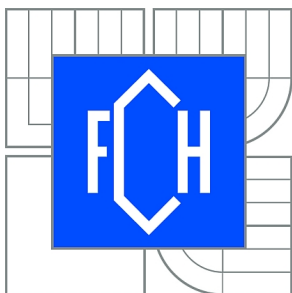


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA MODELOVÝCH MEMBRÁN PRO STUDIUM JEJICH INTERAKCÍ S BIOPOLYMERY POMOCÍ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

PREPARATION OF MODEL MEMBRANES TO STUDY THEIR INTERACTIONS WITH
BIOPOLYMERS USING FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ZUZANA ČERVENKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0890/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Zuzana Červenková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Příprava modelových membrán pro studium jejich interakcí s biopolymery pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Zadání diplomové práce:

- 1) Provést rešerši na téma přípravy modelových membrán na pevném substrátu (supported lipid bilayers) a metody stanovení jejich vlastností s přihlédnutím k technice FCS.
- 2) Na základě rešerše navrhnout vhodnou metodu přípravy membrán a studia interakce s vybraným biopolymerem.
- 3) Provést navrhované experimenty.
- 4) Zhodnotit výsledky, navrhnout optimalizovanou přípravu modelových membrán a metodu stanovení interakce membrána-biopolymer.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Zuzana Červenková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci fosfolipidových dvojvrstev deponovaných na pevném substrátu (supported lipid bilayers) coby zjednodušených modelů buněčných membrán. Z výchozího systému lecitinových liposomů ve fosfátovém pufru byly dvojvrstvy připravovány metodou spojení vezikul (vesicle fusion) na plazmatem hydrofilizovaném povrchu krycího sklíčka. K charakterizaci byly vybrány tři fluorescenční sondy – Nilská červeň, Oregonová zeleň DHPE a DiO – jejichž difuze v rámci membrány byla sledována pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. K tomu byla využita metoda Z-scan FCS vyvinutá speciálně pro planární vzorky. Po optimalizaci procesu přípravy a charakterizace dvojvrstev byla studována interakce mezi modelovou membránou a roztokem kyseliny hyaluronové ve fosfátovém pufru. Bylo zjištěno, že přídavek tohoto biopolymeru způsobí zpomalení difuze fluorescenční sondy ve fosfolipidové dvojvrstvě.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on preparation and characterization of supported lipid bilayers as simplified models of cell membranes. The bilayers were prepared from source system of lecithin liposomes in phosphate buffer using the vesicle fusion method on a cover glass surface hydrophilized by plasma. Three fluorescent probes – Nile red, Oregon Green DHPE and DiO – were utilized to characterize diffusion within the bilayer using fluorescence correlation spectroscopy. For this purpose Z-scan FCS, which is a method developed specially for planar samples, was used. After the process of preparation and characterization of supported lipid bilayer was optimized, interaction between this artificial membrane and solution of hyaluronic acid in phosphate buffer was studied. It was found out, that addition of this biopolymer causes slowing the diffusion of the fluorescent probe within the bilayer.

KLÍČOVÁ SLOVA

supported lipid bilayers, fluorescenční korelační spektroskopie, lecitin, Nilská červeň, Oregonová zeleň DHPE, DiO, kyselina hyaluronová

KEYWORDS

supported lipid bilayers, fluorescence correlation spectroscopy, lecithin, Nile red, Oregon green DHPE, DiO, hyaluronic acid

ČERVENKOVÁ, Z. *Příprava modelových membrán pro studium jejich interakcí s biopolymery pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 70 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
Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, dále Mgr. Michalovi Žitňanovi, Ph.D. za rady a připomínky k měření FCS a Mgr. Vlastě Štěpánové za ochotu a čas věnovaný plazmochemické úpravě sklíček. V poslední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu ve studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Buněčná membrána	8
2.1.1	Modely buněčné membrány	8
2.2	Fosfolipidy.....	9
2.2.1	Struktura	9
2.2.2	Agregace fosfolipidů ve vodných roztocích.....	10
2.2.3	Teplota fázového přechodu fosfolipidů.....	11
2.2.4	Význam fosfolipidů v živých organismech.....	11
2.2.5	Fluidita fosfolipidové dvojvrstvy (biomembrány)	12
2.2.6	Asymetrie fosfolipidové dvojvrstvy	12
2.3	Kyselina hyaluronová	12
2.3.1	Možnosti využití kyseliny hyaluronové	13
2.4	Proces tvory SLB na pevných substrátech	13
2.4.1	Langmuir-Blodgettova a Langmuir-Schaefferova technika.....	14
2.4.2	Spojení vesikul (vesicle fusion).....	14
2.4.3	Úprava povrchu substrátu.....	15
2.5	Dynamický rozptyl světla.....	16
2.6	Fluorescenční spektroskopie.....	17
2.6.1	Luminiscence.....	17
2.6.2	Deaktivační procesy	17
2.6.3	Nezářivé přechody.....	18
2.6.4	Zářivé přechody.....	19
2.7	Fluorescenční korelační spektroskopie.....	20
2.7.1	Z-scan FCS	21
2.7.2	Graf Humpolíčkové	22
2.8	Fluorescenční sondy	23
2.8.1	Nilská červeň.....	23
2.8.2	Oregonová zeleň.....	23
2.8.3	DiO	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1	Použité chemikálie.....	28

4.2	Přístrojové a softwarové vybavení	29
4.3	Pracovní postupy	29
4.3.1	Příprava zásobních roztoků a liposomů.....	29
4.3.2	Příprava vzorků liposomů pro fluorescenční měření.....	30
4.3.3	Hydrofilizace krycích sklíček a měření kontaktního úhlu.....	30
4.3.4	Příprava modelových biomembrán metodou vesicle fusion	31
4.3.5	Měření celkové intenzity fluorescence a vyhodnocení dat.....	31
4.3.6	Měření DLS a vyhodnocení dat.....	32
4.3.7	Měření a vyhodnocení dat FCS a Z-scan FCS	32
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1	Prvotní ověřovací experimenty.....	39
5.1.1	Ověření účinnosti plazmochemické úpravy povrchu sklíčka.....	39
5.1.2	Agregace fosfolipidů ve vodném prostředí	39
5.1.3	Stanovení velikosti liposomů	40
5.2	Výběr fluorescenční sondy pro vizualizaci a charakterizaci membrány	41
5.2.1	Použití Nilské červeně.....	42
5.2.2	Použití Oregonové zeleně DHPE	47
5.2.3	Použití DiO.....	50
5.2.4	Shrnutí – měření se třemi různými sondami.....	53
5.3	Interakce SLB s kyselinou hyaluronovou.....	59
5.3.1	Dvojrstva značená Nilskou červení	59
5.3.2	Dvojrstva značená DiO.....	60
5.3.3	Shrnutí – interakce SLB s kyselinou hyaluronovou	62
5.4	Optimalizovaný postup přípravy a měření SLB	63
6	ZÁVĚR.....	64
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	66
8	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	70

1 ÚVOD

Buňky, membránou ohraničené systémy chemických látek, jsou základními jednotkami života. Na úrovni jednotlivých buněk, případně na úrovni subcelulární, dochází k interakcím a procesům, které následně vyústí v určité chování organismu jako celku. Tímto chováním může být například reakce organismu na přítomnost specifických sloučenin, jako jsou látky v organismu se přirozeně vyskytující, ale rovněž látky exogenní povahy. Proto porozumění dějům v měřítku jednotlivých buněk je základní podmínkou pochopení komplexních reakcí celého organismu na podněty přicházející jak z organismu samotného, tak z našeho okolí a další studium na buněčné úrovni se tak ukazuje jako nezbytné. Pro účely zkoumání určitých interakcí je ovšem komplexní systém živé buňky příliš složitý, pro pochopení základních principů nepřehledný a z toho důvodu ne vždy využitelný. Vzniká tedy snaha o vytvoření systémů, které by dobře imitovaly skutečnou buňku, ale zároveň by postrádaly složitost a provázanost živého organismu a posloužily by tak k prvotnímu rozklíčování fungování dějů probíhajících na buněčné úrovni.

Jedním z takových systémů jsou fosfolipidové dvojvrstvy na podpurném substrátu (supported lipid bilayers), které imitují základní lipidovou strukturu biomembrány. Jedná se o stabilní útvary deponované nejčastěji na krycím sklíčku nebo na slídě, které mohou být využity například pro studium vlivů prostředí obklopujícího tyto struktury nebo studium interakcí s jinými (bio)molekulami. Výhodou je relativně jednoduchá příprava a také značná variabilita kompozice modelové membrány, a to zejména co se použitých fosfolipidů týče. Právě možnost jednoduchým způsobem připravit modelovou membránu o složení odpovídajícímu určité buňce z nich činí poměrně univerzální systém využitelný v mnoha konkrétních studiích. V dalším kroku je také možné rozšířit složení o jiné charakteristické komponenty reálné buněčné membrány – například cholesterol – a tímto způsobem věrněji napodobit jejich vlastnosti a chování.

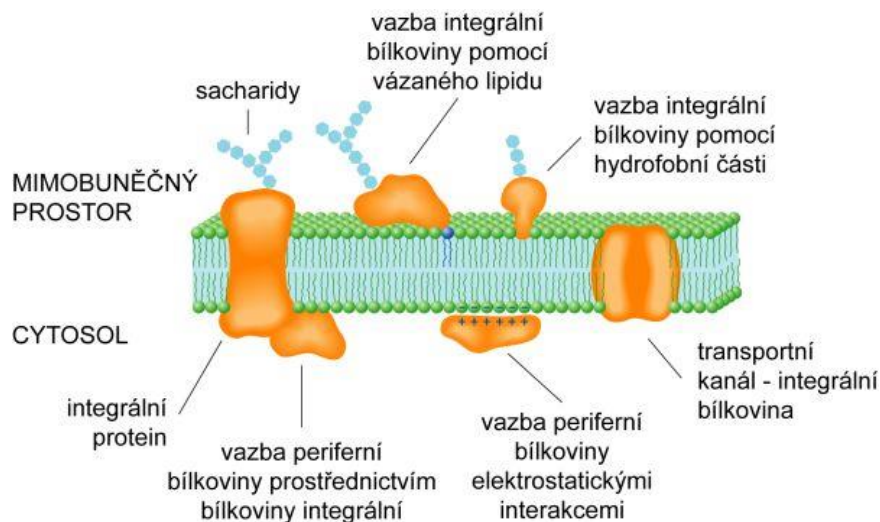
Často využívanou metodou pro popis modelových membrán je fluorescenční korelační spektroskopie, která se vyznačuje vysokou citlivostí, kdy je možné detekovat signál na úrovni jednotlivých molekul. Pomocí této techniky mohou být stanoveny difuzní koeficienty fluorescenčních sond zakotvených určitým způsobem v modelové membráně a na základě toho usuzovány vlastnosti vytvořené dvojvrstvy, případně pozorována změna chování po přidavku biologicky aktivní látky. Cílem této diplomové práce je optimalizovat proces přípravy modelové buněčné membrány na krycím sklíčku a vytvořené dvojvrstvy následně charakterizovat pomocí fluorescenční korelační spektroskopie, v následujícím kroku pak prozkoumat interakce mezi dvojvrstvou a kyselinou hyaluronovou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčná membrána

Živá buňka je ohraničena celistvým obalem nazývaným plasmatická membrána (nebo také biomembrána) o tloušťce asi 5 nm. Nepostradatelnost této membrány spočívá v její schopnosti propouštět pomocí vysoce selektivních kanálků nebo pump živiny dovnitř buňky a odpadní produkty naopak ven. Volně prochází pouze malé hydrofobní (O_2 , N_2) a nenabitě polární molekuly (voda, močovina, CO_2). Nejjednodušší bakterie mají pouze jednu plasmatickou membránu (na povrchu buňky), zatímco eukaryotní buňky obsahují navíc množství vnitřních membrán, které rozdělují prostor buňky na jednotlivé kompartmenty. Všechny tyto membrány obsahují shodné základní stavební prvky – lipidy a proteiny – liší se ovšem poměry základních komponent a tím také charakteristická funkce, kterou plasmatická membrána vykonává v různých organelách.

Obecně platí, že lipidovou složku vytváří molekuly fosfolipidů uspořádané do dvojvrstvy, která určuje tvar buňky a slouží jako (pro většinu látek) nepropustná přepážka. Fosfolipidům, jakožto základní struktuře, která je používána k modelaci biomembrán, bude věnována samostatná kapitola (viz 2.2). Proteinové molekuly zprostředkovávají většinu dalších funkcí membrány, a udávají také charakteristické vlastnosti. U živočichů představují až 50 % hmotnosti membrány a k fosfolipidové struktuře mohou být připevněny různými způsoby – jako prostupující transmembránové proteiny, zcela mimo dvojnou vrstvu připojené pouze kovalentními vazbami k fosfolipidovým molekulám nebo nepřímo vázány na jedné nebo druhé straně přes jiný membránový protein. Kromě transportu specifických živin, metabolitů a iontů zajišťují také funkce receptorů schopných detekovat chemické signály a předávat je dovnitř buňky nebo pracují jako enzymy, které katalyzují určité reakce. [1]



Obrázek 1: *Struktura buněčné membrány* [2]

2.1.1 Modely buněčné membrány

Složitost buněčných membrán byla motivací k nalezení jednodušších systémů, které by dokázaly funkci biomembrán poměrně dobře modelovat a jejichž vlastnosti (zejména zastoupení jednotlivých druhů fosfolipidů) by byly snadno přizpůsobitelné konkrétní požadované aplikaci. Významnými skupinami modelů jsou vezikuly, dvojvrstvy na pevných substrátech nebo hybridní membránové systémy.

Mezi **vezikulární modely** se řadí malé unilamelární vezikuly (SUV) s průměrem v řádu desítek nanometrů a obrovské unilamelární vezikuly (GUV), jejichž průměr se pohybuje v rozmezí 1 až 10 μm . Využívají se například pro studium fázového chování směsí dvou a více fosfolipidů. Podobným systémem jsou obrovské vezikuly plasmatické membrány (GPMV), které vznikají přímo z plasmatické membrány buněk následkem působení chemického stresu. Složení fosfolipidů tak přesně odpovídá zastoupení ve skutečné buněčné membráně a zároveň tyto systémy také přirozeně obsahují membránové proteiny, které se právě vyskytovaly v místě odpojení části plasmatické membrány a vytvoření vezikuly. Do této kategorie je možné zařadit také volné membrány, které jsou obklopené stabilizujícím membránovým proteinem, který je odvozen od apolipoproteinu A-I a funguje jako scaffold. Tyto struktury jsou známy jako nanodisky a jsou vhodné pro experimenty zabývající se vazbou ligandů. [3]

Dvojrstvy na pevných substrátech (SLB) mohou být připraveny řadou metod, které jsou podrobněji zmíněny v oddíle 2.4. Mezi nejvýznamnější z nich patří metoda spojení vezikul. Výhodou SLB je především relativně snadná příprava, stabilita a možnost využití řady v literatuře popsaných metod k jejich charakterizaci. V dalším kroku se SLB využívají ke studiu interakcí proteinů a jiných biomolekul s membránami, nebo slouží k popisu membránového transportu [4][5][6]

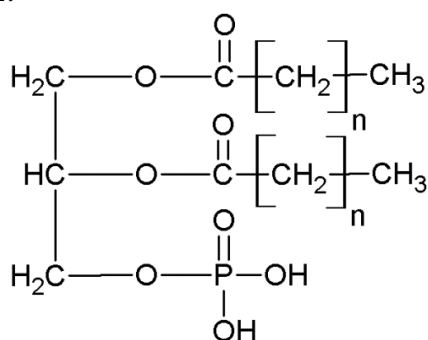
Hybridní membránové systémy představují například vezikuly uchycené na povrch SLB pomocí DNA hybridizace nebo prostřednictvím biotin-streptavidin rozpoznávacího systému. Tyto přístupy kombinují výhody dvojrstev na pevném substrátu s volnými vezikulárními modely. To hraje význam například při studiu proteinů zakomponovaných do membrány vezikuly, které jsou díky přítomnosti SLB chráněny před kontaktem s podpůrným substrátem. [3]

2.2 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou přirozeně se vyskytující sloučeniny nacházející se jak v rostlinných, tak v živočišných buňkách, kde vytváří základní strukturu buněčné membrány. [7] Prvním identifikovaným fosfolipidem nacházejícím se v biologických tkáních byl lecitin izolovaný z vaječného žloutku v roce 1847 francouzským chemikem Theodorem Nicolasem Gobleyem. [8] Molekula fosfolipidů obecně sestává z polární a nepolární části, což vede k vlastnostem nezbytným pro výstavbu biomembrán.

2.2.1 Struktura

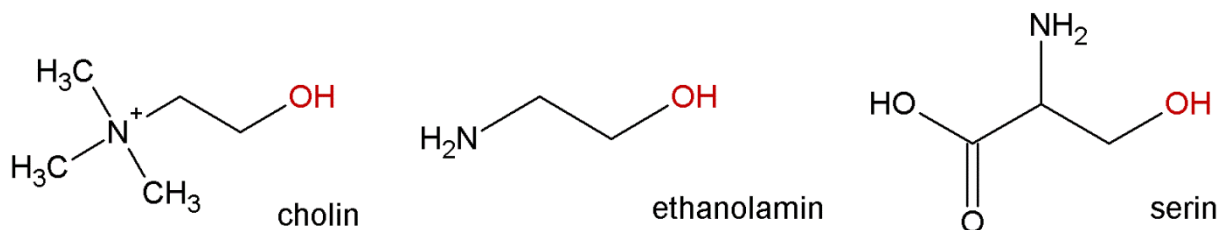
Dvěma základními skupinami, do kterých můžeme fosfolipidy zařadit, jsou *glycero-fosfolipidy* a *sřingomyeliny*. První ze jmenovaných jsou odvozovány od kyseliny fosfatidové, struktury uvedené na Obrázku 2.



Obrázek 2: Struktura kyseliny fosfatidové

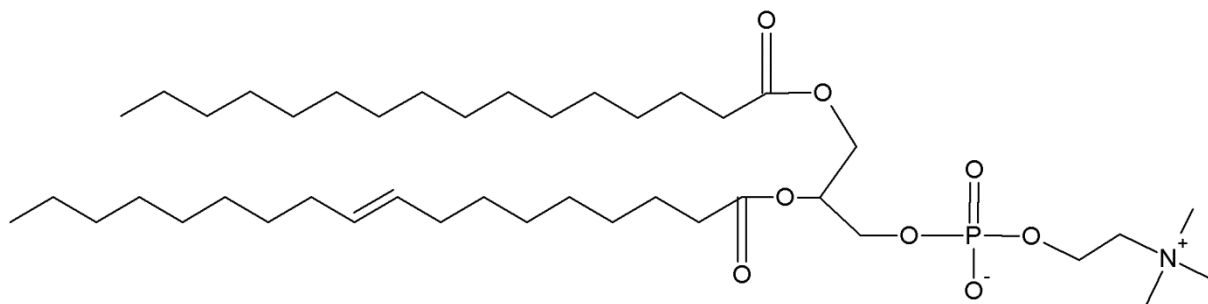
Základní kostru zde tvoří trojsytný alkohol glycerol. Dvě z jeho hydroxylových skupin jsou esterifikovány řetězci (nasycených nebo nenasycených) mastných kyselin a zbývající OH skupina je esterifikována kyselinou trihydrogenfosforečnou. [7]

Kyselina fosfatidová je dále esterifikována aminoalkoholem – mezi nejčastější patří cholin, ethanolamin nebo α -aminokyselina serin (Obrázek 3).



Obrázek 3: Běžné struktury esterifikující kyselinu fosfatidovou

Podle druhu mastných kyselin, jimiž je esterifikována glycerolová kostra, získáváme konkrétní molekuly fosfolipidů (příklad na Obrázku 4). Uhlovodíkový řetězec mastné kyseliny má přitom velký vliv na fyzikální vlastnosti daného fosfolipidu (viz kapitola 2.2.3).



