest 10^5 - 10^6 razy mniejsza, niż w przypadku dwuwarstw. Jest ona tak znikoma, że nie może być przyczyną takiego ściśnięcia membrany, którego efektem jest dwuwarstwa. W tej sytuacji pod uwagę brać można tylko zmiany napięcia powierzchniowego obrzeża, powodujące jego kurczenie się i wyciąganie rozpuszczalnika z wnętrza membrany.

Analogicznego zjawiska można oczekiwać również w przypadku dwuwarstwowej membrany. Przyłożenie napięcia do elektrod powoduje zwiększenie napięcia międzyfazowego obrzeża i jego kurczenie się. Efektem tego jest zmiana równowagi dystrybucji rozpuszczalnika pomiędzy obrzeżem i dwuwarstwą. Zwiększenie wyrazistości krawędzi dwuwarstwa/obrzeże związane jest ze wzrostem kąta kontaktu α . Krawędź obrzeża posiada właściwości pryzmatu i przy większym kącie kontaktu α światło jest bardziej załamywane. Wartości kąta α podawane w literaturze przyjmują szeroki zakres wartości od $1^\circ 53'$ do 80° [220]. Typowy zakres wartości kąta α jest jednak znacznie węższy 20 - 30° . Kąt kontaktu α jest określony przez różnicę w energii swobodnej pomiędzy obrzeżem a dwuwarstwą [1]:

$$\Delta F = 2\gamma(\cos\alpha - 1) \quad (15.2)$$

Przy analizach kształtu obrzeża i zakładana była stała wartość napięcia międzyfazowego γ . Na granicy dwóch elektrolitów niemieszających się zachodzą zjawiska elektrokapilarne, w wyniku zmian potencjału przyłożonego do elektrod znajdujących się w tych elektrolitach zmienia się napięcie międzyfazowe. W wyniku

adsorpcji fosfolipidów na granicy faz woda-nitrobenzen krzywa elektokapilarna staje się asymetryczna i następuje przesunięcie potencjału zerowego ładunku [233]. Zmiana potencjału o taką samą wartość od potencjału zerowego ładunku w kierunku wartości ujemnych i dodatnich powoduje niejednakowe zmiany napięcia międzyfazowego. Dla stężenia lipidów w nitrobenzenie $20\mu\text{M}$ napięcie międzyfazowe przy potencjale zerowego ładunku wynosi około 25.2 mN/m . Zmiana potencjału o 100 mV powoduje zmniejszenia napięcia międzyfazowego odpowiednio do 24.2 i 24.6 mN/m .

Analogicznych zjawisk należy oczekiwać w przypadku membran lipidowych, które można traktować jak dwie sprzężone ze sobą granice międzyfazowe. Przyłożenie napięcia do elektrod powoduje zróżnicowanie rozkładu potencjałów i powierzchniowej gęstości ładunku na obu granicach międzyfazowych: elektrolit 1 - obrzeże i obrzeże - elektrolit 2. Wynikiem tego może być niejednakowa zmiana napięć międzyfazowych po obu stronach obrzeża i membrany. W tej sytuacji można spodziewać się asymetrii kształtu obrzeża. Należy również brać pod uwagę możliwość wybrzuszenia się dwuwarstwy, które powodować może zwiększenie pola powierzchni dwuwarstwy. Dane literaturowe i przeprowadzone eksperymenty wykluczają wyraźną obecność tego efektu. W przypadku istnienia tego efektu, membrany zawierające wewnątrz rozpuszczalnik i wolne od rozpuszczalnika powinny w tym samym stopniu zmieniać swoją pojemność. Okazuje się, że dla membran wolnych od rozpuszczalnika zmiany pojemności są około 500 razy mniejsze [61].

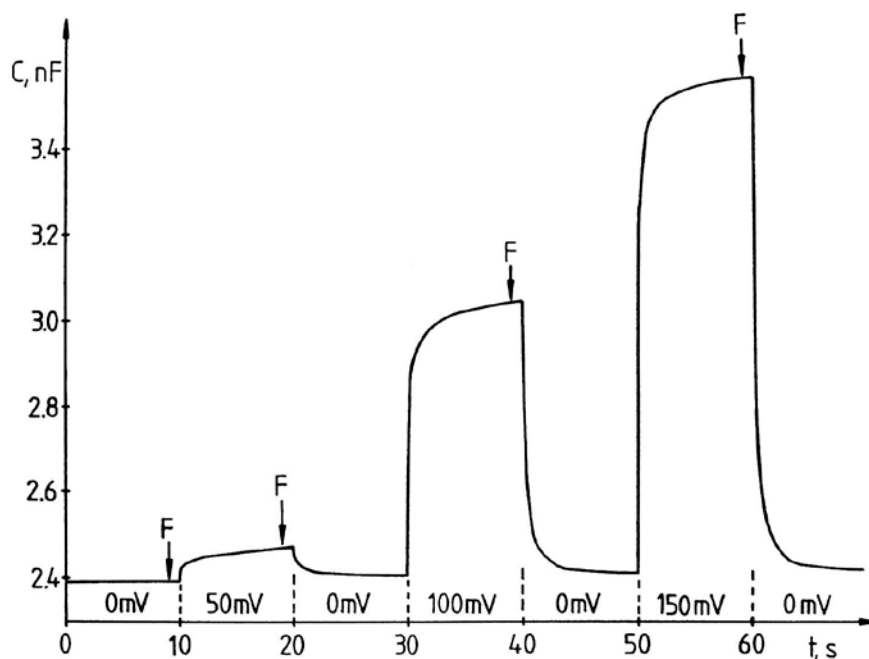
Przeprowadzono również dodatkowe eksperymenty, które wykluczyły możliwość istotnych zmian pojemności w wyniku wybrzuszenia się membrany pod wpływem napięcia. Po uformowaniu membrany przyłożony został do niej potencjał $+80\text{ mV}$. Przy napięciu równym 0 pojemność membrany wynosiła 2.500 nF , a przy $+80\text{ mV}$ wynosiła 2.893 nF . Pojemność wzrosła więc o 0.393 nF , t.j. o 15.7% . Gdyby efekt ten był spowodowany wybrzuszeniem się membrany, to dodatek elektrolitu do komory, w stronę której membrana jest wybrzuszona, powinien powodować zwiększenie ciśnienia po tej stronie. Wybrzuszenie powinno zmniejszać się, prowadząc do zmniejszenia pola powierzchni dwuwarstwy i zmniejszenia pojemności membrany. Dodatek $20\mu\text{l}$ roztworu do komory po stronie dodatniego potencjału powodował dalszy wzrost pojemności do około 3.18 nF , czyli o dodatkowe 0.29 nF . W przypadku dodania $20\mu\text{l}$ do komory po stronie potencjału ujemnego następował również taki sam wzrost pojemności. Nadmiar elektrolitu o $20\mu\text{l}$ po każdej ze stron membrany powodował jednakowy wzrost pojemności.

Eksperyment ten wykazuje, że membrana jest płaska przy przyłożonym do membrany potencjale $+80$ mV, że wzrost pojemności po przyłożeniu do membrany potencjału nie jest spowodowany wybrzuszeniem membrany. Przy nadmiarze roztworu $20 \mu\text{l}$ po jednej stronie membrany powstaje różnica w poziomach cieczy po obu stronach membrany równa 0.05 mm. Odpowiada to różnicy ciśnień $5 \cdot 10^{-6}$ atm.

15.2. Zmiany pojemności specyficznej membran

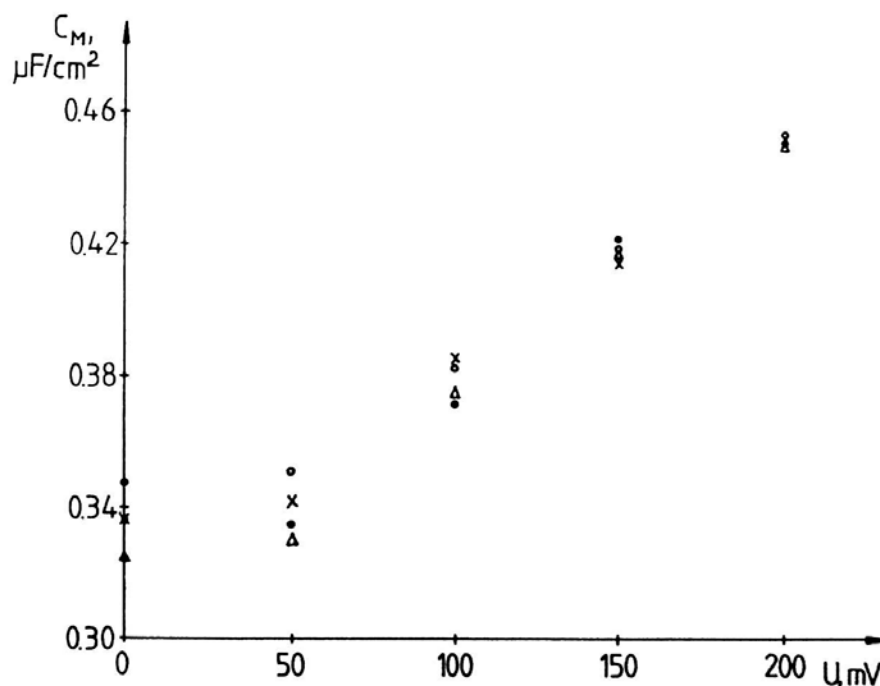
Jednym z czynników wpływających na zmiany pojemności pod wpływem polaryzacji membrany jest zmiana pola powierzchni dwuwarstwy. Kolejnym czynnikiem jest zmiana pojemności specyficznej membrany. W rozdziale tym przedstawione są wyniki i dyskusja pomiarów pojemności specyficznej membran.

Przy pomiarach tych stosowano impulsowe pobudzenie membrany. Do elektrod przykładane były prostokątne impulsy napięciowe o czasie trwania 10 s. Przebieg pojemności membrany podczas pomiaru przedstawiono na rys. 15.6. Fotografii membran wykonywane były po 9 s od chwili przyłożenia potencjału. W tym czasie zmiany pojemności były już niewielkie.



Rys. 15.6. Przebieg pojemności membrany podczas wyznaczenia pojemności specyficznej. Litera F oznacza punkt, w którym wykonywana była fotografia membrany. Roztwór formujący: lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 C.

Membrany tworzone z mieszaniny lecytyny z cholesterolem po uformowaniu miały pojemności specyficzne różniące się nieco między sobą i wynosiły od 0.326 do 0.347 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Zależność pojemności specyficznej od przyłożonego do elektrod potencjału przedstawiono na rysunku 15.7. Na wykres naniesione są punkty uzyskane dla czterech membran. W miarę wzrostu przyłożonego do elektrod potencjału pojemność membran wzrastała, a także zmniejszały się różnice pojemności specyficznej poszczególnych membran. Uzyskany wynik świadczy, że duży rozrzut wyznaczonej pojemności specyficznej dla membran tworzonych w tych samych warunkach spowodowany jest indywidualnymi różnicami pomiędzy poszczególnymi membranami. Różnice te zanikają w miarę wzrostu potencjału przykładanego do elektrod.



Rys. 15.7. Zależność pojemności specyficznej membran od potencjału polaryzującego. Roztwór formujący: lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

W tabeli 15.2 przedstawione są wyniki pomiaru pojemności specyficznej i grubości warstwy hydrofobowej membran. Przy obliczeniach założono, że przenikalność elektryczna warstwy hydrofobowej równa jest 2.2. Wartość ta jest nieco wyższa niż przenikalność czystych węglowodorów, ponieważ warstwa hydrofobowa zawiera wiązania podwójne oraz cząsteczki cholesterolu.

Tab. 15.2. Pojemność specyficzna membran C_M i grubość warstwy hydrofobowej d_h przy różnych wartościach potencjału polaryzującego U . W tabeli zawarte są średnie wyniki uzyskane dla 4 membran. Przy obliczeniach przyjęto współczynnik przenikalności elektrycznej warstwy hydrofobowej $\epsilon = 2.2$.

Roztwór formujący i elektrolit	U = 0 mV		U = 100 mV		U = 200 mV	
	C_M [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	d_h [nm]	C_M [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	d_h [nm]	C_M [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	d_h [nm]
lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie 20mg/ml, 0.1M KCl	0.334	5.8	0.377	5.2	0.453	4.3
azolektyna w dekanie 20 mg/ml, 0.1M KCl, 10mM HEPES	0.332	5.8	0.356	5.5		

Przyjmując, że membrany ulegają zjawisku elektrokompresji, można wyznaczyć dla nich parametr określający ich sprężystość - moduł Younga. Jest on definiowany jako stosunek napięcia do odkształcenia. Napięcie w tym wypadku oznacza siłę działającą na jednostkę powierzchni, natomiast odkształcenie podawane jest w jednostkach względnych. Im wyższa jest wartość modułu Younga, tym trudniej ciało ulega odkształceniu - jest bardziej sprężyste. Moduł sprężystości dla danego rodzaju materiału jest wartością stałą (prawo Hooke'a). Prawo to jest to spełnione dla wielu rodzajów odkształceń sprężystych np. ściskania, rozciągania, skręcania, zginania.

Dla membran lipidowych można określić siłę elektrokompresji działającą na jednostkę powierzchni (równanie 6.3). Po połączeniu z równaniem 6.4 uzyskuje się równanie opisujące elastyczność membran (moduł Younga):

$$Y_{BL} = \frac{\epsilon_0 \epsilon U^2 d_0}{2d_m (d_0 - d_m)} \quad (15.3)$$

Korzystając z równania 15.3, na podstawie danych z tabeli 15.2 wyliczone zostały wartości modułu Younga. Przy obliczeniach przyjęto współczynnik przenikalności elektrycznej $\epsilon = 2.2$. Dla membran z mieszaniny cholesterolu z lecytyną wartości modułu wynoszą $Y_{BL} = 3.48 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$ (przy potencjale 100 mV) i $8.14 \cdot 10^4 \text{ N/m}^2$ (przy potencjale 200 mV). Różnica jest ponad dwukrotna. Oznacza to, że w miarę zmniejszania się grubości, sprężystość membrany wzrasta, staje się ona bardziej odporna na odkształcenia. Moduł Younga dla membrany z azolektyny przy

napięciu 100 mV wynosi $6.22 \cdot 10^4$ N/m². Podane wartości są średnimi wartościami obliczonymi dla kilku membran przy danym potencjale.

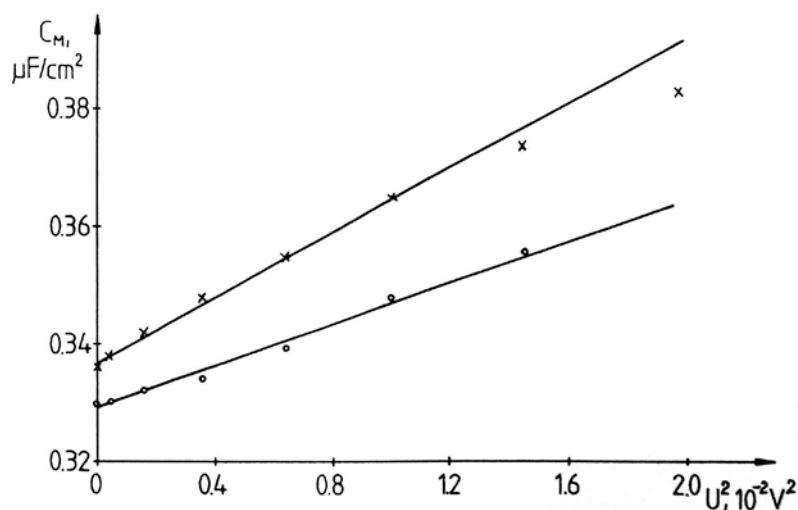
Moduł Younga można wyznaczyć również korzystając z parametru β , określającego podatność pojemności membran na zmiany wywołane przyłożonym potencjałem. Równanie opisujące moduł Younga uzyskuje się poprzez przekształcenie równania 6.9:

$$Y_{BL} = \frac{C_0^2}{2\beta d_0} \quad (15.4)$$

Parametr β można wyznaczyć z wykresu zależności pojemności specyficznej membrany od kwadratu przyłożonego potencjału. Parametr β równy jest nachyleniu prostej opisanej równaniem:

$$C_m = C_0 + \beta U^2 \quad (15.5)$$

Metoda ta z uwagi na uzyskiwanie średniej wartości modułu Younga dla kilku punktów pomiarowych wydaje się dokładniejsza od poprzedniej. Opisana metoda została wykorzystana do wyznaczenia modułu Younga dla membran z azolektyny. Wykres zależności pojemności specyficznej od kwadratu przyłożonego potencjału dla dwóch membran przedstawiony jest na rys. 15.8. Wartości parametru β dla tych membran są równe 2.85 i 1.80 $\mu\text{F}/\text{cm}^2\text{V}^2$. Wartości modułów Younga wynoszą odpowiednio $3.42 \cdot 10^4$ i $5.08 \cdot 10^4$ N/m². Różnica w sprężystości dla dwóch membran tworzonych w tych samych warunkach jest dość duża.



Rys. 15.8. Zależność pojemności specyficznej membran od kwadratu potencjału polaryzującego. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

Liniiowość przebiegu pojemności specyficznej w funkcji kwadratu przyłożonego potencjału jest spełniona jedynie do potencjałów 100 mV. Przy wyższych wartościach potencjałów są duże odchylenia, pojemności specyficzne są zaniżone. Obserwowane było to niemal dla wszystkich membran, formowanych z samej fosfatydylocholiny, mieszanin fosfatydylocholiny z cholesterolem, z azolektyny.

Rozważania sprężystości membran prowadzone były przy założeniu, że zachodzi tylko zjawisko elektrokompresji. Jednak wartości modułu Younga uzyskane dla jednej membrany przy potencjałach 100 i 200 mV różnią się ponad dwukrotnie między sobą. Również wartości modułu Younga uzyskane dla dwóch membran z azolektyny, tworzonych w tych samych warunkach, różnią się półtora raza między sobą. W tej sytuacji należy również brać pod uwagę możliwości zmiany napięcia międzyfazowego obrzeża, powodujące odstępstwa od prawa Hooke'a dla badanych układów.

Przyłożenie napięcia do membrany powoduje powstanie asymetryczności membrany. Analizując podwójną warstwę elektryczną należy brać pod uwagę nie tylko zjawiska zachodzące bezpośrednio na powierzchni membrany, ale również to, co zachodzi w głębi, co najmniej w części hydrofilowej monowarstwy lipidowej. Po przyłożeniu napięcia do elektrod, membrana i obrzeże będą fazami rozdzielającymi roztwory wodne. Rozkład potencjałów wewnątrz dwuwarstwy był badany przez wiele osób i jest już trochę poznany [8,92,179]. Obrzeże w takiej sytuacji należy traktować jako dwie połówki. Inny jest rozkład potencjałów w części obrzeża kontaktującej się z jednym roztworem wodnym, a inny w drugiej części. Skutkiem tego mogą być różnice w napięciach międzyfazowych obu połówek obrzeża.

Dotąd przedstawione wyniki są niewystarczające, aby oszacować udział każdego z efektów w zmianach pojemności membran i wyjaśnić mechanizm zjawiska. Przedstawione dane uzyskane były w warunkach statycznych, gdy parametry membrany były już w miarę stabilne. Można przeprowadzić analizę, jaka jest kinetyka obu zjawisk - elektrokompresji i zmian napięcia powierzchniowego.

15.3. Kinetyka zmian pojemności

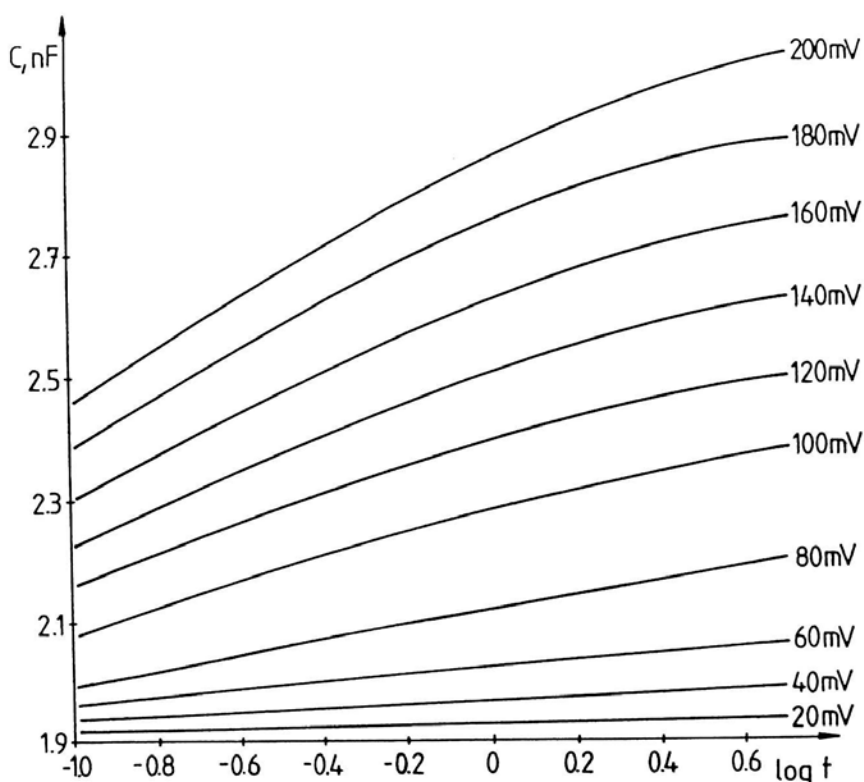
Przy zmniejszeniu grubości membrany pod wpływem potencjału o 1 nm z hydrofobowego wnętrza membrany jest usuwane ok. $0.35 \cdot 10^{-15}$ g rozpuszczalnika (przy polu powierzchni dwuwarstwy 0.5 mm^2). Masa obrzeża przy tym jest rzędu $1 \cdot 10^{-3}$ g.

