



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

POKROČILÉ MEMBRÁNOVÉ SYSTÉMY

ADVANCED MEMBRANE SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alžběta Vargová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1112/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Alžběta Vargová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Pokročilé membránové systémy

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na využití mikrofluidních zařízení pro přípravu fosfolipidických mebrán a metod jejich studia.
2. Na základě rešerše navrhnout design mikrofluidního zařízení, které může být připraveno spolupracujícím pracovištěm, a složení membrány, kterou bude možno pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie.
3. Sestavení mikrofluidního zařízení, optimalizace přípravy membrány zvoleného složení a její vizualizace pomocí fluorescenční mikroskopie.
4. Shodnotit daný design zařízení a složení membrány pro budoucí studium modelových buněčných mebrán.

Termín odevzdání diplomové práce: 12.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Alžběta Vargová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá tvorbou modelové buněčné membrány na mikrofluidním zařízení. Shrnuje postupy přípravy mikrofluidních zařízení, mechanismy tvorby fosfolipidové dvojvrstvy, faktory ovlivňující tvorbu modelové membrány a metody charakterizace těchto systémů. Zaměřuje se především na volně zavěšené planární lipidové dvojvrstvy, které jsou nejlépe přístupné různým metodám charakterizace a současně vykazují dobrou stabilitu a variabilitu.

Úkolem této práce je navrhnout a připravit mikrofluidní čip, na kterém je možno připravit planární lipidovou dvojvrstvu. Představuje proto mikrofluidní zařízení připravené měkkou litografií PDMS uzpůsobené k tvorbě modelové membrány samouspořádáním fosfolipidů na rozhraní vodné a organické fáze vytvořeném díky architektuře mikrofluidního zařízení.

Tvorba modelové membrány byla vizualizovaná optickou mikroskopií a zobrazováním dob života (FLIM).

ABSTRACT

The diploma thesis deals with cellular membrane model preparation on microfluidic devices. It summarizes means of microfluidic device fabrication, phospholipid bilayer formation mechanisms, optimization techniques and characterization methods of those systems. It focuses on free-standing planar lipid bilayers which are easily accessible by a number of different characterization methods and at the same time exhibit good stability and variability.

The aim of this work is to design and prepare a microfluidic chip on which a planar lipid bilayer can be prepared.

It therefore presents microfluidic device prepared by soft lithography of PDMS adapted for model membrane formation by self-assembly of phospholipids at the interface of aqueous and organic phases created by the architecture of the microfluidic device.

Formation of the model membrane was visualized by optical microscopy and fluorescence-lifetime imaging microscopy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrofluidní čip, PDMS, měkká litografie, fosfolipidová membrána, lecitin

KEYWORDS

Microfluidic chip, PDMS, soft lithography, phospholipid membrane, lecithin

VARGOVÁ, A. *Pokročilé membránové systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování
Ráda bych poděkovala Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, moudré rady a trpělivost. Dále Ing. Janu Pekárkovi, Ph.D. za pomoc s přípravou mikrofluidního čipu. V neposlední řadě děkuji své rodině a bližním za veškerou podporu.

| | |
|---|----|
| 1 Úvod | 7 |
| 2 Teoretická část..... | 8 |
| 2.1 Buněčná membrána..... | 8 |
| 2.2 Lipidy | 10 |
| 2.2.1 Fosfolipidy | 10 |
| 2.3 Modely fosfolipidových membrán..... | 11 |
| 2.4 Mikrofluidika | 12 |
| 2.4.1 Proudění kapalin v mikrofluidice..... | 13 |
| 2.4.2 Příprava mikrofluidních zařízení..... | 14 |
| 2.5 Polydimetylsiloxane..... | 18 |
| 2.5.1 Rozpouštědla vhodná pro PDMS | 19 |
| 2.6 Optická mikroskopie | 19 |
| 2.6.1 Světelné pole | 20 |
| 2.6.2 Fluorescenční mikroskopie | 20 |
| 2.6.3 Zobrazování dob života (FLIM)..... | 21 |
| 2.7 Fluorofory | 22 |
| 3 Současný stav řešení problematiky..... | 23 |
| 3.1 Fosfolipidová dvojvrstva na čipu..... | 23 |
| 4 Experimentální část | 29 |
| 4.1 Použité chemikálie | 29 |
| 4.2 Přístrojové a softwarové vybavení..... | 30 |
| 4.3 Metody | 31 |
| 4.3.1 Návrh mikrofluidního čipu..... | 31 |
| 4.3.2 Odlévání mikrofluidního čipu | 32 |
| 4.3.3 Kompletace mikrofluidního čipu | 32 |
| 4.3.4 Příprava zásobních roztoků pufru | 32 |
| 4.3.5 Příprava roztoku pufru pro fluorescenční zobrazování | 32 |
| 4.3.6 Příprava roztoků lipidů..... | 32 |
| 4.3.7 Příprava roztoků lipidů pro fluorescenční zobrazování | 33 |
| 4.3.8 Ověření funkčnosti čipu pomocí mikroskopie | 33 |
| 4.3.9 Ověření tvorby membrány pomocí mikroskopie | 33 |
| 5 Výsledky a diskuze..... | 35 |
| 5.1 Výroba mikrofluidního čipu..... | 35 |
| 5.1.1 Odlévání čipu | 35 |
| 5.1.2 Kompletace čipu..... | 35 |
| 5.2 Zapojení zařízení..... | 36 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3 | Ověření funkčnosti čipu | 36 |
| 5.4 | Ověření tvorby membrány | 37 |
| 5.4.1 | Princip tvorby lipidové dvojvrstvy..... | 37 |
| 5.4.2 | Vliv rychlosti průtoku | 37 |
| 5.4.3 | Vliv organického rozpouštědla..... | 38 |
| 5.4.4 | Vizualizace membrány | 38 |
| 5.4.5 | Design mikrofluidního zařízení..... | 40 |
| 5.4.6 | Složení dvojvrstvy | 41 |
| 6 | Závěr..... | 42 |
| 7 | Literatura | 43 |
| 8 | Seznam použitých zkratk..... | 51 |
| 9 | Seznam příloh..... | 52 |

1 ÚVOD

Buněčná membrána, která obklopuje buňku, slouží nejen k oddělení vnitřního obsahu buňky od vnějšího prostředí, udávání tvaru a poskytování ochrany, ale navíc obsahuje velké množství aparátů, které buňka využívá ke komunikaci s okolním prostředím a pro transport. Do dnešní doby stále nejsou objasněny všechny buněčné mechanismy a pochody a je tedy přirozené, že buňka jako základní stavební kámen všech živých organismů zůstává předmětem velkého zájmu.

Živá buňka je ovšem velice složitý a všestranný systém, jehož reprodukce zůstává náročným úkolem, a proto se vývoj zaměřil na tvorbu jednodušších modelů biologických membrán na bázi fosfolipidů. Mezi konvenční modelové systémy patří buněčné kultury, lipidové vezikuly a liposomy, fosfolipidové dvojvrstvy na pevném podkladu a volně zavěšené fosfolipidové dvojvrstvy. Jako ve všech oblastech vývoje, i zde spěje pokrok k miniaturizaci a automatizaci, a proto se objevuje čím dál tím více systémů, které k tvorbě modelových buněčných membrán využívají mikrofluidní zařízení.

V těch se lipidová dvojvrstva nejčastěji tvoří samouspořádáním amfifilních molekul fosfolipidů na mezifázovém rozhraní zajištěném strukturou zařízení. Taková dvojvrstva je přístupná mnoha povrch-charakterizujícím analytickým metodám, což umožňuje zkoumání procesů, jakými jsou buněčná signalizace, receptorové interakce, enzymové reakce na povrchu, transport přes proteinové kanály a napadení patogeny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčná membrána

Buňka je základním stavebním kamenem všech živých organismů a jako taková zajišťuje řadu životně důležitých funkcí, jako jsou přeměna energie, ukládání zásobních látek, genová exprese a molekulární syntéza. Všechny živé buňky jsou ohraničeny tenkými membránami. Tyto membrány jsou pro život krajně důležité, jelikož oddělují vnitřní obsah buňky od vnějšího prostředí, udávají buňce jistý tvar a poskytují ochranu. Na rozdíl od prokaryotických buněk (bakterie a archea) mají eukaryotické buňky (tzn. houby, živočichové a rostliny) také intracelulární útvary nebo organely, které jsou odděleny membránou a slouží jako funkční jednotky (např. jádro, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, chloroplasty a další). Membrána sestává z lipidové dvojvrstvy, ve které jsou zapuštěny nebo na ni připojeny proteiny a další struktury (např. filamenta, microtubuly či peptidoglykany). To vše je udržováno nekovalentními interakcemi mezi lipidy a mezi proteiny (i navzájem), a díky hydrofobním interakcím s vodným prostředím, které je obklopuje. Buňky potřebují se svým okolím interagovat – musí získávat kyslík a živiny, udržovat osmotický tlak a zbavovat se metabolitů. Toto konstantní prostředí uvnitř buňky je zajištěno polopropustností plazmatické membrány, která selektivně kontroluje, co může a nemůže vstoupit do buňky nebo ji opustit [1].

Molekuly rozpustné v lipidech mohou do určité velikosti projít membránou přímo skrze dvojvrstvu. Některé pomocí *difúze*, která nevyžaduje žádný dodatečný přísun energie a je spontánním pohybem molekul ve směru koncentračního spádu (z oblasti vyšší koncentrace do oblasti koncentrace nižší). Difúze je ovlivňována rozsahem koncentračního gradientu a teplotou okolního prostředí. Molekuly, jako je kyslík, které mohou difundovat přes plazmatickou membránu, nevyžadují přítomnost proteinového přenašeče [1, 2].

Zprostředkovaná difúze molekul také nevyžaduje dodání energie a je to forma transportu potřebná pro velké molekuly, jako je glukóza, které přes membránu nemohou snadno difundovat [1, 2].

Osmóza je difúze vody. Přestože přechod vody přes membránu nevyžaduje dodání energie, jsou k němu zapotřebí speciální proteiny umístěné v plazmatické membráně. Těmto proteinům se říká aquaporiny a kontrolují množství vody proudící z a do buňky a tím i zajišťují osmotický tlak v buňce [1, 2].

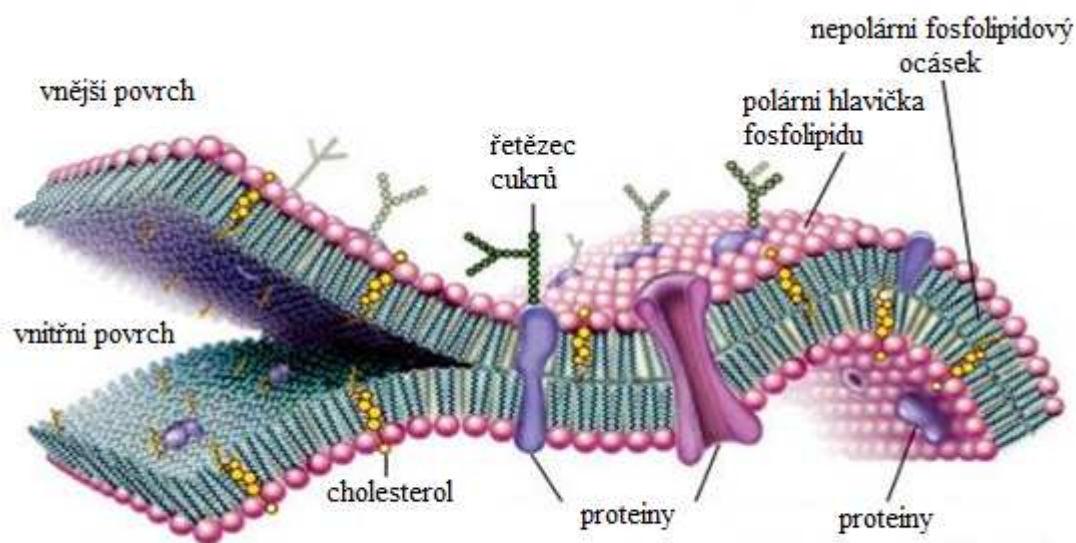
Aktivní transport na rozdíl od předchozích způsobů vyžaduje dodání energie v podobě ATP. Je to pohyb molekul proti koncentračnímu spádu (z oblasti nižší koncentrace do oblasti koncentrace vyšší). Takto musejí být transportovány například nabité ionty, pro které je membrána nepropustná. Některé transportní pumpy zdvojují transport přes membránu, jako například sodno-draselná pumpa, která přenáší draselné ionty do buňky a sodné ionty ven. Těmito pumpami jsou právě proteiny [1, 2].

Proteiny jsou sloučeniny tvořené jedním nebo více polypeptidy. Typicky jsou složené do globulární nebo fibrilární struktury. V plazmatické membráně většiny buněk se nacházejí tři hlavní typy proteinů. *Transmembránové proteiny* jsou amfifilní a prochází celou membránou. Jsou zakotveny skrze celou dvojvrstvu a umožňují průchod nepolárních molekul mezi vnitřním a vnějším prostředím. Buňka má schopnost přísně kontrolovat co přes membránu pustí úpravou exprese genů kódujících transmembránové proteiny. Takto přepsané proteiny se přemísťují na místa v membráně, kde mohou usnadnit zvýšený příjem glukózy [1, 3].

Integrální proteiny se nalézají na vnitřní straně dvojvrstvy a jsou k ní pevně připojeny. Odděleny od membrány mohou být pouze za použití detergentů [1, 3].

Periferní proteiny se naopak nalézají pouze na vnější straně dvojvrstvy. Přiléhají k membráně pouze dočasně připojením k integrálním proteinům nebo proniknutím do vrchní vrstvy membrány díky hydrofobním, elektrostatickým nebo dalším nekovalentním interakcím. Molekuly navázané na povrchu buňky identifikují specifické buňky a usnadňují interakce s látkami ve vnějším prostředí [1, 3].

Membránové proteiny zachovávají potřebný rozdíl v koncentraci elektrolytů mezi vnějším a vnitřním buněčným prostředím a vytvářejí tak na membráně elektrochemický potenciál. V membránách buněk se vyskytují i další proteiny, které nejsou tak běžné, ale stále jsou velice důležité pro fungování buňky. Proteiny pro mezibuněčnou komunikaci, receptory a rozpoznávací proteiny. Pro zachování funkčnosti proteinu po zavedení do membrány je velice důležité složení membrány a struktura lipidových molekul v membráně [2, 4].



Obr. 1: Model biologické membrány [4]

Buněčná membrána (Obr. 1) je z více jak padesáti procent tvořena fosfolipidy. Fosfolipidy jsou iontové amfifily a jako takové ve vodě agregují – dovolující hydrofilním hlavičkám tvořit vodíkové vazby s molekulami vody, zatímco hydrofobní konce mohou eliminovat většinu svého kontaktu s ní. Tvar i amfifilní charakter těchto molekul přispívá ve vodném prostředí k samovolné tvorbě lipidových dvojvrstev (takzvané samouspořádávání). Protože se ocásek fosfolipidu skládá ze dvou acylových řetězců a díky kombinovanému náboji v jejich hlavičce je upřednostňována tvorba dvojvrstevých struktur před micelami [2].

Podle Singerova a Nicolsonova modelu fluidní mozaiky (1972, *Singer and Nicolson, The fluid-mosaic model of membrane structure*), se molekuly fosfolipidu mohou pohybovat v rámci jedné strany membrány, a tím tvořit jakousi dvojdimenzionální tekutinu, ale značná energetická bariéra jim brání migrovat na druhou stranu membrány. Tato tekutost umožňuje ohebnost membrány, a tím jí napomáhá přizpůsobit se teplotním změnám [4].

Dříve se vědci domnívali, že pokud se membránové proteiny jednou zařadí na své místo, jsou zasazeny do membrány s absolutní asymetrií a zůstávají kineticky vázané na její příslušné straně po zbytek své existence – nemění již svoji orientaci mezi oběma vrstvami membrány. Novější výzkumy však ukázaly, že membránové lipidy kromě bočního pohybu (laterální difuze) vykazují v řadě membrán poměrně rychlý příčný pohyb (překlápění neboli takzvaný flip-flop). Příčná nesouměrnost naznačuje, že obě vrstvy membrány nemají stejné složení. Stejně tak důkazy o laterální nesouměrnosti biologických membrán ukazují

přítomnost oblastí s odlišnou kompozicí a funkcí (velkých, na něco specializovaných oblastí). Tyto asymetrie představují významné pozměnění Singerova a Nicolsonova modelu fluidní mozaiky, tak jak ho původně navrhovali [5].

Spolu s fosfolipidy obsahují membrány i mnoho dalších komponent. Například cholesterol, který napříč svému malému obsahu hraje důležitou roli v zachování integrity membrány (bez cholesterolu by se membrány staly příliš tekutými v teplém prostředí nebo naopak nedostatečně tekutými ve studeném prostředí) a zároveň se podílí na mezibuněčné signalizaci. Glykolipidy nacházející se výhradně na vnější straně membrány s uhlovodíkovou částí vystavenou buněčnému povrchu. Sfingolipidy, které membránu chrání před nepříznivými vlivy okolí jako jsou nízké pH či degradační enzymy. A antigeny, které slouží jako rozpoznávací molekuly, mají hlavní roli v imunitním systému a nepřeberné množství proteinů [3].

2.2 Lipidy

Lipidy jsou velkou a rozmanitou skupinou přirozeně se vyskytujících organických sloučenin, které spojuje jejich dobrá rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech a relativní nerozpustnost ve vodě. Běžně se dělí na jednoduché (acylglyceroly, vosky), složené (fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy) a isoprenoidy (terpenoidy, steroidy).

V buňkách plní stavební, zásobní a ochrannou funkci. Tvoří buněčné membrány, obaly nervových vláken, jsou důležitým zdrojem energie. Chrání vnitřní orgány před mechanickým poškozením a organizmy před ztrátou tělesné teploty. V lidském těle usnadňují vstřebávání důležitých vitamínů a podílejí se na tvorbě některých hormonů [1, 4].

2.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčných membrán. Jsou to estery nebo amidy glycerolu nebo sfingosinu s mastnými kyselinami a kyselinou fosforečnou. Fosfátová část fosfatidové kyseliny je dále esterifikovaná etanolaminem, cholinem nebo serinem v samotný fosfolipid.

Fosfolipidy obecně dělíme na glycerolfosfolipidy a sfingomyeliny (obsahují jako alkohol sfingosin) [1, 4].

Vykazují širokou variabilitu v délce, nasycení a prostorovém uspořádání alkylových řetězců stejně jako v náboji, velikosti a tvaru hlavičky. Tyto faktory, společně s teplotou, silně ovlivňují fyzikální parametry membrány jako je viskozita, permeabilita a náboj [5]. Fosfolipidy obsahující delší (>C20) nasycené řetězce mastných kyselin mají tendenci tvořit ostrůvky, kde je membrána silnější a soudržnější (lipidové ostrůvky, lipid rafts). V těchto místech je usnadněna vazba některých transmembránových proteinů a glykolipidů [6].

2.2.1.1 Lecitin

Lecitin je historicky používaný triviální název pro fosfatidylcholin, ačkoli fosfatidylcholin bývá hlavní složkou lecitinu, lecitin je surový lipidový extrakt z rostlinných pletiv nebo živočišných tkání, který obsahuje množství složek. Součástí molekuly lecitinů je glycerol, aktivovaná kyselina fosforečná, cholin a dva acylové zbytky mastných kyselin. Lecitiny mají poměrně komplikovanou strukturu a liší se v zastoupení mastných kyselin [4].

Jsou složkou vnější buněčné membrány živočichů a rostlin s významnou rolí v poskytování opory, udržování permeability a buněčné signalizaci. Využití je mnohostranné, od produkce potravin a krmiv, přes farmacii a lékařství, kosmetické přípravky až po nepotravinářské obory [1, 4].

Hojně se nachází ve vaječných žloutcích a buňkách semen rostlin. Nejčastěji je získáván ze sójových bobů [4].

2.3 Modely fosfolipidových membrán

Fosfolipidové membrány jsou všestranné struktury pro napodobování biologických membrán. Skládají se převážně z fosfolipidů a proteinů a typicky se popisují jako fosfolipidové dvojvrstvy. Přesná reprodukce buněčných systémů a jejich prostředí je neuvěřitelně složitým úkolem, který před vědce předkládá velké technologické výzvy. Je potřeba dosáhnout kontroly nad biliony molekul a zachytit vysoce komplikované prostředí, které častokrát rozhoduje o původních biologických funkcích. Tak například v jednoduché červené krvince se nachází okolo 100 druhů lipidů a ve většině plasmatických membrán je jich více jak 600 [7]. Středem zájmu většiny nově vyvíjených humánních léčiv jsou membránové proteiny, a to především iontové kanály [8], ovšem zavedení proteinu do modelové buněčné membrány při současném zachování jeho konformace mimo jeho přirozené prostředí je dalším velkým oříškem. Aby bylo možné studovat tyto složité systémy, musel značně postoupit vývoj tvorby mechanicky, chemicky a termodynamicky stabilních lipidových membrán [9].