Obrázek 4: Struktura 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (POPC)

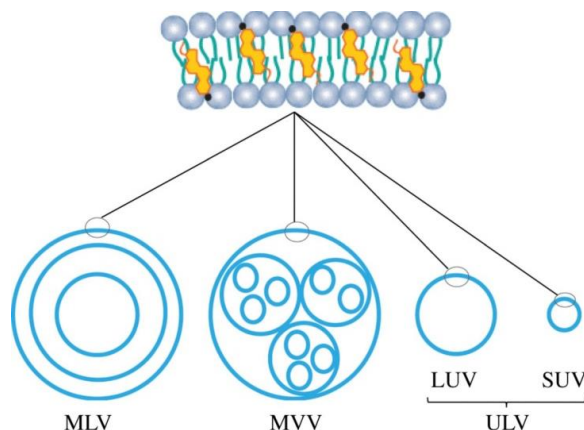
Sfingomyeliny oproti tomu mají jako kostru sfingosin nebo příbuzný dihydroxyamin. Typicky se vyskytují v mozku a nervové tkáni, kde tvoří hlavní složku myelinové pochvy (obalu nervového vlákna). [7]

2.2.2 Agregace fosfolipidů ve vodných roztocích

Suspenze fosfolipidů ve vodě (o dostatečné koncentraci) samovolně tvoří multilamelární váčky, tzv. liposomy, vyznačující se větším počtem na sebe uspořádaných fosfolipidových dvojvrstev. Při sonifikaci dochází k přeskupení této struktury a tvorbě unilamelárních liposomů, což jsou uzavřené, rozpouštědly naplněné váčky ohraničené pouze jednou fosfolipidovou dvojvrstvou. Obvyklá velikost takových liposomů se pohybuje v řádu desítek nanometrů. Jelikož je dvojitá vrstva liposomů složená z molekul fosfolipidů stejně jako skutečná buněčná membrána, jsou tyto systémy využívány k přípravě modelových systémů imitujících právě reálné biomembrány. [9]

Liposomy jsou obvykle klasifikovány na základě jejich velikosti, počtu dvojvrstev a náboje fosfolipidu, který liposomy tvoří. Rovněž metod, kterými lze liposomy připravit, je vícero a jsou obecně rozděleny na metody objemové, kdy jsou liposomy získány přenosem fosfolipidů z organické do vodné fáze a metody filmové, které spočívají v odpaření rozpouštědla z roztoku fosfolipidů (za vytvoření tenkého filmu na stěně vialky) a jejich

následné rehydrataci. Získ liposomů požadované velikosti a počtu dvojrstev probíhá pomocí homogenizace, sonifikace, extruze nebo cyklů zmrazování a rozmrazování. [10]



Obrázek 5: Různé typy liposomů dle velikosti a lamelarity. Zleva: vícevrstevné vezikuly (MLV), multivezikulární váčky (MVV), velké jednovrstevné vezikuly (LUV) a malé jednovrstevné vezikuly (SUV) [11]

Jak již bylo naznačeno, lze samotné liposomy využít jako jednoduché modely buněčné membrány, případně mohou sloužit také jako prekurzory pro tvorbu modelových membrán na pevných substrátech (SLB).

2.2.3 Teplota fázového přechodu fosfolipidů

Teplota fázového přechodu je v případě fosfolipidů definována jako teplota, která je potřebná k vyvolání fázového přechodu fosfolipidu z uspořádané gelové fáze do neuspořádané tekuté fáze. Teplota přechodu fosfolipidu vzrůstá s délkou uhlovodíkového řetězce a se stupněm nasycení zbytků mastných kyselin, jak ilustruje také Tabulka 1, a dále závisí také na náboji a druhu polární hlavičky. S rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce mají van der Waalsovy interakce výraznější vliv, k jejich překonání je tak zapotřebí více energie, v důsledku čehož vzrůstá teplota fázového přechodu. Přítomnost dvojně vazby naopak podporuje nepravidelné uspořádání řetězců a vede ke snížení teploty fázového přechodu. [12]

Tabulka 1: Teplota fázového přechodu vybraných fosfolipidů [13]

Fosfolipid	počet uhlíků:dvojně vazby řetězců fosfolipidu	Teplota fázového přechodu [°C]
DPPC	16:0	41
DSPC	18:0	55
POPC	16:0 18:1	-2
DOPC	18:1	-19

2.2.4 Význam fosfolipidů v živých organismech

Díky své amfifilní povaze se fosfolipidy v buněčných membránách samovolně organizují do dvojrstvy o přibližné tloušťce 5 nm. Taková struktura funguje jako efektivní bariéra, jejíž hydrofobní povaha ve vnitřním prostoru dvojrstvy umožňuje volný průchod pouze malým a nepolárním molekulám. [7] Význam fosfolipidové dvojrstvy však nespočívá jen v tvorbě bariéry – hydrofobní efekt, který organizuje molekuly do typické dvojrstvé struktury, má za následek také dobrou schopnost regenerace membrány. Vzniklé trhliny vytváří volné

rozhraní s vodou, což je energeticky nevýhodné, a proto se molekuly stávající dvojnou vrstvou samovolně přeuspořádají tak, aby toto volné rozhraní bylo odstraněno. [1]

Vodné prostředí, které se nachází jak uvnitř buňky, tak v jejím okolí, znemožňuje jednotlivým molekulám fosfolipidů opustit strukturu dvojité membrány. Pohybu v rámci membrány nicméně nebrání nic, což vede k tomu, že si molekuly fosfolipidů mohou volně vyměňovat své pozice v rámci této planární struktury. Tento pohyb je spolu s rotací molekuly kolem své osy v biomembránách velmi častý, na rozdíl od přemísťování fosfolipidů z jedné monovrstvy do druhé, k čemuž bez přítomnosti speciálních enzymů prakticky nedochází. [1] Právě na sledování pohybu molekul (vyjádřeném jejich difuzním koeficientem) v rámci membrány je založena jedna z technik charakterizujících modelové biomembrány – fluorescenční korelační spektroskopie.

2.2.5 Fluidita fosfolipidové dvojvrstvy (biomembrány)

Ve stavu nad teplotou fázového přechodu jsou nepolární řetězce mastných kyselin fosfolipidů nepravidelně uspořádány a molekuly jsou vysoce pohyblivé v laterálním směru. Při ochlazení fosfolipidové dvojvrstvy pod charakteristickou teplotu fázového přechodu nastávají změny, při kterých dvojvrstva ztrácí svoji fluiditu a získává gelovitý charakter, což je důsledkem výrazně uspořádanější struktury řetězců mastných kyselin v dvojvrstvě. Tekutost biomembrán je jejich nanejvýš důležitou vlastností, protože umožňuje interakce v nich zanořených proteinů, což má význam při buněčné signalizaci. Umožňuje také membránám vzájemnou fúzi a zajišťuje rovnoměrné rozdělení membránových molekul mezi dceřiné buňky při buněčném dělení. Teploty fázového přechodu savčích membrán jsou hluboko pod tělesnou teplotou – všechny tyto membrány mají tedy tekutý charakter. [1][9]

Důležitým moderátorem fluidity biomembrán je molekula steroidní povahy – cholesterol, jehož neohebný kondenzovaný systém zabraňuje pohybu řetězců mastných kyselin. Zároveň se díky přítomnosti cholesterolu rozšiřuje rozsah teplot, při nichž je biomembrána fluidní, protože přítomnost cholesterolu mezi postranními řetězci mastných kyselin zabraňuje jejich krystalizaci. [9]

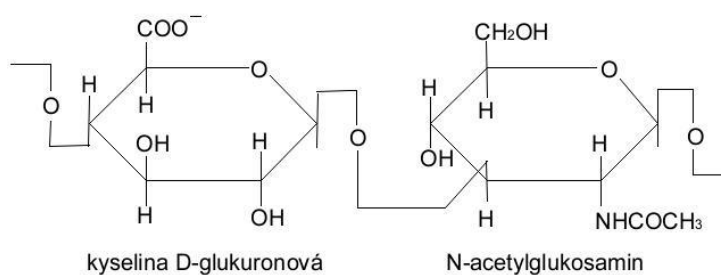
2.2.6 Asymetrie fosfolipidové dvojvrstvy

Složení vnitřní a vnější části fosfolipidové dvojvrstvy není obecně v buněčné membráně shodné. Asymetrické rozmístění se začíná vytvářet již při vzniku membrány, kdy jsou nově syntetizované molekuly fosfolipidů začleňovány do vnitřní monovrstvy. Část vzniklých molekul musí být následně přesunuta do monovrstvy vnější, přičemž tento přesun katalyzují specifické enzymy zvané *flipázy*, které zřejmě přenášejí fosfolipidové molekuly selektivně. Vzniká tak rozdíl v zastoupení jednotlivých fosfolipidů ve vnitřní a vnější monovrstvě. [1]

2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HyA) je ve formě své sodné soli tělu vlastní lineární polysacharid patřící mezi glykosaminoglykany. Její řetězec je tvořený základními disacharidovými jednotkami složenými z kyseliny glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu, které jsou vzájemně spojeny alternujícími β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou. Jednu molekulu HyA může tvořit až 10 000 disacharidových jednotek, z nichž ve výsledku vzniká řetězec o molekulové hmotnosti až 4 MDa. V lidském těle je kyselina hyaluronová přítomna téměř ve všech tkáních a tělních tekutinách, zejména pak v očním sklivci, pupečníku, synoviální tekutině a extracelulární matrix pojivové tkáně, ale vyskytuje se také intracelulárně. Její funkcí je zde především vázat vodu a podílet se na hydrataci, což je dáno její hydrofilitou. Ve své

nízkomolekulární formě (řetězce několika desítek disacharidových jednotek) může nicméně působit jako zánětlivé a imunostimulační agens nebo vysoce angiogenně. [14][15]



Obrázek 6: Základní disacharidová jednotka kyseliny hyaluronové

2.3.1 Možnosti využití kyseliny hyaluronové

Přestože převládající mechanismus působení HyA v těle není stále zcela objasněn, klinické studie popisují množství fyziologických efektů, které dokáže navodit exogenní kyselina hyaluronová. Prokázáný je například její protektivní efekt, zejména na chrupavčitou tkáň, díky čemuž našla velké uplatnění v ortopedii, kde dále může posloužit jako náhrada při nedostatečném množství synoviální tekutiny nebo při regeneraci šlachy. Relativně novou aplikací je tzv. viskosuplementace, která je využívána při léčbě osteoartritidy. Kromě mechanických účinků (lubrikační vlastnosti, absorpce a tlumení otřesů) má injektovaná kyselina hyaluronová také schopnost tlumit bolest. V oftalmologii se při chirurgických zákrocích využívá jejich viskoelastických vlastností, kdy slouží jednak jako ochranná a podpurná pomůcka a jednak bývá využita jako náhrada při ztrátách sklivcové tekutiny. Dalším polem uplatnění kyseliny hyaluronové je dermatologie a hojení ran, což je dáno přirozeným výskytem HyA v kůži a měkkých pojivových tkáních. Popsána byla schopnost této látky urychlit regeneraci kůže procesem tzv. mokrého hojení, při rozsáhlejších poraněních je možné využít scaffoldů na bázi HyA. Velmi populární je její využití rovněž v kosmetice a péči o pleť. [14][15] Zde uvedené příklady zdaleka nejsou vyčerpávajícím výčtem možností použití tohoto biopolymeru, jehož aplikační potenciál sahá i do oblasti cílené distribuce léčiv.

2.4 Proces tvory SLB na pevných substrátech

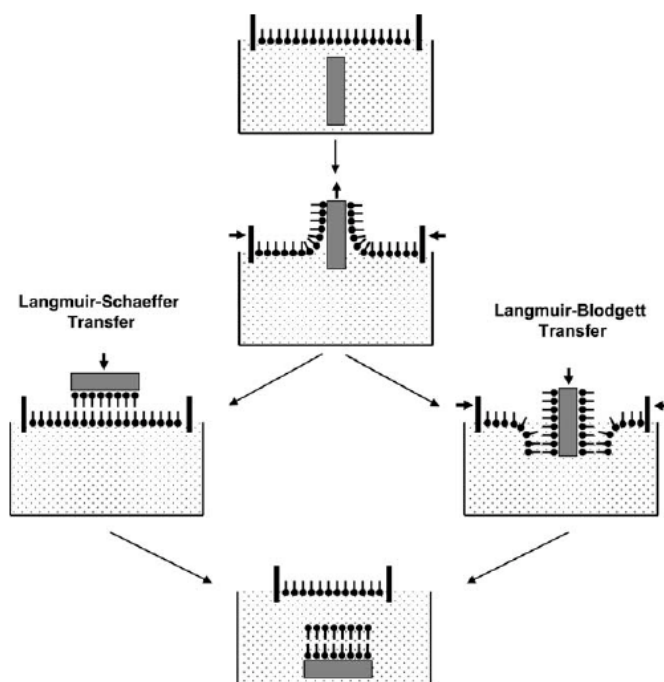
Existuje několik přístupů, jež jsou využívány k přípravě modelových biomembrán na různých podpurných substrátech. Mezi nejlépe popsané, a také nejvíc používané, patří metody přenosu lipidových monovrstev na substrát z rozhraní voda-vzduch (Langmuir-Blodgettova a Langmuir-Schaefferova technika) a metoda fúze liposomů. [16] Byly popsány také další metody, jako například microcontact printing, solvent-exchange deposition, evaporation induced assembly, bubble collapse deposition nebo lipid dip-pen nanolitography [17], které ovšem nedosahují takového významu.

Co se týče použitých substrátů tvořících oporu pro vzniklou fosfolipidovou dvojvrstvu, mezi běžně používané patří sklo (a to buď v podobě krycího sklíčka, nebo speciálních kyvet Lab-Tek navržených pro přípravu SLB a obsahujících oddělené komůrky, na jejichž dně je sklíčko) nebo slída. Popsána byla také příprava na polymerních částicích vyrobených z organického kladně nabitého polymeru [18].

2.4.1 Langmuir-Blodgettova a Langmuir-Schaefferova technika

Fosfolipidy se, jakožto amfifilní molekuly, ve vodných roztocích (o dostatečně nízkých koncentracích, kdy se ještě netvoří liposomy) soustředí na rozhraní voda-vzduch tak, aby byl omezen kontakt hydrofobních acylových řetězců s vodou. Obě techniky tedy využívají přirozené tvorby fosfolipidové monovrstvy právě na tomto rozhraní k jejímu přenosu na požadovaný substrát. Rozdíl mezi nimi je patrný z Obrázku 7.

První vrstva je nanášena vytahováním substrátu vertikálně z vodné fáze přes rozhraní, na kterém jsou soustředěny fosfolipidy, na vzduch. Hydrofilní části molekul fosfolipidů se tak dostanou do kontaktu se substrátem a acylové řetězce zůstávají volně na vzduchu. Druhá vrstva je na první vrstvu nanášena buď horizontálně (Langmuir-Schaefferův přenos), nebo vertikálně (Langmuir-Blodgettův přenos). [16]



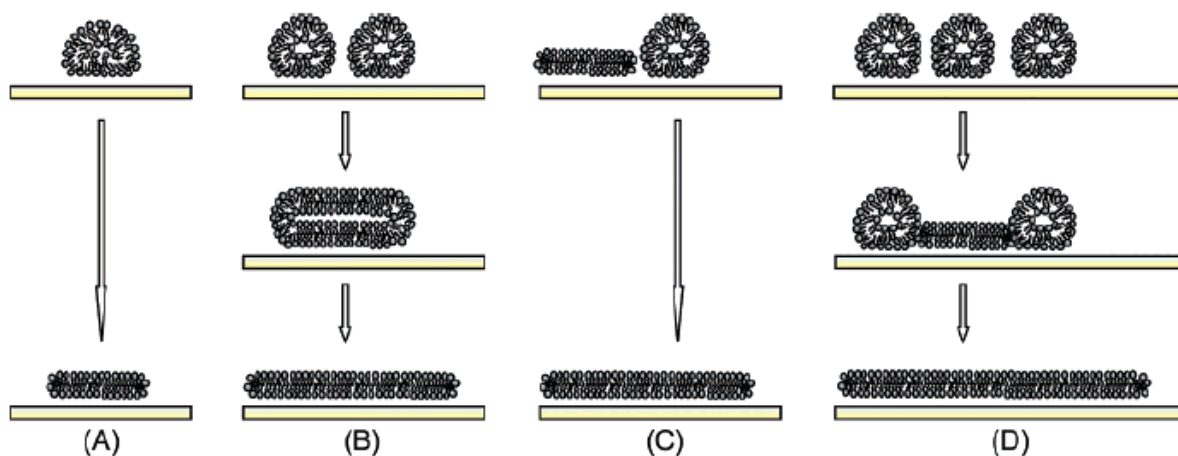
Obrázek 7: Příprava SLB pomocí Langmuir-Schaefferovy a Langmuir-Blodgettovy metody. [16]

2.4.2 Spojení vesikul (vesicle fusion)

Prvním krokem této metody je příprava vhodného roztoku liposomů, který se následně nechá působit na podpůrný substrát. Základní principy přípravy liposomů byly uvedeny v kapitole 2.2.2, přesný postup využitý v této práci je potom popsán v rámci oddílu Experimentální část (kapitola 4.3.1). Klíčovou vlastností liposomů, kterou je potřeba zajistit, je jejich unilamellarita (důležitá proto, aby po rozprostření liposomů do vrstvy byla na substrátu vytvořena pouze jedna dvojvrstva a nikoliv několik dvojvrstev na sobě).

Předpokládá se, že proces tvorby SLB na substrátu zahrnuje dva kroky, během nichž se vytváří napětí na membráně liposomu a dochází k interakcím mezi dvěma liposomy, ale také mezi liposomem a substrátem. V prvním kroku se po vystavení substrátu roztoku liposomů začnou jednotlivé liposomy sorbovat na hydrofilní povrch substrátu a začnou se zde hromadit. Jakmile je dosaženo kritické koncentrace na povrchu, začnou v druhém kroku membrány liposomů postupně praskat a dochází ke spojování mezi sebou, což vytváří tenkou dvojvrstvu na povrchu substrátu. [17] Konkrétních mechanismů fúze jednotlivých liposomů

bylo navrženo vícero s ohledem například na kombinaci zvolených fosfolipidů a substrátu. Možné varianty jsou ukázány na Obrázku 8.



Obrázek 8: Možné mechanismy prasknutí a spojení membrán liposomů.

(A) Prasknutí a rozprostření samotného liposomu indukované jeho silnou interakcí se substrátem, která vede k jeho deformaci.

(B) Spojení dvou sousedních liposomů a jejich následné rozprostření.

(C) Okraj již rozprostřeného liposomu na substrátu způsobí rozprostření dalšího liposomu.

(D) Interakce mezi liposomy po dosažení kritické koncentrace na povrchu substrátu.

[19]

2.4.3 Úprava povrchu substrátu

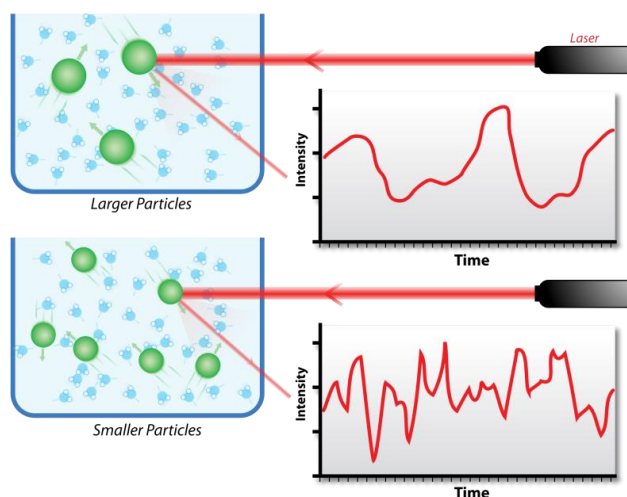
Zejména při použití techniky fúze vezikul musí mít použité substráty hydrofilní povrch, aby byla umožněna interakce mezi tímto povrchem a polárními částmi fosfolipidů. Pokud substrát není přirozeně hydrofilní (nebo není dostatečně hydrofilní), je nutné speciální ošetření povrchu, a to například:

- Plazmatem
- Chemicky
 - směsí H_2SO_4 a H_2O_2 [20]
 - sonifikací v roztoku tenzidu a působením kyseliny chromsírové [16]
- Pomocí UV záření nebo působením ozonu [19]

První ze zmíněných přístupů byl využit v této práci, přičemž jeho výhodou je zejména vysoká účinnost při snižování kontaktního úhlu a také absence kontaktu s chemikáliemi. Pro účely úpravy sklíčků se používá tzv. difuzní koplánární povrchový bariérový výboj (se zkratkou DCSBD z anglického Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge), který generuje difuzní plazma ve vzduchu za atmosférického tlaku (ale může operovat také v jiných plynech). Elektrody jsou umístěny přímo uvnitř dielektrika, které je vyrobeno z keramiky, a výboj hoří na povrchu tohoto dielektrika. Plazma tak není v přímém kontaktu s elektrodami, což zajišťuje dlouhou životnost zařízení. Tato konstrukce navíc umožňuje vznik tenké vrstvy neizotermického studeného plazmatu o velkém povrchu, což je výhodné pro opracovávání plochých vzorků. [21][22]

2.5 Dynamický rozptyl světla

Principem metody, která bývá někdy označována také jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotokorelační spektroskopie (PCS), je měření světla rozptýleného vzorkem v průběhu času. V případě stacionární částice by bylo množství rozptýleného světla na této částici konstantní, v důsledku Brownova pohybu však dochází k fluktuacím intenzity rozptýleného světla v čase. Rychlost Brownova pohybu částic se odvíjí od jejich velikosti – malé částice se pohybují rychleji a naopak, v důsledku čehož bude intenzita světla rozptýleného na malé částici v daném časovém úseku vykazovat výraznější fluktuace, než tomu bude v případě velké částice.



Obrázek 9: Princip měření dynamického rozptylu světla. Větší částice (nahore) způsobí menší fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase, zatímco menší částice (dole) způsobují fluktuace výraznější. [23]

Difuzi obecně ovlivňují tři hlavní faktory: teplota, viskozita rozpouštědla a velikost částic. Jsou-li první dva parametry známé (a konstantní), závisí fluktuace intenzity rozptýleného světla jen na velikosti sledovaných částic. Z translačního difuzního koeficientu lze pomocí Einstein-Stokesovy rovnice vypočítat hydrodynamický poloměr částice:

$$R(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (1)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T termodynamická teplota, η viskozita rozpouštědla při dané teplotě a D translační difuzní koeficient.

Poloměr částice získaný výpočtem pomocí Rovnice 1 odpovídá poloměru koule, která má za daných podmínek stejný translační difuzní koeficient, jako měřená částice. Jedná se o charakteristiku, kterou přímo ovlivňují i vlastnosti kapaliny a interakce částice s kapalinou (hydratační obal).