Rozpatrując jedynie elektrokompresję, po przyłożeniu potencjału (np. 150 mV) ciśnienie elektrostatyczne (ok. 0.1 atm) musi przemieścić $0.35 \cdot 10^{-15}$ g rozpuszczalnika poza obszar dwuwarstwy. Muszą zostać pokonane siły lepkości i bezwładność rozpuszczalnika znajdującego się wewnątrz dwuwarstwy. Przy tym nastąpi zmiana objętości obrzeża, a co za tym idzie, musi być wykonana praca związana ze zmianą pola powierzchni. Jest to jednak tak mała wartość, że można ją całkowicie pominąć. Przy stosunkowo dużych ciśnieniach i niewielkiej masie przemieszczanego rozpuszczalnika można spodziewać się krótkich czasów ustalania się równowagi, poniżej zdolności rozdzielczej stosowanej metody pomiaru pojemności. Podczas ściskania membrany mogą jeszcze zachodzić sprężyste deformacje łańcuchów węglowych o bardzo krótkim czasie relaksacji, rzędu mikrosekund [179].

Jakich czasów relaksacji można spodziewać się przy wpływie obrzeża na pojemność membran? Rozważania można rozpocząć od przypomnienia procesu formowania dwuwarstw. Analiza procesu doprowadziła do wniosku, że decydującą rolę w procesie tworzenia się dwuwarstw odgrywają właściwości obrzeża, które dzięki siłom napięcia powierzchniowego wysysa rozpuszczalnik z pomiędzy monowarstw. Proces ten jest stosunkowo wolny i czas powiększania się pola powierzchni dwuwarstwy (etap B) dla różnych membran wynosi od 0.2 do ponad 20 minut. Osiągnięcie stanu równowagi związane jest z przemieszczaniem rozpuszczalnika z pomiędzy monowarstw do obrzeża, jak również znacznie większych jego ilości wewnątrz obrzeża, w ramach zmiany jego kształtu. Po naruszeniu tej równowagi, np. przez mechaniczny wstrząs, następuje ponowny, powolny powrót do równowagi. Równowaga ta może być naruszona w inny sposób, np. elektrycznie, co wywoła zjawisko elektrokapilarności, które związane jest ze zmianami napięcia powierzchniowego pod wpływem zmian potencjału elektrycznego. Można więc oczekiwać, że obecność powolnych zmian pojemności membran lipidowych w wyniku ich polaryzacji związana jest ze zmianami napięcia powierzchniowego obrzeża.

Przedstawione rozważania wymagają eksperymentalnej weryfikacji, jaka jest rzeczywista szybkość zmian pojemności membran pobudzanych prostokątnymi impulsami napięciowymi. Jako punkt wyjścia można wykorzystać przebieg pojemności membrany przedstawiony na rysunku 15.1. Po zmianie potencjału pojemność membrany zmienia się niejednostajnie. Można wyróżnić dwa etapy - pierwszy, gdzie pojemność zmienia się w sposób skokowy i etap drugi, gdzie zmiany pojemności są powolne i pojemność stabilizuje się. Dla porównania pojemności przy

poszczególnych potencjałach, dane dla membrany z rysunku 15.1 przedstawione zostały na rysunku 15.9. Skala czasu została przyjęta w postaci logarytmicznej, dzięki czemu wyraźniej widoczne są różnice pomiędzy krzywymi. Czas jest podawany od momentu przyłożenia danego potencjału do membrany.

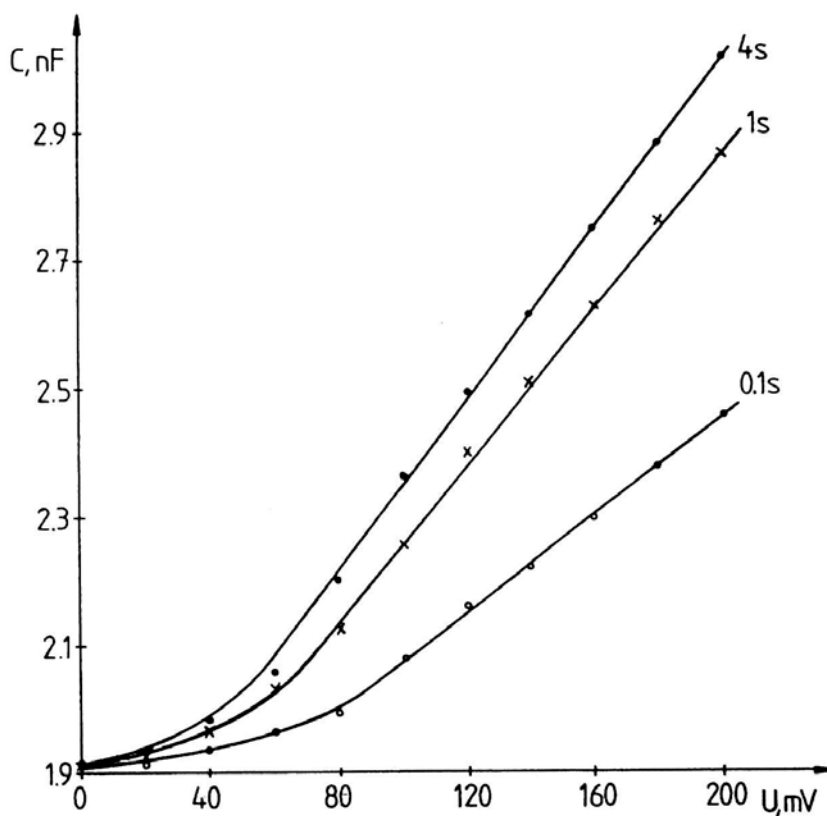


Rys. 15.9. Pojemność membrany po przyłożeniu potencjału do membrany. Wykres jest zrobiony dla membrany z rysunku 15.1. Roztwór formujący: lecytyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

Na podstawie rysunku 15.9 można zauważyć, że około 50% całkowitej zmiany pojemności dokonuje się w czasie krótszym od 0.1 s. Dokładniej zaobserwować można to na rysunku 15.10, który przedstawia zależność pojemności membrany od przyłożonego potencjału po 0.1, 1 i 4 s od chwili jego przyłożenia.

Szybkość ustalania się równowagi pomiędzy obrzeżem i dwuwarstwą zaobserwować można dodając do jednego z roztworów wodnych porcję elektrolitu. Wskutek powstania różnicy ciśnień następuje wybrzuszenie się membrany i wzrost jej pola powierzchni. Po dodaniu 20 μ l roztworu następuje wzrost pojemności membrany o około 10%. Szybkość tych zmian jest kilkakrotnie mniejsza, niż podobne zmiany wywołane przyłożeniem napięcia do membrany.

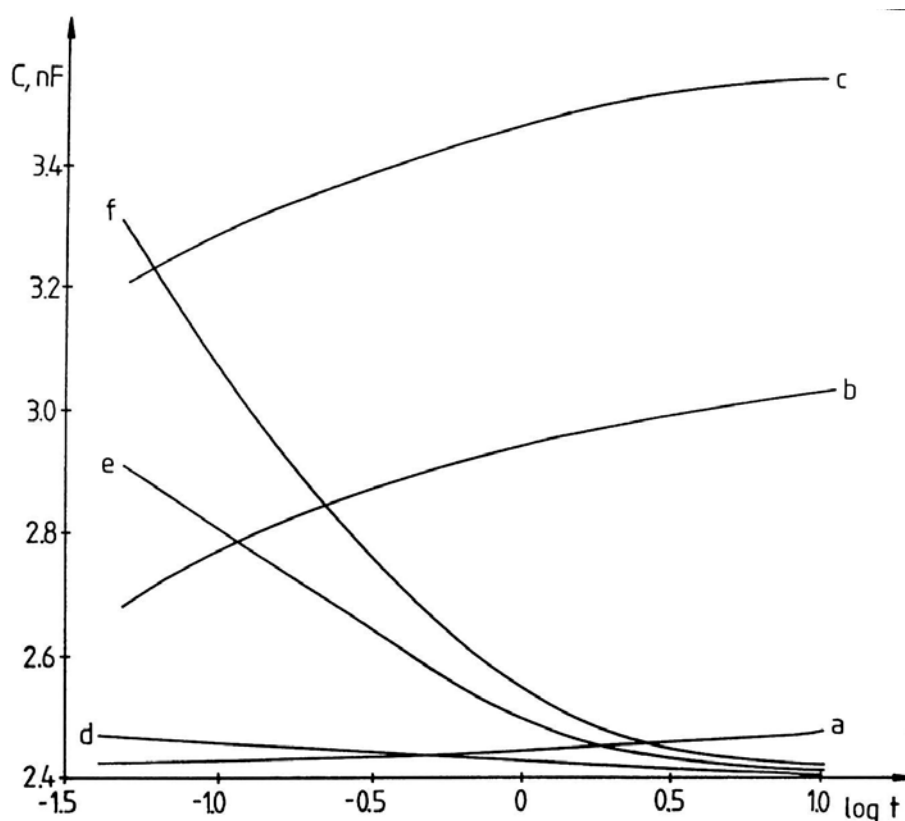
Benz i Janko [168] przedstawiają wyniki badań kinetyki zmian pojemności pojemności membran tworzonych przy użyciu różnych węglowodorów, wywołane przyłożonym impulsem napięciowym. Ze wzrostem długości łańcucha stosowanego węglowodoru (dekan-heksadekan) malała szybkość zmian pojemności. Wzrost długości łańcucha węglowodoru powoduje wzrost jego lepkości. Lepkość stosowanego rozpuszczalnika wpływa szybkość przemieszczania się rozpuszczalnika wewnątrz dwuwarstwy i wewnątrz obrzeża.



Rys. 15.10. Zależność pojemności membrany od przyłożonego potencjału dla czasów 0.1, 1 i 4 s od chwili przyłożenia potencjału. Wykres jest zrobiony dla membrany z rysunku 15.1. Roztwór formujący: lecytyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

Przedstawione wyniki wskazują na istnienie dwóch czynników odpowiedzialnych za zmianę pojemności. Początkową szybką zmianę pojemności można wiązać z elektrokompresją. Stosunkowo duże ciśnienie wywierane na dwuwarstwę powoduje szybkie przemieszczanie się niewielkiej ilości rozpuszczalnika wewnątrz dwuwarstwy. Zmiana kształtu obrzeża związana jest z przemieszczeniem wielokrotnie większych ilości roztworów.

Jeżeli do membrany jest przyłożone napięcie np. 100 mV i układ jest w stanie równowagi, to zmiana napięcia na 0 spowoduje zanik sił powodujących elektrokompresję. Membrana nie będzie ściskana i można oczekiwać, że pojemność membrany będzie zmieniać się w wyniku ustalania się równowagi związanej ze zmianami napięcia międzyfazowego obrzeża. Nie powinno być więc na początku tak gwałtownej zmiany pojemności. Dla sprawdzenia tego założenia, wyniki z rysunku 15.6 przedstawione zostały w zmienionej postaci na rysunku 15.11. Dla lepszej wyrazistości oś czasu przedstawiona została w postaci logarytmicznej.



Rys. 15.11. Pojemność membrany po przyłożeniu potencjału do membrany. Wykres jest zrobiony dla membrany z rysunku 15.6. Roztwór formujący: lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C. Potencjały: a) 50 mV, b) 100 mV, c) 150 mV, d) 0 po 50 mV, e) 0 po 100 mV, f) 0 po 150 mV.

Na podstawie rysunku 15.11 można stwierdzić, że przyłożenie potencjału do membrany (np. 100 mV, 150 mV) powoduje początkowo skok pojemności, po czym pojemność powoli stabilizuje się. Natomiast zmiana potencjału z wartości 100 lub 150 mV na 0 nie jest tak gwałtowna w początkowym okresie. Procentowe zmiany pojemności podane są w tabeli 15.3.

Tab. 15.3. Procentowe zmiany pojemności membrany polaryzowanej impulsami napięciowymi o czasie trwania 10 s. Wyniki przedstawione w tabeli są dla membrany z rysunku 15.11. Wartość 100 % przyjęta jest dla zmiany pojemności po 10 s trwania danego potencjału. Roztwór formujący: lecytyna-cholesterol 7:3 w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl. Otwór: 1.1 mm. Temperatura: 25 °C.

Potencjał [mV]	Zmiana pojemności po 50 ms [%]	Zmiana pojemności po 1 s [%]
100	41.3	82.5
0 po 100	22.2	87.3
150	68.1	94.0
0 po 150	22.4	89.7

Przy wyższych potencjałach polaryzujących większe są względne zmiany pojemności w początkowym okresie od przyłożenia potencjału. Powrót potencjału do wartości zerowej powoduje zmiany pojemności (względne) z podobnymi szybkościami dla początkowych potencjałów 100 i 150 mV. Wyniki przedstawione w tabeli 15.3 potwierdzają przypuszczenia, że początkowe szybkie zmiany pojemności po przyłożeniu potencjału do membrany spowodowane są głównie przez elektrokompresję. Dalsze powolne dochodzenie układu do stanu równowagi następuje w wyniku zmian w ukształtowaniu obrzeża, związanych ze zmianami napięcia powierzchniowego.

15.4. Dyskusja wyników

Wyniki badań elektrochemicznych, których obiektem są dwuwarstwowe membrany lipidowe, są nie tylko wynikiem zjawisk zachodzących w samej dwuwarstwie. Wyniki badań wskazują, że przy analizie danych eksperymentalnych konieczne jest również uwzględnienie właściwości obrzeża znajdującego się w równowadze z membraną. Przedstawione wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że kształt obrzeża i jego zmiany powodowane są zmianami napięcia powierzchniowego. Kształt obrzeża zależy od różnicy potencjałów pomiędzy roztworami wodnymi rozdzielonymi przez membranę. Analiza tego układu jest trudna ze względu na jego znaczną komplikację. Możliwe jest kontrolowanie jedynie różnicy potencjałów pomiędzy roztworami wodnymi, które rozdzielone są dwuwarstwą i obrzeżem.

Rozkład potencjałów wewnątrz dwuwarstwy był tematem bardzo wielu prac, a mimo to nadal wnętrze i powierzchnia dwuwarstwy kryje wiele zagadek. W przypadku obrzeża potencjał wewnątrz fazy jest wartością nieznaną. Odpowiedź na pytanie, dlaczego zwiększenie różnicy potencjałów pomiędzy roztworami wodnymi powoduje zwiększenie napięcia międzyfazowego nie jest łatwa. W przypadku prostej granicy międzyfazowej np. rtęć/roztwór wodny, napięcie międzyfazowe przyjmuje wartość maksymalną, gdy powierzchniowa gęstość ładunku równa jest 0. Rozkład potencjałów wewnątrz obrzeża różni się od rozkładu wewnątrz dwuwarstwy. W obrzeżu, we wnętrzu fazy oprócz cząsteczek rozpuszczalnika są jeszcze cząsteczki lipidów. Cząsteczki lipidów wewnątrz obrzeża nie są równomiernie rozproszone, lecz tworzą złożone struktury przestrzenne. Przyłożenie napięcia do elektrod znajdujących się w roztworach wodnych spowoduje zmiany struktury nie tylko powierzchniowej warstwy lipidów, ale także wewnątrz membrany. Bez odpowiedzi pozostaje również pytanie, czy zmiany kształtu obrzeża od strony obydwu roztworów wodnych są takie same. Zmiany potencjału polaryzującego mogą powodować po jednej stronie obrzeża wzrost, a po drugiej spadek napięcia międzyfazowego. Wyniki eksperymentalne nie wykazały jednak zauważalnego wybrzuszenia się membrany.

Przedstawione wyniki mają głównie charakter jakościowy. Celem ich było przede wszystkim stwierdzenie istnienia określonych zależności pomiędzy obserwowanymi zjawiskami. Opisywane w literaturze zjawisko elektrokompresji znajduje potwierdzenie w przedstawionych w tej pracy wynikach. Jednak dalsza analiza wskazuje na duży wpływ parametrów obrzeża na pojemność membran. Oddzielenie efektów wpływu polaryzacji napięciowej bezpośrednio na membranę i pośrednio przez zmianę parametrów obrzeża napotyka na duże trudności. Wkład poszczególnych efektów na całkowitą wartość obserwowanych zmian pojemności membran zmienia się w funkcji czasu.

Dotąd analizowane były zmiany pola powierzchni i pojemności specyficznej dwuwarstwy. Przy tych analizach zakładano, że przenikalność elektryczna dwuwarstwy jest stała. Pozostaje jednak ciągle nierozstrzygnięty problem zmiany przenikalności elektrycznej membrany pod wpływem potencjału polaryzującego. Przy analizie tego zjawiska należy brać pod uwagę kilka efektów:

1. Dwuwarstwowe membrany lipidowe są częściowo przepuszczalne dla wody. Powstaje więc do rozstrzygnięcia problem, czy przyłożenie potencjału do membrany powoduje wnikanie większej ilości wody, czy nie. W wyniku elektrokompresji wewnątrz membrany tworzy się nadciśnienie wypierające obce

cząsteczki z wnętrza membrany. Można w tej sytuacji oczekiwać, że zmniejszy się ilość wody wewnątrz membrany. Przy odpowiednio dużych wartościach potencjału (np. 200 mV) w membranie tworzą się pory wypełniające się elektrolitem, które z kolei będą zwiększać całkowitą przenikalność elektryczną membrany.

2. Możliwość wnikania jonów znajdujących się w roztworze wodnym. Membrany lipidowe są praktycznie nieprzepuszczalne dla jonów o małych rozmiarach np. Na^+ , K^+ , Cl^- . Membrany posiadają bardzo dużą rezystancję, co świadczy o braku przepływu jonów przez membranę. Jest ich wewnątrz membrany tak mało, że ich wpływ na przenikalność elektryczną jest znikomy. Obecność jednak w roztworze wodnym jonów J^- powoduje znaczne przewodnictwo membrany. Jony znajdujące się wewnątrz membrany powodują wzrost jej przenikalności elektrycznej. Trudno w tej sytuacji ocenić zmiany przenikalności elektrycznej warstwy hydrofobowej po przyłożeniu potencjału polaryzującego. Z jednej strony, wewnątrz membrany wzrasta ciśnienie wewnętrzne powodujące usuwanie materii na zewnątrz, a z drugiej, wzrasta natężenie pola elektrycznego wymuszającego przepływ jonów przez membranę.
3. Cząsteczki o właściwościach lipofilowych np. pochodne fenotiazyny tworzą dość duże stężenie wewnątrz membrany. Współczynnik podziału chlorpromazyny pomiędzy liposomami z fosfatydylocholiną a wodą wynosi 3400-8100 [227]. W tym wypadku też powstaje pytanie, czy elektrokompresja powodująca usuwanie rozpuszczalnika z wnętrza membrany spowoduje również usuwanie fenotiazyn? Jeżeli fenotiazyny nie będą usuwane z membrany razem z rozpuszczalnikiem, w wyniku elektrokompresji zwiększy się ich stężenie w warstwie hydrofobowej i wzrośnie jej przenikalność elektryczna.
4. Szacuje się, że ze względu na obecność wiązań podwójnych w łańcuchach węglowych warstwa hydrofobowa dwuwarstw lipidowych posiada przenikalność elektryczną wyższą niż węglowodory. W zależności od rodzaju łańcuchów węglowych lipidów posiadają one przenikalność elektryczną równą 2.2-2.45 [167]. Również obecność cholesterolu, którego część niepolarna posiada przenikalność elektryczną 2.39 [167], powoduje wzrost przenikalności warstwy hydrofobowej membran. Obecność niepolarnego rozpuszczalnika wewnątrz membrany np. n-dekanu ($\epsilon = 1.991$) będzie powodować zmniejszenie przenikalności warstwy hydrofobowej. Przyłożenie potencjału do membrany powoduje pojawienie się sił ściskających membranę. W wyniku polaryzacji membrany zmniejsza się zawartość rozpuszczalnika wewnątrz membrany. Dzięki

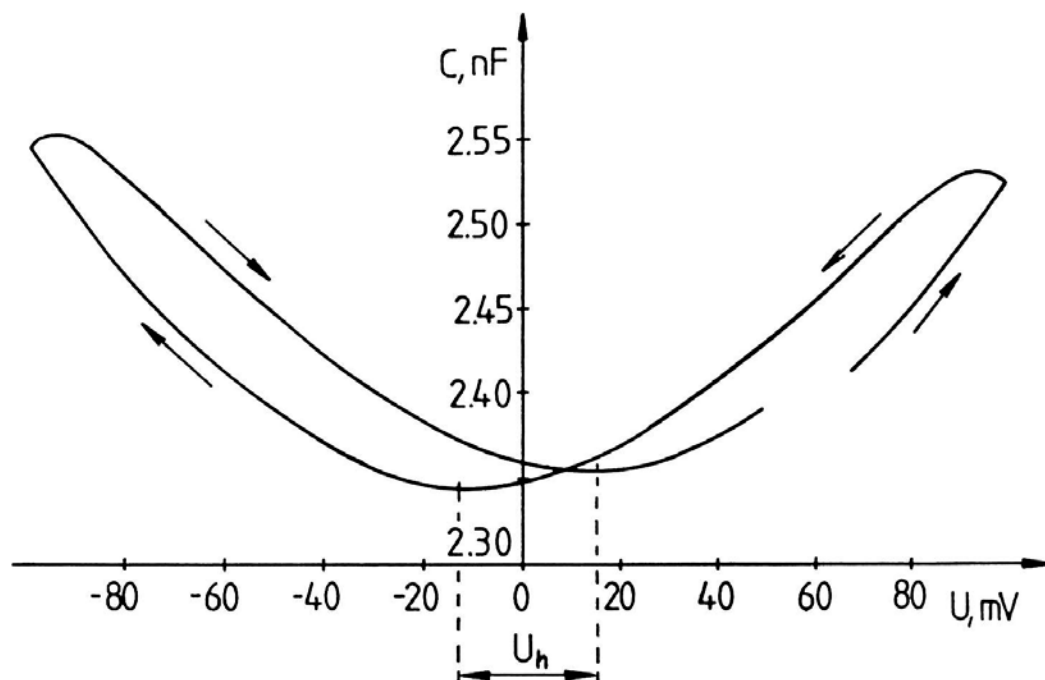
temu wzrasta stężenie nienasyconych łańcuchów w membranie, powodując wzrost jej przenikalności elektrycznej. W zależności od lipidów tworzących membranę można oczekiwać maksymalnych zmian ϵ rzędu 0.1-0.4.