V současnosti je zvládnutelná příprava zjednodušených modelů buněčné membrány založených na lipidové dvojvrstvě s jedním nebo více zavedenými proteiny. Klade si ovšem speciální nároky jak na povrchové vlastnosti použitých materiálů (z hlediska smáčivosti, drsnosti a rozpustnosti), vhodné rozměry zařízení a použitých struktur, tak i na biokompatibilitu a možnost ovládnutí zavedeného prostředí. Na tom všem záleží úspěšnost tvorby modelové buněčné membrány a zavedení funkčního proteinu.

První praktické modely lipidové dvojvrstvy, které poskytovaly nové prostředky a techniky pro tvorbu umělých buněčných membrán, se začaly objevovat v 60.-70. letech dvacátého století. V těchto raných experimentech byly lipidové dvojvrstvy tvořeny přes otvor v teflonové přepážce, která oddělovala dvě vodné fáze. Od té doby byly vyvinuty nejrůznější způsoby přípravy modelových fosfolipidových membrán [10].

Takzvané *roztrhání dvojvrstvy z lipidového reservoáru*, což je právě metoda, která spočívá v nanesení proteinů a lipidů na substrát přímo z roztoku detergentu pomocí štětce nebo drátu, je jednou z nejrozšířenějších metod pro tvorbu planárních lipidových dvojvrstev (PLD) [10, 11]. Další velmi rozšířenou metodou je *Langmuir-Blodgettova depozice*, které je dosaženo přenesením orientované lipidové vrstvy z rozhraní vzduch-voda na pevný podklad [12]. *A vezikulární fúze*, při které se unilamelární vezikuly adsorbují na povrch substrátu, kde prasknou a nakonec splynou, aby vytvořily samotnou spojitou fosfolipidovou dvojvrstvu. Vezikulární fúze je typicky zabezpečena povrchovou adhezní energií mezi vezikuly a substrátem [9, 13].

Po úspěšné tvorbě PLD většinou přichází na řadu zavedení membránových proteinů. Jelikož si tyto proteiny musí zachovat svoji funkci, je to kritický krok při tvorbě umělého buněčného prostředí. V nejjednodušších případech jsou alikvoty malých fusogenních peptidů [14, 15] nebo větších transmembránových proteinů [16] přidány do vodného roztoku na jedné straně PLD přičemž se proteiny během několika minut samy začlení do membrány. Větší transmembránové proteiny se už ovšem samy spolehlivě nezačlení. Jendím ze způsobů jejich začlenění je příprava proteoloposomů, které jsou také přidány do vodného roztoku na jedné straně membrány a časem na PLD přisednou a začlení se. Dalším je použití mechanické sondy, která přenesení póry či kanály přímo na umělou membránu [17].

Nejrozšířenější modelové systémy zahrnují lipidové monovrstvy, lipidové vezikuly (volné či vázané na substrát), lipidové dvojvrstvy na pevném podkladu (*supported lipid bilayers*), dvouvrstvé nanodisky obklopené membránovým nosným proteinem (MSP), fragmenty skutečných buněčných membrán a v poslední době i různá uspořádání lipidových dvojvrstev

na mikrozařizích [18]. Tato práce se dále bude zaměřovat právě na různá uspořádání mikrofluidních systémů pro tvorbu PLD. Vývoj v této oblasti směřuje k tvorbě poloautomatických, vysokokapacitních a spolehlivých metod pro použití v testování léčiv a k reprodukci a studiu buněčných mechanismů [19].

Příklady dobře popsanych platforem pro tvorbu PLD na mikrozařizích s diskusí jejich výhod i omezení budou představeny v sekci 3. Zaměří se především na volně zavěšené PLD, ale představí i PLD přilnuté přímo na substrát a některé alternativní systémy.

2.4 Mikrofluidika

Současnými trendy v přírodních vědách a biomedicíně jsou miniaturizace a automatizace. Jednou z hlavních mikroelektromechanických technologií (MEMS) je mikrofluidika. Mikrofluidika je multidisciplinární obor - spojující inženýrství, fyziku, chemii, biochemii, nanotechnologie a biotechnologie, jehož výsledkem jsou systémy, které manipulují s malými objemy (10^{-9} až 10^{-18} l) roztoků v mikrotechnologiemi vytvořených dutých kanálcích o rozměrech desítek mikrometrů. Zabývá se chováním, přesným ovládním a manipulací kapalin na submilimetrovém měřítku [20].

První náznaky mikrofluidiky se začaly objevovat v 80. letech dvacátého století, kdy byly připraveny první mikroelektromechanické systémy (MEMS) na křemíkových waferech, které daly vzestup průmyslovým aplikacím především ve formě tlakových senzorů a inkoustových tiskových hlav. V 90. letech se výzkum zaměřil na aplikace MEMS v biologii, chemii a biomedicíně. V těchto aplikacích bylo třeba kontrolovat pohyb kapalin v mikrometrových kanálcích a přispěly tedy k rozvoji mikrofluidiky jako takové [21].

Později bylo vyvinuto obrovské úsilí pro tvorbu takzvaných *laboratoří na čipu (lab-on-a-chip)* – zařízení, která by v jednom mikrofluidním čipu integrovala všechny procesy nutné ke kompletní biologické, chemické či biomedicínské analýze. Tou dobou se většina mikrofluidních zařízení připravovala z křemíku nebo ze skla, takže byla drahá a technicky náročná na výrobu [21].

Začátkem jednadvacátého století nastoupily technologie, které pro odlévání mikrozařizích používají polymery. Tím se výrazně snížila cena a časová náročnost, což mnoha laboratořím umožnilo provádět výzkum v oblasti mikrofluidiky [21].

V dnešní době v oblasti mikrofluidiky bádají mnohé výzkumné týmy a jejich aplikace sahají od již zmíněných laboratoří na čipu [22], elektroforézy na čipu [23], různých senzorů [24], diagnostických zařízení [25], DNA čipů [26], přes takzvané *orgány na čipu (organs-on-chips)* – mikrofluidní zařízení na kultivaci buněk, která by mohla efektivně reprodukovat či napodobit strukturní, funkční, biochemické a mechanické vlastnosti skutečného orgánu nebo tkáně a dovolovala monitorování v reálném čase [27] – až po snahu vytvořit takzvaného *člověka na čipu (human-on-chip)* – multiorgánové zařízení, které by bylo schopno lépe předvídat vedlejší účinky nových léčiv už v preklinických studiích (a tím zlevnit vývoj nových léčiv a potenciálně i eliminovat testování na zvířatech a tím se zbavit s tím spojených problémů), sledovat průběh infekcí nebo vliv nejrůznějších látek na orgánovou soustavu jako celek [28, 29]. Z orgánů na čipech byly do dnešní doby vytvořeny například střeva [30, 31], plíce [32, 33], ledviny [34], játra [35], lymfický systém [36], hematoencefalická bariéra na čipu [37], srdce [38] a kůže [39]. Byly vytvořeny i čipy obsahující několik orgánů [40, 41].

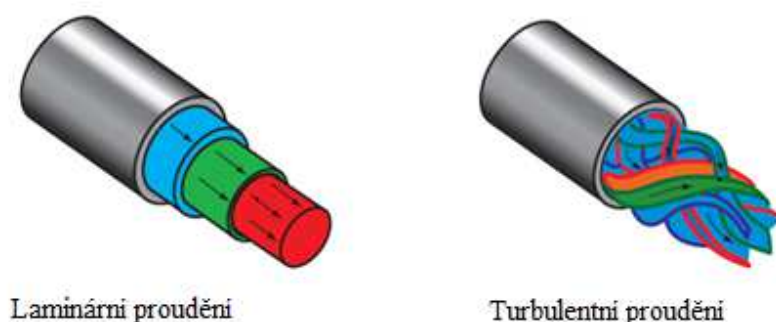
Výhody miniaturizace zahrnují malou spotřebu činidel (snížení nákladů na vzácná a drahá činidla), rychlejší reakční časy (díky difúzním procesům na krátkých vzdálenostech a řízenému proudění kapalin), potenciál k vytvoření vysokokapacitních roboticky řízených analytických systémů.

2.4.1 Proudění kapalin v mikrofluidice

O proudění v kapalinách mluvíme převažujeli pohyb kapalin v jednom směru. Každá částice proudící kapaliny má určitou rychlost, kteréžto velikost a směr se mohou měnit v závislosti na místě a čase. Trajektorie těchto částic znázorňujeme proudnicemi. Rychlost každé částice v libovolném místě proudu má směr tečny k proudnici [42].

Když jsou dráhy jednotlivých částic navzájem rovnoběžné, nazýváme *proudění laminární*. Částice se pohybují ve vzájemně rovnoběžných vrstvách, aniž by se navzájem mísily. Jednotlivé vrstvy kapaliny se však při pohybu v tenké trubici nepohybují stejnou rychlostí. Vrstva kapaliny, která se bezprostředně stýká se stěnami trubice, se v důsledku tření pohybuje nejmenší rychlostí nebo je v klidu. Nejrychleji se pohybuje osová vrstva kapaliny [42].

Na rozdíl od toho, při *turbulentním proudění*, dochází k přechodu částic mezi různými vrstvami kapaliny, čímž dochází k promíchávání těchto vrstev. Částice kapaliny vykonávají při proudění kromě posouvání i složitý vlastní pohyb a nemají již ve všech místech neměnnou rychlost. Dochází ke vzniku vírů, které jsou doprovázeny zvukovými fenomény, a zobrazování pomocí proudnic tak ztrácí svůj význam [42]. Oba typy proudění jsou znázorněné na Obr. 2.



Obr. 2: Vizualizace laminárního a turbulentního proudění [43]

Proudění kapaliny mikrofluidními kanálky může být charakterizováno *Reynoldsovým číslem*. To je bezrozměrné číslo charakterizující chování proudící kapaliny, definované rovnicí:

$$R_e = \frac{\rho \cdot l \cdot v}{\eta} \quad (1)$$

kde ρ je hustota kapaliny, l je délka mikrofluidního kanálku, v je průměrná rychlost proudění kapaliny a η je viskozita kapaliny [43, 44].

Podle jeho hodnoty lze usuzovat na to, zda bude proudění laminární nebo turbulentní. Existuje jistá kritická hodnota Reynoldsova čísla, která rozděluje proudění laminární od proudění turbulentního. Ta se pro různé typy potrubí a různé typy kapalin stanovuje experimentálně. Je-li hodnota Reynoldsova čísla nižší než kritická hodnota odpovídající danému uspořádání, je proudění laminární. Je-li hodnota Reynoldsova čísla vyšší, je proudění turbulentní. V okolí kritické hodnoty je přechodná oblast mezi zjevně laminárním a zjevně turbulentním prouděním [43, 44].

Kvůli malým rozměrům kanálků je R_e v mikrofluidice typicky velmi malé, většinou dokonce menší než 1. To znamená, že proudění uvnitř kanálku je laminární a neobjevují

se žádné turbulence. To zajišťuje způsob, jakým mohou být molekuly v kanálku přemísťovány celkem předvídatelným způsobem. Pokud ovšem potřebujeme kapalinu v kanálku promíchat, musíme do sestavy zařadit prvky jako například mixéry [20,44].

Z důvodu malých rozměrů převažuje v mikrokanálcích tlaková ztráta způsobená třením. Proudění kapaliny mikrokanálky je nejlépe popsáno Navier-Stokesovou rovnicí, což je rovnice popisující proudění nestlačitelné Newtonské tekutiny. Vychází ze zákona zachování hmoty, hybnosti a energie a lze ji odvodit z bilance sil působících na tekutinu:

$$\vec{F}_m + \vec{F}_p + \vec{F}_t = \vec{F}_s, \quad (2)$$

kde \vec{F}_m je silové působení vnějších hmotnostních sil, \vec{F}_p je silové působení tlakových sil, \vec{F}_t je silové působení třecích sil a \vec{F}_s je silové působení setrvačných sil. Z toho vychází rovnice:

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \vec{f}, \quad (3)$$

kde ρ je hustota, v je rychlost, t je čas, p je tlak, μ je kinetická viskozita a f je součet objemových sil [43, 44].

Dvěmi základními metodami pro vytvoření proudu v mikrokanálcích jsou tlakem poháněný a elektrokinetický tok [44].

Tlakem poháněný tok je takový, kdy je kapalina pumpována přes zařízení pomocí čerpadla s pozitivním posunem, jako je například injekční pumpa. Jeden ze základních zákonů mechaniky kapalin říká, že rychlost kapaliny na stěně musí být nulová, což v kanálku vytváří parabolický rychlostní profil. Tlakem poháněný tok je relativně levnou metodou pro pumpování kapaliny přes mikrozařízení. S postupujícím vývojem se stává dobře reprodukovatelným a přístupným miniaturizací [44].

Elektrokinetický tok využívá elektroosmotického pumpování kapaliny. Na povrchu kanálku se – jako na většině povrchů, které mají elektrický náboj – vytvoří elektrická dvojvrstva opačně nabitých iontů. Když se přes kanálek aplikuje elektrické pole, ionty v dvojvrstvě se začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě, což vytvoří pohyb kapaliny u stěny kanálku, který se viskózními silami přenáší do konvekčního pohybu celého objemu kapaliny. Pokud je kanálek u elektrod otevřený, rychlostní profil je jednotný po celé šířce kanálku. Pokud je ovšem kanálek uzavřený, začne kapalina recirkulovat – potom se kapaliny uprostřed kanálku pohybuje poloviční rychlostí v opačném směru než kapaliny u stěny kanálku. Velkou nevýhodou elektrokinetického toku je nepředvídatelnost jeho rychlosti v důsledku různorodých vlastností povrchů. Například pokud by se na povrch kanálku naadsorbovaly proteiny, změnil by se náboj na jeho stěně a tím i rychlost toku [44].

2.4.2 Příprava mikrofluidních zařízení

Velká rozmanitost procesních kroků a materiálů vede k široké škále možných zařízení. V současné době je nejpoužívanější technologií pro výrobu mikrofluidních zařízení pro medicínské aplikace *měkká litografie polydimetylsiloxanu (soft-lithography of PDMS)*. Mikrofluidní zařízení je nejprve navrženo v počítačovém programu (CAD software). Pracovní proces jeho přípravy poté většinou sestává ze čtyř základních procesů. Prvním je *depozice tenké vrstvy*, při které je na substrát nanesen nebo na něm vypěstován tenký povlak. Druhým

je *vzorování*, při kterém se vzor přenese na materiál. Třetím procesem je *leptání*, které vytváří rysy selektivním odstraněním materiálu (tenkého filmu nebo substrátu) v definovaném vzoru. Konečným procesem je *spojování*, při kterém jsou dva substráty spojeny dohromady [45].

2.4.2.1 Substráty

Zařízení jsou obvykle tvořena na podložním substrátu nebo v něm. Substrát dovoluje jednoduchou manipulaci s mikrozařízením skrze všechny výrobní kroky.

Nejběžněji používaným materiálem v mikrofluidice je křemík. Dodává se v podobě monokrystalových waferů a je tak široce využívám kvůli svým vynikajícím elektrickým i mechanickým vlastnostem. Existuje řada metod mikroopracování křemíku a možnost jejich kombinace s přípravou integrovaných obvodů vede k potenciálnímu vytvoření monolitických integrovaných mikrosystémů. Bohužel není opticky transparentní ani biokompatibilní a jeho cena může být příliš vysoká pro zařízení na jedno použití, takže není nejvhodnějším materiálem pro biologické či medicínské aplikace [45].

Pro optická zařízení či ploché displeje jsou většinou používány transparentní substráty jako sklo či křemen. Křemen je také poměrně drahý a levné sodnovápenaté sklo je pouze částečně prostupné pro UV záření, takže se ošetřuje oxidem antimonitým, aby se zlepšila UV transmitance. Procesy pro mikroopracování skla jsou složitější, ale proveditelné. Největší výhodou těchto materiálů je chemická odolnost, díky které mohou být využity v aplikacích, kde je potřeba zařízení před či po použitím důkladně promýt nebo při kterých se používají horké roztoky či sonifikace [22, 45].

Další skupinou široce používaných podložních materiálů pro biologické a medicínské aplikace jsou polymery jako cyklické olefinové kopolymery (COC), polymethylmetakrylát (PMMA) a nejvíce populární – polydimetylsiloxan (PDMS). Velké množství dostupných procesů pro velkovýrobu zařízení z těchto materiálů znamená, že mohou být vyráběny velice levně a ve velkém množství [45].

2.4.2.2 Depozice tenké vrstvy

Depozice tenké vrstvy je obvykle dosažena jednou z následujících technik – fyzikální depozice z plynné fáze (PVD), chemická depozice z plynné fáze (CVD), nátěry (spin-coating nebo dip-coating) [22]. Tenké vrstvy se používají jako maskovací materiály, strukturní materiály, povrchové materiály a elektrické vrstvy. Například SU-8 může být spin coatingem nanášeno na substrát jako fotorezist [21], PDMS zase vytváří strukturní vrstvu pro mikrokanálky [45].

2.4.2.3 Vzorování

Vzorovací technologie definují mikrovýrobu. Jsou používány k přenesení požadovaného navrženého vzoru na materiál. Tyto vzory jsou mikrometrových nebo nanometrových rozměrů [45].

Konvenční metody, které mohou být „zmenšeny“ pro mikrovýrobu zahrnují mechanické vrtání, řezání, laserové stroje a pískování. Jsou to rychlé a levné metody, ale nabízejí jen velmi omezené rozlišení a vcelku nehomogenní prostředí s potenciálními vadami způsobenými mechanickým odstraněním materiálu [21].

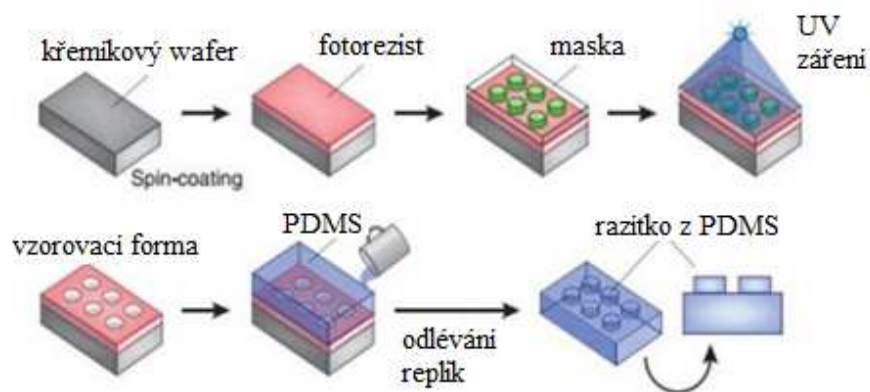
Tato práce se ovšem zaměřuje na v současné době nejvíce využívanou technologii pro výrobu mikrofluidních zařízení pro medicínské aplikace, kterou je *měkká litografie polydimetylsiloxanu*. Před zavedením měkké litografie byla mikrofluidní zařízení převážně vytvářena pomocí fotolitografie na křemíkových substrátech což vyžadovalo čisté prostory a dobrou znalost procesu. Měkká litografie je odlévání elastomerických polymerů za pomoci vzorovací formy pro tvorbu levných mikrofluidních zařízení [19]. Originální vzorovací forma je stále nejčastěji připravována *fotolitografií* (viz Obr. 3), a posléze použita pro vyražení struktur až o velikosti pouhých 10 nm na elastomerický materiál. Elastomer s přeneseným

vzorem poté může být použit pro vytvoření reliéfu skrze odlévání replik, odlévání v kapilárách, mikrokontaktní tisk a mikrotransportní odlévání [46].