Translační difuzní koeficient, jakožto veličina popisující rychlost Brownova pohybu, je z naměřených dat (fluktuace rozptýleného světla v čase) získán pomocí korelační analýzy. Korelátor hodnotí stupeň podobnosti dvou různých signálů nebo jednoho signálu v různých časových intervalech. Ve velmi krátkých časových intervalech je podobnost signálu vysoká, s narůstajícím časovým intervalem korelace postupně klesá, až v určitém momentu dosáhne nuly. Pro různě rychle se pohybující částice (tj. pro různě velké částice) bude korelace nulová v různém čase. Korelační funkce je vyjádřena Rovnicí 2:

$$G(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle, \quad (2)$$

kde I vyjadřuje intenzitu rozptýleného světla a τ časový rozdíl. V případě monodisperzního systému se jedná o exponenciální pokles (Rovnice 3)

$$G(\tau) = A[1 + B \cdot \exp(-2\Gamma\tau)], \quad (3)$$

kde A je výchozí bod korelační funkce (baseline) a B je průsečík korelační funkce. Parametr Γ potom obsahuje hledaný translační difuzní koeficient, který může být pomocí Rovnice 1 přepočítán na hydrodynamický poloměr.

Při měření a vyhodnocování dat dynamického rozptylu světla je třeba vzít v úvahu, že dle Rayleigha rovnice pro rozptyl světla rozptylují velké částice světlo výrazněji, než částice malé, jejichž signál může být vlivem frakce velkých částic potlačen. [24]

2.6 Fluorescenční spektroskopie

2.6.1 Luminiscence

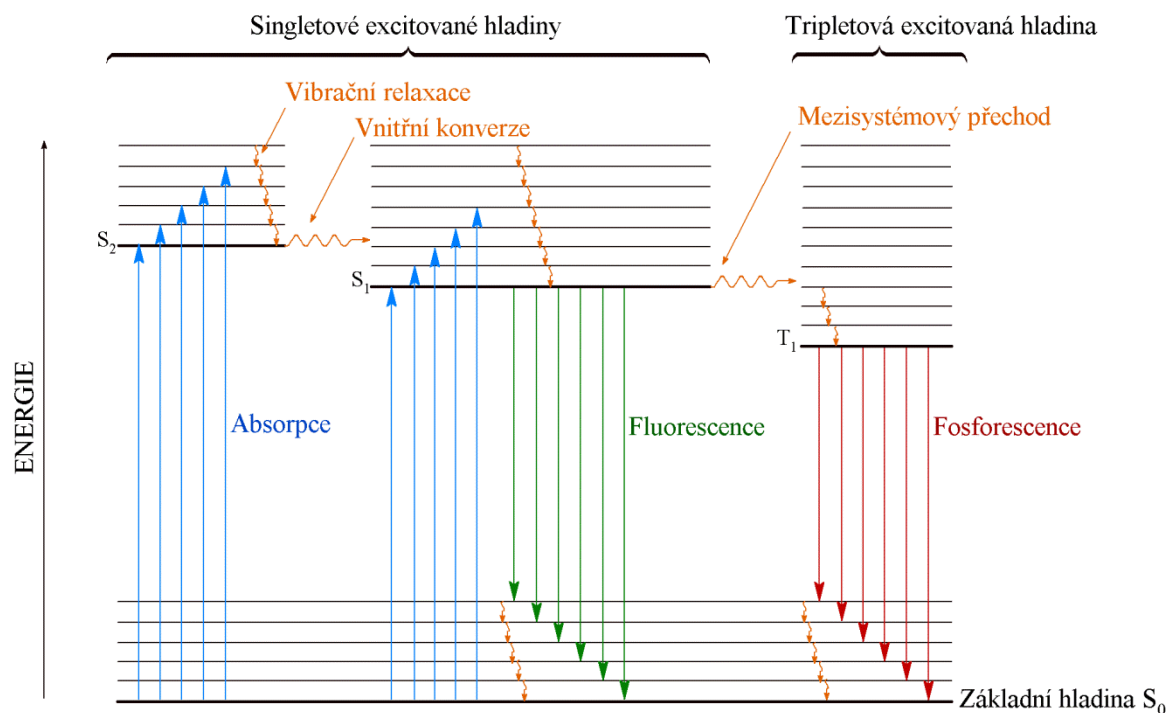
Luminiscence je emise světla látkou, jejíž elektrony byly excitovány ze základní energetické hladiny S_0 do některé z vyšších energetických hladin, případně podhladin. Pomocí luminiscence uvolňují tyto excitované elektrony přebytečnou energii a vrací se zpátky do základního stavu. Elektrony látky mohou být excitovány různými způsoby, pak mluvíme o *chemiluminiscenci* (chemická excitace), *termoluminiscenci* (excitace teplem), *sonoluminiscenci* (excitace zvukem), *mechanoluminiscenci* (excitace mechanickou energií) nebo, což je nejčastější případ, *fotoluminiscenci* (excitace zářením). Fotoluminiscence se dále dělí podle povahy excitovaného stavu na *fluorescenci* a *fosforescenci*. [25]

Po absorpci kvanta záření (UV, VIS nebo NIR) dojde k přechodu elektronů molekuly ze základního (S_0) do excitovaného stavu (S_1 , S_2 až S_n), přičemž absorbovaná energie musí právě odpovídat energetickému rozdílu výchozího a výsledného stavu. V atomech nastává přesun elektronu z valenčního orbitalu do prázdného orbitalu s vyšší energií, v molekulách se uskutečňuje excitace elektronu z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu (HOMO) do nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO).

Pravděpodobnost absorpce fotonu látkou je dána jejím molárním absorpčním koeficientem ε [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$] definovaným pomocí Lambert-Beerova zákona [26]

2.6.2 Deaktivační procesy

Celková energie určitého stavu molekuly může být vyjádřena součtem energie elektronu E_{el} , vibrační energie E_{vib} a rotační energie E_{rot} . Vibrační energie odpovídá frekvencím infračerveného záření a rotační energie mikrovlnným frekvencím. Energie (nebo její část), kterou elektron získal při excitaci, může být zpět uvolněna různými deaktivačními procesy. Excitaci elektronů a deaktivační procesy znázorňuje Jablůnskiho diagram (Obrázek 10).



Obrázek 10: Jablonskiho diagram - znázorňuje základní a dvě excitované singletové elektronové hladiny S_0 , S_1 a S_2 a jednu tripletovou excitovanou hladinu T_1 . Na každé z těchto elektronových hladin mohou elektrony fluoroforu existovat na množství vibračních podhladin.

2.6.3 Nezářivé přechody

Vibrační relaxace

Po absorpci kvanta záření je elektron obvykle excitován na jednu z vibračních podhladin excitovaného stavu. Následuje rychlý přechod na nejnižší vibrační podhladinu excitované hladiny S_1 . Vzhledem k velmi malým energetickým rozdílům mezi jednotlivými vibračními podhladinami dojde k uvolnění energie ve formě infračerveného záření.

Vnitřní konverze

Může nastat v případě, že se vibrační podhladinu excitovaného stavu S_1 překrývají s vibračními podhladinami základního stavu S_0 . Blízkost vibračních podhladin jednotlivých stavů tak umožní elektronu přecházet mezi nimi bez nutnosti uvolňovat energii zářením. Pomocí vnitřní konverze a následné vibrační relaxace se tak elektron může z excitovaného stavu S_1 nezářivě vrátit zpět do základního stavu S_0 .

Mezisystémový přechod

Uplatňuje se, jestliže u jednoho z elektronů nastane změna jeho spinu z $+\frac{1}{2}$ na $-\frac{1}{2}$ nebo naopak. Elektron tak přechází ze singletového stavu S_1 do stavu tripletového T_1 o nižší energii. Samotný mezisystémový přechod je děj izoenergetický, k uvolnění energie dochází až při následné vibrační relaxaci (viz Obrázek 10). [26]

2.6.4 Zářivé přechody

Fluorescence

Návrat z excitovaného do základního energetického stavu $S_1 \rightarrow S_0$ za uvolnění přebytečné energie ve formě záření se nazývá fluorescence a typicky se vyskytuje u aromatických uhlovodíků. Doba života fluorescence je obecně kolem 10^{-8} s.

Fluorescenční spektra – výstupem fluorescenčního měření bývá obvykle emisní spektrum, tedy závislost intenzity fluorescence na vlnové délce. Fluorescenční spektrum každého fluoroforu je unikátní a je charakterizováno píky o určitých vlnových délkách. Samotný tvar spektra je výsledkem existence množství vibračních podhladin, na nichž mohou elektrony existovat. Z Jablůnskiho diagramu (Obr. 10) je patrné, že energetický rozdíl, který je nutno překonat při excitaci elektronů je větší, než energetický rozdíl při emisi. Fluorescenční spektrum je tudíž posunuto směrem k vyšším vlnovým délkám (jinými slovy emitované záření má menší energii) oproti absorpčnímu záření. Rozdíl mezi maximy absorpčního a emisního pásu je znám jako *Stokesův posun*.

Z **Vavilovova zákona** vyplývá, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace. Obvykle se ale pro excitaci volí taková vlnová délka, již přísluší maximum absorpce fluoroforu. [27]

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence, který je definován jako poměr počtu světelných kvant emitovaných k počtu světelných kvant absorbovaných fluoroforem za sekundu. **Vnitřní filtrační efekty** detekovanou intenzitu fluorescence snižují. Vnitřní filtrační efekt *prvního* druhu se projevuje zejména u koncentrovanějších roztoků, ve kterých dojde k absorpci budícího záření povrchovými vrstvami vzorku, a vzdálenější vrstvy vzorku jsou excitovány zářením o nižší intenzitě, což se následně negativně projeví i na intenzitě fluorescence. Při vnitřním filtračním efektu *druhého druhu* dochází k reabsorpci fotonů fluorofory, čímž dojde k jejich excitaci a následné emisi záření do různých směrů.

Excimerová fluorescence se uplatňuje, jestliže molekuly fluoreskující látky začnou tvořit komplexy s jinými molekulami tohoto fluoroforu (excimer je zkratka pro excitovaný dimer). Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k větším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul.

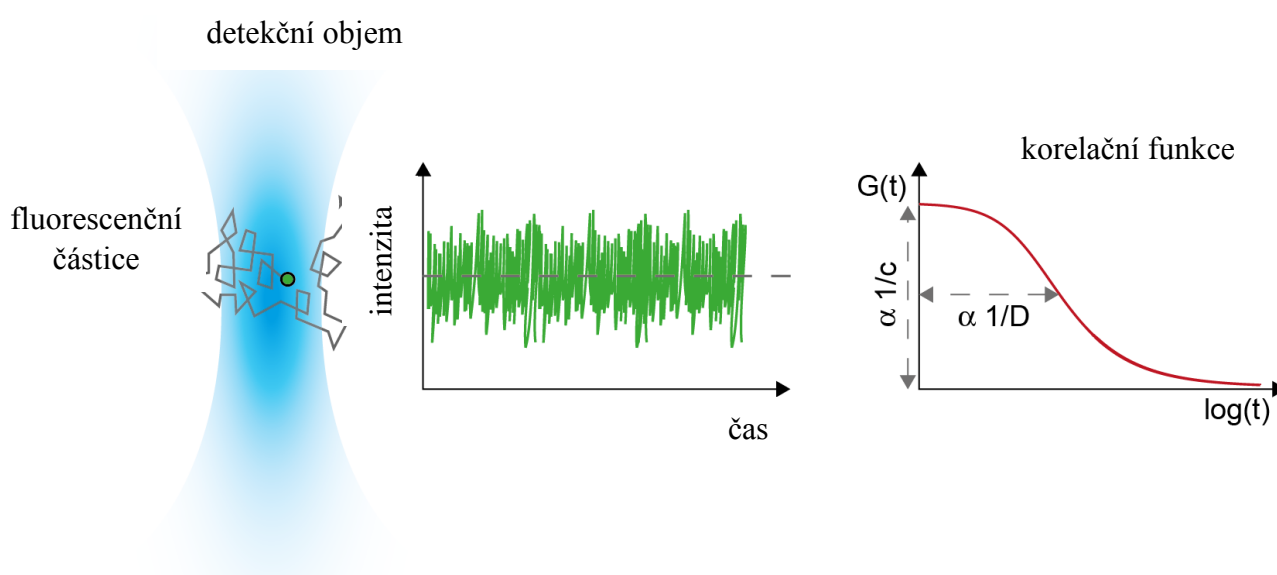
Zhášení fluorescence je proces snižování intenzity fluorescence, přičemž emisní spektrum zůstane zachováno. Při *srážkovém zhášení* dojde ke kolizi excitované molekuly fluoroforu se zhášečem a k následné deaktivaci fluoroforu. *Statické zhášení* nastává v případě, že fluorofor vytvoří se zhášečem nefluoreskující komplex. Jako zhášeč se může chovat celá řada molekul, často kyslík, halogeny nebo aminy. Při vysokých koncentracích fluoroforu může nastat též samozhášení neboli zhášení fluoroforu jím samotným. [25][27]

Fosforescence

Fosforescence je emise záření z tripletového excitovaného stavu, v němž má excitovaný elektron stejný spin, jako elektron na základní hladině. Jelikož je přechod $S_0 \rightarrow T_1$ zakázaný, je elektron excitován z hladiny S_0 na hladinu S_1 a odsud uskuteční mezisystémový přechod na hladinu T_1 . Případně může jít rovněž o přechod mezi vibračními hladinami těchto excitovaných stavů a následné vibrační relaxaci elektronu na hladinu T_1 . Důsledkem toho je, že fosforescence je děj podstatně pomalejší než fluorescence – její doba života je v řádu milisekund až sekund. Ve vodných roztocích za laboratorní teploty se fosforescence prakticky neuplatňuje kvůli velkému množství konkurenčních procesů. Mezi ně patří například nezářivé přechody nebo zhášení. [25][27]

2.7 Fluorescenční korelační spektroskopie

Metoda, často označovaná zkratkou FCS, je založena na principu získávání strukturní a dynamické informace na základě časových fluktuací intenzity fluorescence emitované jednou nebo několika molekulami. Tyto fluktuace mohou být v malém objemu, který je vytvářen fokusovaným laserovým paprskem, způsobovány pohybem fluoreskujících částic dovnitř a ven prostřednictvím translační difuze nebo toku. Díky malé velikosti tohoto objemu (nazývaného konfokální) se počet laserem osvětlených částic a tím pádem i intenzita fluorescence s časem výrazně mění. Fluktuace však mohou být rovněž výsledkem chemické reakce nebo probíhajících fotochemických procesů, jako například mezisystémového přechodu do tripletového stavu. [28] Základem pro analýzu FCS dat je znalost rychlosti, s jakou jednotlivé procesy probíhají. Fluktuace způsobené translační difuzí molekul trvají stovky μs až několik sekund, zatímco fotochemické procesy jsou řádově rychlejší. [29]



Obrázek 11: Základní princip měření difuze molekul pomocí techniky FCS [30]

Zaznamenané fluktuace jsou zpravidla analyzovány pomocí autokorelační funkce, která popisuje stupeň korelace mezi dvěma určitými hodnotami intenzity fluorescence oddělenými časovým intervalem. Autokorelační funkce tedy vyjadřuje pravděpodobnost, že daná molekula přítomná v čase τ v detekčním objemu se v něm bude nacházet i v čase $t + \tau$. [29] Je vypočítána ze zaznamenaných fluktuací intenzity fluorescence $I(t)$.

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (4)$$

Hodnota autokorelační funkce v čase 0, tj. hodnota $G(0)$, poskytuje informaci o rozsahu fluktuací fluorescenčního signálu. Závisí na počtu molekul v detekčním objemu, přičemž platí, že se zvyšujícím se počtem molekul se hodnota $G(0)$ snižuje. Z toho vyplývá, že citlivost FCS (do určité hranice) roste s klesajícím počtem molekul v detekčním objemu. Optimální koncentrace vzorku je taková, že se v detekčním objemu vyskytuje jediná molekula. Při velikosti konfokálního objemu, která je typicky 1 femtolitr (nebo menší), to odpovídá nanomolární koncentraci zkoumaného vzorku.

Základní matematické modely používané k proložení FCS dat jsou uvedeny v Tabulce 2 (označení uvedených matematických modelů je převzato z programu Symphotime používaném k vyhodnocení FCS dat):

Tabulka 2: *Matematické modely proložení FCS dat a jejich označení*

pure diffusion

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]} \cdot \kappa^2\right]^{0.5}} \quad (5)$$

triplet

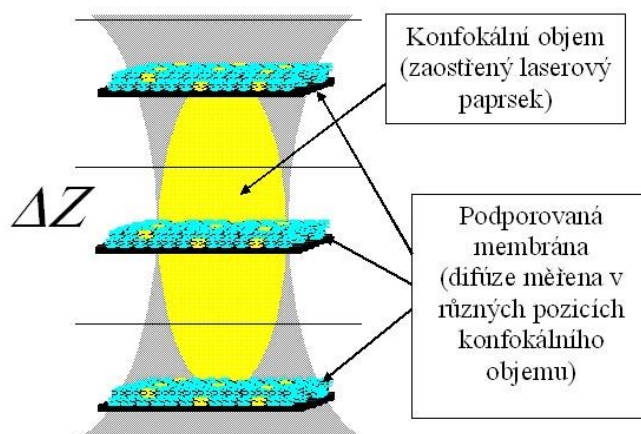
$$G(\tau) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Trip}}}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]} \cdot \kappa^2\right]^{0.5}} \quad (6)$$

triplet extended 2D

$$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{\text{Trip}}-1} T(j) \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Trip}}}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right]^{\alpha[i]}} + G_{\text{inf}} \quad (7)$$

V případě translační difuze závisí difuzní čas (a tím pádem i zjištěný difuzní koeficient) na velikosti detekčního objemu, kterou ovlivňuje řada faktorů, jako například zvětšení objektivu, vlnová délka, intenzita použitého laseru a další. Fakt, že excitační objem není jednoznačně definován, činí analýzu zaznamenaných dat specifickou. [28]

2.7.1 Z-scan FCS



Obrázek 12: *Problematika měření SLB v různých pozicích vzhledem k ose z. V krajních polohách bude vlivem tvaru konfokálního objemu (šedá oblast) detekován delší difuzní čas fluoreskující částice, což vede k výpočtu nižší hodnoty difuzního koeficientu. Žlutě vybarvený vnitřek elipsoidu znázorňuje oblast, kde je účinnost detekce fotonu nejméně $1/e^2$ maximální hodnoty. [31]*

Měření planárních vzorků, jejichž jeden rozměr je zanedbatelný oproti zbývajícím dvěma (a mezi které je nutné zařadit také SLB) má svá specifika. Závažným zdrojem chyb měření je nepřesné umístění vzorku vzhledem k ohnisku podél osy z . To je dáno tloušťkou dvojrstvy, která je přibližně 5 nm, v porovnání s velikostí konfokálního objemu v ose z , která může být až o několik řádů větší. Vzhledem k tvaru konfokálního objemu tedy můžeme dostat různé hodnoty difuzního času a počtu molekul pro různé polohy v rámci osy z , jak je naznačeno na Obrázku 12. [29]

Princip metody je založen na určení parametrů τ_D (difuzní čas) a N (počet molekul) v konfokálním objemu podél optické osy (z) pomocí sekvenčních FCS měření. Za předpokladu Lorentzovského profilu konfokálního objemu v ose z mohou být tyto parametry vypočítány pomocí Rovnic 8 a 9:

$$N(z) = \pi C \omega_0^2 \left(1 + \frac{\lambda_0^2 z^2}{\pi^2 \omega_0^4} \right) \quad (8)$$

$$\tau_D(z) = \frac{\omega_0^2}{4D} \left(1 + \frac{\lambda_0^2 z^2}{\pi^2 \omega_0^4} \right), \quad (9)$$

kde C je průměrná koncentrace difundujících fluoreskujících molekul ve sledovaném objemu, ω_0 je hodnota odpovídající $1/e^2$ poloměru paprsku v ohniskové rovině, λ_0 je vlnová délka excitačního laseru ve vakuu a z je osová vzdálenost pozice vzorku a ohniskové roviny. Celý člen $\pi C \omega_0^2$ odpovídá počtu N_0 částic v nejužším místě paprsku, v tzv. beam waist a D představuje hledaný difuzní koeficient. [32]

2.7.2 Graf Humpolíčkové

Analýzou získaných hodnot difuzních časů v různých polohách vzhledem k ose z je možné získat informace o charakteru difuze značeného fosfolipidu v rámci membrány. V případě bráněné laterální difuze v membráně, která obsahuje jen malé množství bariér bránících difuzi (a velikost těchto bariér je dostatečně malá vzhledem k hodnotě ω_0) je platný tzv. FCS difuzní zákon [33]:

$$\tau_D(z) = t_0 + \frac{\omega_0^2}{D_{eff}} \quad (10)$$

V opačném případě je ovšem nutno vzít v potaz anomální difuzi, která se může v rámci membrány vyskytovat. Kombinací rovnice FCS difuzního zákona a Rovnic 8 a 9 byla získána Rovnice 11:

$$\tau_D(z) = t_0 + \frac{\omega_0^2}{4D_{eff}} \frac{N(z)}{N_0}, \quad (11)$$

kde D_{eff} je efektivní difuzní koeficient, $N(z)$ je počet molekul v dané poloze z a t_0 je průsečík s osou y . Právě tato hodnota poskytuje informace o přítomnosti (nebo nepřítomnosti) bariér v membráně. Pokud se fluorofor pohybuje v membráně, které neobsahuje žádné nehomogenity, je průsečík t_0 s osou y nulový. Totéž platí pro zcela nepropustné bariéry, které pouze snižují hodnotu difuzního koeficientu.