5. Przy badaniach przewodnictwa membran zawierających gramicydynę stwierdzono, że zależność natężenia prądu płynącego przez membranę od potencjału polaryzującego jest nieliniowa. Rezystancja membran maleje przy wzroście potencjału. Zjawisko to można wytłumaczyć zmniejszaniem się grubości membrany, dzięki czemu większa liczba cząsteczek gramicydyny przyjmuje wewnątrz membrany położenie tworzące kanały jonowe. W tej sytuacji możliwy jest przepływ większej liczby jonów przez kanały i wzrost przenikalności elektrycznej membrany.

Podsumowując przedstawione rozważania, ocena zmiany przenikalności elektrycznej membrany możliwa jest w przypadku prostych układów - t.j. membran zawierających tylko typowe lipidy membranowe kontaktujące się z roztworem wodnym bez substancji lipofilowych. W wyniku polaryzacji membrany przenikalność elektryczna może o kilka procent wzrosnąć wskutek zmniejszenia się ilości niepolarnego rozpuszczalnika wewnątrz membrany. W przypadku bardziej złożonych układów konieczne są szczegółowe badania eksperymentalne, gdyż teoretyczna ocena może być obarczona dużym błędem.

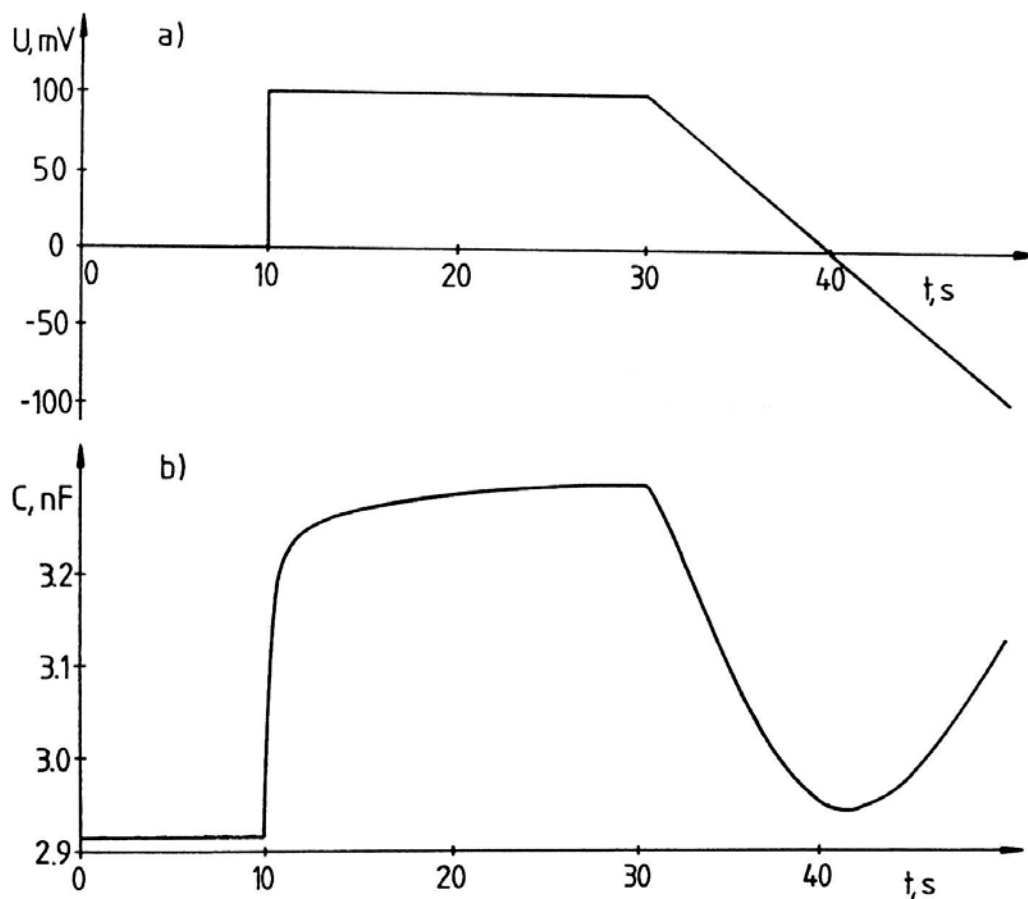
16. Badania potencjału minimalnej pojemności

Podczas rejestracji pojemności membran cyklicznie polaryzowanych potencjałem liniowo zmieniającym się okazało się, że potencjał minimalnej pojemności przy symetrycznych membranach nie jest równy 0. Znak tego potencjału zależy od kierunku zmian potencjału polaryzującego. Gdy membrana polaryzowana była potencjałem zmieniającym się od wartości dodatnich do ujemnych, potencjał minimalnej pojemności przyjmował wartości ujemne (Rys. 16.1). Przesunięcie to wynosiło zwykle kilkanaście miliwoltów. W dalszej części pracy potencjał minimalnej pojemności oznaczany jest jako U_{CM} . Różnica potencjałów minimalnej pojemności dla membran polaryzowanych cyklicznie, nazywana jest napięciem histerezy i oznaczana jako U_h .



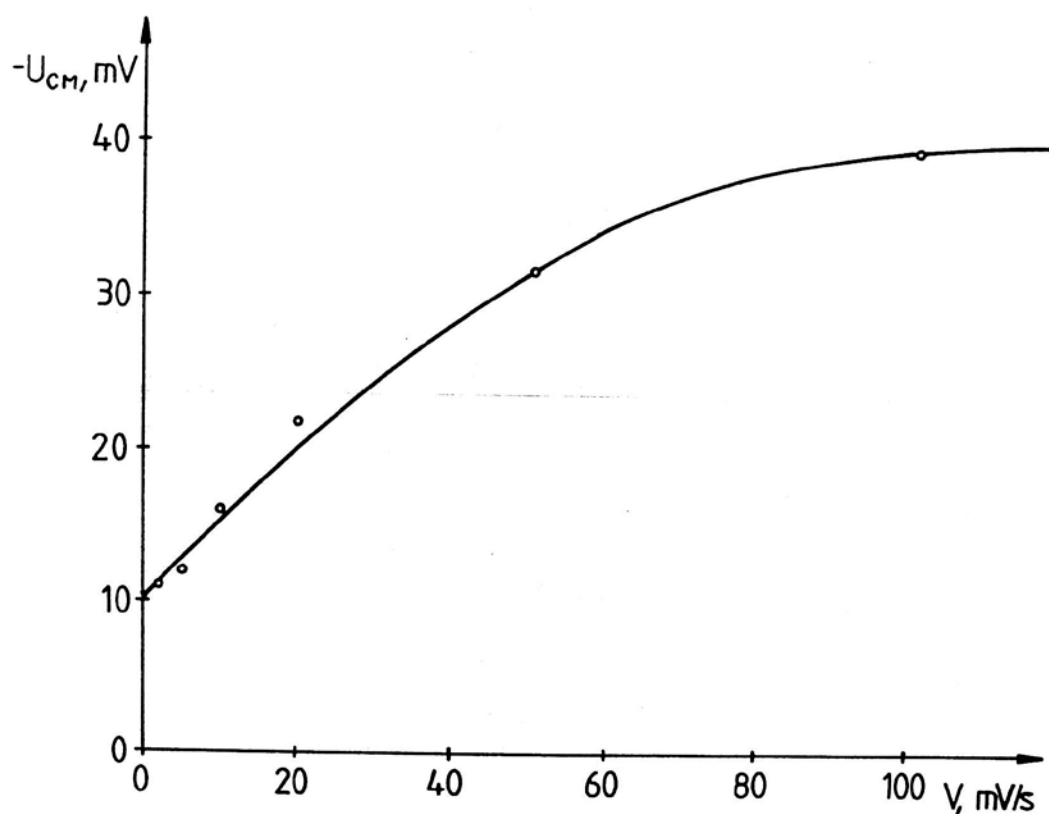
Rys. 16.1. Zależność pojemności membrany od potencjału polaryzującego przy cyklicznie zmieniającym się potencjale. Szybkość zmian potencjału: 10 mV/s. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25 °C. U_h - napięcie histerezy.

W tej sytuacji powstało pytanie, dlaczego występuje to przesunięcie? Gdy do membrany przykładany jest impuls napięciowy, pojemność membrany ustala się w ciągu kilku sekund (rozdział 15). Gdy membrana polaryzowana jest cyklicznie, liniowo zmieniającym się potencjałem, po zmianie kierunku polaryzacji pojemność membrany jeszcze trochę wzrasta (Rys. 16.1). Zmiany pojemności wykazują pewną bezwładność, nie nadążają za zmianami potencjału. Jeżeli to zjawisko jest przyczyną przesunięć potencjału minimalnej pojemności, to przy zmniejszaniu szybkości polaryzacji membrany, wartość przesunięcia potencjału minimalnej pojemności powinna zmniejszać się. W celu sprawdzenia tej tezy zarejestrowano kilka krzywych pojemności przy zaprogramowanym przebiegu potencjału (Rys. 16.2a).



Rys. 16.2. Przebieg napięciowy (a) i pojemność membrany (b). Roztwór formujący: fosfatydylocholina:cholesterol 7:3 w dekanie, 20mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl. Temperatura 23 °C.

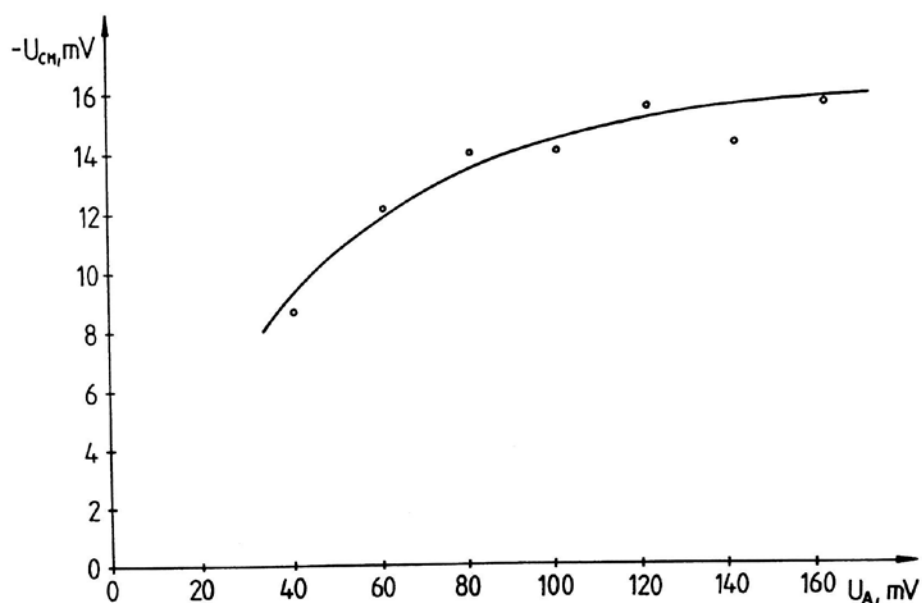
Początkowo do membrany przykładano potencjał 0 mV, a po 10 s potencjał zmieniany był skokowo do wartości +100 mV. Potencjał ten utrzymywany był przez 20 s, aby pojemność ustabilizowała się, po czym potencjał był liniowo zmieniany do wartości -100 mV. Pomiar wykonano na jednej membranie, przy kilku różnych szybkościach polaryzacji. Pomiar zaczynało od najwyższej szybkości polaryzacji t.j. 100 mV/s. Dla każdej krzywej metodą numeryczną wyznaczony został potencjał minimalnej pojemności. Na podstawie tych danych wykreślono zależność potencjału minimalnej pojemności o szybkości polaryzacji (Rys. 16.3). Ekstrapolacja do zerowej wartości szybkości polaryzacji nie daje zerowej wartości potencjału minimalnej pojemności. Potencjał ten wynosił ok. -10 mV. Zjawisko to jest więc spowodowane nie tylko mechaniczną bezwładnością membrany, wynikającą z szybkości przemieszczania się rozpuszczalnika wewnątrz dwuwarstwy i zmianami kształtu obrzeża.



Rys. 16.3. Zależność potencjału minimalnej pojemności od szybkości polaryzacji membrany. Roztwór formujący: fosfatydylocholina:cholesterol 7:3, stężenie lipidów w dekanie 20mg/ml. Elektrolit 0.1M KCl.

Należało więc szukać również innych przyczyn tego zjawiska. Dotychczasowa wiedza wyjaśnia zmiany pojemności membrany pod wpływem napięcia zjawiskiem elektrokompresji. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują również na znaczenie obrzeża przy zmianach pojemności. Efekty te prowadzą do zmniejszenia grubości warstwy hydrofobowej membrany, a tym samym do zwiększenia pojemności membrany. Pojemność membrany jest najmniejsza wtedy, różnica potencjałów pomiędzy powierzchniami warstwy hydrofobowej jest równa 0. Informacje te prowadzą do wniosku, że przyłożenie do membrany napięcia powoduje trwałe zmiany w jej strukturze. Powrót napięcia przyłożonego do membrany do wartości 0 nie powoduje odtworzenia początkowej struktury membrany. Konieczne jest przyłożenie dodatkowego, niewielkiego napięcia o przeciwnym znaku, aby spadek potencjału w warstwie hydrofobowej membrany był równy 0 i pojemność przyjęła minimalną wartość (Rys. 16.4).

Zmian struktury membrany pod wpływem przyłożonego należy szukać w zmianach konformacji grup jonowych lub dipolowych. W fosfatydylocholinie są to grupy polarne tworzące jon obojnaczy i grupy tworzące wiązania estrowe pomiędzy szkieletem glicerolu a łańcuchami węglowymi. Z literatury wiadomo, że grupy polarne lipidów mają możliwość zmiany położenia [95]. W zależności od siły jonowej roztworu i temperatury grupy polarne mogą być ustawione równoległe do powierzchni membrany, mogą być również ustawione prostopadłe do powierzchni membrany. Możliwe jest także takie ustawienie, przy którym grupa z ładunkiem dodatnim schowana jest do wnętrza membrany, a odsłania się atom tlenu, na którym skupiony jest ładunek ujemny. Można oczekiwać, że na położenie grup polarnych fosfolipidów będzie miało również napięcie przyłożone do membrany. Wskutek istnienia sił elektrostatycznych grupy polarne lipidów znajdujące się po stronie roztworu o ujemnym potencjale powinny ustawiać się prostopadłe do membrany.



Rys. 16.4. Zależność potencjału minimalnej pojemności od początkowej wartości potencjału przyłożonego do membrany. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie, 20mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES. Temperatura 23 ° C.

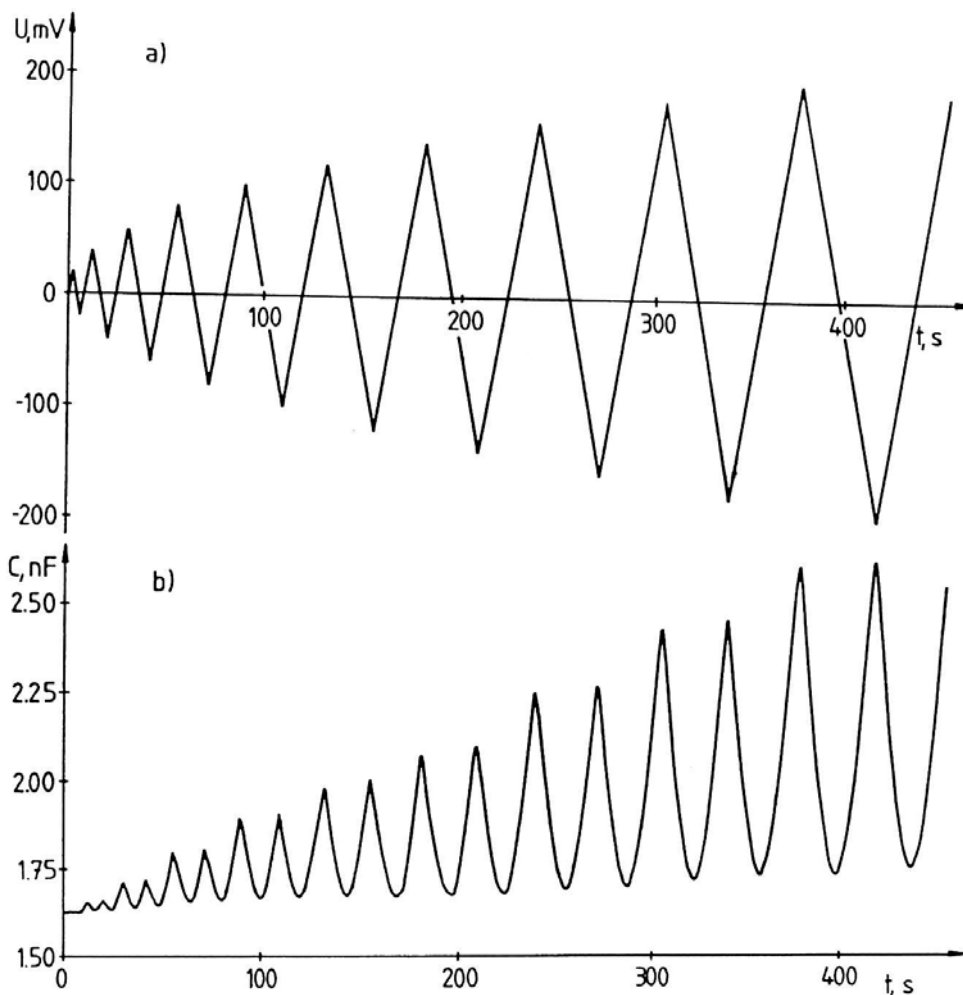
Bliższe poznanie natury zaobserwowanego zjawiska wymagało wykonania szeregu kolejnych badań. Przede wszystkim należało określić zależności pomiędzy wartością maksymalnego potencjału przyłożonego do membrany, a wartością potencjału minimalnej pojemności. Do badań tych wykorzystano przebieg potencjału podobny do przebiegu z rysunku 16.2. Potencjał 0 mV utrzymywany był przez 5 s,

następnie przykładano do membrany potencjał o pożądanej wartości przez 10 s. Po tym potencjał zmieniany był liniowo w kierunku wartości ujemnych z szybkością 5 mV/s. Pomiar przeprowadzone były na jednej membranie. Pomiar rozpoczynany był od niższych wartości przykładanego potencjału. Uzyskane wyniki przedstawione są na rysunku 16.4.

Na podstawie rysunku 16.4 można stwierdzić, że potencjał minimalnej pojemności zależy od wartości początkowego potencjału, który był przyłożony do membrany. Przy wyższych wartościach potencjału startowego U_A , wartość przesunięcia potencjału minimalnej pojemności U_{CM} ulega stabilizacji. Można więc ocenić, że przy małych wartościach napięcia przykładanego do membrany zmiany konformacji lipidów zależą od tego napięcia. Dalsze zwiększanie wartości napięcia może powodować osiąganie granicznych położenia grup dipolowych lipidów. Opisany eksperyment nie daje jednak odpowiedzi, które elementy cząsteczek lipidów odpowiadają za ten efekt, grupy polarne czy wiązania estrowe? Do wyjaśnienia tego problemu należało więc przeprowadzić eksperymenty, w których modyfikowano właściwości grup polarnych lub wiązań estrowych lipidów. Najprostsza wydaje się ingerencja we właściwości grup polarnych lipidów.