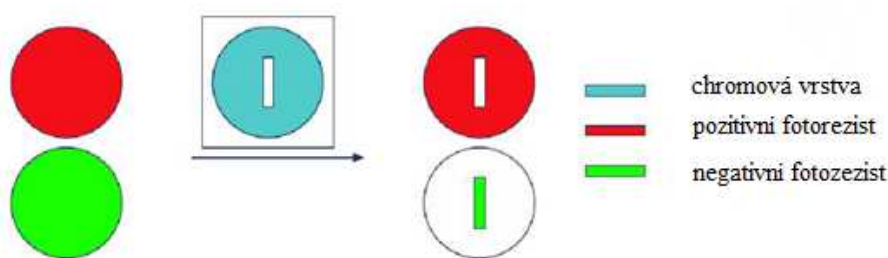
Fotolitografie, výrobní metoda, která je schopná vytvořit kanálky v mikrorozměrech, je náročná technologie, která vyžaduje čisté prostředí a sofistikovaný výcvik. Proces začíná s návrhem *masky* s požadovaným vzorem, který odpovídá aplikaci. Síť mikrofluidních kanálků s optimální velikostí, počtem a částmi kanálků jsou narýsovány v CAD programu a pomocí tiskárny s vysokým rozlišením přeneseny na průsvitku nebo vytištěny na film (pro nižší rozlišení). To může být provedeno v laboratoři nebo zadáno externí firmě. Průsvitka je skleněná destička, na jejímž povrchu je v definovaném vzoru fotosenzitivní neprůsvitný materiál (většinou chrom). Na chromových maskách chrom zastaví UV záření, zatímco křemen nebo sklo ho propustí. U filmových masek zabrání průchodu UV záření inkoust. Chromové masky jsou odolnější a déle vydrží, ale jsou výrazně dražší než masky filmové. [19, 34, 45].

Fotosenzitivní materiál (fotorezist) je nanesen na substrát, který je dále zarovnán s maskou a vytvrzen UV zářením, aby se do něj zreprodukoval design masky. Vzorovací forma a maska jsou odděleny a nevytvrzený fotorezist je odstraněn ve vyvíjecím roztoku. Fotorezist může být pozitivní či negativní. Rozdíl mezi nimi je znázorněn na Obr. 4. U pozitivních fotorezistů jsou polymerní řetězce tenkých filmů po osvětlení UV zářením narušeny a ve vyvíjecím roztoku se tak odstraňuje ozářená část. Negativní fotorezisty účinkem UV záření polymerizují a tím dojde k jejich zpevnění, takže se vyvíjecím roztokem odleptají neozářené části fotorezistu. Negativní fotorezist díky polymeraci mírně zvětšuje svůj objem, a proto je pro nanotechnologie vhodnější pozitivní fotorezist, který si lépe zachovává svůj tvar [19, 45].

Když máme vzorovací formu, můžeme přistoupit k přípravě konečného zařízení. Pokud se vzorovací formou zacházíme opatrně, může být použita k odlití daného zařízení až stonásobně [19].



Obr. 3: Schéma fotolitografie: Fotorezist je v tenké vrstvě nanesen na křemíkový wafer, který je následně zarovnán s maskou, jejíž design byl vytvořen v CAD softwaru. Fotorezist je vytvrzen UV zářením a neexponované oblasti jsou následně odmyty ve vyvíjecí lázni. Forma je připravena na odlévání PDMS. [46]



Obr. 4: Rozdíl mezi pozitivním a negativním fotozestem [47]

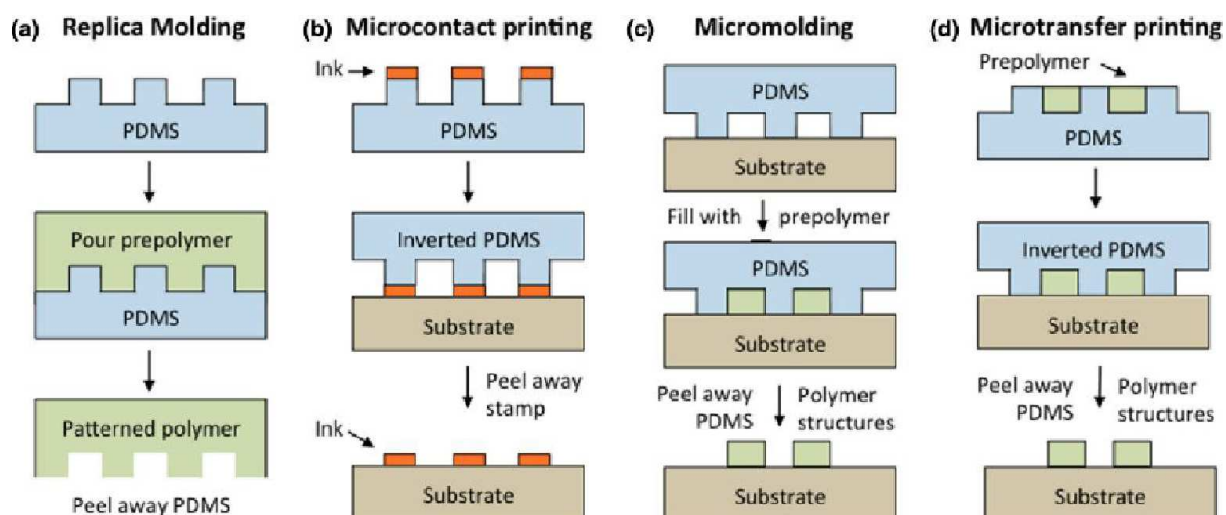
Měkká litografie sestává ze čtyř technik pro přípravu nebo replikaci struktur za použití elastomerických razítek, forem a fotomasek. Pokud konkrétní aplikace vyžaduje integraci elektrod nebo rezistorů mohou být dovnitř zařízení nanесeny kovové či dielektrické vrstvy. To vyžaduje čisté prostory. Kovové a dielektrické vrstvy jsou většinou nanесeny na skleněný substrát před tím, než je na něj odlito PDMS. Nízká povrchová energie a velká měkkost PDMS nejsou totiž pro depozici kovů příznivé [19].

Při *odlívání replik (replica molding)* (Obr. 5a), je PDMS smíseno se síťovací činidlem, nalito na vzorovací formu a po dobu jedné hodiny vytvrzeno při 60 °C. Tím se z PDMS vytvoří jedna vrstva mikrofluidního zařízení. Replika je poté z formy sloupnuta, upravena do požadovaných rozměrů a jsou do ní vyvrtány vstupy na přívodní a odvodní hadičky (většinou pomocí stříkačkové jehly). U jednovrstevných zařízení je vrstva PDMS spojena s podložním substrátem. Tato technologie ovšem dovoluje i tvorbu vícevrstevných mikrofluidních zařízení. V jejich případě jsou jednotlivé vrstvy PDMS spojeny dohromady a celý systém je následně spojen s podložním substrátem. Tato technologie zároveň dovoluje integraci mikropump, mikroventilů a podobných zařízení. Integrace prvků jako jsou ventily umožňuje aktivní kontrolu kapaliny uvnitř čipu, což vede k plně automatizovaným mikrosystémům [48].

Mikrokontaktní tisk (microcontact printing) (Obr. 5b) umožňuje tisk molekul na substrát pomocí „razítka“ z PDMS. Razítko je ponořeno do roztoku obsahujícího námi zvolené molekuly (tioly, proteiny, silany nebo nanočástice), které se na razítko adsorbují a zaschnou na jeho povrchu. Tím pádem pro tuto techniku nelze použít všechny molekuly – pokud tedy nepoužíváme agarová razítka, která brání zasychání [47]. Razítko je dočasně přiloženo na substrát, aby se umožnil přenos molekul, přičemž volný povrch substrátu může být ošetřen dalšími molekulami, které zabrání šíření mimo potlačenou plochu. Jedním zařízením může být naráz nanášeno několik různých molekul, ale je nutno využít zarovnávač [48, 49].

Při *odlívání v kapilárách (micromolding in capillaries)* (Obr. 5c), je forma s mikrokanálky zarovnána na substrátu a kapka suspenze je nanесena ke koncům kanálek. Kapilární síly suspenzi nasají během 10–15 minut. Přebytná suspenze je odmyta a zařízení je ponecháno k vysušení [50].

Mikrotransportní tisk (microtransfer printing) (Obr. 5d) je založeno na aplikaci tekutého prepolymeru na formu z PDMS. Poté co je přebytná tekutina odstraněna seškrábnutím či ofouknutím, naplněná forma je přiložena k substrátu, vytvrzena a sloupnuta, čímž se vytvoří požadovaná mikrostruktura [51].



Obr. 5: Výše popsané techniky pro přípravu mikrofluidních zařízení: a) odlévání replik, b) mikrokontaktní tisk, c) odlévání v kapilárách, d) mikrotransportní tisk [47]

2.4.2.4 Leptání

Leptání je odstraňování určité části tenké vrstvy nebo substrátu, které nejsou chráněny. Jsou vystaveny leptadlu (jako jsou kyselina nebo plazma), které chemicky nebo fyzikálně napadnou danou vrstvu, dokud ji neodstraní [45].

Při *mokrém leptání* je materiál odstraněn pomocí kapalné chemikálie. Jinými slovy je substrát ponořen do pro něj korozivního roztoku [21, 45].

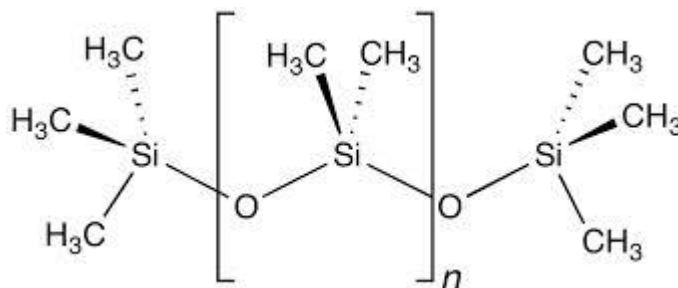
Při *suchém leptání* může být ablace fyzikální (vyžaduje velkou kinetickou energii danou paprskem iontů, elektronů či fotonů), chemická (molekuly plynu) či kombinací obou předcházejících metod [21, 45].

2.4.2.5 Spojování

Je potřeba hermeticky spojit jednotlivé vrstvy PDMS nebo PDMS ke skleněnému substrátu. Skleněný substrát může být ke křemíkovému substrátu navázán anodickým spojováním po aplikaci tepla (400 °C), vysokého elektrického pole a tlaku na oba materiály. Další možností je tavení – spojování superčistých povrchů za vysokých teplot (1000 °C). PDMS může být se sklem či dalšímu PDMS reverzibilně hermeticky spojeno jednoduše kontaktem obou ploch a ireverzibilně pomocí oxidace obou materiálů a jejich přiložením k sobě [45].

2.5 Polydimetylsiloxane

Polydimetylsiloxan, jinak zvaný dimetikon, je minerální organický polymer (struktura obsahující uhlík a křemík) siloxanové rodiny. PDMS má empirický vzorec $(C_2H_6OSi)_n$, kde n je počet opakujících se monomerů. Jeho struktura je znázorněna na Obr. 6.



Obr. 6: Chemická struktura polydimetylsiloxanu [52]

Siloxanové vazby se spojují do flexibilního polymerního řetězce s vysokou mírou viskoelastivity. V závislosti na počtu monomerních řetězců může být nezesíťované PDMS téměř tekuté (nízké n) nebo téměř tuhé (vysoké n). Po zesíťování se PDMS stává hydrofobním elastomerem [19].

Povrchová chemie PDMS může být změněna oxidací pomocí plazmatu. PDMS se potom asi na 30 minut stává hydrofilním. Tím je povrch rezistentní k adsorpci hydrofobních a negativně nabitých molekul z média – což je výhodné pokud zvážíme afinitu PDMS k malým hydrofobním molekulám, které se mohou adsorbovat na jeho povrch a tím ovlivnit experimentální podmínky [22].

PDMS je tak široce využíváno, protože je transparentní, vyznačuje se nízkou autofluorescencí, je biokompatibilní, levné, snadno se odlévá a je propustné pro plyny. Permeace vodních par do PDMS sice může vést k vysychání substrátu, ale jelikož voda nesmáčí povrch PDMS, může být v jeho aplikacích použita - stejně jako glycerol, metanol nebo etanol [19, 53].

Pro přípravu mikrofluidních zařízení je PDMS smíseno se síťovacím činidlem, nalito na formu a po hodinu zahříváno na 60 °C nebo ponecháno při pokojové teplotě po dobu tří dnů (síťování PDMS) abychom zajistili dobré mechanické vlastnosti při získávání elastomerických replik formy. Na tyto aplikace se běžně používají dva typy: PDMS RTV-615 a PDMS Sylgard 184. Sylgard 184 je čistší, ale je technologicky náročnější ho spojit a při přípravě zařízení selhává častěji než RTV-615 [19, 21].

Kromě mikrofluidiky se PDMS využívá i jako aditivum v potravinách (E900), v šamponech, a jako protipěnová látka v nápojích či jako lubrikační olej [21, 54].

2.5.1 Rozpouštědla vhodná pro PDMS

Ne všechna rozpouštědla jsou vhodná pro aplikaci s PDMS. Studie provedená skupinou *Lee et al.*, ve které byla zkoumána kompatibilita PDMS s různými organickými rozpouštědly napomáhá zohlednění vhodnosti organického rozpouštědla pro danou aplikaci. Zohledňovala tři parametry – jestli a jak moc PDMS v rozpouštědle nabobtná, rozdělování rozpuštěných látek mezi rozpouštědlo a PDMS a rozpad oligomerů PDMS v rozpouštědle. Z těchto tří faktorů má při rozhodování o kompatibilitě největší vliv bobtnání PDMS v rozpouštědle. Bobtnání PDMS může totiž způsobit jeho odlepení od substrátu nebo změnu rozměrů mikrostruktur na čipu, čímž je ovlivněn i průtok kapaliny a vytvoření membrány. Míra bobtnání je vyjádřena koeficientem bobtnání S , který je poměrem délky PDMS s rozpouštědlem a suchého PDMS. Výsledky experimentálního měření bobtnání PDMS jsou korelovány s rozpustnostním parametrem (δ [$\text{cal}^{1/2}\cdot\text{cm}^{-3/2}$]), který je založen na hustotě kohezní energie materiálů (c [cal/cm^3]). V potaz se bere i dipólový moment rozpouštědel. Mezi rozpouštědla jejichž působením PDMS nabobtnává nejméně, patří voda, většina alkoholů, nitrily, sulfoxidy a disubstituované amidy. Naopak mezi rozpouštědla, kterýmiž PDMS nabobtnává nejvíce, patří cyklické i acyklické uhlovodíky, aromatické uhlovodíky, halogenované sloučeniny, étery a sekundární a terciární aminy. Činidla, kterými PDMS nabobtnává, jsou vyhodnocena jako nevhodná pro aplikace s PDMS, ale dobře se hodí pro extrakci kontaminantů a změnu povrchových vlastností PDMS [53].

2.6 Optická mikroskopie

Mikroskopie je souhrn aplikací optiky, které se využívají k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem. Mikroskopické zobrazovací metody se rozlišují na základě druhu záření přicházejícího do objektu nebo způsobu uspořádání optické soustavy. Mezi zobrazovací metody optické mikroskopie patří například světlé pole, temné pole, fázový kontrast, ultrafialová a infračervená mikroskopie, cytofotometrie, fluorescenční mikroskopie, interferenční a polarizační mikroskopie, konfokální mikroskopie a Hoffmanův modulační kontrast. Tato práce se zaměří na světlé pole a fluorescenční mikroskopii [55].

2.6.1 Světelné pole

Světelná mikroskopie má 1000 krát větší rozlišovací schopnost než lidské oko. Je schopná rozlišit dva body od sebe vzdálené až $0,15 \mu\text{m}$. To je dáno jak vlnovou délkou záření, které mikroskopem prochází (v tomto případě proud fotonů), tak vlastnostmi objektivu [56].

Světelný mikroskop sestává z mechanické části a tří spojných optických soustav. *Kondenzor* slouží k osvětlení preparátu. *Objektiv* je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, které dohromady fungují jako spojná čočka a zobrazují převrácený, skutečný a zvětšený předmět. *Okulár* je soustava čoček, které fungují jako čočka spojná a vytváří zdánlivý, přímý a zvětšený obraz [56].

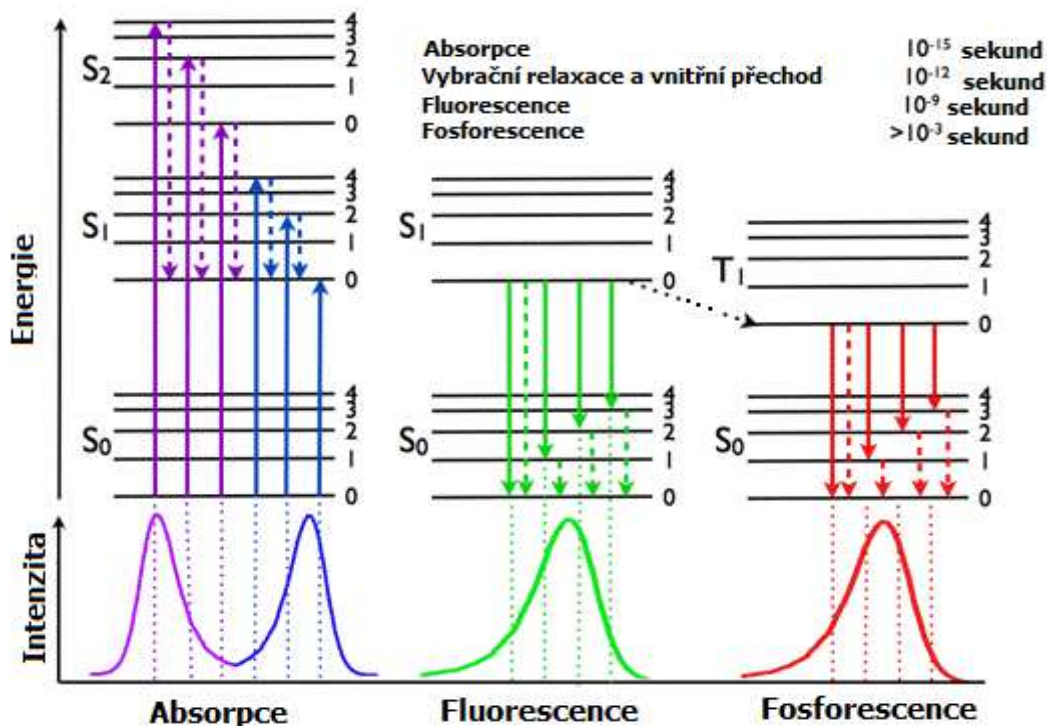
Světelné pole je původní a základní metoda optické mikroskopie. Světelný kužel prochází sledovaným vzorkem nebo se od vzorku odráží a vstupuje do objektivu, kde soustava čoček vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz, který pozorujeme přes okulár. Při této metodě má objekt tmavé obrysy a nachází se ve světlém poli [56].

2.6.2 Fluorescenční mikroskopie

2.6.2.1 Fluorescence

Luminiscence je skupinou procesů, při nichž molekuly, které jí podléhají, emitují světlo z excitovaných stavů, do kterých se dostaly fyzikálním (adsorpce světla), mechanickým (tření) nebo chemickým (bioluminiscence) mechanismem. Fotoluminiscence (excitace molekuly ultrafialovým nebo viditelným světlem) se dělí v závislosti na povaze excitovaného stavu na fosforescenci a fluorescenci [57].

Fluorescence je vlastnost některých látek, které jsou následně po absorpci záření schopny emitovat záření vyvolané přechodem mezi elektronovými stavy o stejné multiplicitě. Procesy, ke kterým dochází mezi absorpcí a emisí světla, jsou obvykle znázorněny pomocí Jabloňského diagramu (Obr. 7). Diagram znázorňuje základní a dvě excitované singletové hladiny (S_0 , S_1 a S_2). Každá hladina je rozdělena na několik vibračních a rotačních energetických hladin (0, 1, 2, 3, 4 atd). Přechody mezi stavy jsou ilustrovány svislými čarami [57].



Obr. 7: Znázornění procesů fotoluminiscence pomocí Jabloňského diagramu [58]

Při interakci molekuly s fotonem určité vlnové délky, který má postačující energii pro vyvolání přechodu mezi elektronovými stavy je tato molekula vybudena do svého excitovaného stavu. Pokud absorbovaný foton obsahuje více energie, než je nezbytné pro elektronový přechod, nadbytek energie je obvykle převeden na vibrační a rotační energii.

Základním stavem většiny molekul je elektronový singlet. Excitace začíná obvykle z nejnižší vibrační hladiny základního stavu, protože malá vnitřní energie většiny molekul nedovoluje existenci v jiném stavu. Absorpcí vhodného záření dochází zpravidla k excitaci do jedné z vibračních hladin vyššího (S_1 nebo S_2) singletového energetického stavu. Okamžitě po absorpci fotonu molekula přechází na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu vnitřní konverzí (nezářivý přechod mezi dvěma elektronovými stavy stejné spinové multiplicity) a vibrační relaxací. Excitovaná molekula existuje v nejnižším excitovaném singletovém stavu (S_1) několik nanosekund, než nakonec přejde do základního stavu (S_0). Právě tento přechod je doprovázen emisí fotonu a nazývá se *fluorescence* [57].