V případě, že membrána obsahuje mikrodomény, které fungují jako past pro difundující fluorofory a brání jejich pohybu, je hodnota t_0 kladná. Pokud je membrána rozdělena

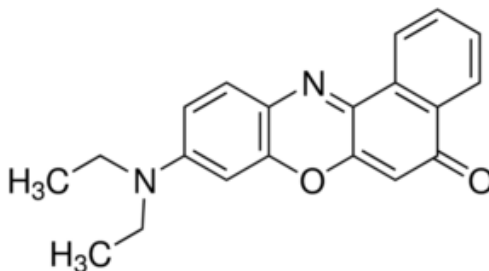
do ostrůvků, v rámci kterých se fluorofor pohybuje volně, a které jsou od sebe odděleny nepropustnými bariérami, nabývá t_0 záporné hodnoty. [29]

2.8 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou velkou a různorodou skupinou organických látek, jejichž molekuly bývají zpravidla planární, s množstvím konjugovaných dvojných vazeb. Po absorpci v UV nebo VIS jsou tyto molekuly schopné emitovat záření. Jedná se tedy o fluorofory s vlastnostmi navrženými tak, aby byly schopny specifické odpovědi nebo lokalizace v rámci vzorku. Fluorescence těchto látek je často mimořádně citlivá na změny prostředí, kterým jsou obklopeny, nebo jsou svým tvarem uzpůsobeny ke specifické vazbě na požadované místo v rámci vzorku. [25][34]

2.8.1 Nilská červeň

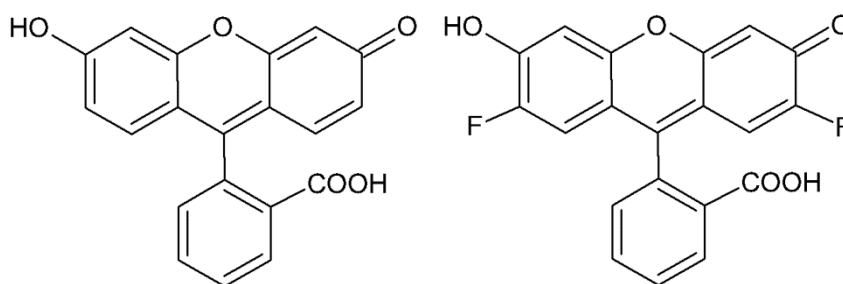
Fenoxazinové fluorescenční barvivo Nilská červeň je velmi omezeně rozpustné ve vodě, kde vykazuje poměrně nízkou intenzitu fluorescence, na rozdíl od nepolárního prostředí, ve kterém fluorescence této sondy roste. Jejím typickým využitím je lokalizace hydrofobních oblastí, což může být využito i pro studium SLB. Nilská červeň je jinými slovy polaritní sondou reagující na prostředí, ve kterém se nachází, a to změnou svého dipólového momentu, což nastává při excitaci molekuly. Změna dipólového momentu je spojována se separací náboje mezi diethylamino skupinou (donorem elektronu) a chinoidní částí (akceptorem elektronu). Kromě již zmíněného růstu intenzity fluorescence dochází v nepolárním prostředí také k hypsochromnímu posunu emisního maxima Nilské červeně. [34][35]



Obrázek 13: *Struktura Nilské červeně*

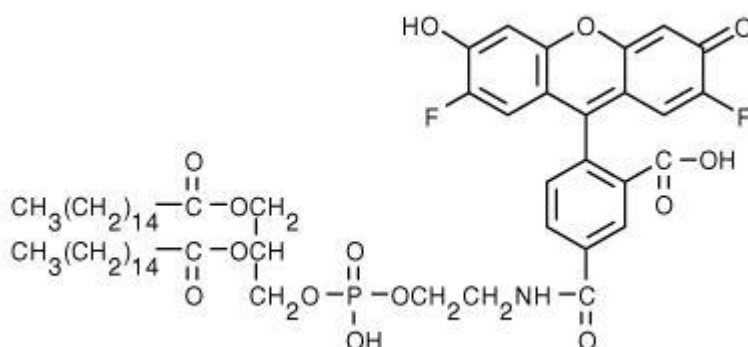
2.8.2 Oregonová zeleň

Oregonová zeleň (struktura vpravo na Obrázku 14) je derivátem fluoresceinu, rozšířeného fluorescenčního barviva, mezi jehož nevýhody ovšem patří silná závislost fluorescence na pH nebo náchylnost k fotovybělování. Tyto nedostatky jsou u nových derivátů potlačeny pomocí substitucí na xanthenové struktuře. [34]



Obrázek 14: *Struktura fluoresceinu (vlevo) a jeho derivátu oregonové zeleně (vpravo).*

V této práci byl jako fluorescenční sonda využit fosfolipid DHPE (1,2-dihexadekanoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylethanolamin) označený na své polární části oregonovou zelení, jak je ukázáno na Obrázku 15.

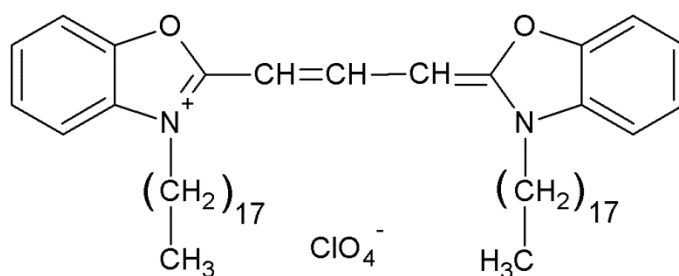


Obrázek 15: *Struktura Oregonové zeleně DHPE*

Molekula DHPE se může včlenit do modelové biomembrány jako jeden z jejích stavebních prvků, přičemž fluorescenční značka v podobě oregonové zeleně vyčnívá nad dvojvrstvu a je v kontaktu s okolním prostředím. Díky tomu je možné sledovat laterální difuze DHPE přímo v rámci SLB.

2.8.3 DiO

Systematický název této fluorescenční sondy je 3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát, struktura je uvedena na Obrázku 16. Dlouhý alkylový řetězec má hydrofobní charakter a umožňuje použití DiO jako membránové sondy. Spektrální vlastnosti sondy tohoto typu jsou určeny heteroatomy přítomnými na aromatických jádrech a také délkou spojovacího uhlíkatého můstku. Doby života excitovaného stavu v prostředí lipidů jsou velmi krátké (~ 1 ns) a fotostabilita je vysoká. Nevýhodou je nižší kvantový výtěžek.



Obrázek 16: *Struktura DiO*

Podobně jako v případě DHPE značeného oregonovou zelení je sonda v membráně ukotvena pomocí svých hydrofobních alkylových řetězců, které se zanoří mezi mastné řetězce fosfolipidů. Dle současných poznatků je distribuce DiO mezi fluidní a gelovou fází membrány určena také délkou alkylového řetězce sondy. V případě řetězce s 18 uhlíky převládne tendence zdržovat se v gelové fázi, zatímco analogy s kratším řetězcem preferují fází fluidní. [34]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mechanismem tvorby SLB z fosfolipidových vezikul připravených z zwitterionického DMPC na různých skleněných substrátech za různých podmínek se zabývali kalifornští vědci **Anderson a spol.** [36] Využity byly metody SFA (*surface forces apparatus*), QCM (*quartz crystal microbalance*), fluorescenční mikroskopie, FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) a SP (*streaming potential*). Výsledkem studie byl návrh posloupnosti několika kroků, které mají význam při adsorpci fosfolipidové dvojvrstvy na podpůrný nabitý substrát, konkrétně sklo. Při vhodných podmínkách (dvojice substrát-fosfolipid, rozpouštědlo a jeho iontová síla) dochází k adhezi vezikul na povrch substrátu. Při dostatečně silné adhezi nebo při působení tlaku (například osmotického) na vezikulu může docházet k deformaci vezikuly, což vede až k jejímu prasknutí a rozestření se na substrátu. K prasknutí vezikul může ale též docházet při překročení kritického množství vezikul adherovaných na substrát. Větší množství rozestřených vezikul na podpůrném substrátu se může prostřednictvím jejich volných konců spojovat, což ve výsledku vede k vytvoření celistvé planární dvojvrstvy. Po kompletním vytvoření dvojvrstvy mohou být nadbytečné vezikuly vypuzeny do roztoku. Pro případ adheze vezikul tvořených neutrálními fosfolipidy na nabitý substrát byly jako zásadní podmínky shledány: vysoká koncentrace vezikul ($> 0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), střední až vysoký potenciál povrchu substrátu, vysoká iontová síla a teplota vyšší, než je teplota fázového přechodu fosfolipidů.

Přípravou a charakterizací fosfolipidových dvojvrstev na dvou různých substrátech – slídě a oxidu křemičitém – se zabývali italští vědci **Seeger a spol.** [37] za účelem zjistit vliv substrátu na kvalitu a vlastnosti vytvořené dvojvrstvy. Experimenty byly prováděny se směsí POPE:POPG v molárním poměru 3:1. Z výsledků měření metodou AFM vyplynulo, že zvolený substrát významně ovlivňuje vlastnosti fosfolipidových dvojvrstev, což je dáno především jeho drsností, kdy větší členitost povrchu potlačuje interakce mezi substrátem a dvojvrstvou. Slabší interakce substrát-dvojvrstva se projeví také v zesílení interakce mezi dvěma vrstvami a výsledný systém pak lépe odpovídá volné membráně. Z tohoto hlediska byl jako lepší substrát vyhodnocen oxid křemičitý, který podporoval mobilitu fosfolipidů více, než slída. Dále byl zkoumán vliv různého pH na vlastnosti dvojvrstvy, a to jak při změně podmínek přípravy, tak při dodatečné úpravě pH roztoku obklopujícího již hotovou dvojvrstvu. V druhém případě byla ovlivněna pouze jedna z vrstev (vnější), což by mohlo odpovídat stavu, kdy je neukotvená membrána vystavena gradientu pH.

Vliv substrátu byl prokázán také v práci **Magdaleny Prybyzlo a spol.** [38], ve které byla pomocí techniky FCS zkoumána difuze sondou BODIPY značeného fosfolipidu ve dvou systémech – dvojvrstvě deponované na pevném substrátu, konkrétně na slídě (SLB) a obřích unilamelárních vezikulách (GUV). Oba systémy byly připraveny ze stejné směsi fosfolipidů a pro zaručení stejných experimentálních podmínek byla měření provedena v jedné kyvetě tak, že slída s vytvořenou dvojvrstvou byla připevněna do držáku asi 200 μm nad dnem kyvety, do které byly přeneseny také GUV. Závěrem vyplývajícím z měření bylo zjištění, že ve volně stojící membráně (tj. v systému GUV) se molekuly fosfolipidu pohybují dvakrát rychleji, než je tomu v případě dvojvrstvy na podpůrném substrátu. Systémy byly proměřeny také samostatně se stejným výsledkem jako v případě měření v jedné kyvetě, což potvrdilo nezávislost obou systémů. Zároveň bylo měřením na horní a spodní části membrány GUV zjištěno, že lipidy v tomto typu membrány neinteragují se substrátem (kterým je například dno kyvety, se kterým se vezikuly dostanou do kontaktu kvůli jejich sedimentaci), protože difuzní koeficient na těchto dvou místech byl stejný. Z výsledků získaných v této práci bylo

také odvozeno to, že v případě SLB se uplatňují interakce nejen mezi dvojvrstvou a podpůrným substrátem, ale také mezi jednotlivými vrstvami tvořícími dvojvrstvu.

Možnosti využití různých variant techniky FCS při měření planárních systémů (jako například SLB) shrnuli ve svém přehledovém článku **R. Macháň a M. Hof** [39]. Problém s výběrem pozice měření velmi tenkých vzorků, mezi něž typicky spadají SLB s tloušťkou v řádu jednotek nm, vzhledem k velikosti konfokálního objemu v ose z (několik μm) může být vyřešen využitím nějakého vnitřního měřítka. V případě *dvoufokusové FCS* je takovým měřítkem přesně známá vzdálenost mezi dvěma ohnisky, vzdálenost mezi interferenčními okraji při *FCS se vzorovaným osvětlením (Patterned Illumination FCS)*, velikost pixelu při *záznamu FCS kamerou* nebo velikost kroku během *Z-scan FCS*, respektive rychlost skenování při použití různých *skenovacích FCS technik*. Vzhledem k velikosti konfokálního objemu v ose z by mohly k zaznamenanému fluorescenčnímu signálu kromě sond v membráně přispívat také sondy ve volných částicích vyskytujících se v roztoku nad membránou (kupříkladu volné liposomy). Tyto dva různé příspěvky mohou být od sebe navzájem odlišeny například využitím matematického modelu, který obsahuje členy popisující 2D a 3D difuzi. Jiným přístupem je využití *FLCS (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy)*, což je metoda spojující principy klasického FCS a analýzy TCSPC. Díky analýze TCSPC jsou získány vyhasínací křivky všech fluoroforů přispívajících do celkového fluorescenčního signálu a pomocí dekonvoluce mohou být zjištěny jejich příspěvky (zastoupení) a vypočítány FCS křivky pro jednotlivé frakce lišící se dobou života. Tato data mohou být následně odděleně zpracovávána. Dalším, v praxi velmi významným uplatněním FLCS, je redukce šumu, signálu pocházejícího z rozptýleného světla nebo tzv. afterpulsingu detektorů. Jiným řešením problematiky příspěvku volných fluoroforů do signálu pocházejícího z fluoroforů ve vrstvě je použití metody *Surface Confined FCS*, která spočívá v omezení velikosti detekčního objemu v optické ose z. Konkrétně se jedná o přístupy *TIR FCS (Total Internal Reflection FCS)* nebo *SA FCS (Supercritical Angle FCS)*.

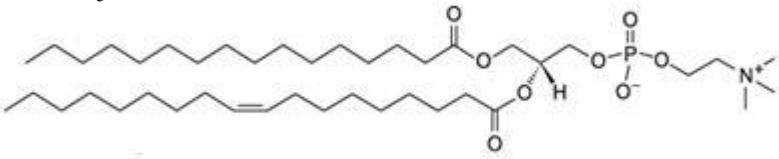
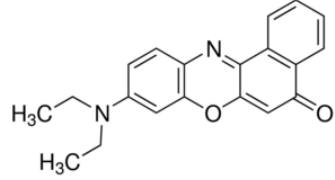
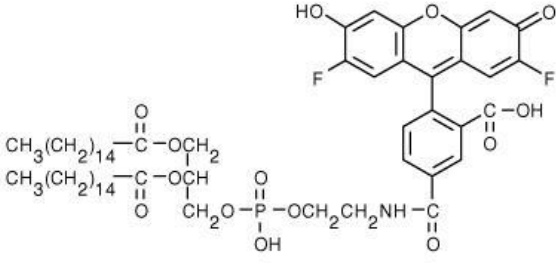
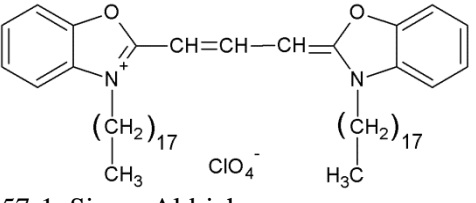
Pomocí metody Z-scan FCS a laserové skenovací mikroskopie zkoumali **Macháň a spol.** [40] interakce fosfolipidové dvojvrstvy deponované na skličku s arenicinem-1, látkou ze skupiny antimikrobiálních peptidů, které jsou produkovány téměř všemi organismy. Předpokládaným klíčovým faktorem pro selektivní interakci arenicinu-1 s membránami bakteriálních buněk je fosfolipidová skladba dané membrány. Porovnávány byly výsledky dvou modelových membrán odlišného charakteru – SLB připravené z DOPC s celkovým neutrálním nábojem a záporně nabitě SLB obsahující směs DOPC/DOPS v molárním poměru 4:1. Pro fluorescenční měření byl využit lipidový analog C8-BODIPY 500/510C5-HPC a pro zkoumání interakce ze strany peptidu pak arenicin-1 značený pomocí ATTO 465. Bylo prokázáno, že náboj membrány má zásadní vliv na interakci s arenicinem-1 – mobilita fosfolipidů neutrální SLB nebyla přidavkem peptidu ovlivněna, zatímco v případě dvojvrstvy s částečným záporným nábojem (zajištěným obsahem 20 %_{mol} DOPS) došlo ke snížení mobility fosfolipidů při koncentracích nad 1 μM peptidu. Při zkoumání difuze značeného peptidu v membráně byl zaznamenán nižší difuzní koeficient pro záporně nabitou dvojvrstvu, což může být vysvětleno větším zanořením peptidu do struktury membrány. Prostřednictvím analýzy dat prostřednictvím grafu Humpolíčkové byla odhalena přítomnosti mikrodomén méně pohyblivého fosfolipidu a peptidu v případě záporně nabitých dvojvrstev, zatímco v případě neutrální SLB nebyla tvorba takových mikrodomén zaznamenána.

Jiný antimikrobiální peptid – cryptidin-4 a jeho interakce s membránami byl v článku **Adama Miszty a spol.** [41] zkoumán nejen pomocí Z-scan FCS a laserové skenovací

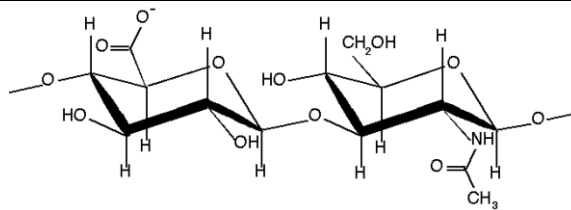
mikroskopie, ale také prostřednictvím elipsometrie. První metoda sloužila k popisu mechanismu interakcí cryptidinu-4 s SLB, druhá k ověření homogenity zkoumané dvojvrstvy před a po přidání peptidu a pomocí poslední ze zmíněných bylo prokázáno, že interakce s peptidem významně nemění strukturu lipidů v membráně. Experimenty byly provedeny na modelové membráně složené ze směsi DOPC a DOPS, jako fluorescenční značení byla využita Oregonová zeleň DHPE a coby podpůrný substrát byla využita slída. Přídavek peptidu způsobil pokles intenzity fluorescence a také tvorbu nehomogenit v laterální distribuci lipidů. Zároveň bylo zjištěno, že všechny změny, které přídavek peptidu způsobí, jsou reverzibilní a mohou být odstraněny vymytím nadbytkem pufru.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

dihydrogenfosforečnan draselný	KH_2PO_4 CAS 7778-77-0, p.a., Lachner, číslo šarže PP/2009/00261 $M = 136,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
hydrogenfosforečnan draselný	K_2HPO_4 CAS 7758-11-4, p.a., Lachner $M = 174,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
chlorid sodný	NaCl CAS: 7647-14-5, Lachner s.r.o., číslo šarže 06278 $M = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
L- α -fosfatidylcholin (lecitin)	Převládající struktura:  Egg, Chicken, CAS 97281-44-2, Avanti Polar Lipids, > 99%, číslo šarže EPC-599 $M = 770,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (průměr)
Nilská červen	 BioReagent, suitable for fluorescence, > 98 %, CAS 7385-67-3, Sigma Aldrich, číslo šarže BCBM0136V $M = 318,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Oregonová zeleň DHPE	 Life Technologies, číslo šarže 1212111 $M = 1086,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
3,3'-Dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát (DiO)	 CAS 34215-57-1, Sigma Aldrich $M = 881,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Kyselina hyaluronová (sodná sůl)



300 – 500 kDa, Contipro Biotech s.r.o, číslo šarže 213-6349

4.2 Přístrojové a softwarové vybavení

Přístroje:

- MS2 Minishaker
- Ultrazvuk (s vodní lázní nebo tyčový Bandeline Sonopuls, typ UW3200)
- ZetaSizer Nano Series (Malvern)
- Fluorolog (Horiba)
- Microtime 200 (Picoquant)
- Difuzní koplánární povrchový bariérový výboj (frekvence 15 kHz, výkon 300 W)
- Contact Angle System OCA10

Software:

- ZetaSizer
- FluorEssence
- Symphotime 64
- Contact Angle System OCA10
- Microsoft Word 2007
- Microsoft Excel 2007
- Origin 8.1
- Gnuplot

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 Příprava zásobních roztoků a liposomů

Zásobní roztok fosfátového pufru: fosfátový pufr o koncentraci 10 mM byl připraven v prostředí 150 mM NaCl. Na přípravu 250 ml pufru bylo naváženo 0,0768 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,3371 g hydrogenfosforečnanu draselného. Navážka byla následně doplněna roztokem chloridu sodného do celkového objemu 250 ml. Iontová síla takto připraveného pufru byla rovna 25,484 mM a pH 7,4.