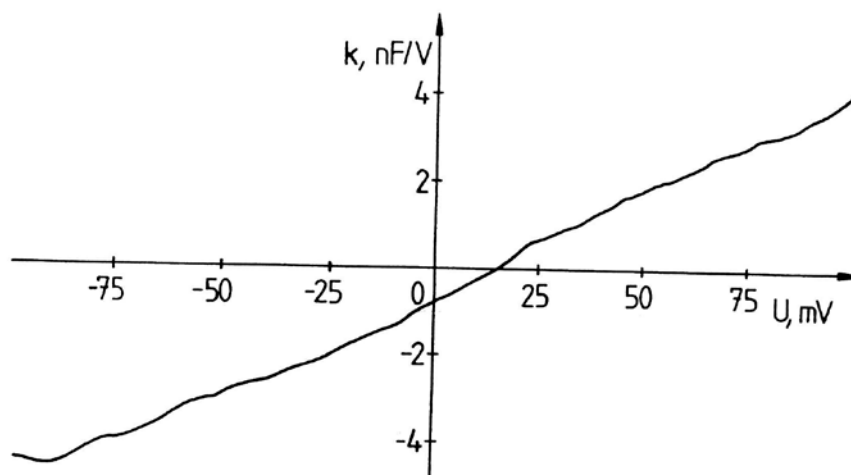
Wyjaśnienie tych problemów wymagało wykonania wielu pomiarów. Należało więc opracować metodykę pomiarów, która pozwoliłaby na wydajną pracę. Aby za jednym pomiarem można było wyznaczyć zależność potencjału minimalnej pojemności od potencjału przykładanego do membrany, stosowano trójkątny przebieg napięciowy o wzrastającej amplitudzie (Rys. 16.5a). Potencjał, którym polaryzowano membranę zmieniał się liniowo w następującym ciągu: $0 \rightarrow +20\text{mV} \rightarrow -20\text{mV} \rightarrow +40\text{mV} \rightarrow -40\text{mV}$ itd. Pojemność membrany rejestrowana przy tym programie napięciowym przedstawiona jest na rysunku 16.5b.

Wyznaczanie potencjałów minimalnej pojemności prowadzone było metodami numerycznymi za pomocą programu *Excel* (Microsoft). Dane pomiarowe (komplety liczb: czas, potencjał, pojemność) wprowadzane były do programu w postaci pliku tekstowego. Metodą numeryczną wyznaczano pochodną krzywej pojemności względem potencjału. Pochodna w pobliżu przecięcia z osią x ma przebieg zbliżony do liniowego. Punkt przecięcia pochodnej z osią x odpowiada potencjałowi minimalnej pojemności. Wyznaczano go wykorzystując regresję liniową. Do odcinków pochodnych (Rys. 16.6) znajdujących się w pobliżu potencjału minimalnej pojemności dopasowywano prostą. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczano współczynniki a i b w równaniu prostej. Na ich podstawie obliczano potencjał, przy którym prosta przecinała oś x, czyli potencjał minimalnej pojemności.

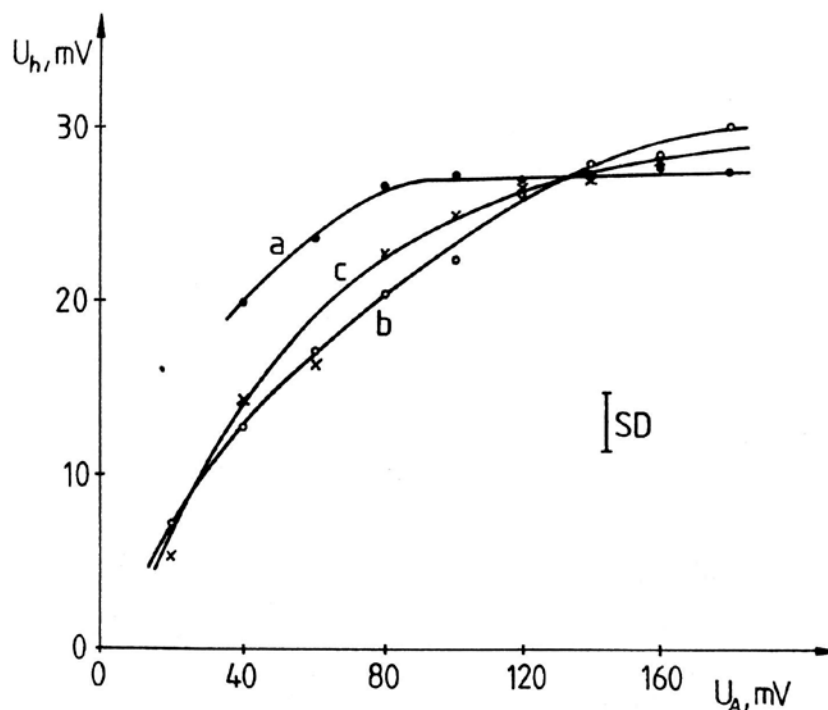


Rys. 16.5. Rejestracja pojemności przy zaprogramowanym przebiegu potencjału. a) Przebieg potencjału w funkcji czasu. Szybkość polaryzacji 10 mV/s. b) Pojemność membrany przy zaprogramowanym potencjale. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25 °C.

Na rys. 16.7 przedstawiona jest zależność potencjału minimalnej pojemności od maksymalnego potencjału, który przyłożony był do membrany. Pomiary wykonane były dla roztworów KCl o trzech stężeniach. Punkty pomiarowe przedstawione na rysunku otrzymane były dla 6-8 membran. Siła jonowa elektrolitu praktycznie nie wpływa na badaną zależność. Jedynie dla roztworu KCl o stężeniu 0.01M maksymalna wartość potencjału minimalnej pojemności osiągnana jest przy mniejszej amplitudzie potencjału polaryzującego. Obserwowane różnice zawarte są jednak w granicach odchylenia standardowego i nie dają podstaw do jednoznacznych wniosków.



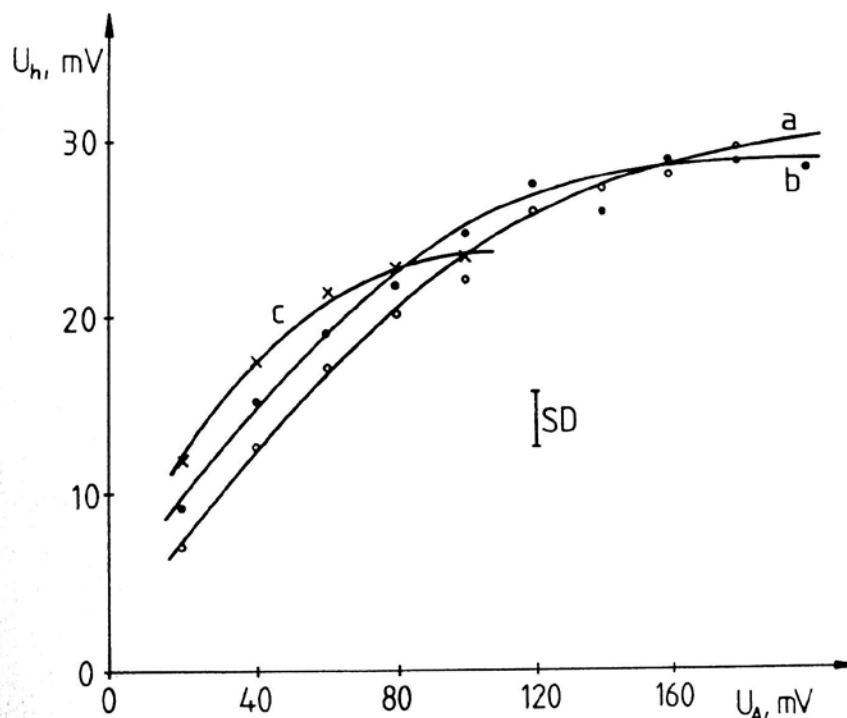
Rys. 16.6. Pochodna pojemności membrany względem potencjału polaryzującego. Krzywą wykreślono na podstawie danych z rysunku 16.6 dla przebiegu potencjału od -140 do +140 mV. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25 °C.



Rys. 16.7. Wykres zależności napięcia histerezy od wartości maksymalnego potencjału polaryzującego membranę. Szybkość polaryzacji 10mV/s. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie, 20mg/ml. Elektrolit: a) (•) 10 mM KCl, 1 mM HEPES, b) (○) 0.1 M KCl, 10 mM HEPES, c) (×) 1 M KCl, 10 mM HEPES. Temperatura 25 °C. SD - odchylenie standardowe.

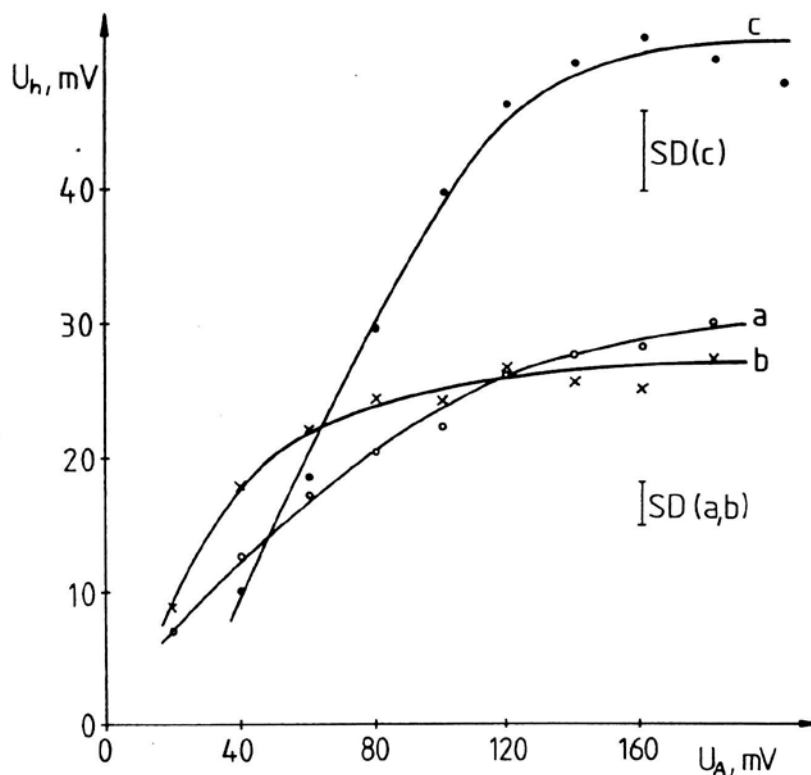
Wykonano również badania z jonami dwuwartościowymi. Wybrane zostały jony Ca^{2+} ze względu na ich zdolność do adsorpcji na błonach lipidowych [234]. Jony Ca^{2+} działają stabilizująco na błony biologiczne poddawane elektroporacji [235,236]. Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 16.8,b. W tym wypadku nie występują istotne różnice w stosunku do roztworu bez jonów Ca^{2+} .

Przeprowadzono jeszcze jeden rodzaj badań. Wykorzystano do niego cytochrom C z serc wieprzowych. Jest to membranowe białko powierzchniowe, które bierze udział w reakcjach redoks zachodzących w membranach [8]. Jego funkcjonowanie uzależnione jest od obecności w membranie lipidów anionowych. Membrany formowano bez obecności cytochromu C. Gdy membrana była już uformowana, do komory, w której znajdowały się elektrody CE1 i RE1, dodawano roztwór cytochromu C. Do drugiej komory dodawano taką samą ilość elektrolitu podstawowego. Roztwór w naczyniu był wymieszany. Po 30 minutach po dodaniu roztworów do naczynia prowadzono pomiar pojemności membrany stosując taki sam program napięciowy jak w poprzednich eksperymentach.



Rys. 16.8. Wykres zależności napięcia histerezy od wartości maksymalnego potencjału polaryzującego membranę. Szybkość polaryzacji 10 mV/s. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20 mg/ml. Elektrolit: a) (○) 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0 b) (●) 0.1M KCl, 0.1M CaCl_2 , 10mM HEPES, pH 7.0 c) (×) 0.1M KCl, 2 μ M cytochrom C, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25 °C. SD - odchylenie standardowe.

Duże cząsteczki zaadsorbowane na powierzchni membrany, takie jak cytochrom C, też nie spowodowały zmiany kształtu krzywych zależności potencjału minimalnej pojemności od amplitudy potencjału polaryzującego. Potencjały minimalnej pojemności U_A przesunęły się w kierunku wartości ujemnych (ok. 7 mV), natomiast napięcie histerezy U_h nie uległo istotnym zmianom (Rys. 16.8,c).



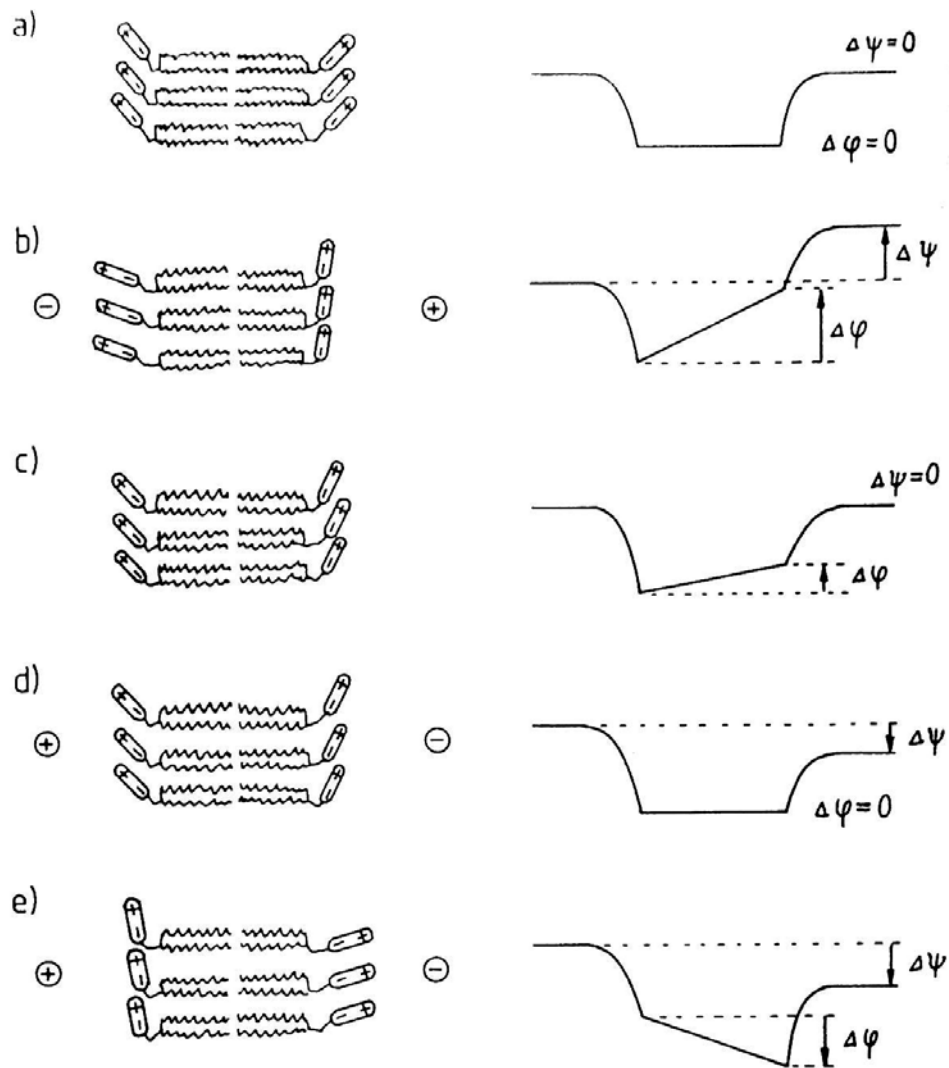
Rys. 16.9. Wykres zależności napięcia histerezy od wartości maksymalnego potencjału polaryzującego membranę. Szybkość polaryzacji 10 mV/s. Roztwór formujący: a) (○) azolektyna w dekanie 20 mg/ml, b) (×) fosfatydylocholina-fosfatydyloetanolamina 1:1 w dekanie, 20 mg/ml, c) (●) fosfatydylocholina-fosfatydyloseryna 1:1 w dekanie, 20 mg/ml. Elektrolit: 0.1M KCl, 10mM HEPES, pH 7.0. Temperatura 25 °C. SD - odchylenie standardowe.

Przeprowadzono również badania, w których do tworzenia membran stosowano lipidy o różnej budowie grup polarnych. Na rysunku 16.9 przedstawione są krzywe zależności napięcia histerezy U_h od amplitudy potencjału polaryzującego U_A dla membran tworzonych z różnych lipidów. Różnice pomiędzy membranami z azolektyny (Rys. 16.9,a) i mieszaniny fosfatydylocholino z fosfatydyloetanolaminą (Rys. 16.9,b) są zbyt małe, aby można było brać je pod uwagę. Wyrażna różnica występuje wtedy, gdy membrana zawiera lipidy z grupą polarną posiadającą ujemny

ładunek elektryczny (Rys. 16.9,c). Do tworzenia membran wykorzystano mieszaninę fosfatydylocholiny z fosfatydyloseryną 1:1. Napięcie histerezy dla takich membran przyjmuje wartość większą, niż dla membran tworzonych z obojętnych lipidów.

Przedstawione badania nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi, że tylko grupy polarne lipidów decydują o powstawaniu przesunięcia potencjału minimalnej pojemności. Należy również przeprowadzić eksperymenty, które dałyby odpowiedź, jaki jest wkład zmiany położenia grup $>C=O$ w wiązaniach estrowych na badany efekt. Można to sprawdzić stosując lipidy o zmienionej budowie, posiadające zamiast wiązań estrowych inne, mniej polarne wiązania. Mogą to być też membrany tworzone z mieszanin fosfolipidów z lipidami mogącymi tworzyć wiązania wodorowe z ugrupowaniami $>C=O$ wiązań estrowych. Ważne też są badania opisywanego efektu przy różnych temperaturach. Dla temperatury poniżej punktu krzepnięcia lipidów efekt powinien zaniknąć ze względu na brak możliwości zmiany konformacji cząsteczek. Na rysunku 16.10 przedstawione zostały schematycznie możliwe zmiany konformacyjne cząsteczek lipidów pod wpływem potencjału. Na rysunku dla uproszczenia pominięto wiązania estrowe w lipidach i istnienie potencjału dipolowego wewnątrz membrany.

Otrzymane dotąd wyniki mogą wskazywać na skokową zmianę ustawienia grup dipolowych. Obecności w membranie innych cząsteczek, drgania termiczne i inne zjawiska mogą powodować rozmycie efektu i przy niższych potencjałach polaryzujących zmiany potencjału dipolowego nie osiągają swych maksymalnych wartości. Pomimo braku wystarczającej ilości danych do jednoznacznego wyjaśnienia tego efektu, zjawisko wydaje się być interesujące z punktu widzenia elektroniki molekularnej. Opisane badania wskazują na właściwości cząsteczek lipidów, które polegają na skokowej zmianie ich konformacji pod wpływem napięcia przyłożonego do membrany i "pamiętaniu" tego ustawienia po zaniku napięcia. Zjawisko to w połączeniu z anizotropową strukturą membran zachęca do dalszych badań, które w perspektywie byłyby badaniami nad elektronicznymi układami pamięciowymi na poziomie molekularnym. Zjawisko to jest również interesujące z punktu widzenia biochemii. W membranach jest wiele białek, których funkcjonowanie zależy od wartości potencjału transmembranowego, np. otwieranie się i zamykanie kanałów jonowych poryn. Na bazie przedstawionych wyników powstaje pytanie, czy zmiany przewodnictwa białek porynowych uzależnione są od zmian konformacyjnych lipidów otaczających białko, czy tylko bezpośrednio od potencjału transmembranowego?



Rys. 16.10. Zmiany właściwości elektrycznych membrany pod wpływem potencjału polaryzującego. Membrana bezpośrednio po uformowaniu jest symetryczna (a) i symetrycznie ułożone są grupy polarne po obu stronach membrany. Przyłożenie napięcia do membrany powoduje zmiany położenia grup polarnych (b), następują przy tym zmiany rozkładu potencjału wewnątrz membrany związane także ze zmianą orientacji grup polarnych. Przyłożenie zewnętrznego potencjału polaryzującego równego 0 nie powoduje powrotu grup polarnych do pierwotnego położenia (c). Wewnątrz membrany występuje spadek potencjału $\Delta\varphi$. Przyłożenie zewnętrznego potencjału $\Delta\psi$ o wartości $-\Delta\varphi$ powoduje kompensację wewnętrznego spadku potencjału (d). Jest to potencjał minimalnej pojemności. Dalsze zwiększanie potencjału $\Delta\psi$ powoduje przeorientowanie położenia grup polarnych lipidów w drugą stronę (e). Na rysunku pominięto potencjał dipolowy, występujący w warstwie hydrofobowej membrany.

17. Zastosowanie chronopotencjometrii w badaniach zjawisk membranowych

Chronopotencjometria jest techniką w nikłym stopniu wykorzystywaną w badaniach zjawisk w dwuwarstwach lipidowych. W rozdziale tym przedstawione są możliwości i ograniczenia zastosowania chronopotencjometrii w pomiarach pojemności membran oraz metoda tworzenia charakterystyk pojemność-napięcie dla membran lipidowych. Przedstawiono również możliwości zastosowania chronopotencjometrii w badaniach elektroporacji membran.