Jestliže by se jednalo o přechod mezi dvěma vibračními hladinami stejné energie, patřící ale elektronovým stavům různé multiplicity, jednalo by se o tzv. mezisystémový přechod (z S_1 na T_1). Emise z T_1 se nazývá fosforescence. Přechod elektronu z T_1 na základní singletový stav je zakázaný [57].

2.6.2.2 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop, který k zobrazení struktur využívá fluorescenci. První fluorescenční mikroskop byl zkonstruován kolem roku 1911 Carlem Reichertem. Fluorescenční mikroskopie zahrnuje dvě metody, pozorování v odraženém světle (epifluorescence) a pozorování v procházejícím světle (diafluorescence). Fluorescenční pozorování v procházejícím světle se v současné době téměř nepoužívá, a proto se dále budeme bavit jen o epifluorescenci [56].

Jako zdroj světla se pro fluorescenční mikroskopii obvykle používají vysokotlaké výbojky – rtuťové nebo xenonové. Obloukový výboj mezi elektrodami představuje intenzivní bodový zdroj světla (často v UV oblasti). Záření dopadá přes objektiv na vyšetřovaný vzorek, ve kterém vyvolá excitaci elektronů a následnou emisi záření o větší vlnové délce, které lze pozorovat optickým mikroskopem v okuláru. Důležitou součástí sestavy jsou fluorescenční filtry. Ty se skládají z excitačního a emisního filtru a dichroického zrcátka. Filtry se od sebe liší vlnovými délkami, které vymezují pásma propustnosti excitačního a emisního záření. Dichroické zrcadlo odráží přednostně excitační záření na preparát a propouští emisní záření do okuláru [55].

Fluorescenční mikroskopie je v současné době široce využívanou zobrazovací metodou jak v rostlinné, tak živočišné histologii a buněčné biologii [45].

2.6.3 Zobrazování dob života (FLIM)

Zobrazováním dob života (*fluorescence life-time imaging*) získáme obraz založený na rozdílných dobách života ve vzorku. Intenzita jednotlivých bodů obrazu odpovídají daným dobám života fluoroforu, nikoli jejich emisním spektrům. Doba života je definována jako průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu, než se emisí fotonu navrátí do stavu základního. Doba života není závislá na koncentraci, absorpci vzorku nebo jeho tloušťce, fotovybělování či intenzitě excitačního záření. Zvláště díky tomu je poměrně široce využívanou metodou. Závisí ovšem na pH, koncentraci iontů a způsobu vazeb mezi molekulami [59].

Sestava se většinou skládá ze zdroje záření (pulzní laser), konfokálního mikroskopu, detektoru schopného rozlišit jednotlivé fotony, dichroického zrcátka, objektivu a TCSPC (*Time-Correlated Single Photon Counting*) jednotky, která zaznamenává čas mezi excitací a emisí fluorescence [59].

2.7 Fluorofory

Fluorofory jsou chemické sloučeniny, které po excitaci dokáží emitovat světlo ve viditelné oblasti spektra. Jsou to fluorescenční barviva, která se používají pro barvení preparátů. Všeobecně se dělí na vlastní a nevlastní. Vlastní fluorescence je daná přítomností přirozeně se vyskytujících fluoroforů jako jsou například v buňce proteiny, redukované kofaktory, vitamín A, hemoglobin nebo chlorofyl. Nevlastní fluorescence využívá zavedení fluoroforů do struktur, které samy fluorescenci nevykazují. Pokud jsou ke studovanému vzorku navázány kovalentní vazbou, říká se jim fluorescenční značky. Ty jsou využívány například v imunologii a histologii. Pokud jsou ke vzorku vázány nekovalentně, říká se jim fluorescenční sondy. Používají se například k analýze membránového potenciálu. Volba vhodného fluoroforu je klíčovou součástí všech experimentů, které využívají fluorescenci. Právě vlastnosti fluoroforu umožňují získat potřebné informace o vzorku [60].

2.7.1.1 Nilská červeň

Nilská červeň je fenoxazinové fluorescenční barvivo velmi omezeně rozpustné ve vodě. Je polaritní sondou reagující na prostředí, ve kterém se nachází. Ve vodě vykazuje poměrně nízkou intenzitu fluorescence, zato v nepolárním prostředí fluorescence této sondy roste. Zároveň v nepolárním prostředí dochází také k hypsochromnímu posunu emisního maxima Nilské červeně. V nepolárním prostředí má emisní spektrum dva peaky s maximem intenzity okolo vlnové délky 525 nm, ale s rostoucí polaritou prostředí se maximum posouvá k vlnovým délkám 600–650 nm a druhý peak zaniká [61].

2.7.1.2 Fluorescein

Fluorescein je syntetická organická látka, která byla poprvé připravena Adolfem von Baeyerem v roce 1871 [62]. Dodává se jako sytě oranžový až červený prášek, který je rozpustný ve vodě a alkoholech. Ve vodě má fluorescein absorpční maximum při 494 nm a emisní maximum při 512 nm. Jeho dvě velké nevýhody spočívají v relativně velké míře fotovybělování a fluorescenci závislé na pH (výrazně snižena při pH nižším než 7). Ty do určité míry překonávají jeho analogy jako Alexa Fluor, Oregonová zeleň, Rodaminová zeleň a další. Využití najde v mikroskopii, forenzní analýze, oftalmologii, serologii, jako barvivo v kosmetice a mnoha dalších oborech. Jeho relativně široké emisní spektrum ovšem znesnadňuje použití s dalšími fluorofory při vícebarevném zobrazování [60].

2.7.1.3 Oregonová zeleň

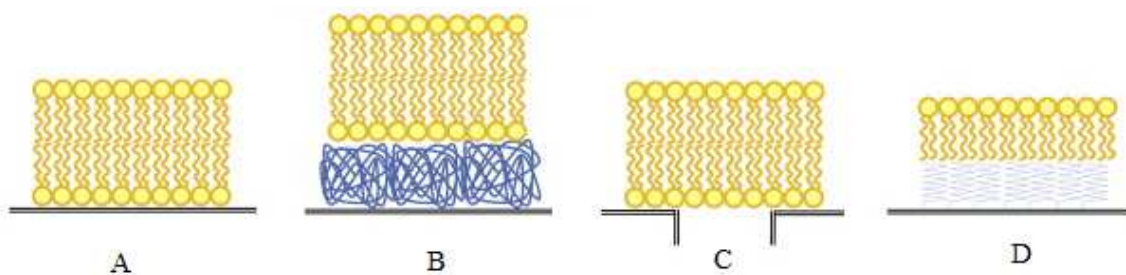
Oregonová zeleň je fluorovaný analog fluoresceinu. V porovnání s Fluoresceinem má Oregonová zeleň vyšší výtěžek fluorescence a větší odolnost proti fotovybělování. Také narozdíl od fluoresceinu není ve fyziologickém rozmezí citlivá na hodnotu pH. Absorpční maximum má při 488 nm a emisní maximum při 526 nm. Dodává se i konjugovaná k řadě protilátek, peptidů, proteinů, lipidů a různých substrátů optimalizovaných pro buněčné značení a detekci. Jako například námi používaná Oregonová zeleň DHPE což je fosfolipid označený na hlavové skupině [60].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Fosfolipidová dvojvrstva na čipu

Tvorba PLD konvenčními způsoby vyjmenovanými v kapitole 2.3 má nízkou úspěšnost tvorby PLD a problém připravit systémy, které by mohly být zároveň monitorovány elektricky, opticky i fluidně. Překonání těchto nedostatků stále zůstává náročným úkolem, ale PLD vytvořené na mikrozařízeních, ač v současné době třeba nedostatečně vyvinuté, mají velký potenciál k tomu, že se z nich v budoucnosti vyvinou opravdu autentické modelové membránové systémy. Optimalizace těchto zařízení otevírá bránu k tvorbě automatizovaných, rychle pracujících, levných, vysoce citlivých zařízení pracujících pouze s malými objemy reagentů, které mohou přinést nové poznatky v oblasti biofyzikálního, biomedicínského a farmaceutického výzkumu [63].

Do dnešní doby již byla navržena spousta různých přístupů k vytvoření PLD (i se zavedenými proteiny) na mikrofluidních čipech. PLD byly vytvořeny přímo na povrchu substrátu, připoutané k substrátu přes jiné molekuly nebo volně zavěšené v uspořádáních, která dovolují, aby nebyly v kontaktu se substrátem. Všechna tato uspořádání znázorňuje Obr. 8. Reproductibilita a praktičnost jednotlivých systémů se značně liší [63].



Obr. 8: Různá uspořádání PLD: (A) lipidová dvojvrstva připoutaná k pevnému podkladu, (B) lipidová dvojvrstva připoutaná k substrátu přes jinou molekulu, (C) volně zavěšená lipidová dvojvrstva, (D) hybridní lipidová dvojvrstva [64]

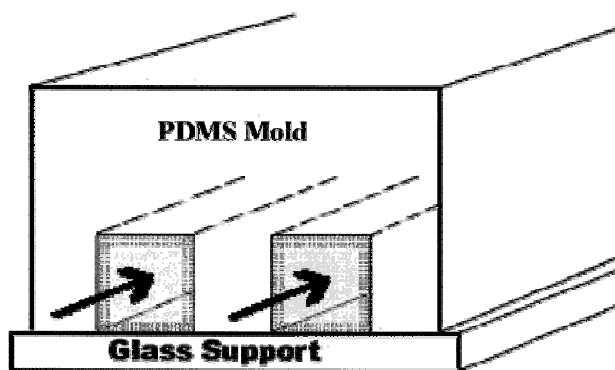
3.1.1.1 Připoutané dvojvrstvy

V první řadě byly vyvinuty mikrosystémy, které tvoří PLD připoutané přímo k povrchu substrátu. Řada těchto systémů byla vyvinuta v makroměřítku předtím než byla inkorporována do mikrosystémů. Tyto PLD se na pevném podkladu jako jsou sklo, křemík, polymery, gely, chrom, zlato, oxid hlinitý a další, tvoří převážně vezikulární fúzí. [9]. Většinou jsou na povrch dopraveny liposomy, které se na něm inkubují, dokud nedojde k jejich prasknutí a následnému přilnutí k povrchu. To může být způsobeno opačnými náboji liposomů a povrchu substrátu, použitím látek, které liposomy k povrchu připoutají (obojí vlivem povrchového napětí) nebo použitím polymerů či hydrogelů jako lubrikantů mezi membránou a substrátem [13].

Interakce mezi dvojvrstvou a substrátem jsou založeny na elektrostatických a hydratačních silách, jež obě mohou být odpuzivé a van der Waalsových silách, které jsou striktně přitažlivé. Tato kombinace sil vytváří energetické minimum potřebné k pevnému připoutání dvojvrstvy blízko povrchu substrátu. Kovalentní spojování dvojvrstvy s pevným substrátem bylo také použito jako přídatného mechanismu pro ustanovení adheze [65, 66]. Nedá se to ovšem použít univerzálně neboť v některých případech vykazují povrchy substrátů interakce

s vezikuly, které brání vezikulární fúzi, a proto musí být použity techniky speciální pro daný povrch [9]. Běžně se využívá metoda, kdy jsou vezikuly a proteoliposomy použity k vytvoření konkrétních struktur. Toho je většinou dosaženo za použití fotolitografie nebo mikrokotaktního tisku, které na substrátu vytvoří oblasti s různými vlastnostmi, které napomáhají prasknutí liposomů [67].

Jedním z příkladů je mikrozařízení vyvinuté *Yangem et al.* [68] uzpůsobené pro imunologické testování založené na navázání bivalentních anti-dinitrofenylových (anti-DNP) protilátek k fosfolipidové dvojvrstvě obsahující dinitrofenylové hapteny. Mikrozařízením znázorněným na Obr. 9 je čip s osmi mikrokanálky z PDMS na skleněném substrátu, který je pro dosažení tvorby lipidové dvojvrstvy proplachován roztokem malých unilamelárních vezikulů fluorescenčně označených Texaskou červení nebo fluoresceinem v pufru. Lipidová dvojvrstva se samovolně utvoří vezikulární fúzí. Pro odstranění přebytečných vezikulů je kanálek proplachován čistým pufrům. Tvorba dvojvrstvy je vizualizována epifluorescenčním mikroskopem. Následně jsou do čipu pumpovány roztoky obsahující různé koncentrace anti-DNP imunoglobulinů fluorescenčně značených sondou Alexa 594. Pro rozlišení protilátek navázaných na dvojvrstvě a těch navázaných přímo na povrchu kanálku je použita metoda absolutního vnitřního odrazu (TIRF). Tou se potvrdí monolitost dvojvrstvy.



Obr. 9: Mikrofluidní kanálky pokryté lipidovou dvojvrstvou připravené *Yangem et al* [68]

Další zajímavou variantou je systém představený *týmem Dr. Malmstadta* [69], který enkapsuloval PLD mezi hydrogel na bázi polyetylen glykolu. PLD jsou v tomto případě připraveny standardně roztíráním směsi difytanoyl-fosfatidyletanolaminu (DPhPE) a difytanoyl-fosfatidylcholinu (DPhPC) z lipidového rezervoáru přes otvor v teflonové přepážce. DPhPE je nejdříve modifikován reakcí s N-akryloxysukcinimidem, aby se zpřístupnila akrylátová skupina. Expozicí UV zářením se spustí radikálová polymerizace polyetylen glykoldiakrylátových molekul v pufru obklopujícím dvojvrstvou, která vede k vytvoření gelu a konjugaci dvojvrstvy a gelu. Takto enkapsulované PLD jsou mechanicky mnohem odolnější a trvanlivější než dosud zmiňované PLD a stále poskytují možnost inkorporování proteinů. Dají se s nimi pořídit optická i elektrická měření. Tyto systémy poskytují kompromis mezi PLD vytvořenými přímo na podložním substrátu a volně zavěšenými PLD diskutovanými v další sekci.

Velkou výhodou PLD na pevném podkladu je jejich dlouhodobá stabilita, která se pohybuje v rámci několika hodin až několika týdnů a vykazují odolnost vůči mechanickému namáhání [69]. Obecně jsou tyto jednoduché dvojvrstvy sice neuvěřitelně úspěšné v napodobování základní struktury a dynamiky plasmatické membrány, ale zároveň se jim nedaří zachytit vysoce komplikované lipidové prostředí, které častokrát rozhoduje o původních biologických funkcích. Jejich nevýhodou zůstává možná výrazně omezená difúze lipidů a proteinů do

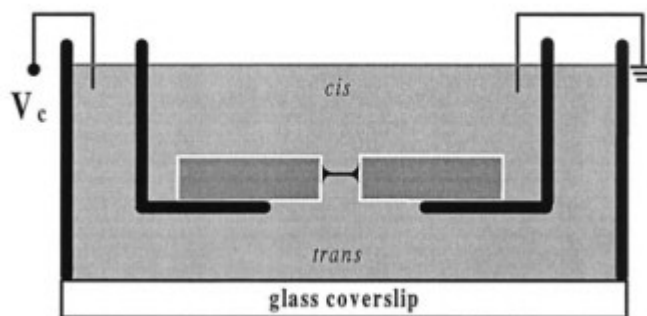
roviny membrány a změněna jejich přirozených vlastností kvůli přiléhání membrány k podkladu, i když ji u většiny systémů dělí od substrátu tenká ($\sim 10 \text{ \AA}$) vrstva pufru zajišťující zachování fluidity a laterální difúze. Ze stejného důvodu je možno měnit prostředí pouze na jedné straně membrány což znemožňuje zkoumání proteinových mechanismů, které k aktivaci kanálu vyžadují asymetrické podmínky. Transmembránové proteiny jsou většinou imobilizované, pravděpodobně kvůli přisednutí na substrát, ale stále si zachovávají svoji funkci. Takto široká paleta substrátů byla použita právě ve víře, že se podaří dosáhnout větší kontroly nad mobilitou transmembránových proteinů [63, 70].

3.1.1.2 Volně zavěšené PLD

Zavěšené membrány jsou lipidové dvojvrstvy, které byly vytvořeny přes otvor mezi dvěma vodnými prostředími. Jejich výhodou je, že si PLD zachovává fluiditu přirozené buněčné membrány a charakterizaci jsou typicky přístupné obě strany dvojvrstvy – tedy mohou být vytvořeny gradienty, perfúzní systémy a dynamické podmínky. Další jejich výhoda spočívá v možnosti zkoumat jednotlivé proteiny s rozlišením na jednotlivé kanály [63].

Bylo vyvinuto několik mikrozařízení, která pracují na principu takzvané roztírací techniky, kdy se planární lipidové dvojvrstvy (PLD) manuálně tvoří přes otvor o mikrorozměrech. Například *Pantoja et al.* [71] připravili horizontálně orientovanou dvojvrstvu rozetřením směsy fosfolipidu a dekanu přes cylindrický pór vyleptaný do $200 \mu\text{m}$ tlustého křemíkového waferu. Aby podpořili adhezi lipidové směsy, zajistili hydrofobitu povrchu silanizací vrstvy oxidu křemičitého. Dosáhli tak stabilních 100 a $200 \mu\text{m}$ velkých pórů, do kterých se jim podařilo zavést velké draselné kanály. Toto uspořádání je skvělé pro měření elektrických vlastností iontových kanálů neboť mají roztoky dobrý přístup k oběma stranám dvojvrstvy. Zároveň jsou kanály přístupné i optickým metodám jak lze vidět na Obr. 10.

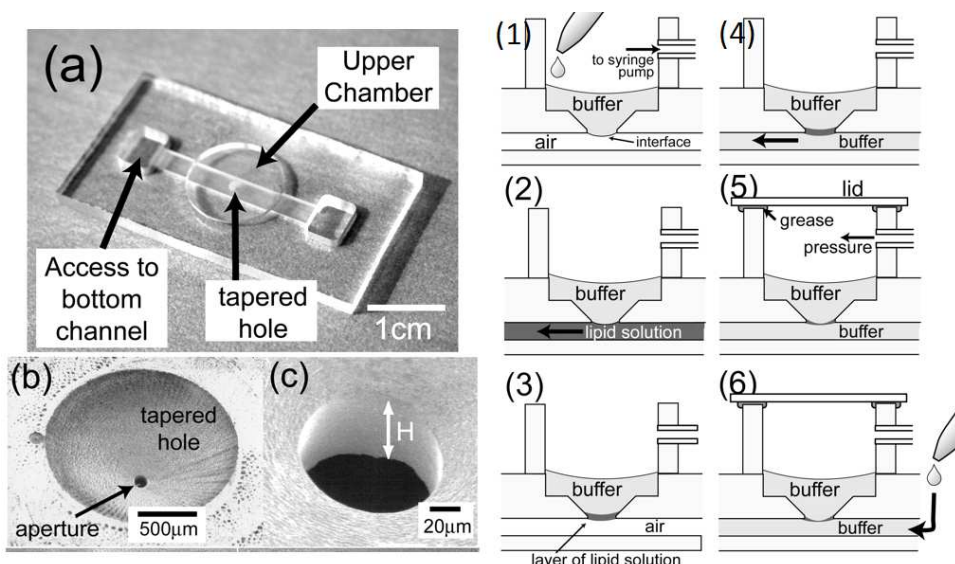
Weiskopf et al. [72] připravili PLD přes $7 \mu\text{m}$ póry na porézním křemíkovém substrátu. Vrchní vrstva křemíkového substrátu byla potažena vrstvou zlata, na kterou byl nasorbován 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphothioethanol (DPPTe) na nějž byla přidána kapka 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) rozpuštěného v dekanu. PLD byla označena fluorescenční sondou a studována pomocí fluorescenční mikroskopie a impedanční spektroskopie. Impedanční spektroskopii byla potvrzena tvorba jednotlivé lipidové dvojvrstvy a monitorováno protrhnutí mikroPLD, které bylo zároveň vizualizováno fluorescenční mikroskopii. Pomocí obnovení fluorescence po fotovybělování (FRAP) byla zkoumána i laterální mobilita lipidů v PLD a byl stanoven efektivní difúzní koeficient.



Obr. 10: Schéma volně zavěšené PLD přístupná elektrofyziologickým i optickým měřícím metodám [71]

Volně stojící PLD byly také vytvořeny přes mikrometrové vrty a komůrky v substrátech metodou střídavého napouštění mikrofluidního zařízení roztokem lipidů a pufrem. Tyto příklady dokazují, že se dají miniaturní zařízení pro tvorbu PLD mikrooperativními technikami připravit velice rychle.