Zásobní roztok fosfolipidu v chloroformu: za účelem zpřesnění přípravy jednotlivých vzorků o dané koncentraci fosfolipidu byl z čistého fosfolipidu dodávaného výrobcem v pevném stavu připraven zásobní roztok o koncentraci $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v chloroformu. Koncentrace byla zvolena tak, aby při přípravě 10 ml vzorku s koncentrací fosfolipidu $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo možné pipetovat 200 μl tohoto zásobního roztoku, což je množství, které se v přijatelné době odpaří a dojde k vytvoření tenkého filmu na stěnách vialky. Takto připravený zásobní roztok fosfolipidu byl uchováván při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Roztoky liposomů byly připravovány metodou rehydratace tenkého filmu fosfolipidů. V prvním kroku bylo potřebné množství zásobního roztoku fosfolipidů v chloroformu ponecháno odpařit za sníženého tlaku. Po dokonalém odpaření rozpouštědla byl na stěnách a dně vialky patrný tenký film fosfolipidů, který byl v následujícím kroku rehydratován

ve výsledném objemu fosfátového pufru. Na počátku tohoto procesu byly vzorky promíchány na vortexu za vzniku kalné suspenze fosfolipidu ve vodě a následně přemístěny do ultrazvuku, kde byly ve vodní lázni zahřívány na teplotu 45 °C sonifikovány až do vyčerení nebo velmi lehké opalescence. Variantou tohoto postupu bylo využití tyčového ultrazvuku (Bandeline Sonopuls, typ UW3200), pomocí kterého byly vzorky sonifikovány po dobu 1 minuty v intervalech 20 sekund.

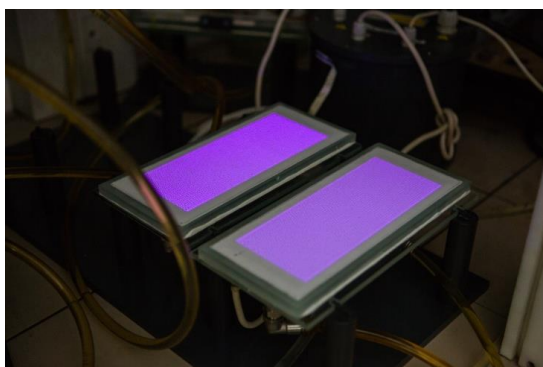
Roztok kyseliny hyaluronové pro studium interakce s fosfolipidovou dvojvrstvou byl připraven ve stejném fosfátovém pufru, jako roztok lecitinu. Množství kyseliny hyaluronové bylo na dno vialky naváženo v takovém množství, aby výsledný roztok měl koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a tato navážka byla následně doplněna fosfátovým pufrem. Roztok byl přes noc promícháván na magnetické míchačce až do úplného rozpuštění. Hotový roztok byl skladován při 4 °C.

4.3.2 Příprava vzorků liposomů pro fluorescenční měření

Připravená koncentrační řada vzorků lecitinu v pufru začínala o jeden řád nižší koncentrací, než byla předpokládaná koncentrace, při níž se začínají tvořit první agregáty. Každý vzorek byl připraven třikrát, aby bylo možné data statisticky vyhodnotit. Do prázdných čistých vialek bylo pipetováno takové množství Nilské červeně v acetonu, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno a na odparek sondy bylo napipetováno dané množství předem připraveného roztoku lecitinu ve fosfátovém pufru o koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a následně byly všechny vzorky doplněny fosfátovým pufrem na objem 10 ml. Vialky byly poté uzavřeny víčkem a umístěny na třepačku do následujícího dne.

4.3.3 Hydrofilizace krycích sklíček a měření kontaktního úhlu

Pro dobrou adhezi liposomů na povrch sklíčka sloužícího jako podpora modelové biomembrány byla nutná jeho hydrofilizace. Tato úprava byla provedena působením plazmatu na jednu stranu sklíčka po dobu 10 sekund. Využit byl difuzní koplánární povrchový bariérový výboj hořící ve vzduchu, k jehož generaci byl využit generátor o frekvenci 15 kHz. Celkový výkon výboje byl 300 W.



Obrázek 17: Koplánární povrchový výboj využitý k hydrofilizaci povrchu sklíček [22]

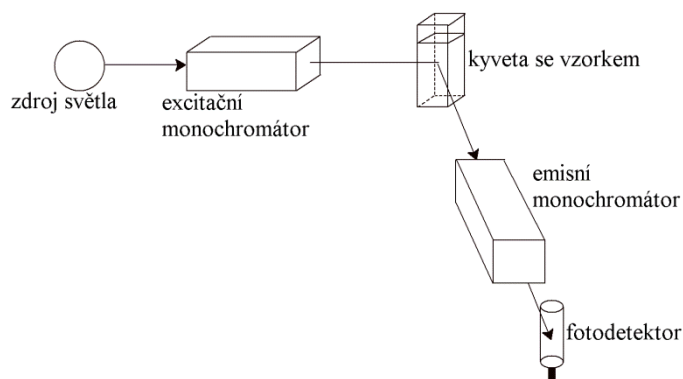
Pro ověření účinnosti hydrofilizace plazmatem byl naměřen kontaktní úhel vody na sklíčku před plazmochemickou úpravou a po ní. K tomu byl využit přístroj Contact Angle System OCA10. Objem kapky nanesené na povrch sklíčka byl 5 μl , přičemž samotné měření bylo provedeno do 3 sekund od nanesení kapky na sklíčko.

4.3.4 Příprava modelových biomembrán metodou vesicle fusion

Připravený roztok liposomů byl nalit do Petriho misky nebo nízké kádinky a na hladinu bylo položeno sklíčko hydrofilizovanou stranou dolů tak, aby na ní splývalo. Za laboratorní teploty na tmavém místě bylo sklíčko ponecháno na hladině 60 minut, aby došlo k vytvoření dvojvrstvy. Přebytné liposomy byly následně opláchnuty čistým pufrům, sklíčko bylo upevněno do držáku a zalito pufrům, aby bylo zabráněno kontaktu se vzduchem a vyschnutí. V případě studia interakcí dvojvrstvy s kyselinou hyaluronovou bylo nejdříve provedeno měření samotné vrstvy a následně byl roztok pufru vyměněn za roztok HyA, který byl rovněž připraven ve fosfátovém pufru.

4.3.5 Měření celkové intenzity fluorescence a vyhodnocení dat

Měření celkové intenzity fluorescence bylo v této práci využito ke stanovení minimální koncentrace, při níž se v roztoku fosfolipidu (konkrétně lecitinu) v prostředí fosfátového pufru začnou tvořit liposomy. K tomuto účelu byla využita fluorescenční sonda Nilská červeň přidaná do řady vzorků se zvyšující se koncentrací lecitinu. Vzorky byly proměřeny na přístroji Fluorolog firmy HORIBA, schéma přístroje je uvedeno na Obrázku 18:



Obrázek 18: Schéma přístroje Fluorolog k měření celkové intenzity fluorescence.

Zdroj světla (konkrétně 450 W bezozónová xenonová výbojka) vysílá záření, které prochází přes excitační monochromátor, prostřednictvím něhož je separováno záření o požadované vlnové délce. Toto dále dopadá na kyvetu se vzorkem, kde je vzorkem absorbováno, což vede k excitaci elektronů molekul vzorku. Při návratu na základní hladinu se přebytečné energie elektrony vzorku zbaví (mimo jiných procesů) vyzářením v podobě fluorescenčního záření o vlnové délce typicky větší, než byla vlnová délka původního záření vysílaného na vzorek. Emisní monochromátor postupně propouští záření zvoleného rozmezí vlnových délek na detektor, kde je intenzita fluorescence měřena. Aby mohlo být fluorescenční záření separováno od záření pouze procházejícího vzorkem, je emisní monochromátor a detektor umístěn typicky do pravého úhlu vůči zdroji světla a excitačnímu monochromátoru.

Při měření intenzity fluorescence Nilské červeně v roztoku lecitinu byla excitační vlnová délka nastavena na 560 nm a emisní spektrum bylo zaznamenáno v rozmezí vlnových délek 580 až 750 nm. Šířka štěrbin byla nastavena na 6 nm, integrační čas 0,1 s.

Při vyhodnocení dat byla sledována zejména celková intenzita fluorescence (totální integrál přes všechny vlnové délky, na kterých byla měřena emise) a hypsochromní (modrý) posun maxima emise Nilské červeně, který nastává při její solubilizaci v nepolárním prostředí.

4.3.6 Měření DLS a vyhodnocení dat

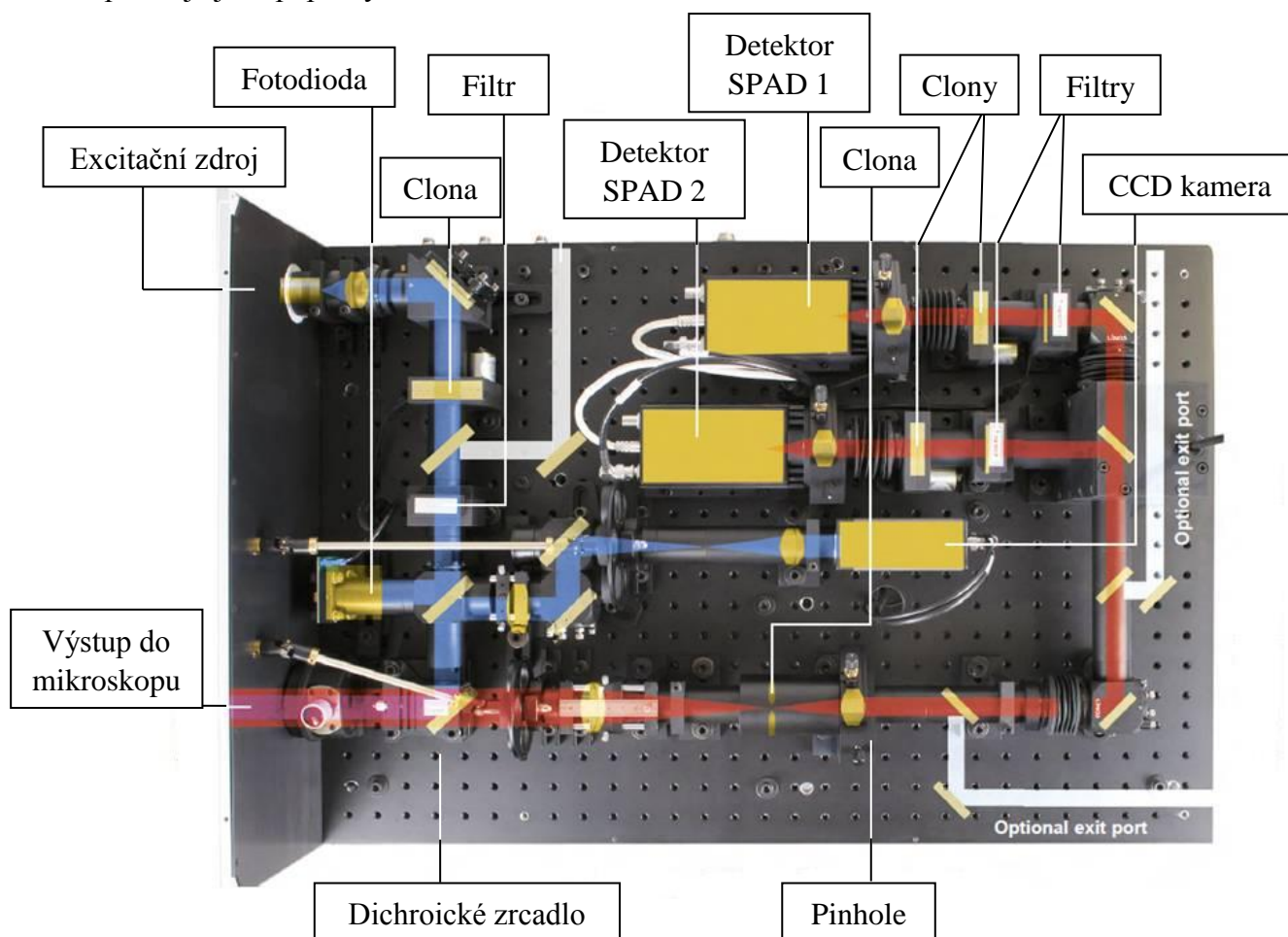
Vzorky pro měření velikosti liposomů pomocí dynamického rozptylu světla byly připraveny bez fluorescenční sondy, aby bylo vyloučeno rušení signálu z rozptylu světla emitovaným fluorescenčním zářením sondy. Měření bylo provedeno na přístroji ZetaSizer Nano Series firmy Malvern s následujícím nastavením:

Disperzant	voda (index lomu 1,33)
Index lomu materiálu	1,48
Teplota	25 °C (cela temperována 120 s)
Režim měření	173° Backscatter

Výstupem byl graf závislosti intenzitní nebo objemové distribuce velikost částic na jejich hydrodynamickém poloměru. Měření DLS sloužila zejména k ověření toho, že připravené liposomy mají velikost vhodnou k přípravě SLB.

4.3.7 Měření a vyhodnocení dat FCS a Z-scan FCS

Měření FCS bylo prováděno na přístroji MicroTime 200 firmy PicoQuant s konfokálním mikroskopem Olympus IX71. Využíván byl superapochromatický objektiv s vodní imerzí UplanSApo se 60násobným zvětšením a numerickou aperturou 1,2. Skenování vzorku je umožněno díky skeneru s piezoelektrickým posuvem, na kterém je objektiv namontován (typ skeneru P-733.2 CL firmy Physik Instrumente). Jednotlivé prvky optické jednotky přístroje jsou popsány na Obrázku 19.



Obrázek 19: Schéma hlavní optické jednotky přístroje Microtime 200

Laserové záření o zvolené vlnové délce a polarizaci je přiváděno do optického systému a prochází až na dichroické zrcadlo. Ještě před dopadem na tento prvek je pomocí fotodiody měřena intenzita vysílaného laserového paprsku. Dichroické zrcadlo musí být zvoleno tak, aby excitační záření o určité vlnové délce odrazilo směrem do mikroskopu a naopak záření emitované fluoroforem propustilo na detektory. Odražené záření tedy prochází objektivem na vzorek (zespodu), kde dochází k excitaci molekul a jejich následné fluorescenci. Objem ozářený excitačním paprskem se nazývá konfokální a v tomto objemu následně dochází k detekci fluktuací intenzity fluorescence a ke sběru FCS dat. Emitované záření prochází zpět na dichroické zrcadlo a je propouštěno přes emisní filtry dále. Úloha emisních filtrů je zejména odstranění signálu pocházejícího z Ramanova rozptylu v rozpouštědle vzorku (nejčastěji ve vodě) a mohou být umístěny buď za dichroickým zrcadlem (což je výhodné při měření se dvěma detektory), nebo těsně před detektory. Dále prochází emisní záření přes tzv. pinhole až na detektory. Ty jsou typu SPAD (Single Photon Avalanche Diode) s časovým rozlišením lepším než 350 ps.

Kalibrace FCS – vzhledem k proměnlivé velikosti a tvaru konfokálního objemu vytvořeného laserovým paprskem bylo před každým měřením, jehož výstupem byla hodnota difúzního koeficientu, nutné zjistit velikost tohoto objemu. To lze provést pomocí roztoku fluorescenční sondy o nanomolární koncentraci a známém difúzním koeficientu při dané teplotě. Vzhledem k tomu, že difúzní koeficienty se standardně tabelují pro teplotu 25 °C, bylo v případě odlišných experimentálních podmínek potřeba hodnotu přepočítat podle Rovnice 12:

$$D(T) = D(25^{\circ}\text{C}) \cdot \frac{T}{298,15 \text{ K}} \cdot \frac{8,9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}}{\eta(T)}, \quad (12)$$

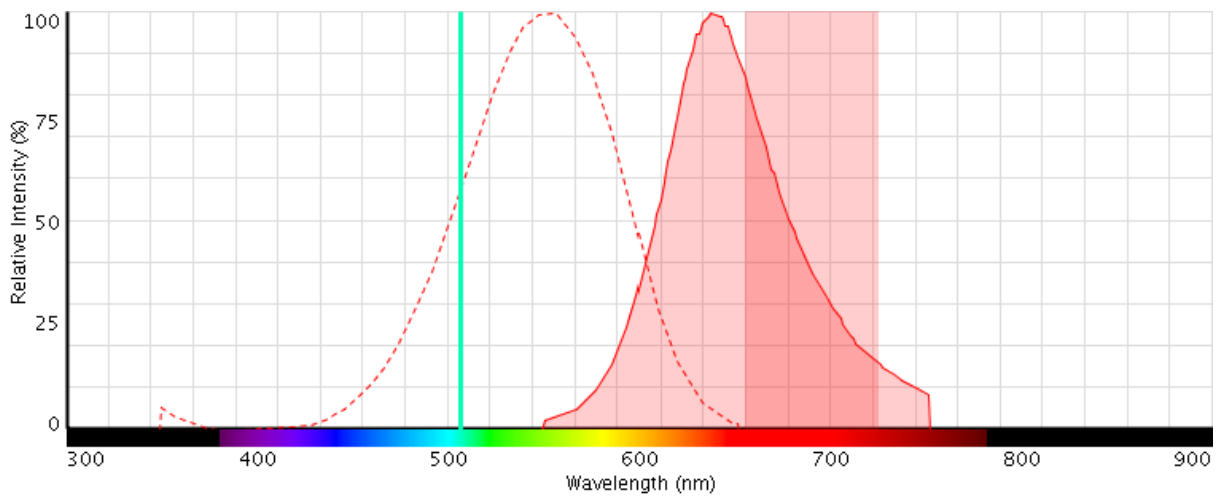
kde $\eta(T)$ je viskozita vody při dané teplotě.

Tato hodnota difúzního koeficientu byla po naměření FCS křivky barviva v daném prostředí dosazena do matematického modelu, kterým byla naměřená data proložena v módu vyhodnocení FCS Calibration. Výsledkem bylo zjištění velikosti konfokálního objemu, přičemž tato hodnota byla následně dosazována do modelu k vyhodnocení FCS analýz měřených vzorků při daném experimentálním nastavení, pro které byla velikost konfokálního objemu zjištěna.

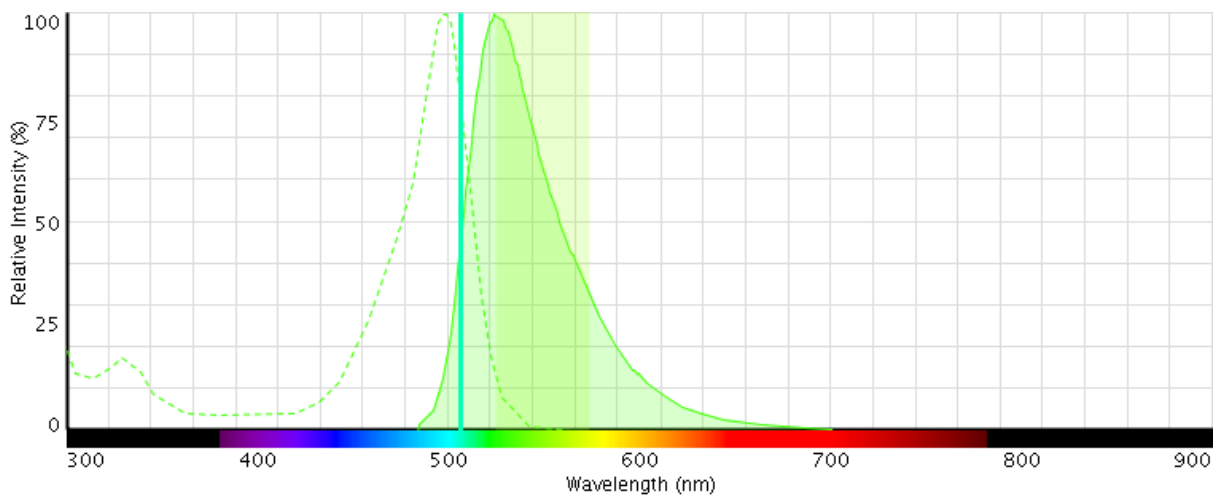
Kombinace laseru a emisního filtru pro jednotlivá měření byla zvolena na základě spektrálních charakteristik použitých fluorescenčních sond (viz Obrázek 20) a požadavku vyloučení píku Ramanova rozptylu ve vodě ze zaznamenaných dat. Při použití laseru o vlnové délce 507 nm dochází k Ramanově rozptylu při vlnové délce 613 nm a v případě laseru 467 nm k němu dochází při vlnové délce 555 nm. Pro libovolnou vlnovou délku excitačního záření může být vlnová délka Ramanova rozptylu ve vodě vypočítána dle následující rovnice:

$$\lambda_{\text{Ram}} = 1 \cdot 10^7 \cdot \left(\frac{1 \cdot 10^7}{\lambda_{\text{ex}}} - 3400 \right)^{-1} \quad (13)$$

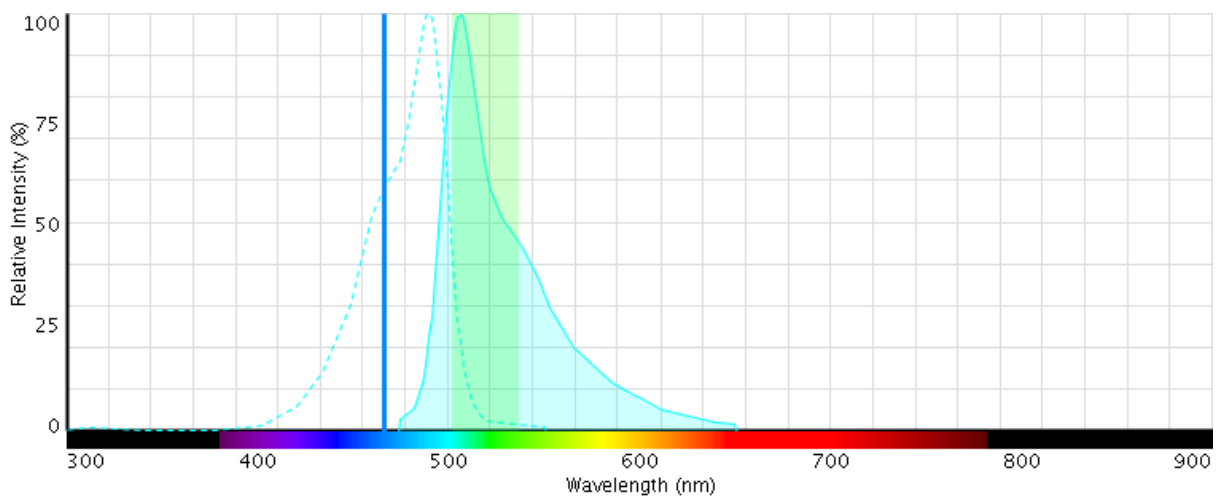
Nilská červeň



Oregonová zeleň



DiO



Obrázek 20: *Excitační (čárkovaně) a emisní (plnou čarou) spektra použitých fluorescenčních sond, konkrétně Nilské červeně, Oregonové zeleně a DiO (shora). Na grafech jsou též vyznačeny použité lasery a emisní filtry.*

Výběr optických prvků pro jednotlivé experimenty je shrnutý v Tabulce 3.