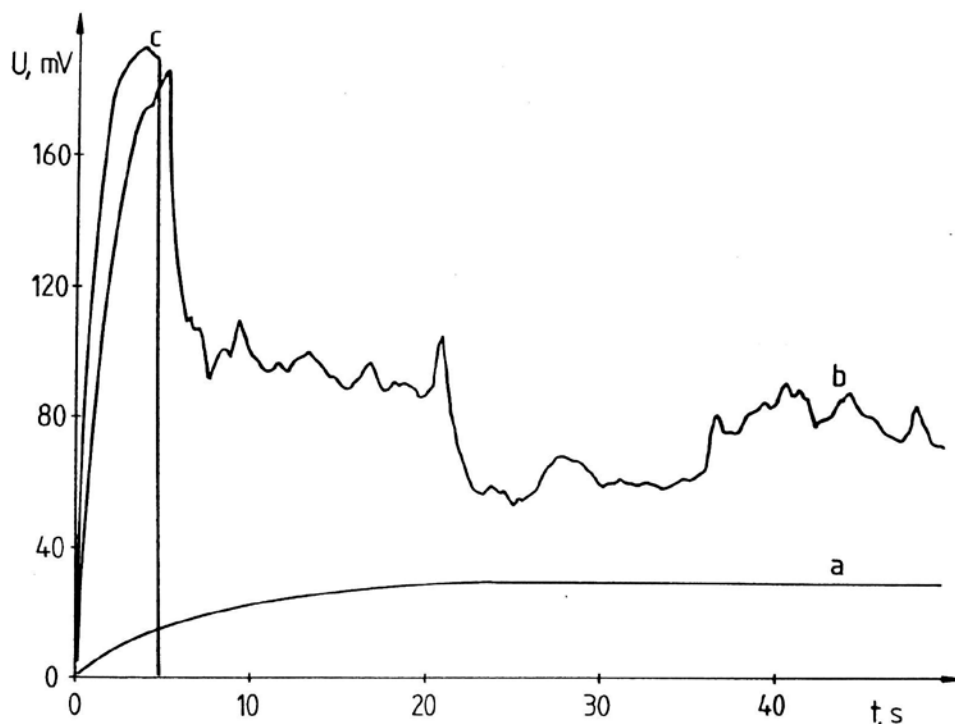
17.1. Pomiary pojemności membran

Chronopotencjometria polega na wymuszeniu przepływu prądu o stałym natężeniu przez badany układ i rejestracji potencjału w funkcji czasu. Chronopotencjometria wykorzystywana jest głównie w analizie chemicznej jakościowej i ilościowej oraz do badań mechanizmów reakcji elektrodowych.

Dwuwarstwy lipidowe można traktować jako równoległe połączenie pojemności i rezystancji. Przy różnych natężeniach prądu płynącego przez dwuwarstwy lipidowe, można uzyskać krzywe chronopotencjometryczne różnego typu (Rys. 17.1). Przy odpowiednio małych natężeniach prądu (krzywa *a*) potencjał ustala się przy wartości określonej przez rezystancję membrany R_M i natężenie prądu *i*:

$$U_M = i \cdot R_M \quad (17.1)$$

Zwiększenie natężenia prądu płynącego przez membranę powoduje wzrost potencjału do wartości, przy której następuje przebicie membrany. Gdy natężenie prądu nie jest zbyt duże, membrana nie ulega zniszczeniu. Powstające pory zmniejszają rezystancję membrany, przez co potencjał zmniejsza się (krzywa *b*). Występują nieregularne oscylacje potencjału. Przy zbyt dużej wartości natężenia prądu, przebicie membrany powoduje jej zniszczenie (krzywa *c*).



Rys. 17.1. Typowe krzywe chronopotencjometryczne dla dwuwarstwowych membran lipidowych. Natężenie prądu: a) 0.1 nA, b) 0.4 nA, c) 1.2 nA. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0.

Całkowity prąd płynący przez membranę lipidową (i) posiada dwie składowe. Część prądu płynie poprzez rezystancję membrany (i_R), natomiast część powoduje ładowanie pojemności membrany (i_C). Szybkość zmian potencjału na membranie V zależna jest od pojemności membrany C i natężenia prądu pojemnościowego i_C :

$$\frac{dU}{dt} = V = \frac{i_C}{C} = \frac{i - i_R}{C} \quad (17.2)$$

Po przekształceniu równania 17.2 uzyskuje się równanie, które stanowi podstawę do wyznaczania pojemności membrany:

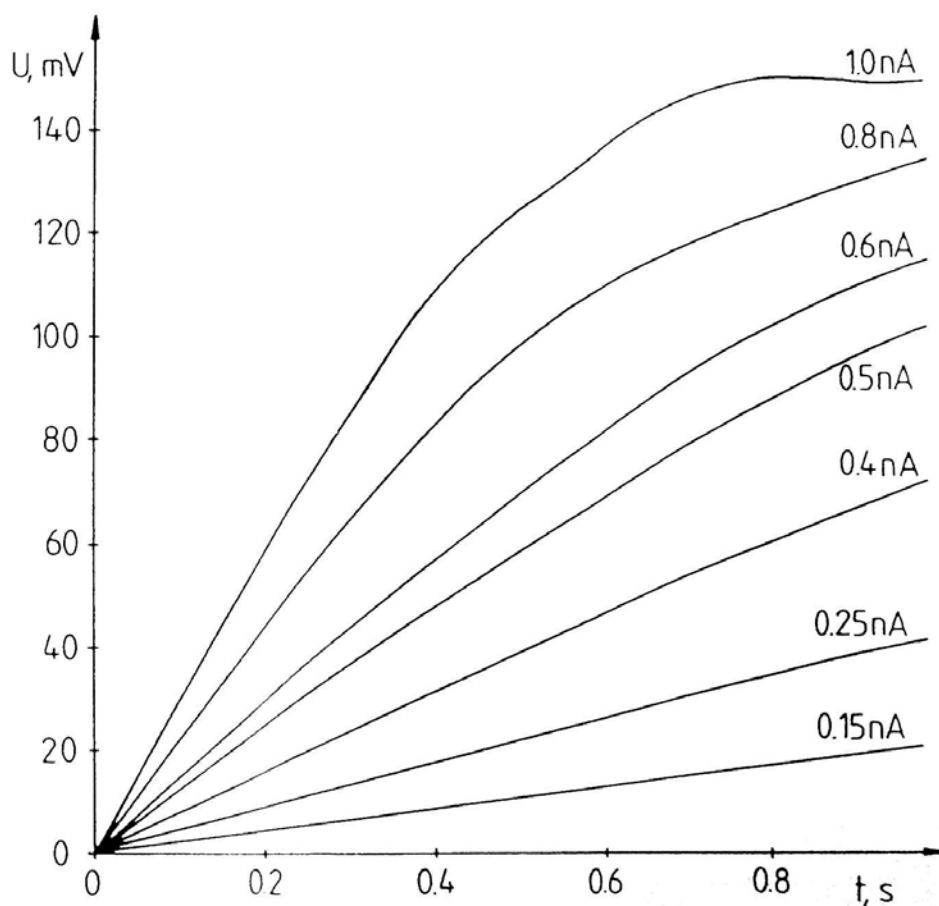
$$C = \frac{1}{V}(i - i_R) \quad (17.3)$$

Natężenie prądu rezystancyjnego przepływającego przez membranę i_R zależy od rezystancji membrany R_M i napięcia na membranie U_M . Po uwzględnieniu tej zależności równanie 17.3 przyjmuje postać:

$$C = \frac{1}{V} \left(i - \frac{U_M}{R_M} \right) \quad (17.4)$$

Szybkość zmian napięcia V wyznaczana jest na podstawie krzywych chronopotencjometrycznych. Jest to nachylenie krzywej w danym punkcie (przy napięciu U_M). Rezystancja membrany R_M może być wyznaczona różnymi metodami. Można wyznaczyć ją z nachylenia krzywych chronowoltamperometrycznych (rozdział 13.7). Rezystancję membrany można wyznaczyć także z krzywych chronoamperometrycznych lub chronopotencjometrycznych, wykorzystując prawo Ohma. Krzywe chronopotencjometryczne rejestruje się dla małego prądu, przy którym potencjał ustala się na niewielkiej wartości (20-50mV). Gdy membrana ma bardzo dużą rezystancję i pomiary wykonywane są przy małej wartości U_M , natężenie prądu rezystancyjnego w porównaniu z prądem pojemnościowym jest małe i równanie 17.4 można uprościć:

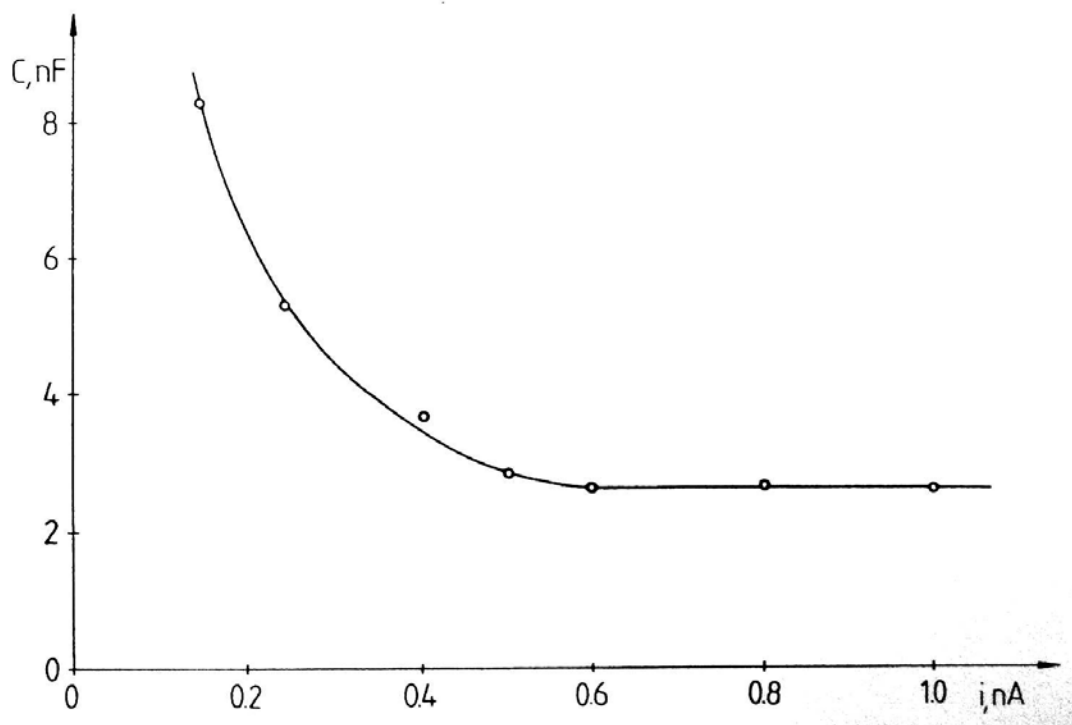
$$C = \frac{i}{V} \quad (17.5)$$



Rys. 17.2. Seria krzywych chronopotencjometrycznych zarejestrowanych dla jednej membrany. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0.

Praktyczne wykorzystanie chronopotencjometrii do pomiarów pojemności membran wymaga dobrania warunków pomiarów. Na rysunku 17.2 przedstawiona jest seria krzywych chronopotencjometrycznych zarejestrowanych dla jednej membrany. Krzywe rejestrowano zaczynając od najmniejszego natężenia prądu.

Do wyznaczenia pojemności wykorzystane zostało równanie 17.3. Rezystancja membrany wyznaczona była na podstawie zarejestrowanej wcześniej krzywej chronowoltameterometrycznej w zakresie potencjałów 0-100 mV. Pojemność wyznaczano dla prądów o różnych natężeniach. Szybkości zmian napięcia V wyznaczano metodą najmniejszych kwadratów w zakresie napięć 0-20 mV (funkcja *linest* w programie *Excel*). Dla prądów powyżej 0.5 nA uzyskane wartości pojemności zgodne były z wartościami uzyskanymi metodą przetwarzania pojemności na częstotliwość (rozdział 10.4). Dla prądów o wartościach poniżej 0.5 nA wartości pojemności były zawyżone (rysunek 17.3).



Rys. 17.3. Wykres wyznaczonej pojemności membrany w funkcji natężenia prądu stosowanego do rejestracji krzywych chronopotencjometrycznych. Roztwór formujący: fosfatydylocholina w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0.

Główną przyczyną błędów w wyznaczaniu pojemności membrany jest niedokładność w pomiarze jej rezystancji. Przy małych natężeniach prądu w chronopotencjometrii znaczna część prądu przepływa przez membranę w postaci

prądu rezystancyjnego. Mała niedokładność w wyznaczeniu rezystancji membrany powoduje duże błędy w obliczeniach prądu pojemnościowego. Rezystancję membrany wyznaczano również na podstawie krzywych chronopotencjometrycznych rejestrowanych dla prądów o małych natężeniach (Rys. 17.1, krzywa a). Odczytywano potencjał, który się ustalił i na podstawie równania 17.1 obliczano rezystancję membrany. Przy tym sposobie wyznaczania rezystancji membrany dla prądów o małych natężeniach również występowały duże błędy w pomiarach pojemności. Wyznaczona wartość pojemności przy obu metodach pomiaru rezystancji membrany była zawyżona.

Równanie 17.2 może być podstawą do obliczania jednocześnie kilku parametrów membrany na podstawie krzywej chronopotencjometrycznej. Pojemność membrany zależna jest od aktualnego potencjału polaryzującego:

$$C = C_0(1 + \alpha U^2) \quad (17.6)$$

Pojemność C_0 jest pojemnością membrany przy potencjale polaryzującym równym 0, natomiast parametr α określa podatność membrany na zmiany pojemności pod wpływem polaryzacji. Uwzględniając równanie 17.6 oraz prąd rezystancyjny, który zależy od rezystancji membrany i aktualnego potencjału, równanie 17.2 przyjmuje postać:

$$\frac{dU}{dt} = \frac{i - \frac{U}{R}}{C_0(1 + \alpha U^2)} \quad (17.7)$$

Otrzymaliśmy równanie różniczkowe opisujące krzywą chronopotencjometryczną, uwzględniające pojemność początkową membrany C_0 , rezystancję membrany R i podatność pojemności membrany na polaryzację napięciową α . Równanie to jest spełnione wtedy, gdy rezystancja membrany jest stała i pojemność membrany jest funkcją kwadratową potencjału polaryzującego. W membranach, które były dotychczas opisywane w tej pracy, warunki te są dobrze spełnione do potencjałów 100 mV. Po rozwiązaniu równania różniczkowego 17.7 otrzymuje się dość złożone równanie:

$$(C_0 R + i^2 R^3 C_0 \alpha) \ln|iR + U| + \frac{RC_0 \alpha}{2} U^2 - iR^2 C_0 \alpha U = t + \text{const} \quad (17.8)$$

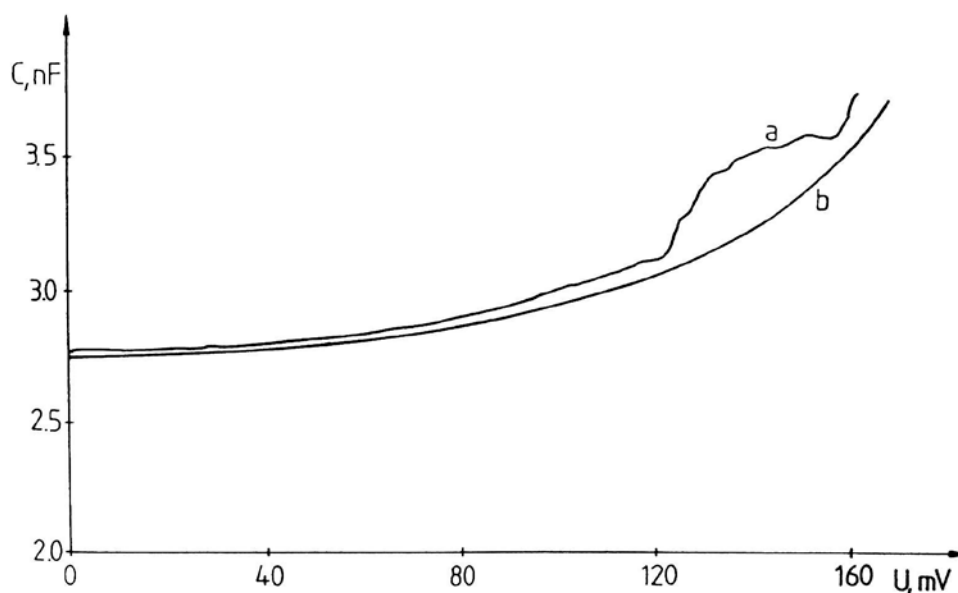
Za pomocą metody najmniejszych kwadratów, na podstawie danych eksperymentalnych (krzywych chronopotencjometrycznych), można wyznaczyć parametry równania C_0 , R i α . Jednak ze względu na złożoną postać równania i równie złożone jego pochodne cząstkowe dalsze obliczenia nie były kontynuowane.

Mogą stanowić jednak punkt wyjścia do dalszych badań nad wykorzystaniem chronopotencjometrii do wyznaczania kilku parametrów membrany jednocześnie. Zagadnienie to byłoby interesujące z punktu widzenia biosensorów, gdzie jednoczesny pomiar kilku parametrów, umożliwiający uzyskanie wyższej czułości i selektywności pomiarów byłby bardzo pożądany.

17.2. Charakterystyki pojemność-napięcie

Podczas rejestracji krzywych chronopotencjometrycznych zmienia się napięcie na membranie. Dla każdego punktu na krzywej możliwe jest obliczenie pojemności membrany. Poprzez połączenie tych dwóch parametrów można dla membrany wyznaczyć charakterystyki pojemność-napięcie (rozdział 15.3).

Na rysunku 17.4 przedstawiono charakterystyki C-U uzyskane dwiema metodami. Krzywa z rysunku 17.4,a uzyskana została z krzywej chronopotencjometrycznej zarejestrowanej dla prądu o natężeniu 0.8 nA. Dla porównania, na rysunku 17.4,b przedstawiono krzywą zarejestrowaną dla tej samej membrany, stosując metodę przetwarzania pojemności na okres. Krzywe różnią się między sobą. Podobny przebieg mają jedynie do potencjałów ok. 120 mV.



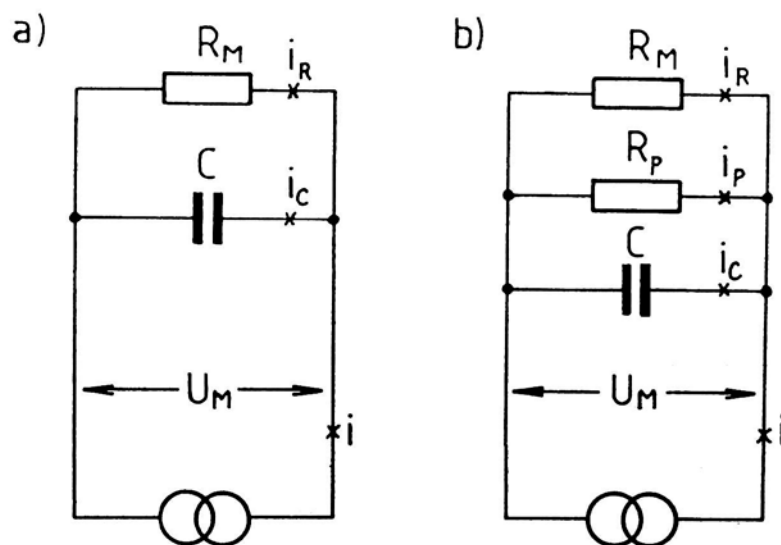
Rys. 17.4. Wykres pojemności membrany w funkcji napięcia pomiędzy elektrodami, a) wyznaczony na podstawie krzywej chronopotencjometrycznej przy natężeniu prądu 0.8 nA, b) krzywa zarejestrowana przy pomocy metody przetwarzania pojemności na okres. Roztwór formujący: fosfatylocholina w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0.

Różnice w przebiegu krzywych wynikać mogą ze znacznej różnicy w natężeniach prądu przepływających przez membranę. Krzywa chronopotencjometryczna rejestrowana była przy prądzie o natężeniu 0.8 nA, natomiast przy rejestracji charakterystyki C-U metodą przetwarzania pojemności na okres, natężenie prądu ładującego i rozładowującego membranę wynosiło 0.5 μ A. W natężeniach prądów jest różnica trzech rzędów wielkości. Przy natężeniach prądu rzędu nanoamperów, niewielkie nieregularne przecieki prądu przez membranę powodują zniekształcenia krzywych C-U.

17.3. Badania odwracalnego przebicia membran

Zjawisko indukowania porów w membranach pod wpływem napięcia przyłożonego do membrany jest interesujące z punktu widzenia biologii i inżynierii genetycznej. Wykorzystywane jest już praktycznie do wprowadzania obcych cząsteczek do wnętrza komórek np. DNA, umożliwia wypływ cytoplazmy z komórki bez jej zniszczenia, pozwala na fuzję komórek [152-153]. W badaniach elektroporacji membran stosowane są przede wszystkim techniki impulsowe. Dobór wartości napięcia i czasu trwania impulsu pozwala na uzyskanie warunków, przy których uzyskuje się odwracalne przebicie membran. Po zaniku impulsu indukującego powstanie porów, pory zasklepiają się i następuje odtworzenie ciągłej struktury membrany.