Například *Suzuki et al.* [73] připravili PLD na 100 μm otvorech v mikrofluidním zařízení z dielektrického polymethylmetakrylátu (PMMA) tak, že do mikrofluidního kanálku střídavě napouštěli roztok lipidů a pufr. Čip má dva prostory pro kapaliny (na přední a spodní straně substrátu), komůrku a kanálek. Ty jsou spojeny kuželovitým otvorem, na jehož užším konci se má vytvořit PLD. Jeho schéma je vyobrazeno na Obr. 11. Otvor je navržen tak, aby v něm zůstalo přesně definované množství roztoku lipidů, což zásadně zvyšuje možnost reprodukce tohoto systému. Lipidová dvojvrstva je poté vytvořena zúžením vrstvy roztoku po zavedení stálého tlaku 200–400 Pa až na několik Å, kdy se lipidy na rozhraní voda/rozpuštědlo začnou přitahovat van der Waalsovými silami a dvojvrstva je spontánně vytvořena samouspořádáním. Jelikož je dvojvrstva vytvořena v horizontální poloze, může být její tvorba pozorována mikroskopem (optickým či fluorescenčním při použití fluorescenční sondy) a zároveň mohou být prováděna elektrická měření pomocí Ag/AgCl elektrod zavedených na obou stranách dvojvrstvy. Do dvojvrstvy se podařilo zavést i gramicidinový peptidový kanál, kterým přechází monovalentní ionty. Maximální výtěžek úspěšné tvorby dvojvrstvy byl 90% a dvojvrstvy byly stabilní až desítky minut.

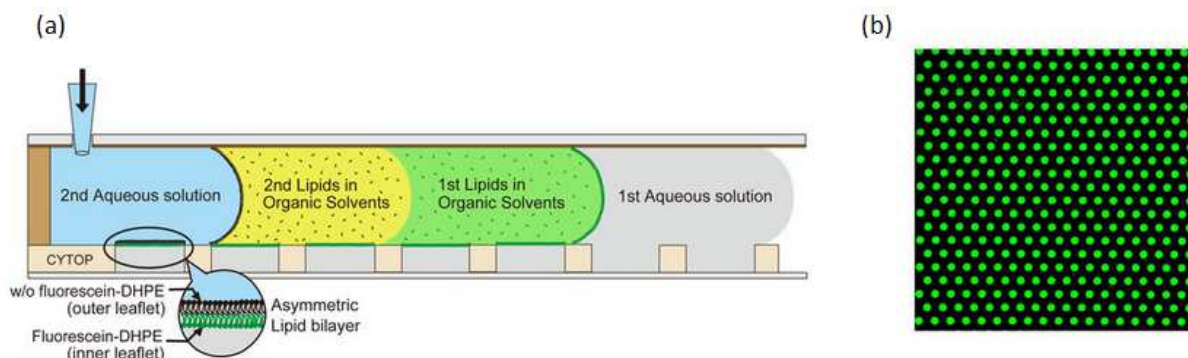


Obr. 11: Čip pro tvorbu PLD na 100 μm otvoru (a, b, c) přístupným z obou stran a schéma tvorby PLD (1–6) popsané výše [73]

Ganesan a Boxer [74] zase připravili PLD přes mikrometrové komůrky vyleptané do křemíkového waferu tak, že byla dvojvrstva asi 500 nm nad vysoce reflektivní plochou waferu, což umožnilo zkoumání zakřivení PLD a změnu zakřivení změnou osmotického tlaku, pomocí fluorescenční interferometrie.

Opravdu vysokokapacitní systém představili *Watanabe et al.* [75], kteří na jednom mikrofluidním zařízení vytvořili více jak 10 000 asymetrických PLD. Na hydrofilním skleněném substrátu byly vytvořeny kruhové komůrky z fluorokarbonového hydrofobního polymeru. Jak lze vidět na Obr. 12, lipidová dvojvrstva s rozdílným složením vrchního a spodního listu dvojvrstvy byla vytvořena proplachováním zařízení více různými roztoky. Nejdříve vodným roztokem, následně roztokem fluorescenčně označených lipidů, poté roztokem neoznačených lipidů a nakonec další vodný roztok odplaví přebytečný roztok

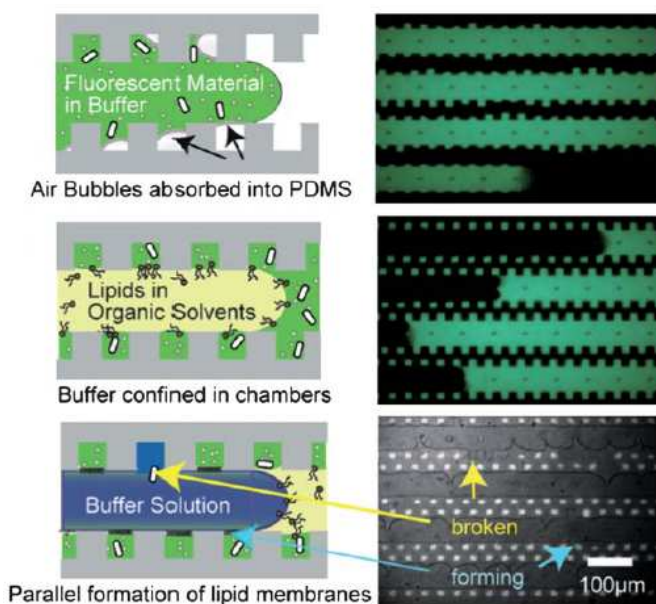
lipidů. Úspěšnost tohoto postupu byla přes 97%. Šířka membrány byla potvrzena zevedením α -hemolysinu, který funguje jako transportér pouze pokud vzniklý nanopór prochází celou membránou. Izolovanost jednotlivých komůrek s dvojrstvami byla potvrzena absencí laterální difúze po obnovení fluorescence po fotovybělení (FRAP). Flip-flop obrat lipidů byl potvrzen pomocí zhášení NBD-DPPE po kontaktu s ditioničitanem sodným, který byl k horní vrstvě dvojrstvy přiváděn s konečným roztokem pufru.



Obr. 12: Schéma přípravy PLD na mikrootvůrcích proplachovaných čtyřmi různými roztoky (a) a vrchní pohled na fluorescenčně zobrazené dvojrstvy (b) [75]

Podobný systém ovšem s PLD vytvořenou ve vertikální poloze představili *Ota et al.* [76] Ti připravili mikrofluidní čip z PDMS s řadou kanálků, na kterých jsou komůrky, na jejichž rozhraní se tvoří PLD. Lipidová dvojrstva se opět tvoří proplachováním zařízení různými roztoky. Nejdříve je mikročip napuštěn roztokem pufru obsahujícím fluorescenční sondu a α -hemolysin (membránový protein tvořící nanopóry). Ten je následován směsí lecitinu v hexadekanu, která pufr uzavře v komůrkách. Nakonec je čip promýván dalším roztokem pufru obsahujícím bovinní sérový albumin, který zabraňuje nespecifickým vazbám lecitinu na PDMS, a který vytlačí přebytečnou organickou fázi. Na rozhraní komůrka/kanálek tak zůstane fosfolipidová dvojrstva, do které se zabudeje α -hemolysin. Jeho funkčnost se po zabudování do dvojrstvy sleduje fluorescenční mikroskopií. Intenzita fluorescence v komůrkách klesá, protože se sonda přes nanopór dostává do kanálku a odchází spolu s pufrem ze zařízení. To zobrazuje Obr. 13.

Watanabe a Takeuchi [77] později představili zařízení na stejném principu vytvořené ze skla. Jelikož sklo na rozdíl od porézního PDMS nevstřebává kapaliny, vytvořené membrány jsou stabilnější a vydrží déle než čtyři dny. Skleněné zařízení může také být jednoduše propláchnuto organickými rozpouštědly a takto vyčištěný čip může být znovu použit.



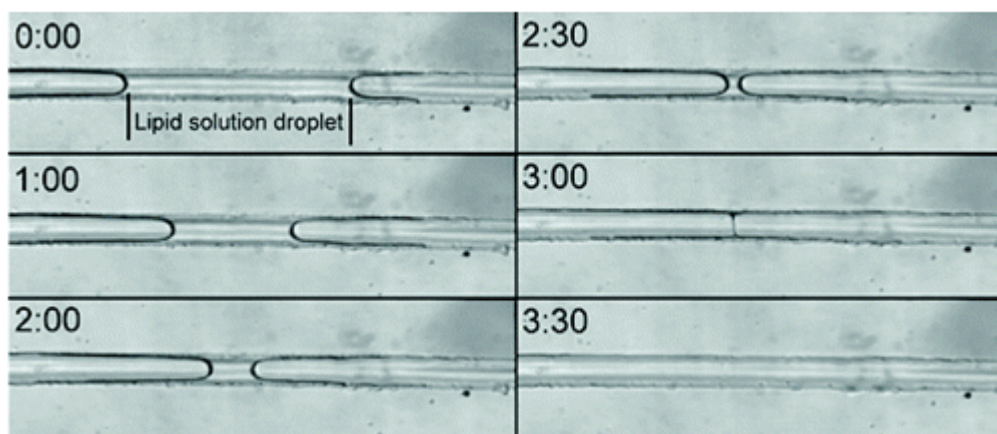
Obr. 13: Princip přípravy PLD na rozhraní kanálek/komůrka v mikrofluidním čipu proplachovaném třemi různými roztoky a připraveném skupinou Ota et al.[76]

Na tvorbu PLD, které neobsahují rozpouštědla, se také používá technika vezikulární fúze poté, co je roztok obsahující liposomy či proteoliposomy vpraven na otvor nebo porézní membránu. Podle velikosti otvoru či pórů se používají milimetrové či nanometrové lipidové vezikuly. Aby se dosáhlo prasknutí vezikulů, je většinou použit podtlak na jedné straně otvoru nebo se nabitě vezikuly dopraví na opačně nabitý porézní povrch. Velkou výhodou používání proteoliposomů je, že v jednom kroku vytvoříme dvojvrstvu s již zakomponovaným proteinem. Nevýhodou je většinou špatné elektrické těsnění mezi membránou a substrátem což vede k chybám v elektrických měřeních [78, 79].

Kreir et al. [79] vytvořili PLD prasknutím velkých unilamelárních vezikulů (GUV) poté co byly jemně nasáty na mikrometrový otvor v substrátu z borosilikátového skla. Použité GUV byly inkubovány s porinem OmpF z *Escherichia coli*, který je hlavním vstupem pro betalaktamová antibiotika. Tyto proteoliposomy dovolují okamžité zkoumání aktivity kanálu po přilnutí na substrát. Kreir a jeho skupina na nich zkoumali translokační procesy antibiotik a modulace OmpF sperminem. Poskytlí takzajímavou techniku pro zkoumání membránových proteinů, u kterých se nedá použít technika terčíkového zámku (*patch clamp*). Úspěšnost zavedení proteinu touto cestou byla 60%.

Předchozí způsoby tvorby PLD závisely na přesném a reprodukovatelném doručení malých objemů kapalin do mikrozařízení navržených tak, aby se v nich mohla PLD vytvořit samouspořádáním. Další zajímavá technika tvorby zavěšených PLD představuje systém, který není závislý na geometrii zařízení.

Malmstadt et al. [80] představili metodu založenou na extrakci rozpouštědla z kapky organického rozpouštědla obsahujícího lipidy, která je znázorněna na Obr. 14. Porézní PDMS organická rozpouštědla absorbuje, a proto se jim vědci v těchto aplikacích většinou vyhýbají. Tato metody ovšem dané vlastnosti PDMS využívá k tvorbě PLD. Kapka organického rozpouštědla je uzavřena mezi dvěma vodnými fázemi v mikrofluidním kanálku z PDMS a PLD je utvořena zužováním lipidové vrstvy nasáváním organického rozpouštědla do PDMS dokud se nespojí dvě monovrstvy. Tvorba PLD byla potvrzena měřením kapacitance.



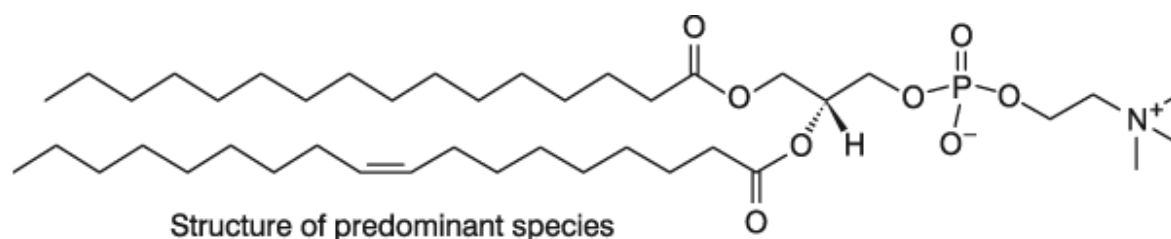
Obr. 14: Tvorba PLD na mikrofluidním čipu pomocí extrakce rozpouštědla s časem[80]

Může být konstatováno, že volně zavěšené PLD poskytují nejpřesnější modely přirozeného buněčného prostředí. Žádné konkrétní zařízení, metoda či materiál se pro tvorbu PLD na čipu neprojevili jako výrazně lepší než zbylé možnosti. Volba zařízení tedy závisí na konkrétní aplikaci a zamýšlené detekční metodě. Pro účely této práce se nejlépe hodí systém připravený skupinou *Ota et al.* [76], který byl podrobněji popsán výše. Představuje totiž zařízení, které je relativně jednoduché na přípravu a přístupné charakterizaci celou řadou fluorescenčních metod.

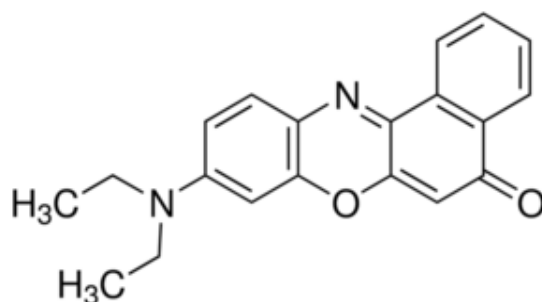
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

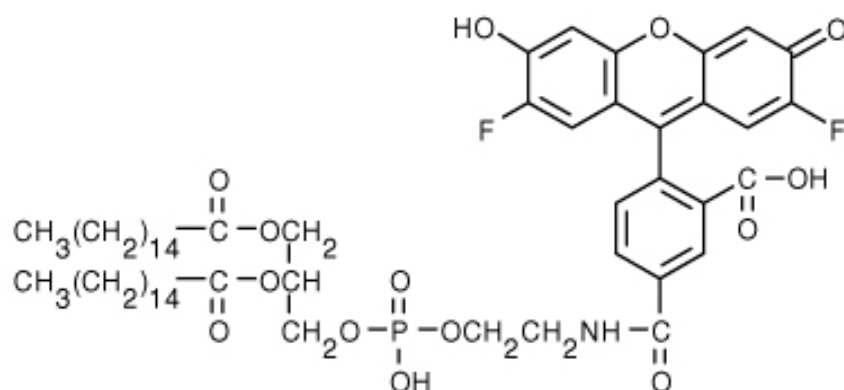
Lecithin, 1- α -Phosphatidylcholine (Egg, Chicken), CAS: 97281-44-2, Avanti Polar Lipids (USA), >99%, šarže: EPC-599



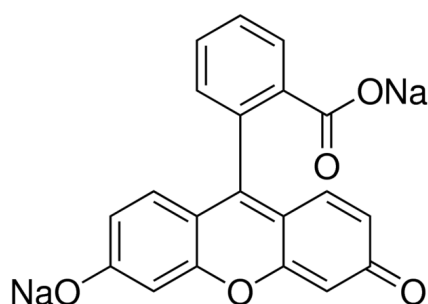
Nilská červeň, CAS 7385-67-3, Sigma-Aldrich (SRN), $\geq 98\%$, BioReagent, suitable for fluorescence, šarže: BCBM0136B



Oregonová zeleň DHPE, Life Technologies, šarže: 1212111



Fluorescein sodný, CAS: 2321-07-5, Sigma Aldrich (SRN), šarže: 101355957



Chloroform, CHCl_3 , CAS: 67-66-3, Sigma-Aldrich (SRN), $\geq 99,8\%$, šarže: 03096CK

Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , CAS: 7778-77-0, PENTA (ČR), čistota p.a., šarže: 1805180516

Chlorid sodný, NaCl , CAS: 7647-14-5, PENTA (ČR), čistota p.a., šarže: 2106210616

Chlorid draselný, KCl , CAS: 7447-40-7, PENTA (ČR), čistota p.a., šarže: 1903280314

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, CAS: 10039-32-4, PENTA (ČR), čistota p.a., šarže: 2105180516

Albumin z bovinního séra, CAS: 9048-46-8, Sigma-Aldrich (SRN), $\geq 98\%$, šarže: SLBF7168V

Hexadekan, $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$, CAS: 544-76-3, Sigma-Aldrich (SRN), 99%, ReagentPlus, šarže: SHBG3884V

Tetradekafluorhexan, C_6F_{14} , CAS: 355-42-0, Sigma-Aldrich (SRN), 99%, šarže: MKBW5242V

Polydimetylsiloxan, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo (ČR), šarže: 0008885206

Isopropanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, CAS: 67-63-0, PENTA (ČR), čistota p.a.

Aceton, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, CAS: 67-64-1, PENTA (ČR), čistota p.a.

1-oktanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$, Sigma Aldrich (SRN), 99%

MiliQ voda

4.2 Přístrojové a softwarové vybavení

Analytické váhy – Pioneer, OHAUS Europe (Švýcarsko)

Předvážky – S-603, Denver Instruments(USA)

Vortex – MS2 Minishaker, IKA (SRN)

Třepačka – Vibramax 100, Heidolph (SRN)

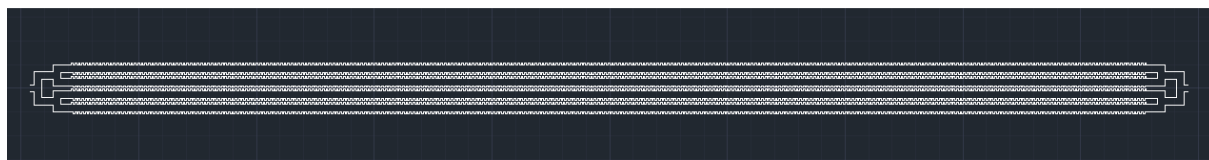
Membránová vývěva – KNF (SRN),

NANO Plasma cleaner – Diener (SRN)
Stříkačková pumpa – Aladdin 1000, World Precision Instruments (USA)
Invertní mikroskop – Olympus IX71 (Japonsko)
Lampa – X-Cite 120Q, Excelitas Technologies (USA)
Monochromatická kamera – Olympus XM10 (Japonsko)
Microtime 200, PicoQuant (SRN)
AutoCAD 2014 – AutoDesk (USA)
SymPhoTime 64 – PicoQuant (SRN)
CellSens – Olympus (Japonsko)

4.3 Metody

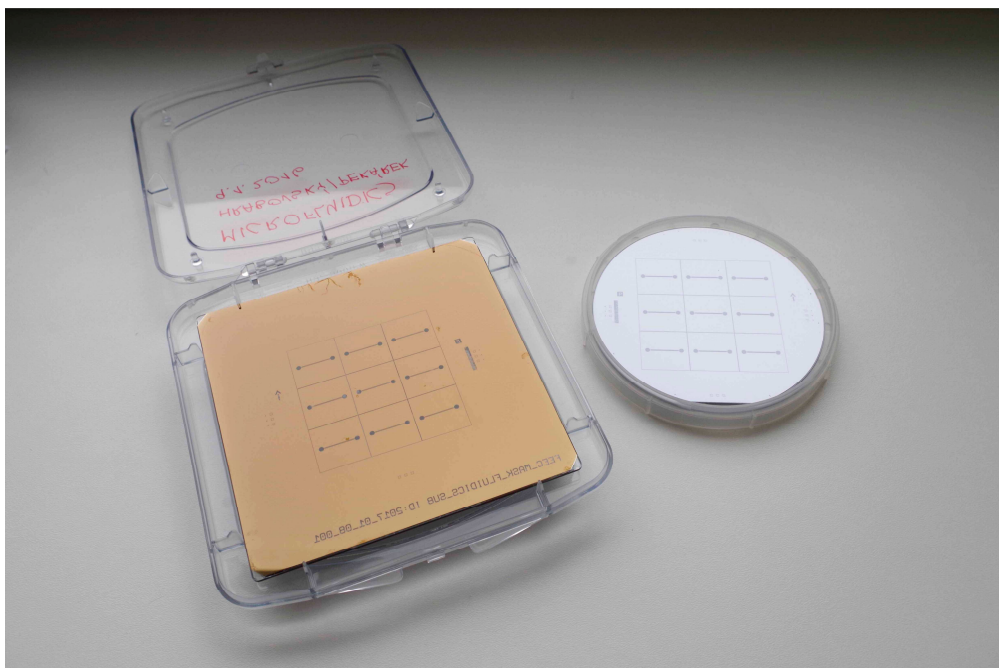
4.3.1 Návrh mikrofluidního čipu

Byla vytvořena CAD složka s návrhem mikrofluidního čipu, který nejlépe vyhovuje dané aplikaci. Čip obsahuje čtyři kanálky (každý 80 μm široký), které se na konci a na začátku spojují do jednoho přívodního/odvodního kanálku. Po obou stranách z každého kanálku vystupují obdélníkové komůrky o hloubce 19 μm a šířce 17 μm , které jsou od sebe navzájem vzdálené 20 μm a nejsou na kanálku rozmístěny naproti sobě, ale na přeskáčku (viz. Obr. 15Obr. 15 a Obr. 22). Výška celého kanálku je 10 μm .