Tabulka 3: *Charakteristiky optických prvků použitých při měření s jednotlivými sondami*

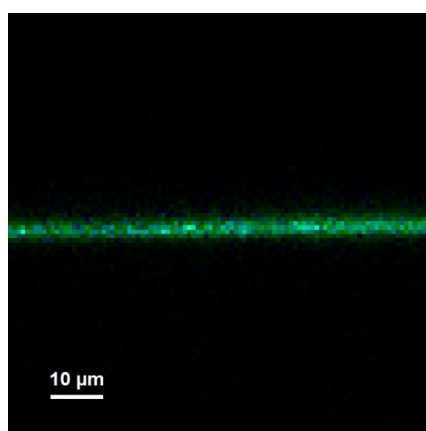
Sonda	Laser	Frekvence laseru	Intenzita laseru [a.u.]	Přepočet intenzity [μW]	Dichroické zrcadlo	Emisní filtr
Nilská červeň	507 nm	40 MHz	120 nebo 200	6,1 nebo 10,2*	514/640	690/70
Oregonová zeleň DHPE	507 nm	40 MHz	120 nebo 200	6,1 nebo 10,2*	514/640	550/49
DiO	467 nm	40 MHz	120 nebo 200	7,9 nebo 13,2**	470/635	520/35

* Pro kombinaci laseru 507 nm s dichroickým zrcadlem 514/640 nm je odpovídající přepočet 0,051 $\mu\text{W}/\text{a.u.}$

** Pro kombinaci laseru 467 nm s dichroickým zrcadlem 470/635 nm je odpovídající přepočet 0,066 $\mu\text{W}/\text{a.u.}$

K měření byl používán objem 50 μl nanosený pomocí automatické pipety na čisté sklíčko upevněné v držáku a umístěné na stolek nad objektivem. Měření v objemu byla prováděna 50 μm nad povrchem sklíčka. Doba záznamu FCS křivky se lišila dle odezvy vzorku, zpravidla se pohybovala v rozmezí 5 až 10 minut. Pokud byly při měření využívány 2 detektory, byla z jejich záznamu provedena kroskorelační analýza. Pro odstranění tzv. afterpulsingu, což je známý artefakt detektorů při měření FCS, byly využity filtry FLCS (pomocí funkce Background correction). Získané křivky byly proloženy vhodným matematickým modelem, jejich přehled je uveden v kapitole 2.7.

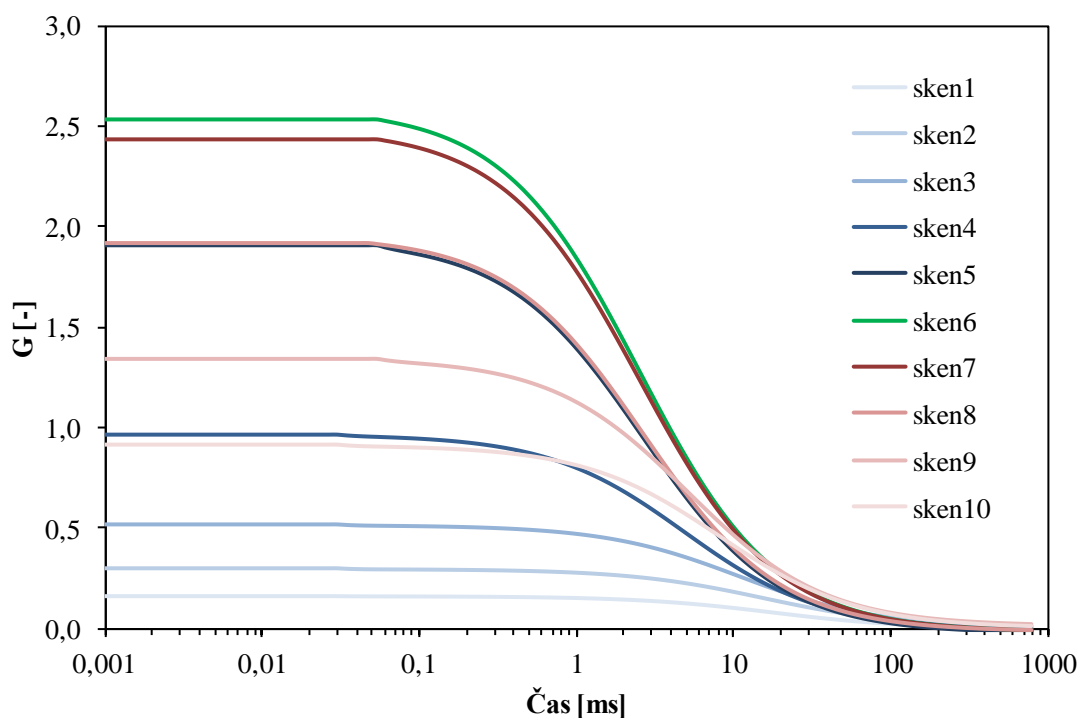
Z-scan FCS – měřením intenzity fluorescence (případně vyhasínací křivky fluorescence) v různých polohách osy z v režimu Test programu SymphoTime byla určena přibližná poloha SLB vzhledem k ose z vhodná k proměření difuzního koeficientu fluorescenční sondy v rámci membrány. Přibližnou hodnotu na ose z , kde se dvojvrstva nacházela, bylo možné zjistit také pomocí funkce FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), kdy byl pořízen snímek v rovinách xz nebo yz a pomocí kurzoru byla odečtena souřadnice z , ve které byla detekována významná intenzita fluorescence (viz Obrázek 21).



Obrázek 21: *Výrazný fluorescenční signál pocházející z oblasti fosfolipidové dvojvrstvy deponované na krycím sklíčku.*

Po tomto orientačním odhadu správné polohy z pro měření difuze v SLB bylo v ovladači sekvenčního měření Z-scan nastaveno rozmezí $1\ \mu\text{m}$ nad a $1\ \mu\text{m}$ pod odhadovanou polohou z a počet měření mezi těmito hranicemi byl nastaven na 10. Doba měření na jedné úrovni z musela být zvolena jako kompromis mezi dostatečnou dobou sběru FCS dat a stabilitou posuvného stolku v jedné poloze v čase. Nastavena byla na 60 sekund pro každé měření.

Příklad získaných dat je uveden na Obrázku 21. Měření označené jako „sken1“ se provede zhruba $1\ \mu\text{m}$ nad předpokládanou pozicí dvojrstvy. Pomocí piezo skeneru se při každém dalším měření (sken2 až sken10) sníží poloha objektivu o $0,22\ \mu\text{m}$, přičemž při jednom z měření (obvykle uprostřed série) se poloha dvojrstvy na sklíčku nejvíce blíží nejužšímu místu tvaru konfokálního objemu (tzv. beam waist). V tomto bodě je fluorescenční záření detekováno z nejmenší plochy, díky čemuž je možné z dat vypočítat difuzní koeficient, který není zkreslený nepřesným umístěním vzorku vzhledem k optické ose. Se zmenšující se plochou, z které je fluorescenční záření detekováno, se také zmenšuje počet molekul, které přispívají do detekovaného signálu. Tím pádem vzrůstá hodnota autokorelační (v případě měření dvěma detektory kroskorelační) funkce v bodě nula, tedy G_0 .



Obrázek 22: Ukázka dat získaných provedením FCS Z-scanu fosfolipidové dvojrstvy deponované na sklíčku jako podpůrném substrátu. Sken1 začíná $1\ \mu\text{m}$ nad odhadovanou polohou dvojrstvy, sken10 končí $1\ \mu\text{m}$ pod touto polohou. Zeleně je znázorněn sken, kdy poloha dvojrstvy nejlépe shoduje s tzv. beam waist.

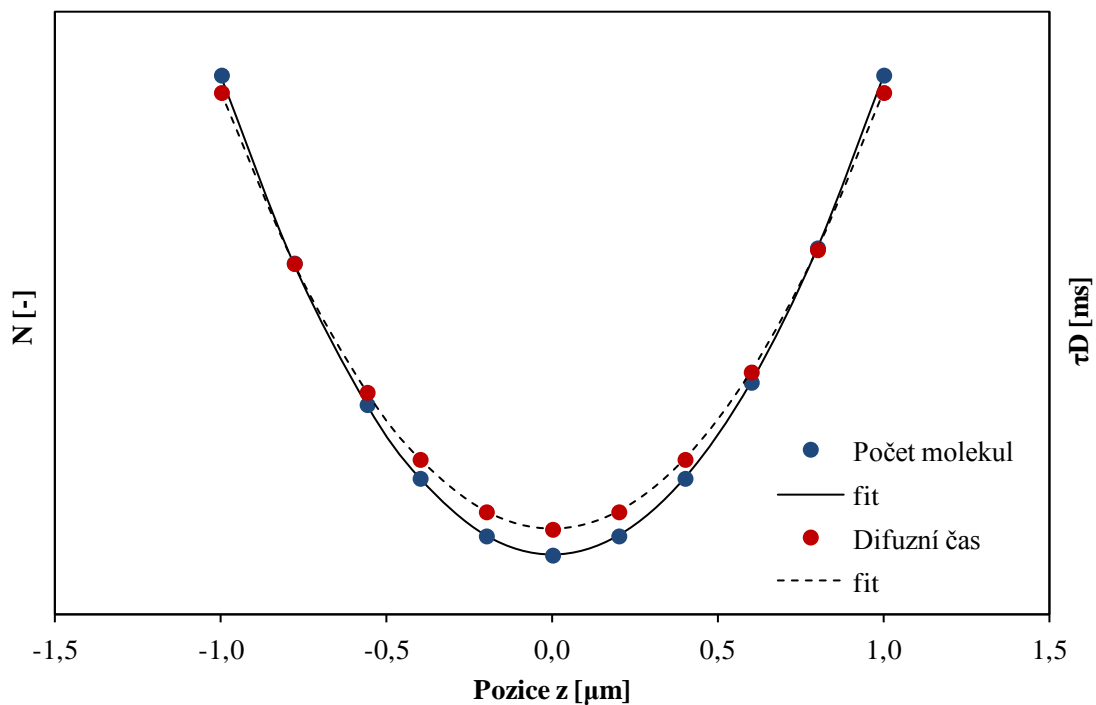
Pokud tedy skutečně měříme dvojrstvu (planární vzorek) platí posloupnost zvyšujícího se G_0 a zároveň zkracujícího se difuzního času, který je určen jako inflexní bod autokorelační křivky až do okamžiku, kdy poloha dvojrstvy odpovídá nejužšímu místu konfokálního objemu. Tomuto trendu na Obrázku 22 odpovídají modrou barvou vykreslené skeny 1-5, jejichž postupně se ztmavující modrá barva naznačuje posun vrstvy směrem k tzv. beam

waist. Při šestém skenu byla naměřena křivka s nejvyšším G_0 , označena je zeleně. Od tohoto okamžiku dochází postupně opět ke snižování G_0 (skeny 7-10, vybarvené červeně).

Po zisku sady FCS křivek byly jednotlivé funkce analyzovány proložením modelu Triplet Extended 2D, jehož tvar byl uveden v Rovnici 7:

$$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{trip}-1} T(j) \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Trip}}\right) - 1 \right] \right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{diff}-1} \frac{\rho[i]}{1 + \left[\frac{t}{\tau_{Diff}[i]} \right]^{\alpha[i]}} + G_{inf}$$

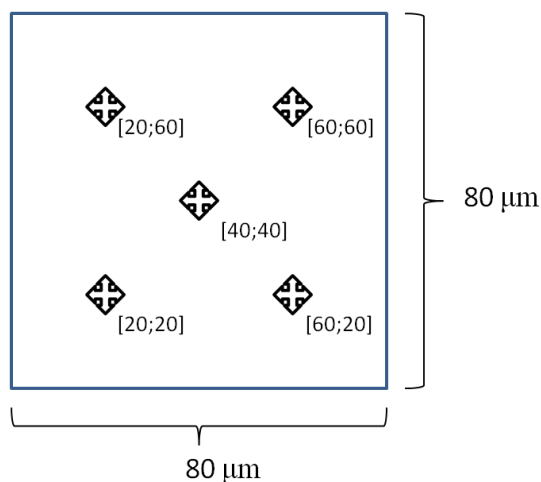
Vypočítané parametry τ_D (difuzní čas) a N (počet molekul v detekovaném objemu) se vynášejí do grafu v závislosti na poloze vzhledem k ose z a jsou prokládány parabolami (viz Rovnice 8 a 9). Na základě tohoto proložení dat může být ze závislosti $\tau_D = f(\Delta z)$ získán difuzní koeficient D a ze závislosti $N = f(\Delta z)$ počet molekul N_0 v nejužším místě tvaru konfokálního objemu (tzv. beam waist), kdy tomuto parametru odpovídá výraz $\pi C \omega_0^2$. Tato operace byla provedena v programu Gnuplot, který spolu s hledanými parametry určí také jejich nejistotu.



Obrázek 23: Modelové vyhodnocení sady FCS dat. Modře je vynesena závislost počtu molekul detekovaných v konfokálním objemu a červeně závislost difuzního času na pozici vzorku vzhledem k ose z . Černé křivky znázorňují proložení dat parabolami.

Kvůli možné experimentální chybě zejména v oblastech vzdálených od beam waist, ale také kvůli možným nehomogenitám membrány, je vhodné opakovat celé měření Z-scan v rámci jedné SLB víckrát na různých místech. V této práci bylo měření provedeno vždy

pětkrát, přičemž poloha bodu, ve kterém měření probíhalo, byla nastavována pomocí softwarového ovladače podle následujícího schématu:



Obrázek 24: Schéma měření Z-scan v různých bodech SLB. Modře je vyznačena část plochy xy dvojvrstvy, černě potom body, ve kterých probíhalo měření a jejich souřadnice.

Pro jednotlivé polohy vzhledem k ose z byly spočítány průměrné hodnoty pěti měření difuzního času, a tyto byly dále použity k analýze. Vzhledem k tomu, že každá hodnota difuzního času byla stanovena s určitou chybou (podle míry shody s modelem Triplet Extended 2D), musela být tato chyba zohledněna i v celkové nejistotě výsledku, společně se směrodatnou odchylkou průměru z měření pěti hodnot. K výpočtu celkové chyby byla využita Rovnice 14:

$$s_{tot} = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^n (s_i^2) + \sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (14)$$

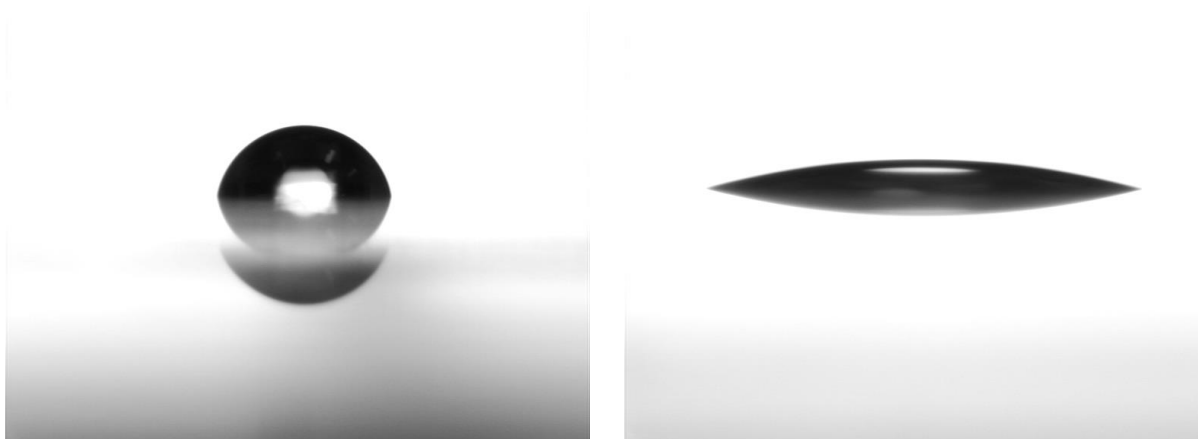
Pro hodnocení membrán z hlediska homogenity (ve smyslu přítomnosti nebo nepřítomnosti mikrodomén o jiném chování, než má zbytek dvojvrstvy) byla data vynesena do grafu Humpolíčkové. Využívá se přitom Rovnice 11.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Prvotní ověřovací experimenty

5.1.1 Ověření účinnosti plazmochemické úpravy povrchu sklíčka

Po hydrofilizaci sklíčka pomocí plazmatu byla ověřena účinnost této úpravy naměřením kontaktního úhlu, viz Obrázek 25:

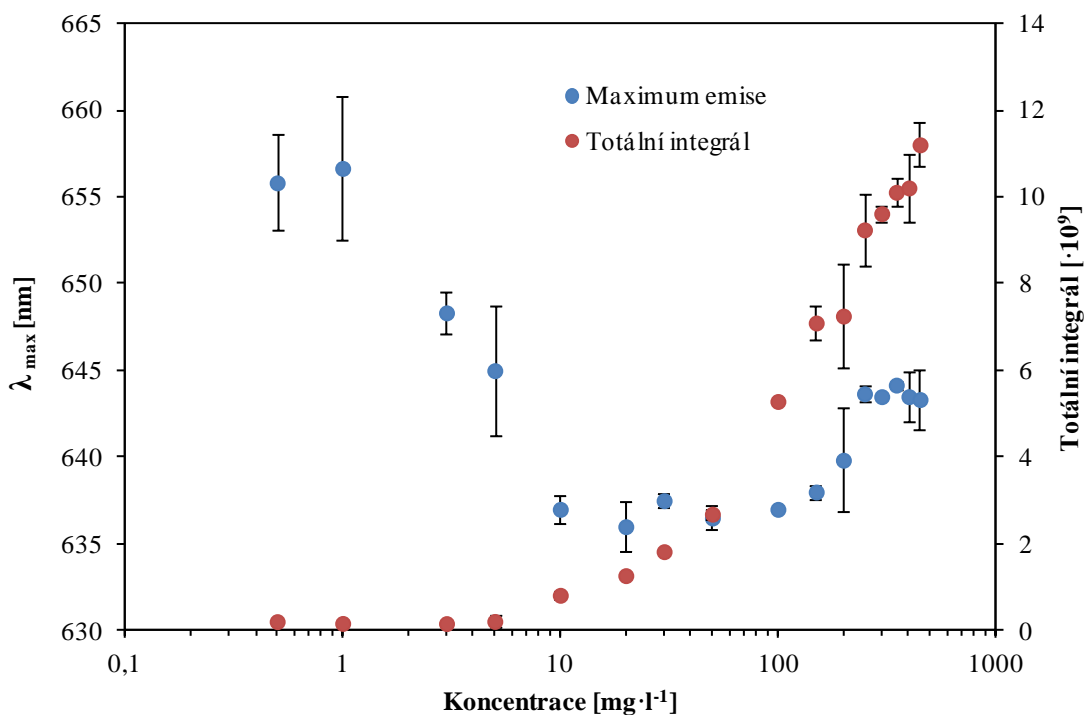


Obrázek 25: Kontaktní úhel sklíčka před plazmochemickou úpravou (vlevo) a po plazmochemické úpravě (vpravo).

Nejprve byla jako reference naměřena hodnota kontaktního úhlu na sklíčku neopracovaném plazmatem. Kapka vody smáčela sklíčko poměrně málo - naměřený kontaktní úhel byl $77,2 \pm 2,5^\circ$. V případě opracovaného sklíčka došlo k velmi výraznému snížení kontaktního úhlu, a to až na $22,0 \pm 2,6^\circ$. K tomuto výsledku je třeba ještě podotknout, že větší nepřesnost měření (vzhledem k hodnotě kontaktního úhlu) je způsobena velmi malým kontaktním úhlem, který byl už na hranici vyhodnotitelnosti použitým softwarem. Ve skutečnosti tak byla hodnota pravděpodobně ještě o něco nižší.