Przeprowadzone badania wykazały, że w warunkach chronopotencjometrycznych możliwe jest uzyskanie stanu, w którym w membranie istnieją cyklicznie otwierające i zamykające się pory (krzywa b na rys. 17.1). Otwieranie i zamykanie się porów powoduje zmiany przewodnictwa membrany, a przez to zmiany potencjału. W badaniach elektroporacji membran powstaje wiele pytań np. jakie jest przewodnictwo i wielkość powstających porów, czy pory zamykają się całkowicie czy tylko częściowo, jaka jest szybkość otwierania i zamykania się porów?



Rys. 17.5. Zastępczy schemat elektryczny dwuwarstwowej membrany lipidowej, a) bez obecności porów, b) z porami. C - pojemność membrany, R_M - rezystancja membrany, R_p - rezystancja porów, i - natężenie prądu płynącego przez elektrody, i_C , i_R , i_p - natężenia prądu pojemnościowego, prądu rezystancyjnego i prądu porów, U_M - napięcie na membranie.

Gdy w membranie nie ma porów, pod względem elektrycznym można potraktować ją jako równoległe połączenie kondensatora i rezystora (Rys. 17.5a). Gdy w membranie powstają pory, należy dodatkowo uwzględnić ich rezystancję (Rys. 17.5b). Dla membrany zawierającej pory można zapisać bilans prądów płynących w układzie:

$$i = i_C + i_R + i_p \quad (17.9)$$

Powstanie poru pod wpływem napięcia elektrycznego powoduje zmniejszenie rezystancji membrany. Membrana rozładowuje się. Szybkość zmian napięcia na membranie podczas rozładowania (V_p) zależy od pojemności membrany (C) i natężenia prądu rozładowującego pojemność (i_C):

$$V_p = \frac{i_C}{C} \quad (17.10)$$

Poprzez przekształcenie równania 17.9 uzyskuje się równanie opisujące natężenie prądu płynącego przez pory. Po połączeniu przekształconego równania 17.10 uzyskuje się równanie, na podstawie którego możliwe jest określenie natężenia prądu płynącego przez elektrycznie indukowane pory:

$$i_p = i - i_R - V_p \cdot C \quad (17.11)$$

Pojemność membrany wyznaczana jest na podstawie równania 17.3. Wstawiając to równanie do równania 17.11 można wyeliminować etap obliczania pojemności membrany:

$$i_p = i - i_R - \frac{V_p}{V} \cdot (i - i_R) \quad (17.12)$$

Równanie 17.12 po przekształceniu równanie przyjmuje postać:

$$i_p = (i - i_R) \cdot \left(1 - \frac{V_p}{V}\right) \quad (17.13)$$

Przewodnictwo powstałych porów (G_p) oblicza się dzieląc natężenie prądu i_p przez napięcie U_M , które w danej chwili jest na membranie:

$$G_p = \frac{i_p}{U_M} \quad (17.14)$$

Po połączeniu równań 17.13 i 17.14 otrzymuje się równanie:

$$G_p = \frac{1}{U_M} \cdot (i - i_R) \cdot \left(1 - \frac{V_p}{V}\right) \quad (17.15)$$

Po uwzględnieniu, że prąd rezystancyjny zależy od rezystancji membrany (R_M) i napięcia na membranie (U_M) można zapisać w postaci:

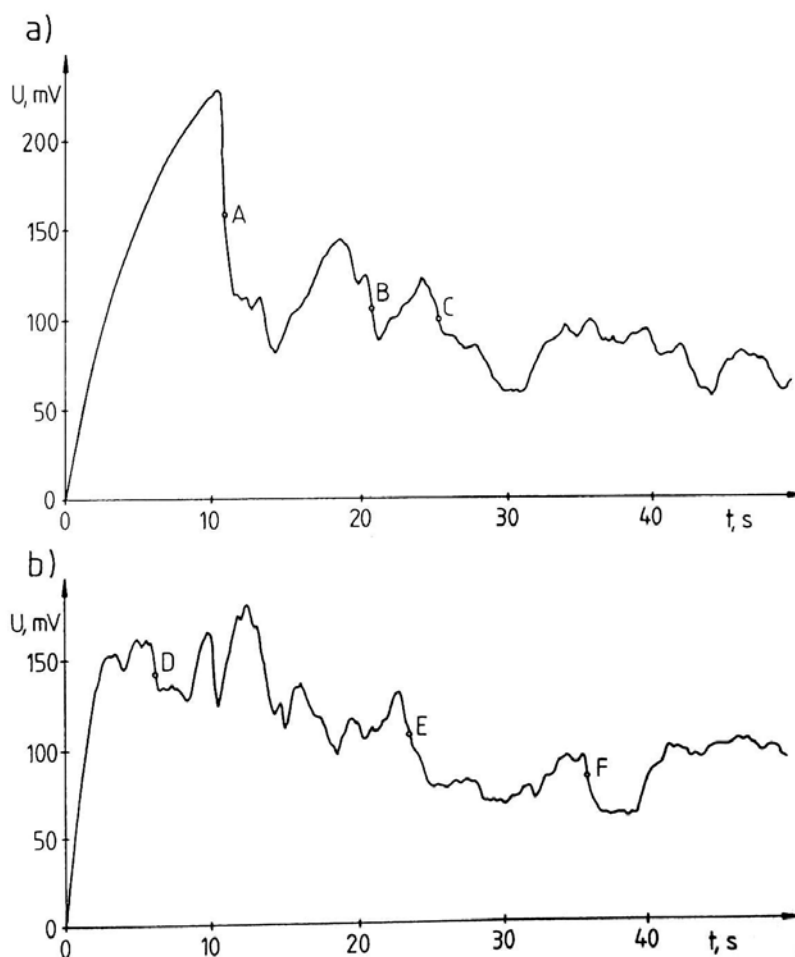
$$G_p = \left(\frac{i}{U_M} - \frac{1}{R_M}\right) \cdot \left(1 - \frac{V_p}{V}\right) \quad (17.16)$$

Równanie 17.16 stanowi podstawę do wyznaczania przewodnictwa elektrycznie indukowanych porów w membranach w warunkach chronopotencjometrycznych. Poszczególne parametry w równaniu 17.16 oznaczają:

- i - natężenie prądu przepływającego przez elektrody,
- U_M - napięcie na membranie, przy którym wyznaczane jest przewodnictwo poru,
- R_M - rezystancja membrany bez obecności porów,
- V_p - szybkość zmian napięcia na membranie po utworzeniu się poru,
- V - szybkość zmian napięcia na membranie przy napięciu U_M bez obecności porów, wyznaczana na podstawie początkowej części krzywej chronopotencjometrycznej.

Na rysunku 17.6 przedstawione są dwie krzywe chronopotencjometryczne zarejestrowane dla jednej membrany przy prądach o natężeniu 0.2 i 0.3 nA. Rejestrację rozpoczynano od najmniejszego natężenia prądu. Przy pierwszej

rejestracji krzywej w początkowym momencie następował wzrost potencjału do wartości, przy której następowało przebicie membrany. Po zarejestrowaniu krzywej przy prądzie 0.2 nA przez 50 s, po ok. 10 s rozpoczynano rejestrację następnej krzywej przy większym natężeniu prądu. Na rysunku zaznaczone są punkty, dla których wyznaczone zostało przewodnictwo powstających porów. Wybrane zostały punkty, gdzie spadek potencjału jest najszybszy, a tym samym pory są największe. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 17.1. Rezystancję membrany wyznaczono na podstawie wcześniej zarejestrowanej krzywej chronowoltamperometrycznej w zakresie potencjałów 0-120 mV. Wynosiła ona 5.2 G Ω .



Rys. 17.6. Krzywe chronopotencjometryczne membrany ulegającej odwracalnemu przebicciu elektrycznemu. Natężenie prądu: a) 0.2 nA, b) 0.3 nA. Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 0.1M CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.0. Na rysunkach zaznaczone są punkty A-F, dla których wyznaczone zostało przewodnictwo powstających porów. Wyniki przedstawione są w tabeli 17.1.

Znając przewodnictwo porów w membranie można próbować wyznaczyć efektywne pole powierzchni indukowanych porów. Wstępnie zostały poczynione uproszczone założenia, że pory przyjmują kształt cylindryczny i są wypełnione elektrolitem o takim samym przewodnictwie, jak w głębi roztworu. Nie uwzględniano oddziaływania jonów z polarnymi grupami lipidów tworzących wewnętrzną powierzchnię porów. Nie uwzględniono również zmian temperatury elektrolitu wewnątrz porów, nagrzewającego się w wyniku przepływu prądu oraz niejednorodności pola elektrycznego w warstwie elektrolitu przylegającego do porów. Na podstawie danych z rozdziału 15.2, do obliczeń przyjęto całkowitą grubość membrany równą 7 nm. Dla najmniejszej i największej wartości przewodnictwa porów z tabeli 17.1 obliczone wartości efektywnego pola powierzchni porów wynoszą $2.24 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2$ i $3.54 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2$. Jeżeli przyjmą, że jest to pojedynczy por o cylindrycznym kształcie, miałby on średnicę odpowiednio 5.3 i 6.7 nm. Są to wartości zbliżone do grubości membrany. Pory uzyskiwane za pomocą technik impulsowych posiadają zwykle średnice od jednego do kilku nanometrów [152-153,237]. Zaprezentowane dane dają więc pewność, że w warunkach chronopotencjometrycznych uzyskuje się w membranie pojedynczy por, cyklicznie otwierający się i zamykający.

Tab. 17.1. Przewodnictwo porów powstających w dwuwarstwowej membranie lipidowej w warunkach chronopotencjometrycznych (Rys. 17.6). Roztwór formujący: azolektyna w dekanie 20mg/ml. Elektrolit: 0.1 M KCl, 0.1M CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.0.

Punkt	Natężenie prądu i [nA]	Napięcie U_M [V]	Szybkość zmian nap. V_d [mV/s]	Szybkość zmian nap. V [mV/s]	Przewodn. porów G_p [nS]
A	0.2	0.146	-91.7	20.2	6.52
B	0.2	0.112	-61.1	26.3	5.30
C	0.2	0.103	-39.9	29.4	4.12
D	0.3	0.144	-67.0	30.2	6.09
E	0.3	0.108	-33.1	53.9	4.17
F	0.3	0.084	-50.7	64.1	6.05

Przeprowadzenie analizy Fouriera krzywych chronopotencjometrycznych umożliwi uzyskanie widma częstotliwościowego oscylacji napięcia na membranie. Pozwoli to na analizę właściwości elektromechanicznych membrany. Zjawisko to nie

było jednak dalej badane ze względu na niezgodność z tematem pracy. Jest ono również interesujące z punktu analityki chemicznej. Czujniki wykorzystujące opisywane zjawisko mogą okazać się bardzo czułymi instrumentami analitycznymi. Porowate filtry impregnowane lipidami wykazują w warunkach stałoprądowych oscylacje, których częstotliwość i amplituda zależy od bardzo małych ilości aktywnych substancji obecnych w roztworze wodnym. Były one prezentowane w literaturze jako czujniki zapachu [211].

Na podstawie analizy wielu krzywych chronopotencjometrycznych można stwierdzić jeszcze kolejne interesujące zjawisko. Na jednej membranie rejestrowano kilka krzywych chronopotencjometrycznych przy coraz większym natężeniu prądu. Na każdej krzywej, w początkowej jej części obserwowano się duży wzrost potencjału, do wartości, przy której następowało przebicie membrany (powyżej 200 mV). Następnie potencjał spadał i oscylował przy potencjałach rzędu 100 mV. Zwykle początkowy wzrost potencjału był tylko na pierwszej krzywej chronopotencjometrycznej (Rys. 17.6,a). Przy następnych krzywych potencjał wzrastał tylko do wartości, przy których występowały oscylacje (Rys. 17.6,b). Obserwacja ta prowadzi do wniosku, że pomimo zatrzymania przepływu prądu przez membranę, jej ciągła struktura nie ulega odtworzeniu. W miejscach, w których były pory, struktura membrany została na trwałe zakłócona i ponowny przepływ prądu i wzrost potencjału otwierał pory już przy niższych wartościach potencjału. Zanotowane przeze mnie spostrzeżenia mogą być zachętą do dalszych badań, w których chronopotencjometrię można wykorzystać przy badaniach zmian struktury i powstawania defektów w membranach pod wpływem napięcia. Technika ta pozwala na proste badania czynników ułatwiających odtwarzanie się ciągłej struktury błon komórkowych, które poddawane są elektroporacji w celu elektrofuzji lub elektroiniekcji.

18. Podsumowanie

Dwuwarstwowe membrany lipidowe wykorzystywane są szeroko jako modele błon biologicznych. Stanowią również interesujący obiekt ze względu na możliwość wykorzystania ich w biosensorach, jako nośnika enzymów izolowanych z błon biologicznych. Najprostszą metodą tworzenia takich membran jest metoda Muellera-Rudina, jednak uzyskane w ten sposób błony mogą zawierać wewnątrz dwuwarstwy rozpuszczalnik, zwiększający ich grubość. Przyłożenie do nich napięcia powoduje

duże zmiany pojemności, dochodzące do kilkudziesięciu procent, związane głównie ze zmniejszaniem się ich grubości. Zjawisko to jest w wielu przypadkach bardzo niekorzystne, jednak w pewnych sytuacjach jego obecność jest dużą zaletą takich membran.

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania pomiarów pojemności membran w badaniach zjawisk membranowych. Zagadnienie to potraktowane zostało w pracy dość szeroko. Podstawowym zagadnieniem pracy była analiza mechanizmu zmian pojemności i zmian struktury membrany pod wpływem potencjału. Pojemność wykorzystywana była również jako parametr umożliwiający obserwację procesu formowania się membran. W pracy przedstawione zostały możliwości i ograniczenia wykorzystania chronopotencjometrii w badaniach pojemności membran. Przedstawione zostały również możliwości zastosowania chronopotencjometrii w badaniach elektroporacji membran, gdzie zmiany pojemności pod wpływem napięcia są czynnikiem utrudniającym badania i występuje konieczność eliminacji tego efektu podczas analizy wyników.

Membrany wykorzystywane w badaniach tworzone były metodą Muellera-Rudina. Proces formowania membran śledzony był poprzez rejestrację ich pojemności. Do sporządzania roztworów formujących były wykorzystywane węglowodory od n-heksanu do n-dekanu. Spośród tych rozpuszczalników najkorzystniejsze było stosowanie n-dekanu. Utworzone membrany były stosunkowo trwałe i stabilne. Badany był także proces formowania membran z dodatkiem alkoholu do roztworu formującego. Stosowano propanol, izopropanol, butanol i izobutanol. Proces tworzenia się dwuwarstw w obecności alkoholu przebiegał znacznie szybciej i stabilność uformowanych membran była wyższa. Dodatkowy składnik w membranach taki jak alkohol w wielu wypadkach wyklucza stosowanie takich membran jako modeli błon biologicznych, jednak mogą być one wykorzystywane przy konstruowaniu biosensorów, gdzie istotną cechą jest reakcja układu na określony czynnik zewnętrzny.

Rodzaj i czystość stosowanych lipidów również wpływa na przebieg procesu formowania. Najmniej stabilne membrany tworzyły się, gdy stosowano lecytynę o czystości 99%. Z lecytyn o czystości 60% tworzyły się membrany bardziej stabilne. Trwałe membrany tworzyły się z azolektyny, której głównymi składnikami jest fosfatydylocholina, kefaliny i inozytol. Stabilne i trwałe membrany tworzyły się z lecytyny z dodatkiem cholesterolu (10-30%), jednak wydłużeniu ulegał etap tworzenia się dwuwarstwy.

Rodzaj i stężenie elektrolitu podstawowego nie zmienia w istotny sposób procesu formowania membran. Do badań wykorzystywane były roztwory jonów K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Br^- i J^- . Przy stosowaniu roztworu KJ o stężeniu 0.1M jako elektrolitu podstawowego uzyskuje się membrany o rezystancji około 1000 razy mniejszej, niż przy roztworach KCl. Przebieg procesu formowania nie ulega jednak wyraźnym zmianom. Do badań wykorzystano również pochodne fenotiazyny, posiadające duże znaczenie w medycynie jako neuroleptyki - posiadają one właściwości lipofilowe i zmieniają płynność membran. Badania prowadzono przy stężeniach fenotiazyn $1-5 \cdot 10^{-4}M$ (promazyna, chloropromazyna, tiorydazyna). Powodują one destabilizację procesu formowania. Utworzone membrany posiadają małą pojemność, zmniejszoną rezystancję i ulegają przebiciu przy niższych napięciach.

Nieodłącznym elementem towarzyszącym płaskim membranom lipidowym jest obrzeże Plateau-Gibbsa - pierścień z roztworu formującego, łączący dwuwarstwę z krawędzią otworu, w którym membrana jest tworzona. Analizując literaturę można stwierdzić, że obecność obrzeża i jego właściwości są ignorowane przez większość osób zajmujących się badaniami płaskich membran lipidowych. Jedynie niektórzy doceniają jego znaczenie i wpływ na właściwości pozostającej z nim w równowadze dwuwarstwy. Przeprowadzone badania wykazały, że pojemność specyficzna tworzonych membran zależy od wielkości obrzeża Plateau-Gibbsa. Jako wielkość opisującą parametry geometryczne obrzeża i membrany przyjęty został stosunek pola powierzchni dwuwarstwy do pola powierzchni otworu S_D/S_O . Dla membran tworzonych z lecytyny, przy dwuwarstwie zajmującej 70% pola powierzchni otworu, pojemność specyficzna wynosi około $0.28 \mu F/cm^2$, natomiast przy 20% około $0.38 \mu F/cm^2$. Zbadana została również pojemność specyficzna membran tworzonych z mieszaniny lecytyny i cholesterolu, a także membran formowanych w obecności pochodnych fenotiazyny. Pojemności specyficzne tych membran są niższe niż membran z samej lecytyny. Obniżenie pojemności specyficznej jest jednak tylko pozorne, ponieważ średnie pole powierzchni tych membran jest wyższe niż membran z samej lecytyny. Przy analizie pojemności specyficznej membran przy tym samym polu powierzchni okazuje się, że dla membran tworzonych z dodatkiem cholesterolu pojemność specyficzna jest wyższa. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że przy badaniu czynników wpływających na pojemność specyficzną konieczne jest porównywanie membran posiadających to samo pole powierzchni.

Pojemność membran wzrasta pod wpływem przyłożonego do nich napięcia. Zmiany pojemności membran pod wpływem potencjału są odwracalne.

Spowodowane są zwiększaniem się ich pojemności specyficznej i wzrostem pola powierzchni dwuwarstwy, kosztem zmniejszania się pola powierzchni zajmowanego przez obrzeże. Przyrost pola powierzchni wynosił od 3.1 do 7.0%. Mniejsze zmiany były dla dwuwarstw o większym początkowym polu powierzchni (79.6%), natomiast większe dla mniejszego początkowego pola (52.7%). Polaryzacja napięciowa membran powoduje asymetryczny rozkład potencjałów w membranie i w obrzeżu. Zmiany napięcia międzyfazowego obrzeża i dwuwarstwy na granicy z fazą wodną mogą być asymetryczne. Nie stwierdzono jednak zauważalnego wybrzuszenia membrany, mogącego powodować dodatkowy wzrost pola powierzchni dwuwarstwy.

Na podstawie pomiarów pojemności specyficznej obliczone zostały grubości warstwy hydrofobowej membran przy różnych napięciach. Dla membran tworzonych z mieszaniny lecytyny z cholesterolem o składzie 7:3, grubość przy napięciu 0 wynosiła 5.8 nm. Grubość ta malała do wartości 5.2 nm przy 100 mV i 4.3 nm przy 200 mV. Przy potencjale polaryzującym 0 średnia wartość pojemności specyficznej tych membran wynosiła $0.334 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Rozrzut wartości pojemności wynosił $0.021 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Po przyłożeniu potencjału 200 mV średnia wartość pojemności specyficznej wzrosła do $0.453 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, a przy tym rozrzut wartości pojemności specyficznej zmniejszył się 4-krotnie.