Obr. 15: Návrh připravovaného mikrofluidního čipu v programu AutoCAD

Podle návrhu byla laboratoří Nanomateriálů CEITECu VUT v Brně vytvořena odlévací forma pro přípravu devíti mikrofluidních čipů. Tu lze vidět na Obr. 16.



Obr. 16: Fotomaska a odlévací forma

4.3.2 Odlévání mikrofluidního čipu

Na odlévací formu bylo nanášeno takové množství hmoty Sylgard 184, aby se zajistila požadovaná tloušťka zařízení. Sylgard 184 je dodáván jako sada obsahující silikonovou odlévací hmotu a síťovací činidlo, které je nutné smístit v poměru 10:1. Mísením se ovšem do hmoty zavedou bublinky vzduchu, které je nutné před vytvrzením odstranit. Toho bylo dosaženo vložením směsi pod vakuum. Nanášená vrstva byla vytvrzena po dobu 1 hodiny při 80 °C. Vytvrzená PDMS replika byla z masky sloupnuta a byly z ní vyřezány jednotlivé části čipu. Do každého čipu byl provrtán přívodní a výstupní otvor.

4.3.3 Kompletace mikrofluidního čipu

Odlité a vyřezané PDMS repliky čipu byly vyčištěny ultrazvukováním v isopropanolu a krycí sklíčka byla vyčištěna acetonem. PDMS i krycí sklíčka byla následně ošetřena plazmou (Diener NANO Plasma cleaner, 50% výkon, 70% kyslíku a 30% argonu, tlak 0,5 mbar, 30 sekund) a spojena do koncových mikrofluidních zařízení. Ta byla žíhána při 150 °C dokud nebyl spoj pevný. K přívodnímu i výstupnímu otvoru byly přilepeny konektory. Hotové zařízení je na Obr. 17. Tato zařízení byla skladována ponořená v superčisté vodě.



Obr. 17: Hotový mikrofluidní čip připravený k použití

4.3.4 Příprava zásobních roztoků pufru

Byl vytvořen zásobní roztok fosfátového pufru o koncentraci 10 mM a pH 7,4 (1xPBS) rozpuštěním příslušných množství chloridu sodného, hydrogenfosforečnanu sodného, chloridu vápenatého a dihydrogenfosforečnanu draselného v superčisté vodě.

Do zásobního roztoku fosfátového pufru bylo přidáno takové množství Bovinního sérového albuminu (BSA), aby jeho konečná koncentrace byla 0,5–1 g/l. Tyto roztoky byly skladovány v chladicím boxu při teplotě 8 °C.

4.3.5 Příprava roztoku pufru pro fluorescenční zobrazování

Do vialky bylo pipetováno takové množství Fluoresceinu v roztoku chloridu sodného, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l a na příslušný objem byl roztok doplněn příslušným množstvím zásobního roztoku 1xPBS. Tento roztok byl skladován v chladicím boxu při teplotě 8 °C.

4.3.6 Příprava roztoků lipidů

Byl vytvořen zásobní roztok lecitinu v chloroformu o koncentraci 250 g/l. Tento roztok byl skladován v mrazicím boxu při teplotě –20 °C.

Do vialky bylo pipetováno takové množství lecitinu v chloroformu, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 10 g/l. Rozpouštědlo se nechalo odpařit a vytvořený tenký film se

rehydratoval hexadekanem. Ze stěny vialky byl film uvolněn pomocí vortexu. Tento roztok byl skladován při pokojové teplotě za neustálého protřepávání.

4.3.7 Příprava roztoků lipidů pro fluorescenční zobrazování

Do vialky bylo pipetováno takové množství Oregonové zeleně DHPE v chloroformu, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l a chloroform byl ze vzorku odpařen. Na odparek sondy bylo napipetováno příslušné množství lecitinu v chloroformu, tak aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 10 g/l. Rozpouštědlo se opět nechalo odpařit a vytvořený tenký film byl rehydratován hexadekanem. Ze stěny vialky byl film uvolněn pomocí vortexu. Stejným způsobem byl připraven i roztok lecitinu s hexadekanem a Nilskou červení jako fluorescenční sondou. Tyto roztoky byly skladovány při pokojové teplotě za neustále protřepávání.

Dále bylo do vialky pipetováno takové množství Nilské červeně v chloroformu, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l a chloroform byl ze vzorku odpařen. Na odparek sondy bylo napipetováno příslušné množství lecitinu v chloroformu, tak aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 10 g/l. Rozpouštědlo se opět nechalo odpařit a vytvořený tenký film byl rehydratován 1-oktanolem. Ze stěny vialky byl film uvolněn pomocí vortexu. Tento roztok byl skladován při pokojové teplotě.

4.3.8 Ověření funkčnosti čipu pomocí mikroskopie

Injekční stříkačka byla naplněná puřem obsahujícím fluorescenční sondu, vložena do stříkačkové pumpy (Aladdin 1000, WPI) a připojena k mikrofluidnímu čipu. Čip byl puřem proplachován a vizualizován pomocí fluorescenční mikroskopie a zobrazování dob života.

4.3.9 Ověření tvorby membrány pomocí mikroskopie

Injekční stříkačka byla celá naplněna tetradekafluorohexanem. Na stříkačku byla připojena přívodní hadička, která byla naplněna nejdříve roztokem puřru s BSA, poté roztokem lipidů s fluorescenční sondou a znovu roztokem puřru. Takto naplněná stříkačka byla vložena do stříkačkové pumpy (Aladdin 1000, WPI) a připojena k mikrofluidnímu čipu. Roztoky byly přes mikrofluidní čip pumpovány konstantním proudem o průtoku 1 nl/min.

Tvorba lipidové dvojvrstvy na rozhraní kanálek/komůrka byla vizualizovaná optickou i fluorescenční mikroskopií. Záznam byl pořízen konfokálním mikroskopem Olympus IX71 vybaveným 120 W Hg lampou. Byl použit superapochromatický objektiv s vodní imerzí UplanSApo, 60násobným zvětšením a numerickou aperturou 1,2. Pro Fluorescein byla zvolena filtrační kostka 1 (viz.Tab. 1), pro Oregonovou zeleň byla taktéž použita filtrační kostka 1 (viz. Tab. 1) a pro Nilskou červeň byla použita filtrační kostka 2 (viz.Tab. 1). Záznamy byly zaznamenávány pomocí monochromatické CCD kamery Olympus XM10, kterou je mikroskop vybaven a programu CellSens.

Tab. 1: Přehled filtračních kostek a jejich komponent

| | Filtrační kostka | Excitační filtr | Dichroické zrcadlo | Emidní filtr |
|---|------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| 1 | U-MWIB3 | BP460–495 | DM505 | BA510IF |
| 2 | U-MWG2 | BP510–550 | DM570 | BA590 |

Zobrazování dob života (funkce FLIM) bylo měřeno na přístroji MicroTime 200 firmy PicoQuant s konfokálním mikroskopem Olympus IX71. Byl použit superapochromatický objektiv s vodní imerzí UplanSApo, 60násobným zvětšením a numerickou aperturou 1,2, který byl připevněn ke skeneru s piezoelektrickým posuvem.

Když byla jako sonda použita Nilská červeň, byl pro ni zvolen laser 507 nm s frekvencí 40 MHz a intenzitou 120 a.u.; dichroické zrcátko 514/640; a pro vyloučení peaku Ramanova rozptylu ve vodě byl použit emisní filtr 690/70.

Když byla jako sonda použita Oregonová zeleň, byl pro ni zvolen laser 507 nm s frekvencí 40 MHz a intenzitou 120 a.u.; dichroické zrcátko 514/640; a pro vyloučení peaku Ramanova rozptylu ve vodě byl použit emisní filtr 550/49.

Když byl jako sonda použit Fluorescein, byl pro něj zvolen laser 467 nm s frekvencí 40 MHz a intenzitou 120 a.u.; dichroické zrcátko 470/635; a pro vyloučení peaku Ramanova rozptylu ve vodě byl použit emisní filtr 520/35.

Kanálek i fosfolipidová dvojvrstva byly zkoumány pomocí zobrazování dob života (funkce FLIM) byla zjištěna poloha kanálku na ose z. Snímek v ose xy byl pořízen zhruba uprostřed kanálku. Data byla zpracována v programu SymPhoTime 64.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výroba mikrofluidního čipu

5.1.1 Odlévání čipu

Při odlévání mikrofluidního čipu na odlévací formě popsaném v kapitole 4.3.2 nenastaly žádné komplikace. PDMS šlo po vytvrzení lehce sloupnout z odlévací formy a drželo požadovaný tvar. Stejně tak šly pomocí skalpelu snadno vyřezat jednotlivé repliky, ovšem nebylo až tak snadné vyvrtat přívodní/výstupní otvory neboť je potřeba se strefit na kruh o průměru 1,5 mm přes 3 a více mm tlustou vrstvu PDMS, která zkresluje pohled na strukturu na její druhé straně. Může tak jednoduše dojít k narušení struktury přívodních kanálků. Jednoduchým řešením by bylo prodloužení napojovacího kanálku na otvor tak, aby nebyla vyžadována tak velká míra přesnosti. Například ze současných 40 μm na 120 μm .

5.1.2 Kompletace čipu

Ošetření PDMS replik a krycích sklíček plasmou a jejich spojení probýhalo v čistých prostorách. Jelikož byly čipy připravovány v běžné laboratoři, bylo je nejprve nutné vyčistit sonikací v isopropanolu. Stejně tak bylo nutné vyčistit od nečistot krycí sklíčka. Nečistoty na povrchu mohou zabránit správnému spojení obou materiálů a při tak malých rozměrech struktur na čipu mohou zabránit jeho správné funkčnosti. Krycí sklíčka se dají koupit přečištěná už od výrobce. PDMS se po pobytu v isopropanolu stává extrémně přilnavým k jakémukoli skleněnému či kovovému povrchu což značně znesnadňuje další práci s ním. Je proto vhodné vzít v úvahu, zda je vyčištění čipů opravdu nutné a popřípadě použít podložku z materiálu, ke kterému se PDMS nepřilepí – jako například neprášivou utěrku. V tomto případě jsme použili čipy jak vyčištěné, tak nevyčištěné (přičemž jsme dbali na co největší čistotu práce v laboratoři) a nepozorovali jsme žádné rozdíly v jejich funkčnosti a vliv na tvorbu lipidových dvojvrstev (PLD).

Ošetřením obou povrchů plazmou došlo k obnažení silanolových skupin ($-\text{Si}-\text{OH}$) na povrchu, které vedlo k vytvoření pevných kovalentních vazeb ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) při kontaktu PDMS se sklem. Plazmochemická úprava povrchu je metoda, která vyžaduje přesnou kalibraci, aby nedošlo jen k aktivaci povrchu, která není dostatečná pro kovalentní spojení obou materiálů. Nám se ji podařilo optimalizovat s nejlepšími výsledky při 50% výkonu za použití směsy se 70% kyslíku a 30% argonu, pod tlakem 0,5 mbar, a při délce výkonu 30 sekund (v zařízení Diener NANO Plasma cleaner). Pevnost spoje mezi PDMS a sklem byla podpořena žíháním spojených čipů při 150 $^{\circ}\text{C}$ dokud nebyl spoj prakticky neoddělitelný. Některé čipy, které nebyly žíhány k sobě nepřilnuly celým povrchem.

Nejenže je ošetření plazmou metoda pro spojení jednotlivých částí do konečného zařízení, ale navíc se oplazmováním stává celý povrch kanálku hydrofilním, což napomáhá jeho plnění vodnými roztoky.

Některá literatura [81] uvádí, že skladováním hotových čipů v superčisté vodě se prodlouží doba, po kterou zůstává oplazmovaný povrch kanálku hydrofilní, jiné zdroje [22] zase uvádějí, že tato povrchová úprava zaniká po zhruba třiceti sekundách. My jsme žádný vliv skladování čipů na tvorbu PLD nepozorovali, nicméně jsme neprováděli testy smáčivosti povrchu.

Konektory byly k čipu zprvu lepeny dvousložkovým epoxidovým lepidlem běžně pro tyto účely používaným. Pokud je PDMS dostatečně vysoké, konektory v něm drží zasazené a je možné nechat lepidlo 24 hodin zaschnout bez nutnosti přidržování konektorů na místě. Již při prvním zapojení zařízení se však toto lepidlo ukázalo nedostačujícím. Nevdrželo tlak,

pod kterým byly roztoky do zařízení pumpovány, a i s konektory se od PDMS odlepilo. To mohlo být způsobeno jak špatným poměrem jednotlivých složek při mísení lepidla v dvoukomorové tubě, tak lehkým nabobtnáním PDMS i lepidla ve vodě, které zabránilo správnému přilnutí. Nadále bylo používáno lepidlo Pattex 100% GEL, které si zachovávalo své vlastnosti i po několikadenním skladování čipu v superčisté vodě.

5.2 Zapojení zařízení

Čipy byly v superčisté vodě skladovány minimálně 24 hodin před použitím, aby bylo dosaženo plného nasycení PDMS vodou. To přispívá ke zvýšení stability vzniklých PLD. Pokud by porézní PDMS nebylo nasaturováno vodou již před použitím, došlo by k absorpci vodního roztoku z komůrek do PDMS což by mohlo zamezit vzniku PLD nebo vést k porušení již vzniklých PLD.

Zabránění vniku bublinek vzduchu do celého systému je velice důležitým faktorem při zapojování celého zařízení. Vzduchové bublinky z injekční stříkačky a přívodní hadičky je nutno před připojením na čip vytlačit. Ze stejného důvodu je zařízení před použitím propláchnuto roztokem fosfátového pufru, který vytlačí všechny zbylé vzduchové bubliny a zaplaví celý objem kanálku pufrem. Vzduchové bubliny by narušily fázovou separaci a v konečném důsledku i tvorbu PLD.

Jednotlivé roztoky jsou proto do přívodní hadičky nasávány z kapek příslušných roztoků deponovaných na vyčištěné krycí sklíčko. Při tom je kladen důraz na zarovnání ostrého okraje hadičky s kapkou na sklíčku.

Zde hraje roli i vnitřní průměr používaných hadiček. Tyto jevy jsme byli schopni omezit přejitím ze silikonových hadiček o vnitřním průměru 1 mm na silikonové hadičky s vnitřním průměrem 0,5 mm.

Stále se nám ovšem vniku vzduchových bublinek do systému nepodařilo zcela předejít. Nejlepším řešením by zde bylo zapojení prvků, jako jsou například mikroventily a mikroodvzdušovače, které jsou v dnešní době komerčně dostupné. A přivádění roztoků přes rozdvojku z injekčních stříkaček naplněných pouze jedním druhem roztoku na stříkačkové pumpě s dvěma nezávislými kanály.

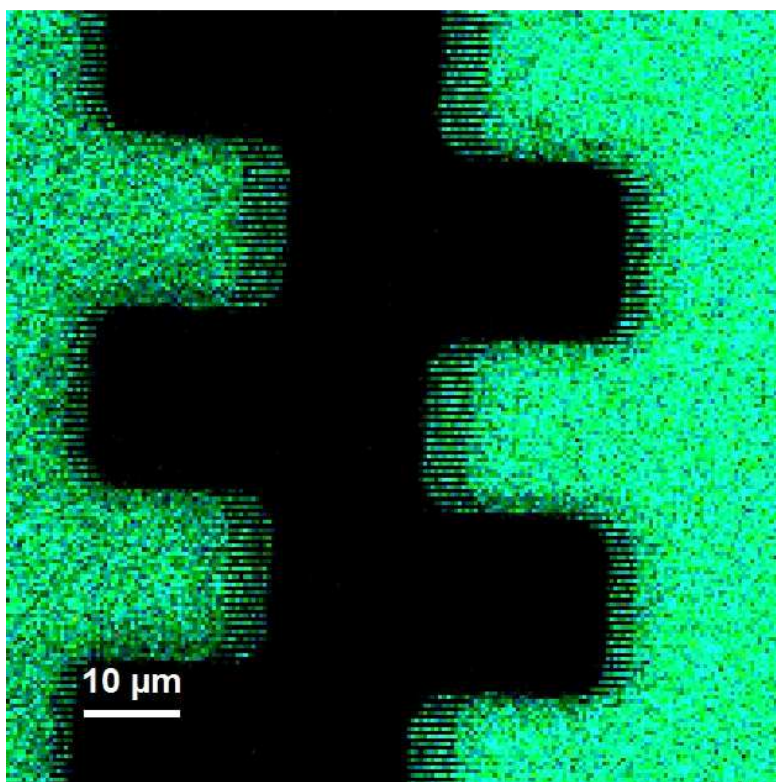
5.3 Ověření funkčnosti čipu

Pro ověření funkčnosti čipu, přesnosti výrobní metody a pevnosti spoje mezi PDMS a krycím sklíčkem byl čip přes noc proplachován fluorescenčně značeným pufrem.

Na fluorescenčním mikroskopu bylo poté patrné, že pufr zatékal do všech komůrek a plně zaplnil celé zařízení. Tudíž jsme potvrdili, že 10 μm je dostatečná výška kanálku pro to, aby do něj byla kapalina schopná zatéct. Zároveň jsme potvrdili správnou architekturu čipu, a také to, že jsme ji neporušili při výrobě a manipulaci s čipem.

Dále jsme potvrdili i pevnost spoje mezi PDMS replikou a krycím sklíčkem neboť oblast mezi čipy tvořená přepážkou z PDMS nevykazuje žádnou fluorescenci, můžeme tudíž usuzovat, že se nám opravdu podařilo dosáhnout kovalentní vazby mezi oběma materiály a roztoky nezatékaly mezi sklo a PDMS repliku.

To vše je patrné i z FLIM scanu na Obr. 18. Na něm jsme i přeměřili rozměry odlitého čipu, které odpovídaly návrhu.



Obr. 18: Zobrazení okrajů dvou kanálků (zářivá oblast) a PDMS přepážky mezi nimi (tmavá oblast) pomocí skenovací mikroskopie

5.4 Ověření tvorby membrány

5.4.1 Princip tvorby lipidové dvojvrstvy

Pro ověření tvorby membrány byla injekční stříkačka celá naplněna tetradekafluorohexanem. Na stříkačku byla připojena přívodní hadička, která byla naplněna nejdříve roztokem pufru s BSA, poté roztokem lipidů s fluorescenční sondou a znovu roztokem pufru. Takto naplněná stříkačka byla vložena do stříkačkové pumpy a přes konektor připojena k mikrofluidnímu čipu přes který byly roztoky pumpovány konstantní rychlostí.

První roztok pufru slouží pro propláchnutí mikrofluidního čipu, vytlačení vzduchových bublinek a naplnění komůrek na kanálku. Následující roztok lipidů v hexadekanu pufr uzavře v komůrkách a na rohraní se vytvoří vrstva lipidů orientovaná polárními hlavičkami do pufru v komůrce a nepolárními konci do hexadekanu v kanálku. Poslední roztok pufru obsahující BSA vytlačí hexadekan za současného utvoření tenké lipidové dvojvrstvy na rozhraní kanálek/komůrka, kde se další vrstva uspořádá nepolárními konci směrem s nepolárním koncem monovrstvy a polárními hlavičkami do druhého roztoku pufru v kanálku.

Tetradekafluorohexan slouží k odtlumení fluktuací v proudu při pumpování roztoků přes čip. BSA se používá pro zabránění nespecifických vazeb molekul na PDMS.