5.1.2 Agregace fosfolipidů ve vodném prostředí

K ověření vzniku agregátů (liposomů) v roztocích fosfolipidů byl proveden experiment využívající vlastností fluorescenční sondy citlivé na polaritu prostředí, ve kterém se nachází – Nilské červeně. Ve vodě (tj. polárním prostředí) vykazuje Nilská červeně jen slabou fluorescenci, v nepolárním prostředí intenzita fluorescence stoupá. V dostatečně zředěném roztoku obsahujícím fosfolipidy ještě nedochází k agregaci jednotlivých molekul do liposomů, předpokládaná intenzita fluorescence Nilské červeně je tedy nízká. S rostoucí koncentrací fosfolipidu v roztoku ovšem dochází ke vzniku liposomů, jejichž tvar určuje dvouvrstvá membrána, ve které jsou nepolární řetězce mastných kyselin fosfolipidu soustředěny uprostřed tak, aby polárnímu prostředí byly na obou stranách vystaveny hydrofilní hlavy molekul. V této střední vrstvě membrány se předpokládá solubilizace Nilské červeně, která se tak dostává do vhodného prostředí pro poskytování vyššího fluorescenčního signálu.

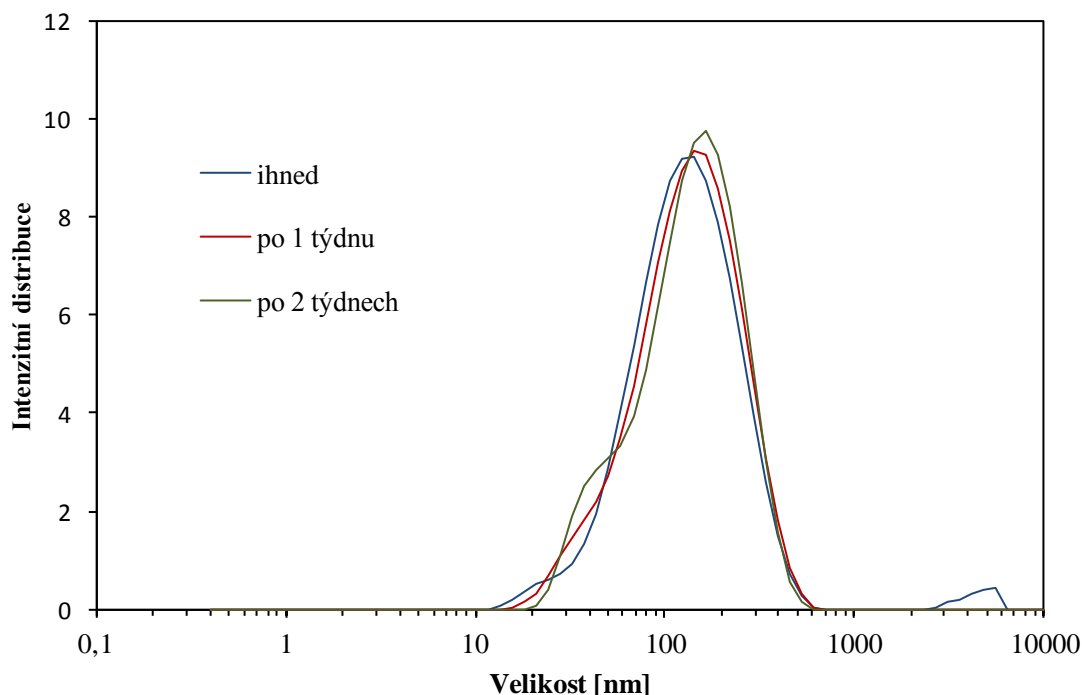


Obrázek 26: *Agregační chování lecitinu ve fosfátovém pufru s Nilskou červení jako fluorescenční sondou.*

Na Obrázku 26 jsou prezentovány výsledky studia agregačního chování lecitinu ve fosfátovém pufru. V oblasti koncentrací 0,5 až 5 mg·l⁻¹ je celková intenzita fluorescence Nilské červeně na konstantní nízké úrovni a po překročení horní koncentrace začíná růst. Tato skutečnost poukazuje na výskyt hydrofobních domén v systému a tedy na agregaci jednotlivých molekul lecitinu do liposomů. Zároveň dochází k hypsochromnímu posunu emisního maxima k přibližně 637 nm, což nastává právě v nepolárním prostředí. Agregace fosfolipidů do liposomů tedy nastává již při koncentracích nižší než 10 mg·l⁻¹. Toto zjištění je ve shodě s předchozími experimenty [43], ve kterých byl jako polaritní sonda využit pyren.

5.1.3 Stanovení velikosti liposomů

Po přípravě roztoku liposomů metodou rehydratace z tenké vrstvy s následným působením ultrazvuku bylo potřeba ověřit velikost vzniklých liposomů a tím pádem také vhodnost roztoku připraveného tímto způsobem jako prekurzoru SLB. K tomuto účelu byla použita metoda dynamického rozptylu světla. Proměřeny byly vzorky s koncentrací lecitinu 500 mg·l⁻¹ v prostředí fosfátového pufru, a to ihned po přípravě, po uplynutí 1 týdne a po uplynutí 2 týdnů. V době mezi měřeními byly vzorky uchovávány při laboratorní teplotě. Výsledky jsou prezentovány na Obrázku 27:



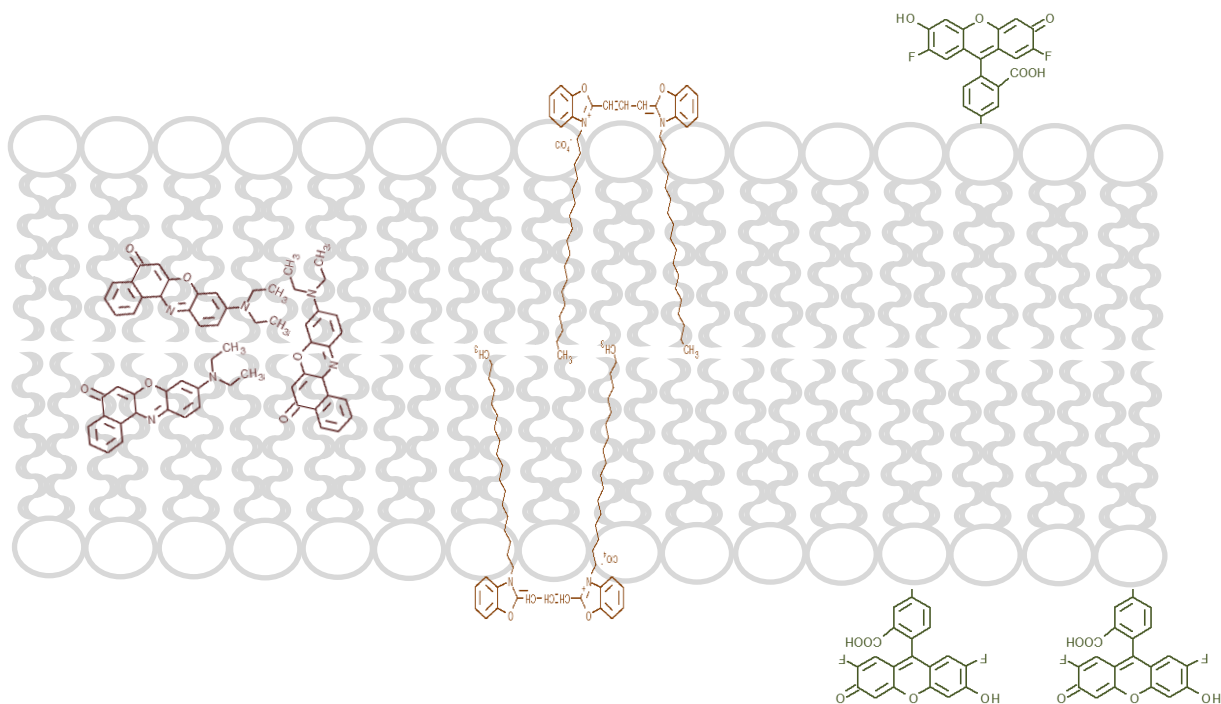
Obrázek 27: *Distribuce velikostí liposomů vytvořených v roztoku lecitinu o koncentraci $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ve fosfátovém pufru a jejich stabilita v čase.*

Z naměřených dat je patrné, že v roztoku byla přítomna velká část liposomů s hydrodynamickým poloměrem přibližně 100 až 200 nm. Menší pík u velikosti 3 000 až 6 000 nm zaznamenaný při měření vzorku ihned po jeho přípravě je přisuzován náhodnému vnějšímu vlivu (například prachovým částicím omylem zachycených vzorkem). Zároveň se připravený vzorek ukázal stabilní po dobu nejméně dvou týdnů, kdy nedocházelo například k agregaci a spojování malých liposomů za tvorby částic o větším hydrodynamickém poloměru. Získané křivky však nejsou zcela symetrické a v oblasti velikostí několika desítek nanometrů se objevují menší píky, které se projevují jako „hrbolky“ na jinak hladké křivce. To poukazuje na přítomnost významné frakce částic o menším hydrodynamickém poloměru, jejichž signál je při detekci „zastíněn“ světlem rozptýleným většími částicemi. Při přepočítání dat z intenzitní distribuce na objemovou distribuci (což umožňuje software k použitému přístroji ZetaSizer) byla potvrzena přítomnost velkého množství částic s velikostí řádově desítek nanometrů.

Na základě těchto výsledků a také výsledků uvedených v předchozí kapitole lze tedy s jistotou říci, že v roztocích používaných k přípravě modelových membrán (koncentrace $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) dochází ke vzniku liposomů, což je struktura, ze které SLB vychází.

5.2 Výběr fluorescenční sondy pro vizualizaci a charakterizaci membrány

Ke studiu membrán pomocí fluorescenčních technik bylo navrženo velké množství fluorescenčních sond, které se k membráně poutají různým způsobem. V této práci byly zvoleny tři z nich, jejichž předpokládaná lokalizace v rámci membrány je znázorněna na Obrázku 28:



Obrázek 28: Použité fluorescenční sondy a schéma jejich poutání k membráně.
Zleva: Nilská červeň, DiO, Oregonovou zelení značený DHPE

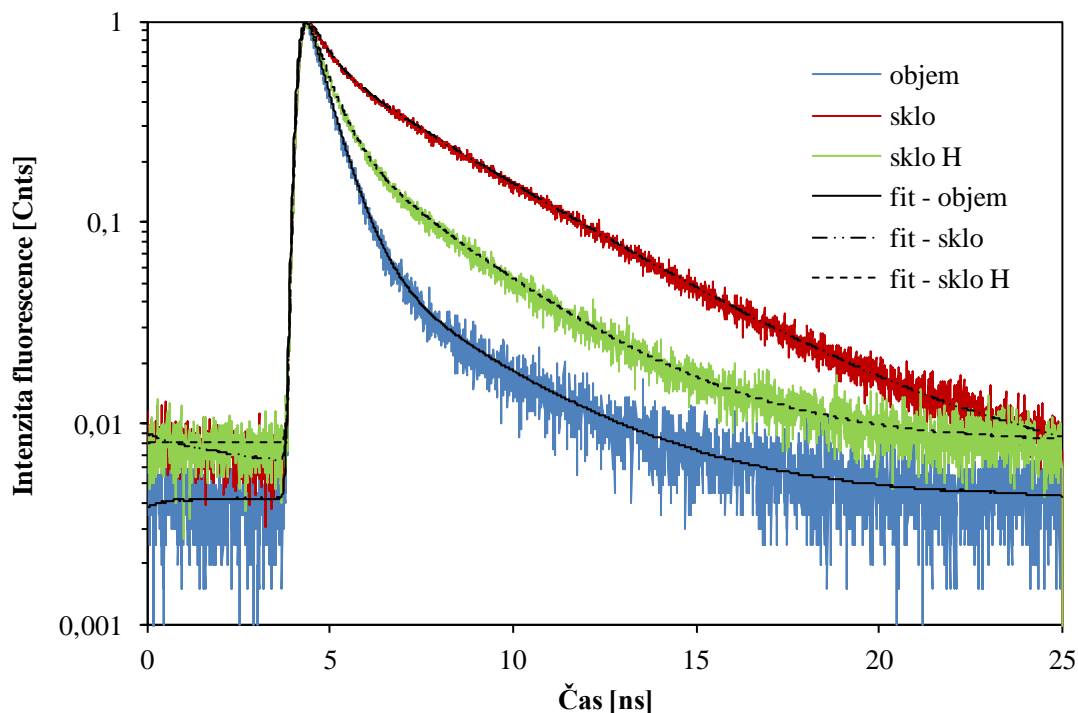
Nilská červeň je sonda, která ve vodném (nebo obecně polárním prostředí) vykazuje nízkou intenzitu fluorescence, zatímco v hydrofobním prostředí, kam se přednostně solubilizuje, její fluorescence roste. V systému SLB bude tudíž lokalizována mezi dlouhými nepolárními řetězci mastných kyselin. Sonda DiO bude díky své (amfifilní) struktuře částečně zanořena mezi nepolární řetězce fosfolipidů a její polární část bude vystavena kontaktu s vodným prostředím obklopujícím dvojvrstvu. Poslední vyzkoušená sonda - DHPE značený Oregonovou zelení bude potom přímou součástí SLB (jako jeden ze stavebních fosfolipidů) a fluorescenční značení na polární hlavice DHPE bude směřováno do roztoku kolem.

5.2.1 Použití Nilské červně

Vlastností typickou pro Nilskou červeň je její silná tendence k adsorpci na sklo, což by mohlo vést k záznamu falešného signálu, a to zejména v případě měření fosfolipidových dvojvrstev, které jsou deponované právě na povrchu sklíčka. Z toho důvodu byly provedeny kontrolní experimenty, jejichž cílem bylo porovnat chování Nilské červně ve vodném roztoku a v roztoku, který obsahuje liposomy jako prekurzory SLB.

Měření různých systémů obsahujících nanomolární koncentraci Nilské červně bylo zjištěno, že její doba života se pro tyto systémy liší. Je tedy možné dobře rozlišit, jestli je sonda lokalizovaná ve vodě nebo v jiném, méně polárním, prostředí. Nejprve byla proměřena fluorescence Nilské červně ve vodném prostředí, ve kterém je velmi omezeně rozpustná. Vzhledem k použitým koncentracím však bylo možné detekovat signál pocházející z malého množství rozpuštěné Nilské červně. Celková intenzita fluorescence byla pomocí TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) rozlišena na příspěvky frakcí s různou dobou života fluorescence. Měření bylo provedeno jednak v objemu kapky umístěné na sklíčku (v tomto případě byl fluorescenční signál zaznamenáván 50 μm nad povrchem sklíčka), tak těsně u rozhraní sklíčko-roztok Nilské červně ve fosfátovém pufru. Ve druhém

případě byly navíc vyzkoušeny dva typy sklíček – obyčejné, nijak zvlášť neupravené a plazmatem hydrofilizované sklíčko.



Obrázek 29: Křivky dohasínání fluorescence Nilské červeně ve fosfátovém pufru v objemu (modrá), na povrchu obyčejného sklíčka (červená) a na povrchu hydrofilizovaného sklíčka (zelená) a proložení matematickými modely (černá)

Jak je vidět na Obrázku 29, dochází v blízkosti povrchu skla ke změně průběhu vyhasínací křivky Nilské červeně. Výsledky jsou přehledně shrnuty v Tabulce 4:

Tabulka 4: Zjištěné doby života Nilské červeně v různých systémech

	doba života τ_1 [ns]	amplituda A_1 [kCnts]	doba života τ_2 [ns]	amplituda A_2 [kCnts]
fosfátový pufr (objem)	$0,588 \pm 0,003$	$2,875 \pm 0,012$	$3,291 \pm 0,045$	$0,158 \pm 0,004$
fosfátový pufr (sklo)	$0,565 \pm 0,007$	$2,965 \pm 0,022$	$3,923 \pm 0,010$	$2,905 \pm 0,011$
fosfátový pufr (hydrofilizované sklo)	$0,570 \pm 0,003$	$3,536 \pm 0,023$	$3,114 \pm 0,012$	$0,843 \pm 0,006$
liposomy (objem)	$4,485 \pm 0,009$	$2,648 \pm 0,011$	x	x
liposomy (sklo)	$4,405 \pm 0,009$	$2,171 \pm 0,014$	x	x
liposomy (hydrofilizované sklo)	$4,390 \pm 0,010$	$1,447 \pm 0,004$	x	x

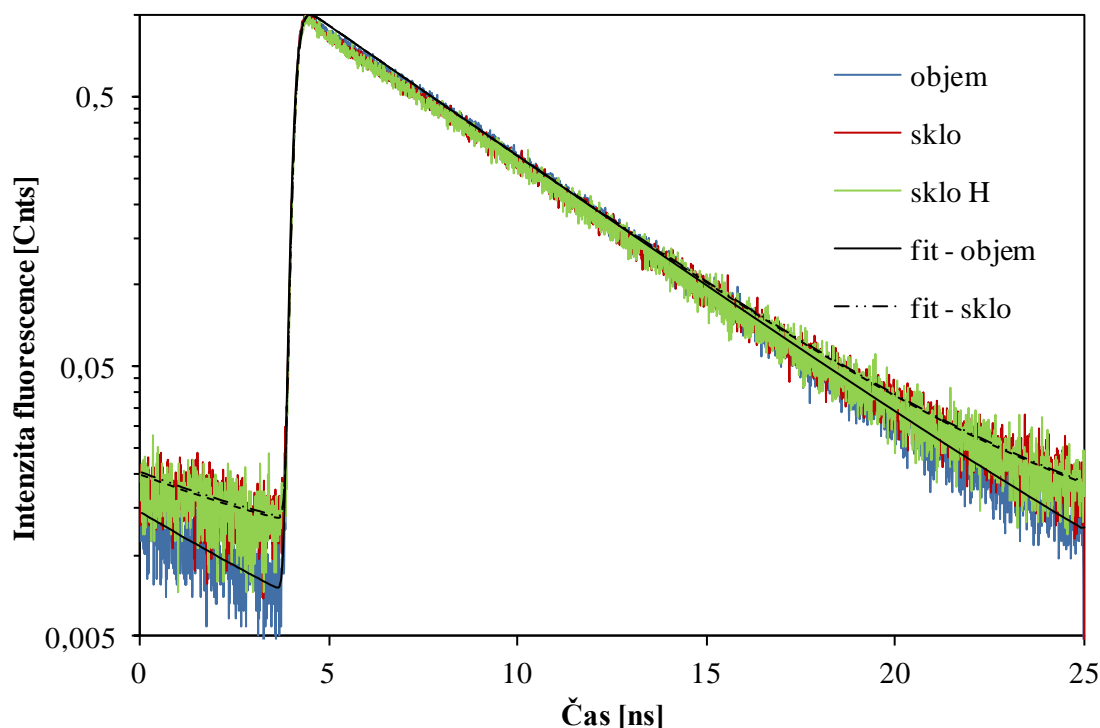
Důvodem odlišnosti vyhasínací křivky Nilské červeně v objemu a v těsné blízkosti povrchu sklíčka je různé zastoupení delší doby života τ_2 vyjádřené amplitudou A_2 . To se projeví jiným tvarem křivky a také vyšším signálem (což ale není na Obrázku 29 znázorněno – data byla normalizována kvůli větší názornosti). Z toho vyplývá, že Nilská červeně má i v takto nízké

koncentraci tendenci sorbovat se na povrch sklička. Zajímavým zjištěním bylo, že adsorpce nebyla tak významná v případě plazmochemicky hydrofilizovaného sklička.

Druhou část Tabulky 4 tvoří výsledky měření časově rozlišené fluorescence v roztoku liposomů. V tomto systému došlo k vymizení frakce s kratší dobou života a data bylo možné proložit monoexponenciální křivkou s jednou charakteristickou dobou života. Lze tak jednoznačně odlišit signál Nilské červeně z vodného prostředí a z prostředí liposomů. Zároveň z měření vyplývá, že v tomto systému k adsorpci Nilské červeně na povrch sklička nedochází, jak je vidět z průběhu vyhasínacích křivek na Obrázku 30.