Przeprowadzono badania kinetyki zmian pojemności pod wpływem potencjału polaryzującego. Potencjał polaryzujący zmieniany był skokowo. Zaobserwowano dwa wyraźne etapy na zarejestrowanych krzywych pojemności. Zmiana potencjału polaryzującego membranę powoduje początkowo szybką zmianę pojemności (w czasie poniżej 0.1 s), po czym następuje etap powolnego jej stabilizowania się. Przeprowadzona została analiza szybkości zmian pojemności przy skokowej zmianie potencjału z wartości 0 na wartości do 200 mV i z tych wartości na 0. Różnice w szybkościach zmian występują przede wszystkim w początkowym czasie po zmianie potencjału, poniżej 0.1 s. Przeprowadzono rozważania możliwych zjawisk zachodzących w membranie przy jej polaryzacji. Zmiana pojemności membrany może zachodzić w wyniku elektrokompresji, gdy różnica potencjałów na powierzchniach warstwy hydrofobowej powoduje powstanie ciśnienia ściskającego tą warstwę i wypychanie obecnego w niej rozpuszczalnika poza obręb dwuwarstwy (0.1 atm przy napięciu 150 mV). Przy zmianie grubości membrany o 1 nm z wnętrza membrany usuwane jest około $0.35 \cdot 10^{-15}$ g rozpuszczalnika. Zwrócono również uwagę na możliwości zmiany napięcia powierzchniowego obrzeża w wyniku zmian potencjałów na granicach faz roztwór wodny 1 - obrzeże i obrzeże - roztwór wodny

2. Zmiany napięcia międzyfazowego obrzeża mogą powodować zmiany jego kształtu i siły wysysającej rozpuszczalnik z wnętrza membran - zmienia się równowaga dystrybucji rozpuszczalnika pomiędzy dwuwarstwą i obrzeżem. Zmiana kształtu obrzeża wymaga przemieszczenia około 10^{-3} g roztworu wewnątrz obrzeża. Przy tych dwóch zjawiskach - elektrokompresji i zmianach napięcia międzyfazowego obrzeża, ilości przemieszczanej masy różnią się ponad dziesięć rzędów wielkości. Należy się więc spodziewać dużych różnic w szybkościach obu efektów, efekt szybki - elektrokompresja, efekt wolny - zmiany kształtu obrzeża.

Przeprowadzone zostały badania potencjału, przy którym pojemność membran przyjmuje wartość minimalną. Przy cyklicznym polaryzowaniu membran liniowo zmieniającym się potencjałem występują przesunięcia potencjału minimalnej pojemności. Wartość tego przesunięcia zależna jest od szybkości polaryzacji. Ekstrapolacja do zerowej wartości szybkości polaryzacji daje wartość potencjału minimalnej pojemności -10 mV. Przy szybkości polaryzacji 100 mV/s potencjał minimalnej pojemności wynosi około 40 mV. Wartość ta jest uzyskana dla potencjału startu 100 mV. Potencjał minimalnej pojemności zależny jest również od amplitudy potencjału polaryzującego. Przy amplitudzie potencjału polaryzującego powyżej 100 mV, wartość przesunięcia potencjału minimalnej pojemności przyjmuje maksymalną wartość kilkunastu miliwoltów i w małym stopniu zależy od dalszego wzrostu amplitudy. Wartość tego przesunięcia w małym stopniu zależy od składu i stężenia roztworu elektrolitu. Przesunięcie to wzrasta dwukrotnie, gdy membrana formowana jest z dodatkiem fosfatydyloseryny - lipidu o ujemnym ładunku elektrycznym. Zjawisko powstawania histerezy potencjału minimalnej pojemności przy cyklicznym polaryzowaniu membran można wiązać ze zmianami konformacji grup polarnych lipidów - hydrofilowych "głów" i wiązań estrowych. Przyłożenie zewnętrznego potencjału wskutek oddziaływań elektrostatycznych powoduje zmiany położenia grup polarnych, które jednak nie wracają do położenia pierwotnego przy powrocie potencjału polaryzującego do wartości zerowej.

Przeprowadzona została analiza możliwości wykorzystania chronopotencjometrii w badaniach pojemności membran. Przy wyznaczaniu pojemności należy brać pod uwagę rezystancję membran. Zbyt małe prądy stosowane w chronopotencjometrii mogą powodować powstawanie dużych błędów pomiarowych, pomimo uwzględniania w obliczeniach rezystancji membrany. Dla badanych membran zadowalające wyniki uzyskiwano dla prądów powyżej 0.6 nA.

Podczas badań membran w warunkach chronopotencjometrycznych stwierdzono, że przy odpowiednio dobranym natężeniu prądu, membrany ulegają

odwracalnemu przebiciu elektrycznemu. W membranie tworzy się pojedynczy por, który w zależności od warunków może być ciągle otwarty lub może cyklicznie otwierać się i zamykać. Na podstawie przewodnictwa membrany określono, że powstające pory posiadają maksymalne efektywne średnice rzędu 4-6.5 nm, a więc zbliżone do grubości membrany.

Dwuwarstwowe membrany lipidowe pomimo tak dużych potencjalnych możliwości ich zastosowania są jeszcze zbyt mało wykorzystywane. Przeprowadzenie badań zaprezentowanych w tej pracy wymagało w pierwszym rzędzie stworzenia zaplecza badawczego, które by umożliwiło ich wykonanie. Konieczna była budowa aparatury, która w prosty i wydajny sposób pozwoliłaby na badania pojemności membran z narzuconym potencjałem polaryzującym, a także na badania membran z wykorzystaniem klasycznych technik elektroanalitycznych. Podczas badań pożądane było przeprowadzanie wielu różnego rodzaju pomiarów na jednej membranie (bardzo nietrwałej). Przy projektowaniu układów pomiarowych trzeba było zwrócić szczególną uwagę na możliwość pojawiania się na elektrodach krótkotrwałych przepięć podczas przełączania rodzaju pracy i równoważenia się układów elektronicznych. Nawet bardzo krótki impuls o czasie trwania rzędu mikrosekund i wartości kilkuset miliwoltów niszczy membranę.

Do pomiarów pojemności zostały zaprojektowane i wykonane dwa układy, oparte na bazie przetwarzania pojemności na częstotliwość, jeden prosty - 2-elektrodowy przetwornik i drugi, bardziej złożony - 4-elektrodowy. Parametry przetworników zostały tak dobrane, że wyeliminowana została konieczność kompensacji lub uwzględniania podczas obliczeń rezystancji membrany, natomiast praca w układzie 4-elektrodowym zminimalizowała błędy pomiarowe związane z rezystancją elektrod i elektrolitów. Do pomiarów elektrochemicznych w warunkach kontrolowanego potencjału lub prądu został zaprojektowany i zbudowany 4-elektrodowy potencjostat-galwanostat.

Przy tworzeniu oprogramowania przyjąłem zasadę, że do każdej techniki pomiarowej stworzony zostanie oddzielny program, a praca w środowisku *Windows* pozwala na proste przełączanie programów. Podejście to pozwoliło na stworzenie szeregu łatwych w obsłudze, a jednocześnie wydajnych programów. Bardzo wygodnym, posiadającym duże możliwości narzędziem okazał się program, który umożliwia pomiar pojemności z zaprogramowanym przebiegiem potencjału. Otwiera on drogę do dalszych eksperymentów związanych z badaniami struktury membran.

Stworzony przy okazji tych badań system pomiarowy okazał się bardzo przydatny nie tylko przy badaniach membran lipidowych, ale również w innych

dziedzinach chemii. System ten wykorzystywany jest obecnie w kilku laboratoriach zajmujących się badaniami dotyczącymi membran lipidowych, biosensorów, fotoefektów, a także elektroanalizą (techniki przepływowo-wstrzykowe).

19. Perspektywy dalszych badań

Wyniki przedstawione w pracy stanowią dobrą podstawę do dalszych badań, gdzie pojemność wykorzystywana jest jako jeden z istotnych parametrów membran lipidowych. Wyniki te pozwalają również na uniknięcie w przyszłości błędów w interpretacji danych eksperymentalnych, gdzie czynniki zewnętrzne zmieniają parametry nie tylko samej membrany, ale i obrzeża, pozostającego w równowadze termodynamicznej z dwuwarstwą. Niektóre zagadnienia przedstawione w pracy wymagają dalszych, głębszych badań w celu ich pełnego wyjaśnienia. Podczas prowadzenia tych badań, których wspólnym elementem jest pojemność membran, zostało poczynionych wiele obserwacji, które zachęcają do kontynuowania badań w kilku kierunkach. Kierunki te można połączyć w dwie grupy, jeden - to wykorzystanie membran lipidowych przy tworzeniu czujników, drugi - badania zmian struktury membran poddawanych działaniu czynników zewnętrznych. Niżej przedstawionych jest kilka zagadnień, które chcę kontynuować po zakończeniu tej pracy:

1. Badania potencjału minimalnej pojemności w celu określenia zmian struktury membran pod wpływem potencjału polaryzującego. Prace prowadziłyby do opracowania metody badań oddziaływań substancji biologicznie aktywnych na błony biologiczne, zmieniające organizację lipidów wewnątrz membrany i zmieniające właściwości powierzchniowe membrany.
2. Opracowanie metody na bazie pomiarów pojemności, która umożliwi rejestrację w funkcji czasu kilku parametrów membrany jednocześnie: pojemność membrany, potencjał minimalnej pojemności, napięcie histerezy i podatność pojemności na potencjał polaryzujący. Możliwość rejestracji tych parametrów umożliwi badania zmian struktury warstwy powierzchniowej membrany, a także zmian właściwości warstwy hydrofobowej membrany. Celem tych badań byłoby wykorzystanie membran lipidowych jako czujników w analityce chemicznej, gdzie jednoczesne badanie kilku parametrów membrany pozwoli na zwiększenie selektywności i czułości.
3. Badania elektroporacji membran metodą chronopotencjometryczną, których celem byłoby poszukiwanie sposobów detekcji substancji o bardzo małych

stężeniach, adsorbujących się na powierzchni membrany. W badaniach tych użyteczna może być analiza częstotliwości otwierania i zamykania się porów metodą transformacji Fouriera. Badania te prowadzić mogą do budowy czujników naśladowujących receptory smaku i zapachu.

4. Badania elektroporacji membran metodą chronopotencjometryczną, których celem jest poszukiwanie substancji ułatwiających powstawanie porów w membranach i stabilizujących powstające pory oraz substancji ułatwiających odtwarzanie ciągłej struktury membran. Badania te prowadzone byłyby pod kątem wykorzystania uzyskanych wyników w elektroporacji błon komórkowych i fuzji komórek.
5. Wykorzystanie chronopotencjometrii do jednoczesnego wyznaczenia kilku parametrów membrany: pojemności, rezystancji i podatności pojemności membran na potencjał polaryzujący. Badania prowadzone byłyby pod kątem wykorzystania membran jako czujników w analityce chemicznej.
6. Wykorzystanie opracowanej aparatury i metodyki w badaniach podstawowych zjawisk membranowych takich jak np. adsorpcja na powierzchni i w głębi membran, zmiany ich potencjałów powierzchniowych.

20. Streszczenie

Praca dotyczy badań wpływu potencjału polaryzującego na pojemność dwuwarstwowych membran lipidowych.

W części teoretycznej omówione zostały podstawowe parametry fizykochemiczne lipidów i membran lipidowych. Przedstawione zostały czynniki wpływające na pojemność membran, metody pomiaru pojemności i zastosowanie pomiarów pojemności membran.

W części eksperymentalnej pracy przedstawiono nowy sposób i aparaturę do pomiarów pojemności dwuwarstwowych membran lipidowych. Pomiary pojemności prowadzone były w układzie 4-elektrodowym, przy wykorzystaniu metody przetwarzania pojemności na częstotliwość.

Dwuwarstwowe membrany lipidowe wykorzystane w badaniach tworzone były metodą Muellera-Rudina, opartej na zjawisku samoorganizacji lipidów. Wykorzystano pomiary pojemności do badania procesu formowania membran. Na podstawie przebiegów pojemności wyróżniono cztery charakterystyczne etapy podczas procesu formowania i opisano zjawiska zachodzące podczas tych etapów. Rejestracja pojemności podczas tworzenia się dwuwarstw umożliwiła określenie czynników wpływających na szybkość tworzenia się i stabilność membran.

Badany był wpływ różnych czynników na przebieg procesu formowania membran. Membrany formowane były przy użyciu różnych węglowodorów, stosowano dodatek alkoholi. Badany był wpływ rodzaju stosowanych lipidów na proces formowania oraz wpływ rodzaju i stężenia elektrolitu.

Badany był wpływ wielkości obrzeża na pojemność specyficzną utworzonych membran. Gdy obrzeże zajmuje większą część pola powierzchni otworu, dwuwarstwa posiada pole powierzchni mniejsze. Pojemność specyficzną utworzonych membran przyjmuje wyższą wartość, gdy obrzeże jest większe. Zmiana składu elektrolitu i roztworu formującego wpływała na pojemność specyficzną membran. Zmiany te były jednak pozorne, gdyż po zmianie składu roztworu formującego i elektrolitu uzyskiwano dwuwarstwy o innym polu powierzchni, a tym samym o innej wielkości obrzeża.

Potencjał elektryczny przyłożony do membrany powoduje wzrost jej pojemności. Wzrasta pole powierzchni dwuwarstwy kosztem zmniejszenia obszaru zajmowanego przez obrzeże. Wzrasta również pojemność specyficzną dwuwarstw. Zmniejsza się grubość membran w wyniku istnienia oddziaływań elektrostatycznych powierzchni dwuwarstwy i wywierania ciśnienia na membranę. Usuwanie rozpuszczalnika pod wpływem potencjału polaryzującego z pomiędzy monowarstw związane jest również ze zmianami napięcia powierzchniowego obrzeża, powodującego przeniesienie części rozpuszczalnika z pomiędzy monowarstw do obrzeża. Wnioski te są oparte na badaniach kinetyki zmian pojemności membran pobudzanych prostokątnymi impulsami napięciowymi.

Przy polaryzacji symetrycznych membran potencjałem liniowo zmieniającym się uzyskuje się przebieg o minimalnej wartości pojemności. Potencjał minimalnej pojemności jest przesunięty względem zera. Potencjał ten przyjmuje wartości dodatnie przy polaryzowaniu membrany od potencjałów ujemnych w kierunku potencjałów dodatnich. Przy odwrotnym kierunku polaryzacji uzyskuje się wartości ujemne. Wartość przesunięcia potencjału minimalnej pojemności zależna jest głównie od amplitudy potencjału polaryzującego. W małym stopniu zależy od składu i stężenia składników roztworu wodnego, a także od składu lipidowego membrany. Zmiany te można wyjaśnić zmianami konformacyjnymi grup polarnych lipidów i wiązań estrowych w lipidach.

Przedstawiono możliwości i ograniczenia zastosowania chronopotencjometrii w badaniach zjawisk membranowych. Przy pomiarach pojemności należy stosować odpowiednio duże natężenie prądu (dla badanych membran powyżej 0.6 nA). Przy niższych natężeniach prądu popełniany jest duży błąd w pomiarach.

Chronopotencjometria przydatna jest również w badaniach zjawiska elektroporacji. W warunkach chronopotencjometrycznych uzyskuje się w membranie pojedynczy por, który może być cały czas otwarty lub może cyklicznie otwierać się i zamykać. Elektrycznie indukowany por w warunkach chronopotencjometrycznych posiada średnicę zbliżoną do grubości membrany, t.j. kilka nanometrów.

21. Literatura

1. S.H. White, The physical nature of planar bilayer membranes. *Ion Channel Reconstitution*. Ed. C. Miller, Plenum Publishing Corporation, 1986, 3-35.
2. A.V. Babakov, L.N. Ermishkin, E.A. Liberman, *Nature*, **210** (1966) 953-955.
3. S.J. Singer, G.L. Nicholson, *Science*, **175** (1972) 720-731.
4. J.N. Israelachvili, *Biochim. Biophys. Acta*, **469** (1977) 221-225.
5. G.L. May, L.C. Wright, C.L. Lean, C.E. Mountford, *J. Magn. Reson.*, **98** (1992) 622-627.
6. R. Moss, T. Fujita, Y. Okumara, *Langmuir*, **7** (1991) 2415-2418.
7. R. Moss, R. J.M. Li, *Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 9227-9229.
8. R.B. Gennis, *Biomembranes: Molecular structure and functions*. Ed. C.R. Cantor. Springer-Verlag, New York 1989.
9. K. Dołowy, *Progr. Surface Sci.*, **15** (1984) 245-368.
10. H. Wikieł, J. Strosznajder, *Post. Biol. Komórki*, **15** (1988) 1-22.
11. A.A. Spector, M.A. Yorek, *J. Lipid Res.*, **26** (1985) 1015-1035.
12. E.R. Block, *Experim. Lung Res.*, **14** (1988) 937-958.
13. C. Djerassi, W.K. Lam, *Acc. Chem. Res.*, **24** (1991) 69-75.
14. C. Somerville, J. Browse, *Science*, **252** (1991) 80-87.
15. M.J. Berridge, *Biochem. J.*, **220** (1984) 345-360.
16. P.L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta*, **822** (1985) 267-287.
17. D. Chapman, M.T.C. Kramers, C.J. Restall, Cholesterol and biomembrane structures. *Sterols and Bile Acids*. Ed. H. Danielsson, J. Sjövall. Elsevier, Amsterdam 1985, 151-174.
18. R. Benz, D. Cros, *Biochim. Biophys. Acta*, **506** (1978) 265-280.
19. T.D. Madden, C. Vigo, K.R. Bruckdorfer, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **599** (1980) 528-537.
20. M.K. Jain, F. Ramirez, T.M. McCaffrey, P.V. Ioannou, J.F. Marecek, J. Leunissen-Bijvelt, *Biochim. Biophys. Acta*, **600** (1980) 678-688.
21. T.J. McIntosh, *Biochim. Biophys. Acta*, **513** (1978) 43-58.

22. A. Carruthers, D.L. Melchior, *Trends Biochem. Sci.*, **11** (1986) 331-335.
23. C. Ho, C.D. Stubbs, *Biophys. J.*, **63** (1992) 897-902.
24. A.R. Cossins, M. Behan, G. Jones, K. Bowler, *Biochem. Soc. Transact.*, **15** (1987) 77-81.
25. R.J. Cherry, *Biochem. Soc. Trans.*, **15** (1987) 91-93.
26. G. Benga, R.P. Holmes, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **43** (1984) 195-257.
27. D. Marsh, *Trends Biochem. Sci.*, **8** (1983) 330-333.
28. C.A. Chicken, F.J. Sharom, *Biochim. Biophys. Acta*, **774** (1984) 110-118.
29. P. Burn, *Trends Biochem. Sci.*, **13** (1988) 79-83.
30. J. Bandorowicz, S. Pikuła, *Acta Biochim. Polonica*, **40** (1993) 281-293.
31. L.I. Horváth, M. Drees, K. Beyer, M. Klingenberg, D. Marsh, *Biochemistry*, **29** (1990) 10664-10669.
32. F.M. Goni, M. Cózar, A. Alonso, A.A. Durrani, L.M. García-Segura, D.C. Lee, J. Monreal, D. Chapman, *Eur. J. Biochem.*, **174** (1988) 641-646.
33. S. Marčelja, *Biochim. Biophys. Acta*, **455** (1976) 1-7.
34. H.T. Tien, S. Carbone, E.A. Dawidowicz, *Nature*, **212** (1966) 718-719.
35. H.T. Tien, *Bilayer Lipid Membranes: Theory and Practice*. Marcel Dekker Inc., New York 1974.
36. I. Pascher, S. Sundell, *Biochim. Biophys. Acta*, **855** (1986) 68-78.
37. R.Z. Lu, J.G. Turcotte, W.H. Lin, J.M. Steim, R.H. Notter, *J. Colloid Interface Sci.*, **154** (1992) 24-34.
38. R. Moss, T. Fujita, Y. Okumara, *Langmuir*, **7** (1991) 440-441.
39. R.A. Moss, S. Bhattacharya, *J. Phys. Org. Chem.*, **5** (1992) 467-470.
40. Y. Ishikawa, T. Kunitake, *J. Macromolec. Sci. - Chem.*, **A27** (1990) 1157-1166.
41. T. Kunitake, *Thin Solid Films*, **210/211** (1992) 48-50.
42. T. Nawroth, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343** (1992) 173.
43. S. Kato, T. Kunitake, *Chem. Lett.*, **2** (1991) 261-264.
44. D.G. Rhodes, S.L. Blechner, P. Yager, P.E. Schoen, *Chem. Phys. Lipids*, **49** (1988) 39-47.
45. D.G. Rhodes, A. Singh, *Chem. Phys. Lipids*, **59** (1991) 215-224.
46. K. Nakano, I. Moriguchi, N. Nakaschima, M. Takagi, *J. Mater. Sci.*, **27** (1992) 1933-1936.
47. H. Ihara, H. Hachisako, C. Hirayama, K. Yamada, *Chem. Comm.*, **17** (1992) 1244-1245.
48. N. Nakashima, K. Nakayama, M. Kunitake, O. Manabe, *Chem. Comm.*, **12** (1990) 887-888.