5.4.2 Vliv rychlosti průtoku

Roztoky byly přes mikrofluidní čip pumpovány konstantním proudem o průtoku 1 nl/min. Zajištění a udržení stálého proudu s co nejmenšími fluktuacemi je pro mikrofluidiku kritické. Literatura [76] tento průtok uvádí jako dostatečně pomalý pro zajištění tvorby PLD, ale zároveň dostatečně rychlý na to, aby organická fáze neucpala mikrofluidní čip. Experimenty, které jsme prováděli s průtokem 1 μ l/min můžeme potvrdit, že při vyšší rychlosti se nám úspěšné tvorby PLD dosáhnout nepodařilo. Experimenty s nižším průtokem

nám nedovolilo technické vybavení. Vyzkoušeli jsme alespoň roztoky po kapkách deponovat na přívodní otvor (u čipů, které nebyly opatřené konektory) a nechat je do zařízení nasát kapilárními silami. Byly však nasáty jen do poloviny zařízení a dále už nepostupovaly. To mohlo být zapříčiněno architekturou zařízení nebo faktem, že hydrofilní povrchová úprava opravdu nevydrží dlouho a hydrofobní povrch není roztokem pufru smáčen, a tedy ho do zařízení nenasává. Průtok 1 nl/min vytvořený stříkačkovou pumpou byl proto potvrzen jako ideální.

5.4.3 Vliv organického rozpouštědla

Lecitin pro přípravu PLD byl rozpuštěn v hexadekanu, který byl jako rozpouštědlo vybrán proto, že je nemísitelný s vodou a kompatibilní s PDMS. Má totiž rozpustnostní parametr vyšší než PDMS, a proto jeho působením PDMS nenabobtnává. Další jeho příznivou vlastností je hustota nižší než má voda, což přispívá k jeho relativně snadnému přepumpování přes kanálek. Ta samá vlastnost se však projevuje jako nevýhoda při plnění roztoků do přívodních hadiček, kdy roztok hexadekanu s lecitinem teče proti proudu směrem ke stříkačce. Tento problém se ovšem, stejně jako v případě vzduchových bublin podařilo omezit použitím hadiček o menším vnitřním průměru. V chladnějších měsících se také stává problémem relativně vysoká teplota tání hexadekanu, který je potřeba uchovávat při teplotě nad 18°C aby zůstal kapalný. Hexadekan měl také tendence k tuhnutí při použití s pufrem skladovaným v chladicím boxu. Pufr bylo nutné před použitím nechat temperovat na pokojovou teplotu a celý systém na této teplotě po celou dobu experimentu udržovat.

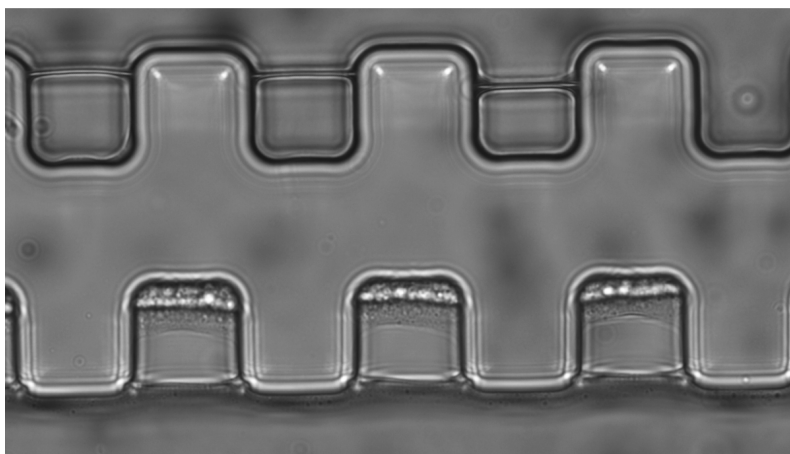
Jako alternativa hexadekanu byl použit 1-oktanol, který je velmi omezeně mísitelný s vodou a také by neměl PDMS moc nabobtnávat. Jelikož má dynamickou viskozitu o něco vyšší než hexadekan, nebyl problém s jeho putováním proti proudu a kapalný zůstává nad teplotu -15°C. Právě tato vyšší viskozita ovšem pravděpodobně způsobila, že roztok oktanolu s lecitinem sice kanálek naplnil a uzavřel pufr v komůrkách, ale nebyl roztokem pufru vytlačen z kanálku, ale vytékal ve spoji přívodního konektoru a přívodní hadičky mimo zařízení.

Výzvou tedy zůstává nalezení vhodného rozpouštědla, které se nemísí s vodou, nenabobtnává PDMS a má správnou míru viskozity. Dalšími alternativami vhodnými k vyzkoušení jsou například hexan nebo dekan.

5.4.4 Vizualizace membrány

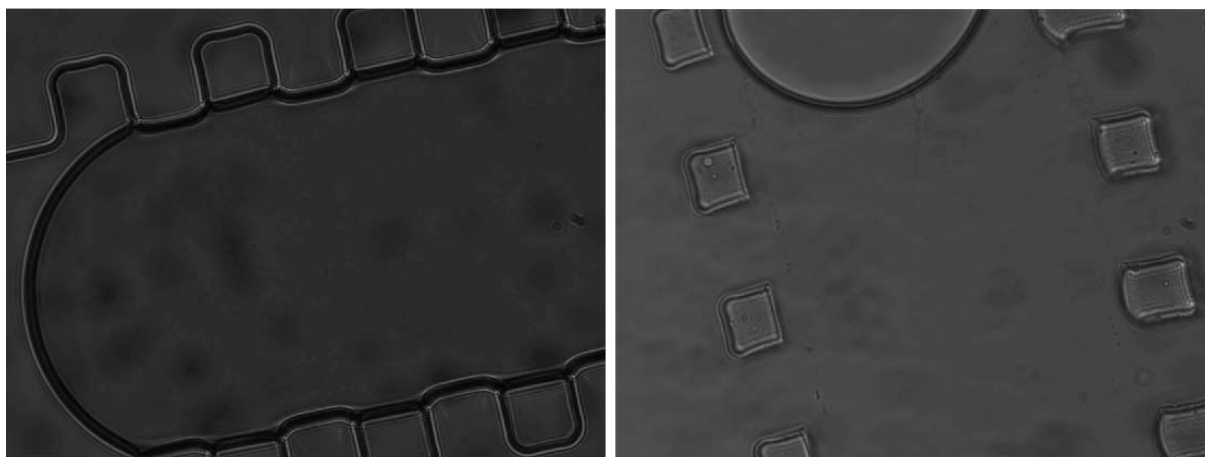
Tvorba lipidové dvojvrstvy na rozhraní kanálek/komůrka byla vizualizovaná optickou i fluorescenční mikroskopií.

Optickou mikroskopií jsme ve světlém poli pozorovali rozhraní dvou fází – vodné a organické. Na Obr. 19 jsme na jednom snímku čipu schopni pozorovat úspěšnou i neúspěšnou tvorbu PLD na rozhraní komůrek a kanálků. Nahoře můžeme na rozhraní prvních tří komůrek a kanálku pozorovat ukázkovou lipidovou dvojvrstvu, kdežto na čtvrté komůrce se PLD nevytvořila nebo nebyla stabilní. Na spodním kanálku se PLD nevytvořila vůbec. Komůrky pravděpodobně nebyly plně zaplněné pufrem a natekla tak do nich organická fáze, která v nich byla enkapsulovaná v tlusté vrstvě. Je také možné, že úspěšné tvorbě PLD zabránily vzduchové bubliny v kanálku, které byly vtlačeny do komůrek, nebo jeho znečištění.



Obr. 19: Snímek okrajů dvou kanálků oddělených stěnou z PDMS (uprostřed) pořízený optickou mikroskopií. Na rozhraní horních komůrek a kanálku je vytvořena fosfolipidová dvojvrstva

Na videu (příloha 1) můžeme tvorbu PLD sledovat v reálném čase. Pro tištěnou formu nám jako ukázka poslouží Obr. 1Obr. 20. Na snímku vlevo můžeme vidět jak roztok hexadekanu s lecitinem postupuje kanálkem a uzavírá roztok pufu v komůrkách. Je krásně vidět fázové rozhraní. To si díky nemísitelnosti obou roztoků zachovává svoji stabilitu po celou dobu přechodu hexadekanu přes kanálek, dokud není do kanálku pumpován druhý roztok pufu. Na snímku vlevo můžeme pozorovat konec organické fáze vytlačované z kanálku roztokem pufu. I po odchodu organické fáze můžeme na rozhraní komůrky a kanálku pozorovat jasné fázové rozhraní, které naznačuje úspěšnou tvorbu PLD.



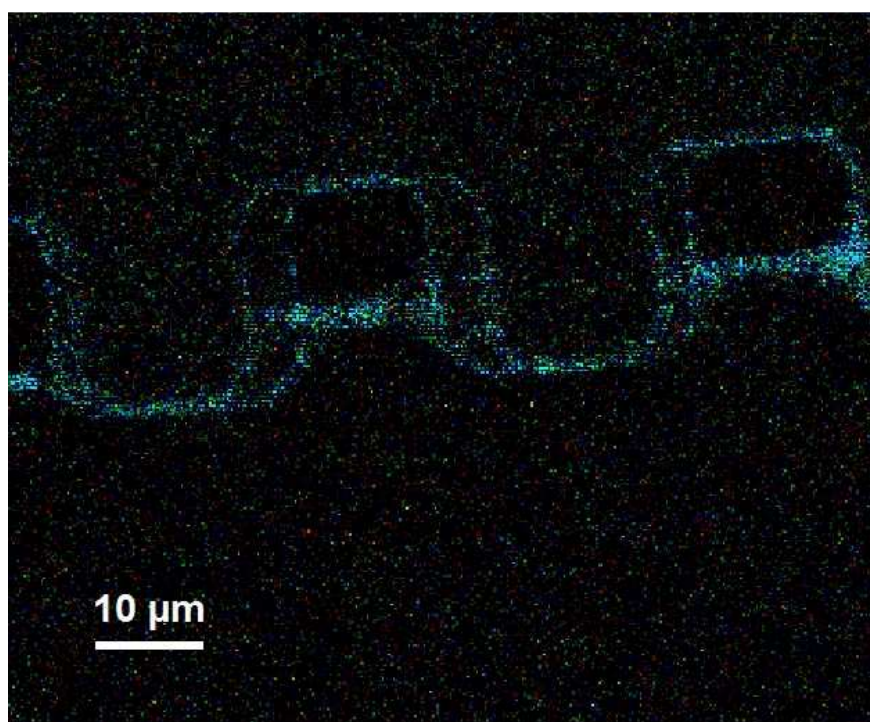
Obr. 20: Zachycení tvorby PLD v kanálku. Vlevo do kanálku přichází organická fáze obsahující fosfolipidy a uzavírá pufu v komůrkách. Vpravo organická fáze odchází a zůstávají za ní komůrky uzavřené PLD

Tomuto závěru přispívají i pozorování tvorby PLD fluorescenční mikroskopií. Zde pozorujeme fluorescenčně označenou PLD proti pozadí, které nevykazuje fluorescenci.

Nejprve byla jako sonda zvolena Oregonová zeleň DHPE, která se stává přímou součástí PLD. Fosfolipid s fluorescenční značkou na polární hlavičce se stává jedním ze stavebních prvků PLD s fluorescenční značkou orientovanou do vodného prostředí. S ním vytvořené PLD byly pozorovatelné pod fluorescenčním mikroskopem, ale kvůli velice rychlému fotovybělování se nepodařilo zachytit jejich snímek.

Jako alternativa byla zvolena Nilská červeň, která v polárním prostředí vykazuje nízkou intenzitu fluorescence, zatímco v hydrofobním prostředí, kam se přednostně solubilizuje, její fluorescence roste. Měla by tudíž zůstat v roztoku organického rozpouštědla a ve vytvořené PLD se začlenit mezi dlouhé nepolární řetězce mastných kyselin. Ani s touto sondou se nám však vzniklé PLD fluorescenční mikroskopií nepodařilo zobrazit. Sonda vykazovala nulovou nebo velice nízkou intenzitu fluorescence jak v hexadekanu, tak v oktanolu. To neodpovídá jejímu běžnému chování a není zcela jasné proč k tomuto jevu docházelo. Neboť má Nilská červeň tendenci k adsorpci na sklo, není vyloučené, že došlo k interakci s povrchem, která způsobila nízkou intenzitu fluorescence.

Jelikož se nám vytvořené dvojvrstvy nepodařilo zobrazit fluorescenční mikroskopií, zvolili jsme jako další vhodnou metodu zobrazování dob život (FLIM). Pomocí zobrazování dob života se nám podařilo vizualizovat jednotlivé PLD na rozhraní komůrek a kanálků což je patrné na Obr. 21. Dovolujeme si z toho usuzovat, že se nám úspěšná tvorba fosfolipidové dvojvrstvy na mikrofluidním čipu podařila.



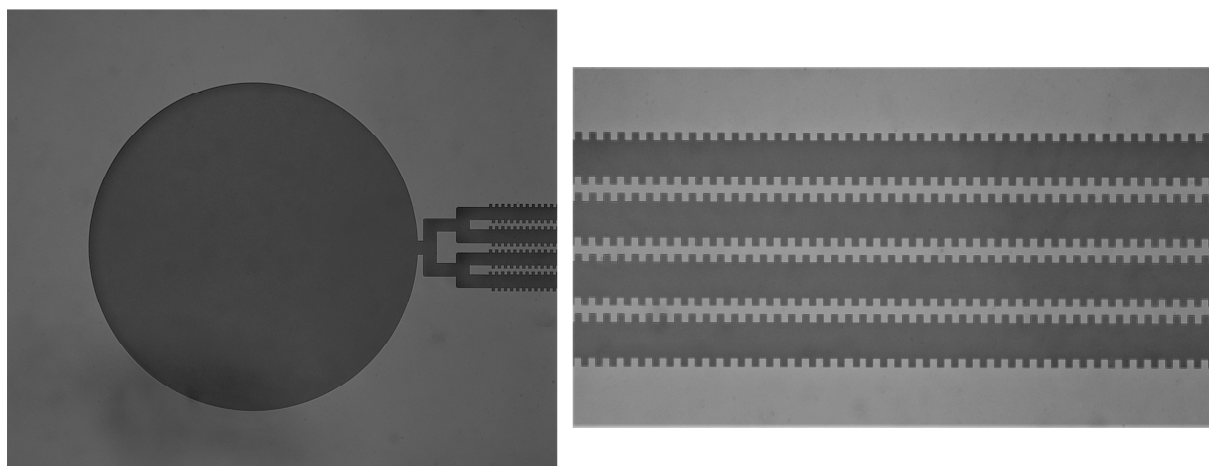
Obr. 21: Vytvořená PLD zobrazená pomocí skenovací mikroskopie

5.4.5 Design mikrofluidního zařízení

Design mikrofluidního zařízení se bez potíží podařilo přenést na odlévací formu při zachování všech detailů a ostrých hran jak lze vidět na Obr. 22. Zaoblení hran je způsobeno až odléváním PDMS repliky kanálků, ale zařízení si stále zachovává požadovaný tvar, rozměry a funkci (viz Obr. 18).

Design mikrofluidního čipu se projevil jako vhodný pro tvorbu PLD námi zvoleným způsobem. Kanálky jsou dostatečně velké pro umožnění průchodu používaných roztoků a komůrky nejsou tak velké, aby došlo k odtržení PLD působením tlaku, který je na ni při pumpování roztoků přes čip vytvářen. Díky použití podložního sklíčka je PLD možno vizualovat pomocí mikroskopie. A vertikální orientace membrány umožňuje provádění řady experimentů. Můžeme například pozorovat difuzi fluorescenčně značených molekul přes

membránu nebo v ní zavedené proteinové kanály. Interakci membrány s dalšími molekulami a systémy. Vliv změny prostředím na stabilitu membrány a mnohé další.



Obr. 22: Mikroskopický snímek struktury mikrofluidního zařízení na odlévací formě. Vlevo přívodní otvor a jeho napojení na kanálky při pětinasobném zvětšení. Vpravo kanálky při desetinasobném zvětšení.

5.4.6 Složení dvojvrstvy

Pro prvotní experimenty bylo zvoleno úplně základní a zjednodušené složení PLD obsahující pouze lecitin. Po potvrzení správnosti metody a funkčnosti mikrofluidního čipu pro tvorbu PLD s tímto zjednodušeným modelem se můžeme zaměřit na tvorbu opravdu autentického modelu buněčné membrány s různorodějším složením lipidů a pokusit se o zavedení funkčních proteinů. Tento postup byl zvolen, protože při pokusech o zvýšení složitosti dvojvrstev přidáním dalších lipidů nebo proteinů či cholesterolu můžeme neúmyslně zabránit úspěšné tvorbě dvojvrstvy. Nemuseli bychom tedy získat záznamy vypovídající čistě o funkčnosti zařízení, ale o stabilitě dvojvrstvy daného složení.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá návrhem, přípravou a optimalizací metod pro tvorbu modelových buněčných membrán na mikrofluidním zařízení. V první fázi byla na základě zpracované rešerše zvolena vhodná metoda přípravy fosfolipidové dvojvrstvy na mikrofluidním čipu a v závislosti na ní byl vytvořen počítačový návrh daného zařízení. Zvolená metoda tvorby PLD na mikrofluidním čipu spočívá v proplachování čipu třemi různými roztoky – nejprve roztokem fosfátového pufru, následně roztokem lecitinu v organickém rozpouštědle a na závěr opět roztokem fosfátového pufru – přičemž se PLD utvoří samospořádáním na rozhraní dvou fází. Aby k tomu mohlo dojít, je třeba navrhnout čip se strukturou, která dovolí přichycení PLD na rozhraní dvou fází. Proto byl navržen čip obsahující kanálek, po jehož obou stranách jsou 20 μm od sebe na přeskáčku rozmístěny komůrky o rozměrech 19x17 μm . Pro větší výtěžnost byly takovéto kanálky na čip vloženy čtyři a spojeny do společných přívodních a výstupních otvorů.

Podle tohoto návrhu byla laboratoří Nanomateriálů CEITECu VUT v Brně připravena odlévací forma pro odlití PDMS repliky požadovaného mikrofluidního čipu.

Na této formě bylo možné najednou odlít devět PDMS replik, které byly do koncového mikrofluidního čipu spojeny s krycími sklíčky po plazmochemickém ošetření obou povrchů a opatřeny konektory pro napojení přívodních a odvodních hadiček. Plazmochemické ošetření povrchů bylo provedeno na přístroji Diener NANO Plasma cleaner optimalizováno na ošetření výbojem obsahujícím směs kyslíku a argonu v poměru 70:30 při 50 % výkonu pod tlakem 0,5 mbar po dobu 30 s. Pevnost spoje byla posílena žíháním spojeného zařízení. Takto bylo úspěšně připraveno navrhované mikrofluidní zařízení.

Jeho funkčnost byla ověřena optickou i fluorescenční mikroskopií.

Byl optimalizován způsob připojení čipu na stříkačkovou pumpu, plnění stříkačky roztoky a pumpování roztoků přes mikrofluidní čip. To vše tak, aby bylo dosaženo tvorby co největšího počtu co nejstabilnějších PLD. Optimální průtok byl potvrzen při 1 nl/min. Vhodnějším rozpouštědlem pro tvorbu PLD se ukázal hexadekan.

Způsobem, který tato práce popisuje, byl připraven funkční mikrofluidní čip, na kterém byla úspěšně vytvořena modelová membrána z lecitinu. Tato membrána byla vizualizovaná pomocí optické mikroskopie a zobrazování dob života (FLIM). Tvorba membrány nebyla na celém zařízení homogenní a je nutné celý proces ještě dále optimalizovat.

Další postup by zahrnoval pumpování roztoků přes čip ze dvou oddělených injekčních stříkaček vložených do dvoukanálové stříkačkové pumpy, zařazení odvzdušňovacího zařízení do sestavy, nalezení vhodnějšího organického rozpouštědla pro roztok lipidů, podrobnější charakterizaci takto připraveného modelu buněčné membrány, stabilitní zkoušky připravených membrán, zvýšení složitosti membrány a zavedení proteinu.