49. K.N. Liang, Y.Z. Hui, *Chinese J. Chem.*, **10** (1992) 396-404.
50. R.C. Waldbilling, G. Szabo, *Biochim. Biophys. Acta*, **557** (1979) 295-305.
51. J.M. Boggs, *Biochim. Biophys. Acta*, **906** (1987) 353-404.
52. X.M. Li, Y.F. Zhang, J.Z. Ni, J.W. Chen, F. Huang, *Chinese Sci. Bull.*, **37** (1992) 1088-1092.
53. D.M. Small, *J. Lipid Res.*, **25** (1984) 1490-1500.
54. A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta*, **557** (1979) 32-44.
55. D. Marsh, *Chem. Phys. Lipids*, **57** (1991) 109-120.
56. S. Marčelja, J. Wolfe, *Biochim. Biophys. Acta*, **557** (1979) 24-31.
57. J.R. Scherer, S. Kint, B.A. Bolton, G.F. Bailey, *J. Molec. Structure*, **224** (1990) 245-257.
58. A. Mellier, *Chem. Phys. Lipids*, **51** (1989) 23-29.
59. A. Mellier, A. Diaf, *Chem. Phys. Lipids*, **46** (1988) 51-56.
60. H.T. Tien, *J. Surface Sci Technol.*, **4** (1988) 1-21.
61. O. Alvarez, R. Latorre, *Biophys. J.*, **21** (1978) 1-17.
62. S.H. White, *Biophys. J.*, **23** (1978) 337-347.
63. S.H. White, T.E. Thompson, *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (1973) 7-22.
64. J.P. Dilger, R. Benz, *J. Membrane Biol.*, **85** (1985) 181-189.
65. S. Ohki, *J. Theoret. Biol.* **19** (1968) 97-115.
66. R.G. Ashcroft, K.R. Thulborn, J.R. Smith, H.G.L. Coster, W.H. Sawyer, *Biochim. Biophys. Acta*, **602** (1980) 299-308.
67. D.R. Laver, J.R. Smith, H.G.L. Coster, *Biochim. Biophys. Acta*, **772** (1984) 1-9.
68. J.P. Dilger, *Biochim. Biophys. Acta*, **645** (1981) 357-363.
69. R.C. Haskell, D.C. Petersen, M.W. Johnson, *Phys. Rev. E.*, **47** (1993) 439-451.
70. K.A. Fisher, S.L. Whitfield, R.E. Thomson, K.C. Yanagimoto, M.G.L. Gustafsson, J. Clarke, *Biochim. Biophys. Acta*, **1023** (1990) 325-334.
71. C.J. Bener, H.T. Tien, *Anal. Chim. Acta*, **201** (1987) 51-58.
72. V.Ya. Vodyanoi, I.Ya. Vodyanoi, N.A. Fedorovich, *Sov. Phys. - Semicond.*, **5** (1971) 604-607.
73. R. Benz, P. Lauger, K. Janko, *Biochim. Biophys. Acta*, **455** (1976) 701-720.
74. B. Ketterer, B. Neumcke, P. Lauger, *J. Membrane Biol.*, **5** (1971) 225-245.
75. A.D. Pickar, R. Benz, *J. Membrane Biol.*, **44** (1978) 353-376.
76. D.C. Tosteson, *Federation Proceedings*, **27** (1968) 1269-1277.
77. G. Eisenman, S.M. Ciani, G. Szabo, *Federation Proc.*, **27** (1968) 1289-1304.
78. G. Szabo, G. Eisenman, S. Ciani, *J. Membrane Biol.*, **1** (1969) 346-382.

79. B.W. Urban, S.B. Hladky, D.A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta*, **602** (1980) 331-354.
80. H. Morgan, J.T. Lonsdale, G. Alder, *Biochim. Biophys. Acta*, **1021** (1990) 175-181.
81. V. De Pinto, R. Benz, C. Caggese, F. Palmieri, *Biochim. Biophys. Acta*, **987** (1989) 1-7.
82. H.A. Kolb, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **115** (1990) 51-91.
83. Y. Kobuke, M. Yamanishi, I. Hamachi, H. Kagawa, H. Ogoshi, *Chem. Comm.* **13** (1991) 895-896.
84. S. Kugimiya, T. Lazrak, M. Blanchard-Desce, J.M. Lehn, *Chem. Comm.*, **17** (1991) 1179-1182.
85. H.T. Tien, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **13** (1984) 299-316.
86. P. Krysiński, H.T. Tien, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **16** (1986) 185-191.
87. H. Yamada, H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *J. Phys. Chem.*, **97** (1993) 9548-9549.
88. H.G.L. Coster, J.R. Smith, *Biochim. Biophys. Acta*, **373** (1974) 151-164.
89. A.D. Pickar, W.D. Amos, *Biochim. Biophys. Acta*, **455** (1976) 36-55.
90. U. Zimmermann, R.G. Ashcroft, H.G.L. Coster, J.R. Smith, *Biochim. Biophys. Acta*, **469** (1977) 23-32.
91. R.G. Ashcroft, H.G.L. Coster, J.R. Smith, *Biochim. Biophys. Acta*, **469** (1977) 13-22.
92. S. McLaughlin, Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Current Topics in Membranes and Transport*. Ed. F. Bronner, A. Kleinzeller. Academic Press, New York 1977, 71-144.
93. P. Krysiński, H.T. Tien, *Progress in Surface Science*, **23** (1986) 317-412.
94. A. Bertl, E. Blumwald, R. Coronado, R. Eisenberg, G. Findlay, D. Gradmann, B. Hille, K. Köhler, H.A. Kolb, E. MacRobbie, G. Meissner, C. Miller, E. Neher, P. Palade, O. Pantoja, D. Sanders, J. Schroeder, C. Slayman, R. Spanswick, A. Walker, A. Williams, *Science*, **258** (1992) 873.
95. K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, T. Kondo, *Biophys. Chem.*, **41** (1991) 175-183.
96. T.R. Stouch, D.E. Williams, *J. Computational Chem.*, **13** (1992) 622-632.
97. O.S. Andersen, S. Feldberg, H. Nakadomari, S. Levy, S. McLaughlin, *Biophys. J.*, **21** (1978) 35-70.
98. R. Latorre, J.E. Hall, *Nature*, **264** (1976) 361-363.
99. U.J. Krull, M. Thompson, H.E. Wong, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **15** (1986) 371-382.

100. K. Gawrish, D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, R.P. Rand, N. Fuller, *Biophys. J.*, **61** (1992) 1213-1223.
101. K.A. Nałęcz, *Post. Bioch.*, **35** (1989) 437-467.
102. J. de Gier, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **27** (1992) 1-10.
103. J. Gutknecht, D.C. Tosteson, *J. General. Physiol.*, **55** (1970) 361-374.
104. H. Minami, N. Sato, M. Sugawara, Y. Umezawa, *Anal. Sci.*, **7** (1991) 853-862.
105. M.C. Goodall, *Biochim. Biophys. Acta*, **203** (1970) 28-33.
106. S. Ciani, G. Eisenman, G. Szabo, *J. Membrane Biol.*, **1** (1969) 1-36.
107. I. Ahmed, G. Krishnamoorthy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1024** (1990) 298-306.
108. A. Hochapfel, H. Hasmonay, M. Jaffrain, P. Peretti, *Thin Solid Films*, **221** (1992) 292-297.
109. A. Ring, *Biochim. Biophys. Acta*, **856** (1986) 646-653.
110. H. Monoi, *J. Theoret. Biol.*, **102** (1983) 69-99.
111. H. Monoi, *Biophys. J.*, **59** (1991) 786-794.
112. T. Hianik, V.I. Passechnik, F. Paltauf, A. Hermetter, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **34** (1994) 61-68.
113. V. Brumfeld, I.R. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **1024** (1990) 49-53.
114. F.M. Menger, Ion transport through lipid bilayers containing synthetic channel-forming compounds. *Frontiers in supramolecular organic chemistry and photochemistry*. Ed. H.J. Schneider, H. Dürr. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1991. pp 193-201.
115. Y. Kobuke, K. Ueda, M. Sokabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 7618-7622.
116. G.G. Cross, T.M. Fyles, T.D. James, M. Zojaji, *Synlett.*, **7** (1993) 449-460.
117. R.J. Clarke, *Biophys. Chem.*, **46** (1993) 131-143.
118. O. Alvarez, M. Brodwick, R. Latorre, A. McLaughlin, S. McLaughlin, G. Szabo, *Biophys. J.*, **44** (1983) 333-342.
119. D.C. Petersen, *Biochim. Biophys. Acta*, **600** (1980) 666-677.
120. R. Fettiplace, *Biochim. Biophys. Acta*, **513** (1978) 1-10.
121. S.W. Chiu, J.A. Novotny, E. Jakobsson, *Biophys. J.*, **64** (1993) 98-108.
122. T.H. Haines, *FEBS Letters.*, **346** (1994) 115-122.
123. R. Neubert, *Pharmazie*, **46** (1991) 442-444.
124. R.E. Wood, F.P. Wirth, H.E. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta*, **163** (1968) 171-178.
125. S. Davis, *J. Membrane Sci.*, **56** (1991) 341-358.
126. S. Phutrakul, M.N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta*, **550** (1979) 188-200.

127. S. Przystalski, Biofizyka błon. *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*, Ossolineum, Wrocław 1989. 23-41.
128. M.R. Wasilewski, *Chem. Rev.*, **92** (1992) 435-461.
129. T. Miyasaka, K. Koyama, I. Itoh, *Science*, **255** (1992) 342-344.
130. J.R. Lopez, H.T. Tien, *Biochim. Biophys. Acta*, **597** (1980) 433-444.
131. M. Mimeault, R. Carpentier, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **22** (1989) 145-158.
132. M. Schadt, *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (1973) 351-366.
133. J.I. Anzai, T. Osa, *Tetrahedron.*, **50** (1994) 4039-4070.
134. H. Fujiwara, Y. Yonezawa, *Nature*, **351** (1991) 724-726.
135. Y. Yonezawa, H. Fujiwara, T. Sato, *Thin Solid Films*, **210/211** (1992) 736-738.
136. H. Yamaguchi, H. Nakanishi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1148** (1993) 179-184.
137. H. Yamaguchi, H. Nakanishi, *Sensors Actuators*, **13-14** (1993) 376-379.
138. C.B. Wang, H.T. Tien, J.R. Lopez, Q.Y. Lin, N.B. Joshi, Q.Y. Hu, *Photobiochem. Photobiophys.*, **4** (1982) 177-184.
139. X.D. Wang, B.W. Zhang, J.W. Bai, Y. Cao, X.R. Xiao, J. Xu, *J. Phys. Chem.*, **96** (1992) 2886-2891.
140. E. Bienvenue, P. Seta, A. Hofmanova, C. Gavach, M. Momenteau, *J. Electroanal. Chem.*, **162** (1984) 275-284.
141. T.H. Tran-Thi, J.F. Lipskier, M. Simoes, S. Palacin, *Thin Solid Films*, **210/211** (1992) 150-152.
142. H. Mihara, N. Nishino, R. Hasegawa, T. Fujimoto, S. Usui, H. Ishida, K. Ohkubo, *Chem. Lett.*, **9** (1992) 1813-1816.
143. J.M. Delfino, S.L. Schreiber, F.M. Richards, *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 3458-3474.
144. H.T. Tien, N.B. Joshi, *Photobiochem. Photobiophys.*, **10** (1986) 241-251.
145. H.T. Tien, J. Kutnik, *Photobiochem. Photobiophys.*, **7** (1984) 319-329.
146. R.V. Bensasson, J.L. Garaud, S. Leach, G. Miquel, P. Seta, *Chem. Phys. Lett.*, **210** (1993) 141-148.
147. K.C. Hwang, D. Mauzerall, *Nature*, **361** (1993) 138-140.
148. T. Osa, J.I. Anzai, Photocontrol of ion permeation through membrane and membrane potential. *Inclusion aspects of membrane chemistry*. Ed. T. Osa, J.L. Atwood. Kluwer Academic Publishers 1991, 157-189.
149. C.J. Stankovic, S.H. Heinemann, S.L. Schreiber, *Biochim. Biophys. Acta*, **1061** (1991) 163-170.
150. D.C. Mauzerall, C.M. Drain, *Biophys. J.*, **63** (1992) 1544-1555.
151. C.M. Drain, D.C. Mauzerall, *Biophys. J.*, **63** (1992) 15456-1563.

152. T.Y. Tsong, *Biophys. J.*, **60** (1991) 297-306.
153. T.Y. Tsong, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **24** (1990) 271-295.
154. C. Wilhelm, M. Winterhalter, U. Zimmermann, R. Benz, *Biophys. J.*, **64** (1993) 121-128.
155. A. Barnett, J.C. Weaver, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **25** (1991) 163-182.
156. E. Tekle, R.D. Astumian, P.B. Chock, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **172** (1990) 282-287.
157. G.S. Nanda, K.P. Mishra, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **34** (1994) 129-134.
158. I. Tsoneva, T. Tomov, I. Panova, J. Doncheva, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27** (1992) 37-40.
159. H.G.L. Coster, R. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, **163** (1968) 234-239.
160. R. Benz, O. Frohlich, P. Lauger, M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta*, **394** (1975) 323-334.
161. S.H. White, *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (1973) 343-350.
162. S.H. White, *Biochim. Biophys. Acta*, **356** (1974) 8-16
163. S.H. White, *Biophys. J.*, **10** (1970) 1127-1148.
164. T. Yoshida, K. Taga, H. Okabayashi, H. Kamaya, I. Ueda, *Biochim. Biophys. Acta*, **984** (1989) 253-256.
165. J.R. Elliot, D.A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta*, **557** (1979) 259-263.
166. B. Fuks, F. Homblé, *Biophys. J.*, **66** (1994) 1404-1414.
167. R. Fettiplace, L.G.M. Gordon, S.B. Hladky, J. Requena, H.P. Zingsheim, D.A. Haydon, Techniques in the formation and examination of "black" lipid bilayer membranes. *Methods in Membrane Biology*, Vol. 4. Ed. E.D. Korn. Plenum Press, New York 1975, 1-75.
168. R. Benz, K. Janko, *Biochim. Biophys. Acta*, **445** (1976) 721-738.
169. H.G.L. Coster, R. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, **203** (1970) 17-27.
170. P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, *J. Phys. Chem.*, **67** (1963) 534-535.
171. M. Montal, P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69** (1972) 3561-3566.
172. M. Montal, *Methods in Enzymology*, **32** (1974) 545-556.
173. S.H. White, *Biochim. Biophys. Acta*, **196** (1970) 354-357.
174. D. Rosen, A.M. Sutton, *Biochim. Biophys. Acta*, **163** (1968) 226-233.
175. V.I. Passechnik, T. Hianik, V.P. Karagodin, V.E. Kagan, *Gen. Physiol. Biophys.*, **3** (1984) 475-482.
176. S. H. White, *Biophys. J.*, **36** (1981) 449-453.
177. S.H. White, *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (1973) 7-22.

178. S. Toyama, A. Nakamura, F. Toda, *Biophys. J.*, **59** (1991) 939-944.
179. P. Schoch, D.F. Sargent, R. Schwyzer, *J. Membrane Biol.*, **46** (1979) 71-89.
180. D. Sužnjević, P.A. Grigorijev, D. Vučelić, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **34** (1994) 19-24.
181. D.F. Sargent, T. Hianik, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **33** (1994) 11-18.
182. V.V. Cherny, V.S. Sokolov, I.G. Abidor, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **7** (1980) 413-420.
183. M. Brullemans, P. Tancrede, *Biophys. Chem.*, **27** (1987) 225-231.
184. M. Stelzle, E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta*, **981** (1989) 135-142.
185. W. Hanke, W.R. Schlue, *Planar lipid Bilayers: Methods and Applications*. Ed. D.B. Sattelle. Academic Press, London 1993.
186. A.N. Chanaturiya, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026** (1990) 248-250.
187. A.N. Chanturiya, H.V. Nikoloshina, *J. Membrane Biol.*, **137** (1994) 71-77.
188. E. Neher, *Biochim. Biophys. Acta*, **373** (1974) 327-336.
189. S.H. White, D.N. Blessum, *Rev. Sci. Instrum.*, **46** (1975) 1462-1466.
190. M. Miyake, I. Inoue, Y. Kobatake, *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (1973) 367-377.
191. S.W. Feldberg, G. Kissel, *J. Membrane Biol.*, **20** (1975) 269-300.
192. P. Läger, W. Lesslauer, E. Marti, J. Richter, *Biochim. Biophys. Acta*, **135** (1967) 20-32.
193. S. Takashima, R. Yantorno, R. Novack, *Biochim. Biophys. Acta*, **469** (1977) 74-88.
194. S.W. Feldberg, A.B. Delgado, *Biophys. J.*, **21** (1978) 71-86.
195. R. Benz, P. Läger *J. Membrane Biol.*, **27** (1976) 171-191.
196. P. Krysiński, *Postępy Biochem.*, **28** (1982) 227-249.
197. G.S. Margules, L.G. Davila, D.C. MacGregor, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **16** (1986) 361-370.
198. H.T. Tien, Z. Salamon, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **22** (1989) 211-218.
199. H.T. Tien, Z. Salamon, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **22** (1989) 211-218.
200. H.T. Tien, Bilayer lipid membranes (BLM) in aqueous media: biomolecular electronic devices, *Biophysics of Membrane Transport*, v. II, Ed. J Kuczera, S. Przystalski, Agricultural University, Wrocław 1988, 171-241.
201. I. Genco, A. Glizzi, A. Relini, M. Robello, E. Scales, *Biochim. Biophys. Acta*, **1149** (1993) 10-18.
202. A.E. Alexander, P. Johnson, *Colloid Science*, vol. 1. Oxford University Press, London 1949, 318-319.
203. R.P. Buck, R.W. Eldridge, *Anal. Chem.*, **37** (1965) 1243-1245.

204. Z. Samec, V. Mareček, J. Koryta, M.W. Khalil, *J. Electroanal. Chem.*, **83** (1977) 393-397.
205. L.Q. Hung, P. Vanýsek, *Chem. Listy*, **74** (1980) 869-873.
206. Z. Figaszewski, Z. Koczorowski, G. Geblewicz, *J. Electroanal. Chem.*, **139** (1982) 317-322.
207. V. Mareček, Z. Samec, *J. Electroanal. Chem.*, **185** (1985) 263-271.
208. H.T. Tien, The bilayer lipid membrane (BLM): an organic ultrathin film separating two aqueous solutions. *Winter Gordon Research Conference: Organic Thin Films*. Oxnard, California, USA. February 1988.
209. S. Iiyama, Y. Suezaki, K. Toko, T. Murata, H. Kamaya, I. Ueda, K. Yamafuji, *Biophys. Chem.*, **36** (1990) 141-147.
210. S. Iiyama, K. Toko, T. Murata, Y. Suezaki, H. Kamaya, I. Ueda, K. Yamafuji, *Biophys. Chem.*, **36** (1990) 149-154.
211. S. Iiyama, K. Toko, K. Yamafuji, *Sens. materials*, **3** (1991) 1-7.
212. S. Iiyama, K. Toko, K. Yamafuji, *Trends Phys. Chem.*, **1** (1991) 121-132.
213. P. Shen, J.T. Kim, R. Larter, K. Lipkowitz, *J. Phys. Chem.*, **97** (1993) 1571-1575.
214. K. Sugawara, H. Aoyama, Y. Sawada, K. Toko, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **62** (1993) 1143-1146.
215. N.E. Evans, *Anal. Instrum.*, **20** (1992) 257-263.
216. S. Kalinowski, Z. Figaszewski, *Biochim. Biophys. Acta*, **1112** (1992) 57-66.
217. S. Kalinowski, Z. Figaszewski, *Meas. Sci. Technol.*, **6** (1995) 1043-1049.
218. S. Kalinowski, Z. Figaszewski, *Meas. Sci. Technol.*, **6** (1995) 1050-1055.
219. A. Hulshoff, J.M. Perrin, *Pharm. Acta Helv.* **51** (1976) 65.
220. S. H. White, *Biophys. J.*, **12** (1972) 432-445.
221. D.D. Lasic, *Nature*, **351** (1991) 613.
222. D.B. Goldstein, Alcohol and cellular membranes, *Alcohol and the developing brain*, Ed. U. Rydberg, Raven Press, New York 1985, 19-26.
223. G.Y. Sun, A.Y. Sun, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **9** (1985) 164-180.
224. E.A. Dawidowicz, *Hepatology*, **5** (1985) 697-699.
225. M.M. Sarasua, K.R. Faught, S.L. Steedman, M.D. Gordin, M.K. Washington, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **13** (1989) 698-705.
226. S. Mitaku, F. Kukita, M. Kasai, Denaturation of membrane proteins: ion channel, calcium-ATPase and bacteriorhodopsin, *Protein structural analysis, folding and desinn*, Ed. M. Hatano, Japan Scientific Societes Press, Tokyo 1990, 127-139.

227. M. Luxnat, H.J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta*, **856** (1986) 274-282.
228. W.O. Kwant, P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta*, **183** (1969) 530-543.
229. M.P. Sheetz, S.J. Singer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71** (1974) 4457-4461.
230. H. Puzanowska-Tarasiewicz, M. Tarasiewicz, *Wiad. Chem.*, **37** (1983) 231-253.
231. K.E. Suckling, H.A.F. Blair, G.S. Boyd, I.F. Craig, B.R. Malcolm, *Biochim. Biophys. Acta*, **551** (1979) 10-21.
232. S.H. White, *Nature*, **262** (1976) 421-422.
233. T. Wandlowski, V. Mareček, Z. Samec, *J. Electroanal. Chem.*, **242** (1988) 277-290.
234. A. McLaughlin, C. Grathwohl, S. McLaughlin, *Biochim. Biophys. Acta*, **513** (1978) 338-357.
235. T.Ch. Tomow, I.Ch. Tsoneva, J.Ch. Doncheva, *Biosci. Rep.*, **8** (1988) 421-426.
236. I. Tsoneva, T. Tomov, I. Panova, J. Doncheva, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **27** (1992) 37-40.
237. A. Barnett, J.C. Weaver, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **25** (1991) 163-182.