7 LITERATURA

- [1] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
- [2] GENNIS, By Robert B. *Biomembranes Molecular Structure and Function*. New York, NY: Springer New York, 1989, s. 138-165. ISBN 9781475720655.
- [3] LIM, Wendell, Bruce MAYER a T. PAWSON. *Cell signaling: principles and mechanisms*. New York: Garland Science, c2015. ISBN 978-0-8153-4244-1.
- [4] MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. 23. vyd. Jinočany: H H, 2002, ix, [3], 872 s. ISBN 80-731-9013-3.
- [5] STILLWELL, William. *An introduction to biological membranes: from bilayers to rafts*. Amsterdam: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-444-52153-8.
- [6] ANDERSON, Travers H., Younjin MIN, Kim L. WEIRICH, Hongbo ZENG, Deborah FYGENSON a Jacob N. ISRAELACHVILI. Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates. *Langmuir*. Elsevier, 2009-06-16, vol. 25, issue 12, s. 6997-7005. DOI: 10.1021/la900181c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900181c>
- [7] RIDGWAY, Neale David a Roger Stephen MCLEOD. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Sixth edition. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-444-63438-2.
- [8] BHATIA, Sangeeta N a Donald E INGBER. *Microfluidic organs-on-chips* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1038/nbt.2989. ISBN 10.1038/nbt.2989. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nbt.2989>
- [9] HARDY, Gregory J., Rahul NAYAK a Stefan ZAUSCHER. Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vol. 18, issue 5, s. 448-458. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.06.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029413000915>
- [10] MONTAL, M. a P. MUELLER. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1972, **69**(12), 3561–3566 [cit. 2017-05-10]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/69/12/3561>
- [11] MUELLER, Paul, Donald O. RUDIN, H. Ti TIEN a William C. WESCOTT. Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1963, **67**(2), 534-535 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/j100796a529. ISSN 00223654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100796a529>
- [12] TAMM, L.K. a H.M. MCCONNELL. Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*. 1985, vol. 47, issue 1, s. 105-113. DOI: 10.1016/S0006-3495(85)83882-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349585838820>
- [13] GROVES, Jay T., Michael L. DUSTIN a Stefan ZAUSCHER. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Journal of Immunological*

- Methods*. 2003, vol. 278, 1-2, s. 19-32. DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00193-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175903001935>
- [14] SHIRAI, Osamu, Hajimu YAMANA, Toshihiko OHNUKI, Yumi YOSHIDA a Sorin KIHARA. Ion transport across a bilayer lipid membrane facilitated by valinomycin. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2004, **570**(2), 219-226 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.jelechem.2004.03.033. ISSN 15726657. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022072804002025>
- [15] MAYER, Michael, Jennah K. KRIEBEL, Magdalena T. TOSTESON a George M. WHITESIDES. Microfabricated Teflon Membranes for Low-Noise Recordings of Ion Channels in Planar Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* [online]. 2003, **85**(4), 2684-2695 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74691-8. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503746918>
- [16] KANG, Xiao-feng, Stephen CHELEY, Allison C. RICE-FICHT a Hagan BAYLEY. A Storable Encapsulated Bilayer Chip Containing a Single Protein Nanopore. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(15), 4701-4705 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/ja068654g. ISSN 00027863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja068654g>
- [17] HOLDEN, Matthew A. a Hagan BAYLEY. Direct Introduction of Single Protein Channels and Pores into Lipid Bilayers. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2005, **127**(18), 6502-6503 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/ja042470p. ISSN 00027863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja042470p>
- [18] CHAN, Yee-Hung M a Steven G BOXER. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2007, **11**(6), 581-587 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.09.020. ISSN 13675931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593107001457>
- [19] VELVE-CASQUILLAS, Guilhem, Maël LE BERRE, Matthieu PIEL a Phong T. TRAN. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today* [online]. 2010, **5**(1), 28-47 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.12.001. ISSN 17480132. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013209001340>
- [20] TESÁŘ, Václav. Mikrofluidika. *AUTOMA: časopis pro automatizační techniku*. 2008, **2008**(10), 6-9.
- [21] Microfluidics and microfluidic devices: A review. *ELVEFLOW: plug&play microfluidics* [online]. France, 2015 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review>
- [22] ABGRALL, P a A-M GUÉ. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2007, **17**(5), R15-R49 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1088/0960-1317/17/5/R01. ISSN 09601317. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0960-1317/17/i=5/a=R01?key=crossref.c24504191bbdbbc35f746483f719698a>
- [23] NUCHTAVORN, Nantana, Worapot SUNTORNSUK, Susan M. LUNTE a Leena SUNTORNSUK. Recent applications of microchip electrophoresis to biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **113**, 72-96 [cit. 2017-

- 05-10]. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.002. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515001685>
- [24] WU, Jing a Min GU. Microfluidic sensing: state of the art fabrication and detection techniques. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2011, **16**(8), 080901- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1117/1.3607430. ISSN 10833668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3607430>
- [25] MAO, Xiaole a Tony Jun HUANG. Microfluidic diagnostics for the developing world. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(8), 1412- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1039/c2lc90022j. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc90022j>
- [26] ABATE, Adam R., Tony HUNG, Ralph A. SPERLING, Pascaline MARY, Assaf ROTEM, Jeremy J. AGRESTI, Michael A. WEINER a David A. WEITZ. DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* [online]. 2013, **13**(24), 4864- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1039/c3lc50905b. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50905b>
- [27] BHISE, Nupura S., João RIBAS, Vijayan MANOHARAN, Yu Shrike ZHANG, Alessandro POLINI, Solange MASSA, Mehmet R. DOKMECI a Ali KHADEMHOSEINI. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **190**, 82-93 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.004. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002958>
- [28] ABACI, Hasan Erbil a Michael L. SHULER. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integr. Biol* [online]. 2015, **7**(4), 383-391 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1039/C4IB00292J. ISSN 17579694. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4IB00292J>
- [29] ESCH, Mandy B., Alec S.T. SMITH, Jean-Matthieu PROT, Carlota OLEAGA, James J. HICKMAN, Michael L. SHULER, Mehmet R. DOKMECI a Ali KHADEMHOSEINI. How multi-organ microdevices can help foster drug development: note II. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1016/j.addr.2013.12.003. ISBN 10.1016/j.addr.2013.12.003. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X13002895>
- [30] KIM, Hyun Jung, Dongeun HUH, Geraldine HAMILTON, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow: note II. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1039/C2LC40074J. ISBN 10.1039/c2lc40074j. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40074j>
- [31] KIMURA, Hiroshi, Takatoki YAMAMOTO, Hitomi SAKAI, et al. An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models: note II. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1039/B717091B. ISBN 10.1039/b717091b. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b717091b>
- [32] HUH, D., B. D. MATTHEWS, A. MAMMOTO, et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip: note II. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1126/science.1188302. ISBN 10.1126/science.1188302. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1188302>

- [33] DORYAB, Ali, Ghassem AMOABEDINY, Amir SALEHI-NAJAFABADI, et al. Advances in pulmonary therapy and drug development: Lung tissue engineering to lung-on-a-chip. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.006. ISBN 10.1016/j.biotechadv.2016.02.006. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975016300131>
- [34] KIM, Sejoong, Shuichi TAKAYAMA, Vijayan MANOHARAN, Yu Shrike ZHANG, Alessandro POLINI, Solange MASSA, Mehmet R. DOKMECI a Ali KHADEMHOSEINI. Organ-on-a-chip and the kidney: note II. *Journal of Controlled Release*. 2014, **190**, 82-93. DOI: 10.1016/j.krcp.2015.08.001. ISBN 10.1016/j.krcp.2015.08.001. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211913215300310>
- [35] LEE, Jungwoo, Si Hyeon KIM, Young-Chan KIM, Inwook CHOI a Jong Hwan SUNG. *Fabrication and characterization of microfluidic liver-on-a-chip using microsomal enzymes* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.02.015. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2013.02.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022913000379>
- [36] GOPALAKRISHNAN, N., R. HANNAM, G. P. CASONI, D. BARRIET, J. M. RIBE, M. HAUG a Ø. HALAAS. *Infection and immunity on a chip: a compartmentalised microfluidic platform to monitor immune cell behaviour in real time* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1039/c4lc01438c. ISBN 10.1039/C4LC01438C. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC01438C>
- [37] WOLFF, Anette, Maria ANTFOLK, Birger BRODIN a Maria TENJE. *In Vitro Blood–Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches*. DOI: 10.1002/jps.24329. ISBN 10.1002/jps.24329. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916300557>
- [38] JASTRZEBSKA, Elzbieta, Ewelina TOMECKA a Iwona JESION. *Heart-on-a-chip based on stem cell biology* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.012. ISBN 10.1016/j.bios.2015.08.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566315303390>
- [39] ATAÇ, Beren, Ilka WAGNER, Reyk HORLAND, Roland LAUSTER, Uwe MARX, Alexander G. TONEVITSKY, Reza P. AZAR a Gerd LINDNER. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab on a Chip* [online]. 2013, **13**(18), 3555- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1039/c3lc50227a. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc50227a>

- [40] SUNG, Jong Hwan, Carrie KAM, Michael L. SHULER, Qiong ZHANG, Wei WANG, Xiao-Mian ZHOU a Da-Yu LIU. *A microfluidic device for a pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) model on a chip* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1039/B917763A. ISBN 10.1039/b917763a. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b917763a>
- [41] MASCHMEYER, Ilka, Alexandra K. LORENZ, Katharina SCHIMEK, et al. *A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1039/C5LC00392J. ISBN 10.1039/C5LC00392J. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5LC00392J>
- [42] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER, DUB, Petr, ed. *Fyzika. 2., přeprac. vyd. Přeložil Miroslav ČERNÝ. Brno: VUTIUM, c2013. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 9788021441231.*
- [43] Znázornění typů proudění. In: *SVOBODA rozdíl je v kvalitě* [online]. Brno, ČR, 2015 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <http://www.jansvoboda.cz/Prutokomer-Dr-Eddy-c45501>
- [44] HOLMES, Douglas P. *Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity* [online]. Sapienza, Università di Roma, 2015 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: http://www.bu.edu/moss/files/2015/08/Sapienza2015_Microfluidics.pdf. Short Course. Boston University.
- [45] VOLDMAN, Joel, Martha L. GRAY a Martin A. SCHMIDT. *Microfabrication in Biology and Medicine* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.401. ISBN 10.1146/annurev.bioeng.1.1.401. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bioeng.1.1.401>
- [46] THERRIAULT, Daniel, Scott R. WHITE, Jennifer A. LEWIS a Phong T. TRAN. *Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1038/nmat863. ISBN 10.1038/nmat863. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nmat863>
- [47] HALAAS, Øyvind. *Nanomedicine: Bioanalysis I lecture presentation: Microfluidics. 2015.*
- [48] MCDONALD, J. Cooper a George M. WHITESIDES. *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/ac980656z>. ISBN 10.1021/ar010110q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar010110q>
- [49] MAYER, Michael, Jerry YANG, Irina GITLIN, David H. GRACIAS a George M. WHITESIDES. *Micropatterned agarose gels for stamping arrays of proteins and gradients of proteins* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1002/pmic.200300748. ISBN 10.1002/pmic.200300748. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200300748>
- [50] WISSER, F. M., B. SCHUMM, G. MONDIN, J. GROTHE a S. KASKEL. *Precursor strategies for metallic nano- and micropatterns using soft lithography* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1039/C4TC02418D. ISBN 10.1039/C4TC02418D. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TC02418D>
- [51] FLORES, Angel, Michael R., G. MONDIN, J. GROTHE a S. KASKEL. *Soft Lithographic Fabrication of Micro Optic and Guided Wave Devices* [online]. [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.5772/8185. ISBN 10.5772/8185. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/lithography/soft-lithographic-fabrication-of-micro-optic-and-guided-wave-devices>

- [52] *Physics Central: learn how your world works* [online]. American Physical Society, 2016 [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: <http://www.physicscentral.com>
- [53] LEE, Jessamine Ng, Cheolmin PARK a George M. WHITESIDES. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* [online]. 2003, **75**(23), 6544–6554 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/ac0346712. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0346712>
- [54] BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. Fourth edition. CRC Press, 2014. ISBN 9781842145647.
- [55] Mikroskopie II. In: *Fakulta chemická: Vysoké učení technické v Brně* [online]. Brno, ČR, 2017 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: [http://www.fch.vut.cz/~zmeskal/obring/prednasky_2004/mikroskopie_2%20\(martin%20juinek\).pdf](http://www.fch.vut.cz/~zmeskal/obring/prednasky_2004/mikroskopie_2%20(martin%20juinek).pdf)
- [56] PLÁŠEK, Jaromír. Nové metody optické mikroskopi. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie* [online]. 1996, **41**(1), 1-24 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf
- [57] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 954 s. ISBN 0-387-31278-1.
- [58] VISSER, Antonie J.W.G. a Olaf J. ROLINSKI. Basic Photophysics. In: *PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES ONLINE: American Society for Photobiology* [online]. 2017 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>
- [59] Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM): Imaging technique based on differences in the excited state decay rate. *PicoQuant* [online]. Germany [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-lifetime-imaging-flim>
- [60] SPENCE, Michelle T. Z. a Iain D. JOHNSON. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11th ed. Carlsbad, CA: Live Technologies Corporation, c2010. ISBN 0982927908.
- [61] MUKHERJEE, Soumi, H. RAGHURAMAN a Amitabha CHATTOPADHYAY. Membrane localization and dynamics of Nile Red: Effect of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2007, **1768**(1), 59-66 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.07.010. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273606002665>
- [62] *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. Berlin: Verlag Chemie, 1871
- [63] ZAGNONI, Michele. Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(6), 1026- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1039/c2lc20991h. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc20991h>
- [64] REBAUD, Samuel, Ofelia MANITI a Agnès P. GIRARD-EGROT. Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie* [online]. 2014, **107**(A), 135-142 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.06.021. ISSN 03009084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414001746>
- [65] CREMER, Paul S., Steven G. BOXER, Kim L. WEIRICH, Hongbo ZENG, Deborah FYGENSON a Jacob N. ISRAELACHVILI. Formation and Spreading of Lipid Bilayers

- on Planar Glass Supports. *The Journal of Physical Chemistry B*. Elsevier, 1999, vol. 103, issue 13, s. 2554-2559. DOI: 10.1021/jp983996x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp983996x>
- [66] SACKMANN, Erich, Motomu TANAKA, Kim L. WEIRICH, Hongbo ZENG, Deborah FYGENSON a Jacob N. ISRAELACHVILI. Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends in Biotechnology*. Elsevier, 2000, vol. 18, issue 2, s. 58-64. DOI: 10.1016/S0167-7799(99)01412-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779999014122>
- [67] CASTELLANA, Edward T. a Paul S. CREMER. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* [online]. 2006, **61**(10), 429-444 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.surfrep.2006.06.001. ISSN 01675729. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167572906000616>
- [68] YANG, Tinglu, Seung-yong JUNG, Hanbin MAO a Paul S. CREMER. Fabrication of Phospholipid Bilayer-Coated Microchannels for On-Chip Immunoassays. *Analytical Chemistry* [online]. 2001, **73**(2), 165-169 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/ac000997o. ISSN 00032700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac000997o>
- [69] MALMSTADT, N., T.-J. JEON a J. J. SCHMIDT. Long-Lived Planar Lipid Bilayer Membranes Anchored to an In Situ Polymerized Hydrogel. *Advanced Materials* [online]. 2008, **20**(1), 84-89 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1002/adma.200700810. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200700810>
- [70] KÜHNER, M., R. TAMPÉ, E. SACKMANN, Hongbo ZENG, Deborah FYGENSON a Jacob N. ISRAELACHVILI. Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. A new vesicular model system studied by ²H-nuclear magnetic resonance: fabrication, characterization and applications. *Biophysical Journal*. Elsevier, 1994, vol. 67, issue 1, s. 357-362. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80472-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349590823821>
- [71] PANTOJA, Rigo, Daniel SIGG, Rikard BLUNCK, Francisco BEZANILLA a James R. HEATH. Bilayer Reconstitution of Voltage-Dependent Ion Channels using a Microfabricated Silicon Chip. *Biophysical Journal* [online]. 2001, **81**(4), 2389-2394 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75885-7. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349501758857>
- [72] WEISKOPF, Daniela, Eva K. SCHMITT, Marco H. KLÜHR, Stephan K. DERTINGER a Claudia STEINEM. Micro-BLMs on Highly Ordered Porous Silicon Substrates: Rupture Process and Lateral Mobility. *Langmuir* [online]. 2007, **23**(18), 9134-9139 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/la701080u. ISSN 07437463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la701080u>
- [73] SUZUKI, Hiroaki, Kazuhito V. TABATA, Hiroyuki NOJI a Shoji TAKEUCHI. Highly Reproducible Method of Planar Lipid Bilayer Reconstitution in Polymethyl Methacrylate Microfluidic Chip. *Langmuir* [online]. 2006, **22**(4), 1937-1942 [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1021/la052534p. ISSN 07437463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la052534p>
- [74] GANESAN, P. V. a S. G. BOXER. A membrane interferometer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(14), 5627-5632 [cit. 2017-05-11]. DOI:

- 10.1073/pnas.0901770106. ISSN 00278424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901770106>
- [75] WATANABE, Rikiya, Naoki SOGA, Tomoko YAMANAKA a Hiroyuki NOJI. High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition. *Scientific Reports* [online]. 2015, **4**(1), - [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1038/srep07076. ISSN 20452322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep07076>
- [76] OTA, Sadao, Hiroaki SUZUKI a Shoji TAKEUCHI. Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays. *Lab on a Chip* [online]. 2011, **11**(15), 2485- [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1039/c1lc20334g. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1lc20334g>
- [77] WATANABE, Y. a S. TAKEUCHI. *Glass Microfluidic CHips for Long-term lipid Bilayer Formation* [online]. Groningen, The Netherlands: 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2010 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: http://www.rsc.org/binaries/loc/2010/pdfs/papers/185_0185.pdf
- [78] MACH, Tivadar, Catalin CHIMEREL, Jürgen FRITZ, Niels FERTIG, Mathias WINTERHALTER a Claus FÜTTERER. Miniaturized planar lipid bilayer: increased stability, low electric noise and fast fluid perfusion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **390**(3), 841-846 [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1007/s00216-007-1647-7. ISSN 16182642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1647-7>
- [79] KREIR, Mohamed, Cecilia FARRE, Matthias BECKLER, Michael GEORGE a Niels FERTIG. Rapid screening of membrane protein activity: electrophysiological analysis of OmpF reconstituted in proteoliposomes. *Lab on a Chip* [online]. 2008, **8**(4), 587- [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1039/b713982a. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b713982a>
- [80] MALMSTADT, Noah, Michael A. NASH, Robert F. PURNELL a Jacob J. SCHMIDT. Automated Formation of Lipid-Bilayer Membranes in a Microfluidic Device. *Nano Lett* [online]. 2006, **6**(9), 1961–1965 [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1021/nl0611034. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/nl0611034#nl0611034AF1>
- [81] ZHAO, Li Hong, Jennifer LEE a Pabitra N. SEN. Long-term retention of hydrophilic behavior of plasma treated polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces stored under water and Luria-Bertani broth. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2012, **181**, 33-42 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.sna.2012.04.038. ISSN 09244247. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924424712002774>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------|--|
| ATP | Adenozintrifosfát |
| Anti-DNP | Anti-dinitrofenylové protilátky |
| BSA | Albumin z bovinního séra (z anglického <i>Bovine serum albumin</i>) |
| CAD | Počítačem podporované projektování (z anglického <i>computer-aided design</i>) |
| CCD | Zařízení citlivé na elektrický výboj (z anglického <i>charge coupled device</i>) |
| COC | Cyklické olefinové kopolymery |
| CVD | Chemická depozice z plynné fáze |
| DHPE | 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamin |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DPhPC | 1,2-difytanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin |
| DPhPE | 1,2-difytanoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamin |
| DPPE | 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanol |
| FCS | Fluorescenční korelační spektroskopie |
| FLIM | Zobrazování doby života (z anglického <i>Fluorescence-lifetime imaging</i>) |
| FRAP | Obnovení fluorescence po fotovybělování (z anglického <i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>) |
| FRET | Fluorescenční rezonanční přenos energie (z anglického <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>) |
| GUV | Velké unilamelární vezikuly (z anglického <i>giant unilamellar vesicles</i>) |
| MEMS | Mikroelektromechanické systémy |
| NBD DPPE | 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) |
| OmpF | Prekurzor periferního membránového proteinu F (z anglického <i>Outer membrane protein F precursor</i>) |
| PDMS | Polydimetylsiloxan |
| PMMA | Polymetylmetakrylát |
| PVD | Fyzikální depozice z plynné fáze |
| TCSPC | Časově rozlišené počítání jednotlivých fotonů (z anglického <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>) |
| UV | Ultrafialové záření (z anglického <i>ultraviolet</i>) |

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Video záznam *Tvorba PLD.mp4*