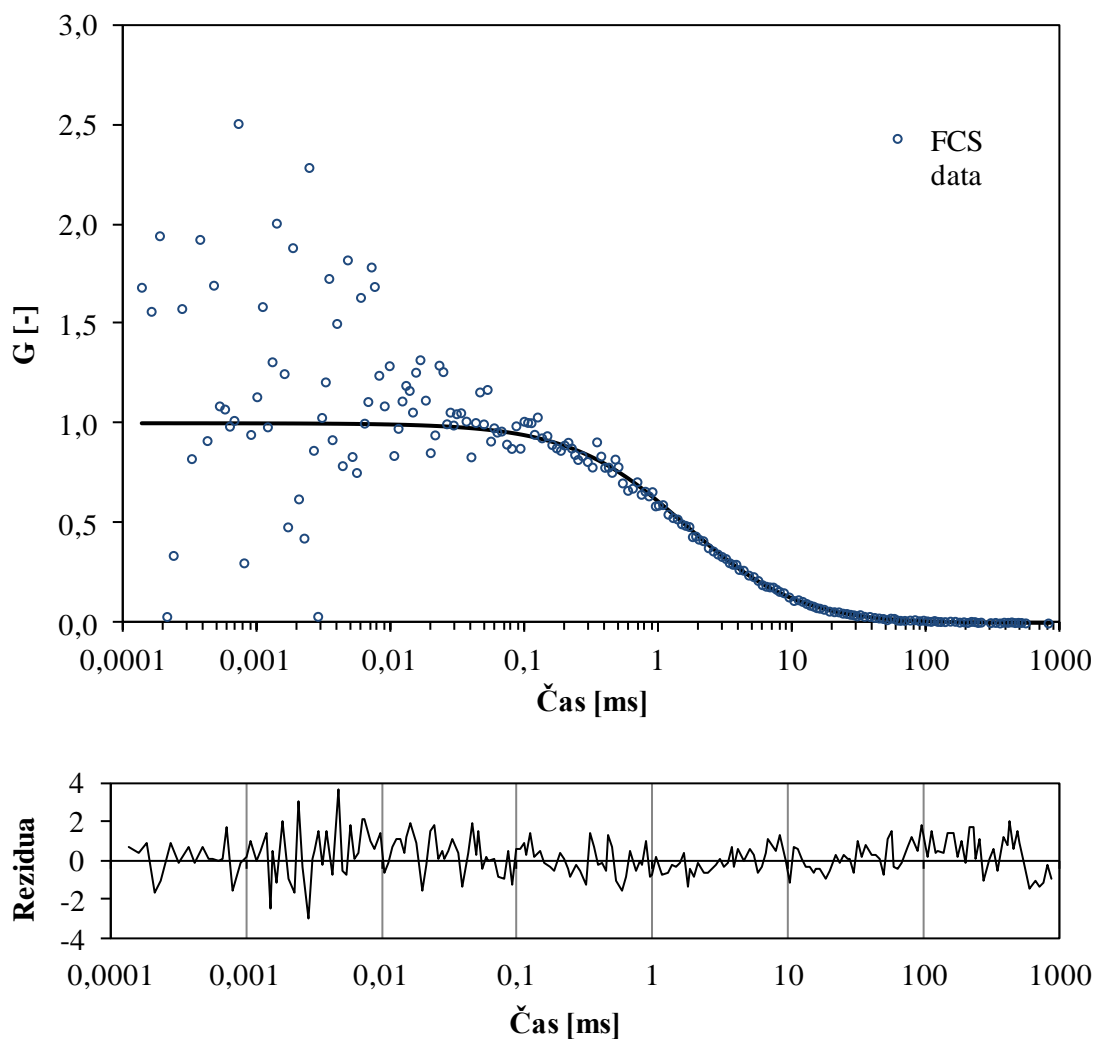
Z těchto měření lze vyvodit, že v přítomnosti liposomů se Nilská červeně solubilizuje uvnitř těchto liposomů (lépe řečeno v hydrofobní oblasti jejich dvojvrstvy) a že signál v blízkosti povrchu sklička nepochází z adsorbované Nilské červeně na tento povrch.

Při měření fluorescence Nilské červeně ve vytvořených SLB byla nalezena rovněž jedna doba života, která ovšem byla oproti době života v liposomech kratší o 1 ns, případně i více.



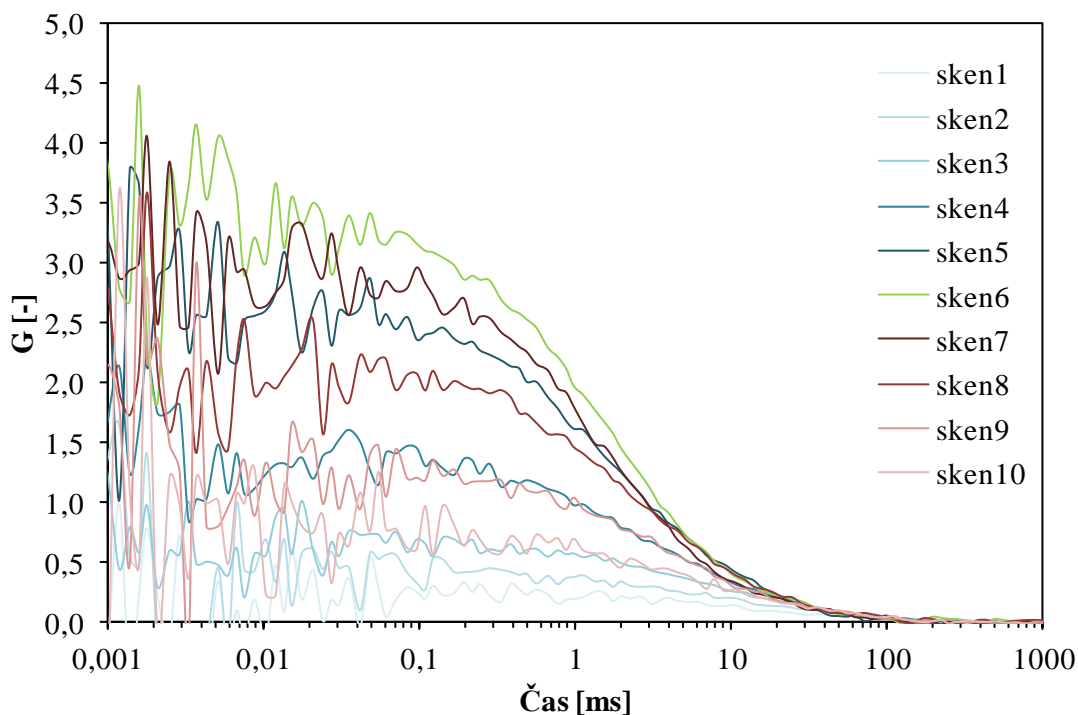
Obrázek 30: Vyhasínací křivky Nilské červeně solubilizované v liposomech ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ lecitinu) v prostředí fosfátového pufru: v objemu (modrá), na povrchu sklička (červená) a na povrchu hydrofilizovaného sklička (zelená) a proložení matematickými modely (černá)

Systém liposomů se solubilizovanou Nilskou červeně byl následně charakterizován pomocí FCS analýzy difúze Nilské červeně v hydrofobní části vrstvy. Výsledky jsou prezentovány na Obrázku 31. Měření bylo v rámci jednoho vzorku zopakováno třikrát a hodnota difuzního koeficientu byla vypočítána jako průměr z těchto měření, přičemž byla zohledněna jak chyba proložení, tak směrodatná odchylka průměru. Zjištěná hodnota difuzního koeficientu byla $15,41 \pm 1,07 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

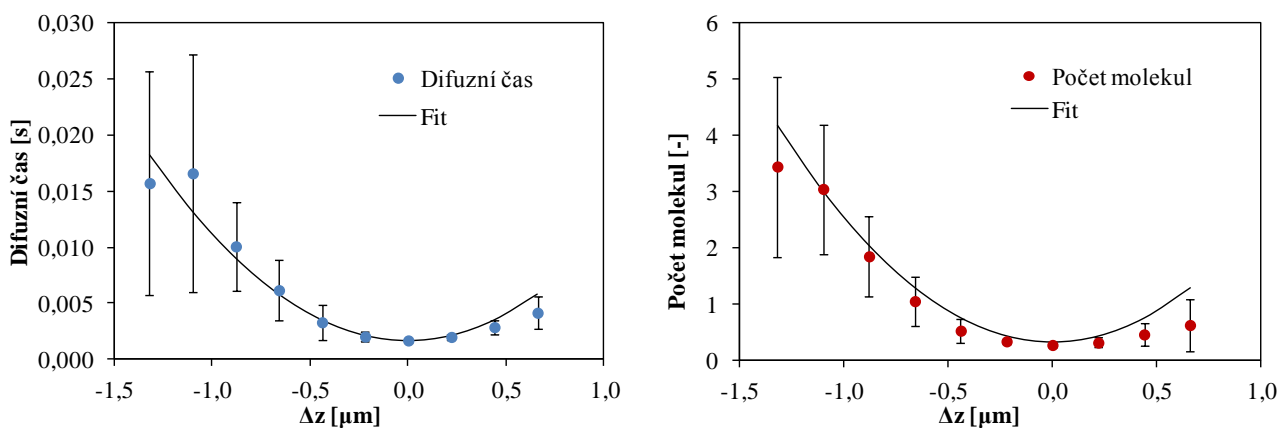


Obrázek 31: FCS analýza difuzního koeficientu Nilské červeně solubilizované v liposomech ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lecitinu) ve fosfátovém pufru.

Po charakterizaci liposomů byla vytvořena dvojvrstva na sklíčku a bylo provedeno měření Z-scan a následné vyhodnocení dat. Na Obrázku 32 jsou vyneseny naměřené FCS křivky dvojvrstvy s Nilskou červení. Doba života Nilské červeně v tomto systému byla výrazně nižší (o 1 ns i více), než ve volných liposomech, což rovněž potvrzuje vytvoření SLB na substrátu. Jednotlivé kroskorelační křivky byly proloženy modelem Triplet Extended 2D, v tomto případě s vyloučením parametru popisujícího triplet, protože dle získaných dat byl přechod sondy do tripletního stavu zanedbatelný. Průměrné hodnoty difuzních časů pro různé polohy vzhledem k ose z byly následně proloženy parabolickými modely (Rovnice 8 a 9), jak ukazuje Obrázek 33.

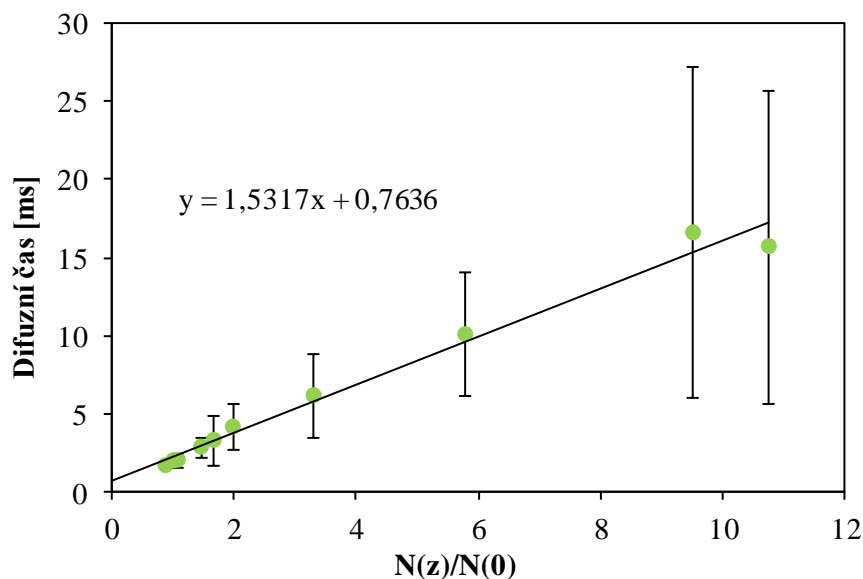


Obrázek 32: Z-scan dvojvrstvy na sklíčku s Nilskou červení jako fluorescenční sondou. Sken6 (zeleně) odpovídá nelépe poloze dvojvrstvy v tzv. beam waist.



Obrázek 33: Vyhodnocení měření Z-scan ve fosfolipidové dvojvrstvě deponované na sklíčku s Nilskou červení jako fluorescenční sondou. Difuzní čas molekuly konfokálním objemem (graf vlevo, modře), počet molekul v tomto objemu (graf vpravo, červeně) a proložení matematickými modely (černě)

Difuzní čas molekul Nilské červeně v rámci SLB odpovídal hodnotě $10,24 \pm 1,95 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Zjištěný údaj o počtu molekul N_0 ($0,321 \pm 0,016$) v tzv. beam waist detekčního objemu byl použit pro vynesení dat do grafu Humpolíčkové (Obrázek 34):



Obrázek 34: Vynesení dat pro lecitinovou dvojvrstvu s Nilskou červení do grafu Humpolíčkové

Po proložení dat lineární regrese byl zjištěn úsek na ose y , který byl rovný hodnotě **0,76 ms**. Kladný průsečík s osou y naznačuje přítomnost mikrodomén nebo jiných nehomogenit v rámci vrstvy. Možný význam tohoto výsledku bude diskutován v kapitole 5.2.4.

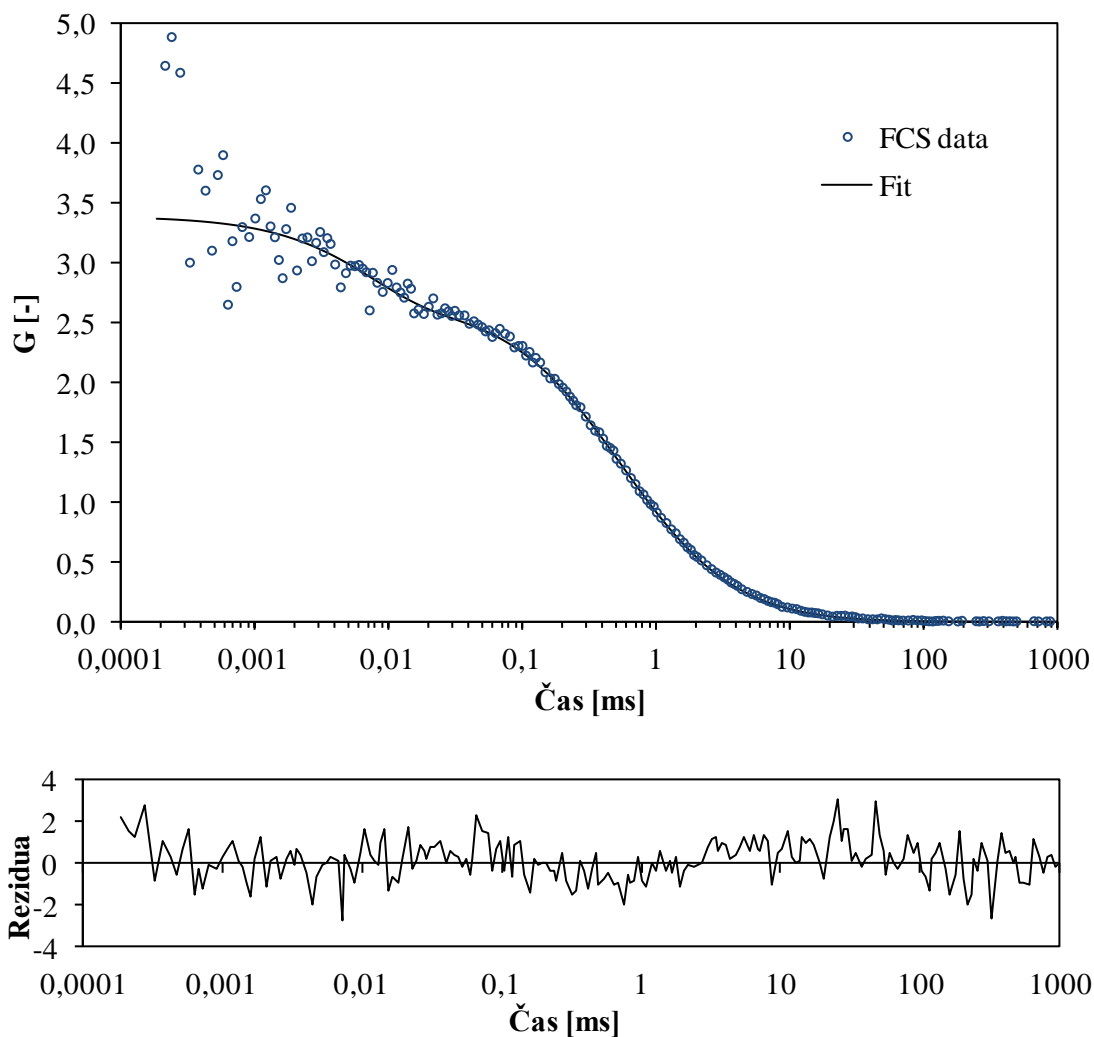
5.2.2 Použití Oregonové zeleně DHPE

Další vyzkoušenou fluorescenční sondou byla molekula fosfolipidu DHPE označená na své polární části Oregonovou zelení. Vzhledem k tomu, že se jedná o amfifilní molekulu, která se při nízké koncentraci hromadí na rozhraní voda-vzduch, nebylo možné měřit odezvu této sondy v čistém rozpouštědle (pufru) za účelem porovnání její odezvy se signálem pocházejícím z prostředí fosfolipidů. Z tohoto důvodu byla jako první proměřena doba života fluorescence Oregonové zeleně DHPE v prostředí liposomů. Zjištěná doba života byla porovnána s výsledky získanými z měření ve fosfolipidové dvojvrstvě (Tabulka 5).

Tabulka 5: Zjištěné doby života Oregonové zeleně DHPE v liposomech a SLB

	Doba života [ns]
Oregonová zeleň DHPE v liposomech	$4,52 \pm 0,02$
Oregonová zeleň DHPE v SLB	$3,70 \pm 0,02$

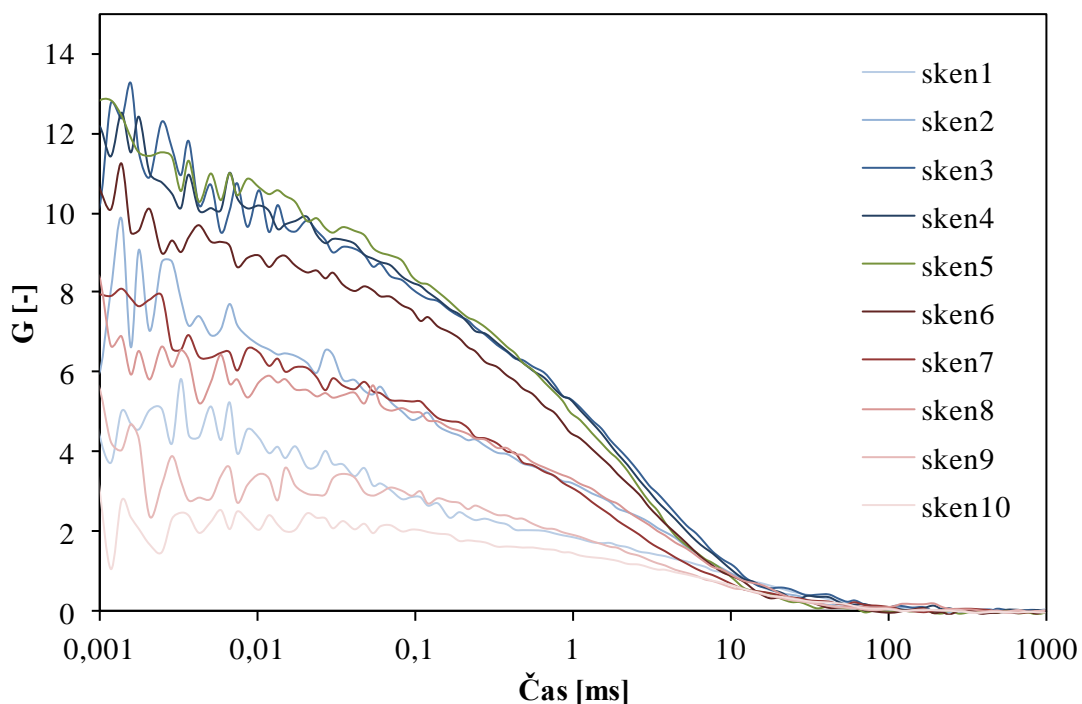
Následně byla pomocí FCS proměřena difuze Oregonové zeleně DHPE v prostředí liposomů. Data byla proložena modelem s jedním difuzním časem a parametrem popisujícím tripletní stav sondy. Difuzní koeficient získaný jako průměrná hodnota ze tří měření jednoho vzorku byl roven $29,24 \pm 0,62 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Průběh měření uveden na Obrázku 35.



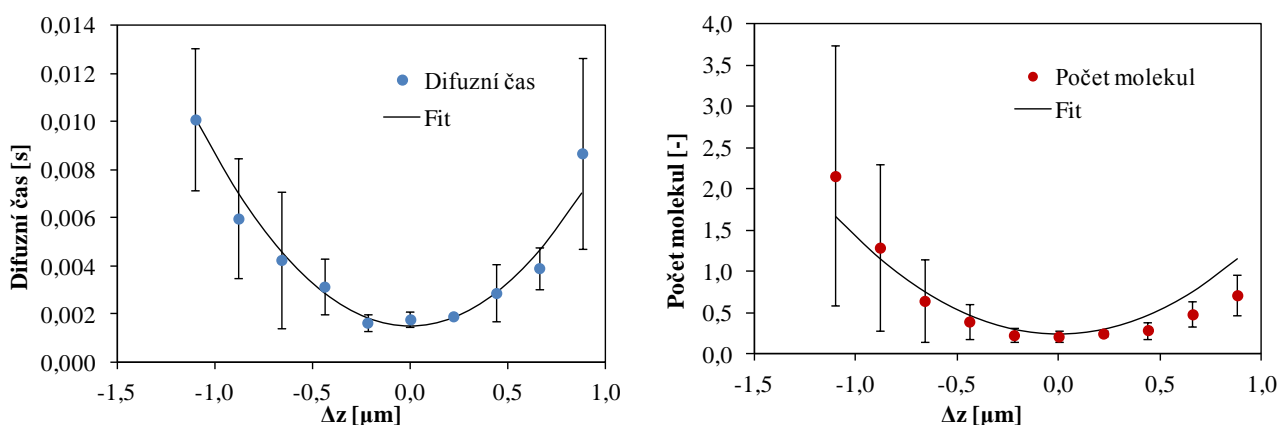
Obrázek 35: FCS křivky difuze Oregonové zeleně DHPE v prostředí liposomů ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ lecitinu)

Měření ve vrstvě bylo poměrně problematické, získaná data nebylo možné často vyhodnotit nebo postrádala logiku Z-scan. Jedno z povedených měření je prezentováno na Obrázku 36, které ovšem patří do série, kdy tři z měření Z-scan bylo možné vyhodnotit, zbývající však ne. Tento fakt může rovněž poukazovat na nehomogenitu vytvořené vrstvy.

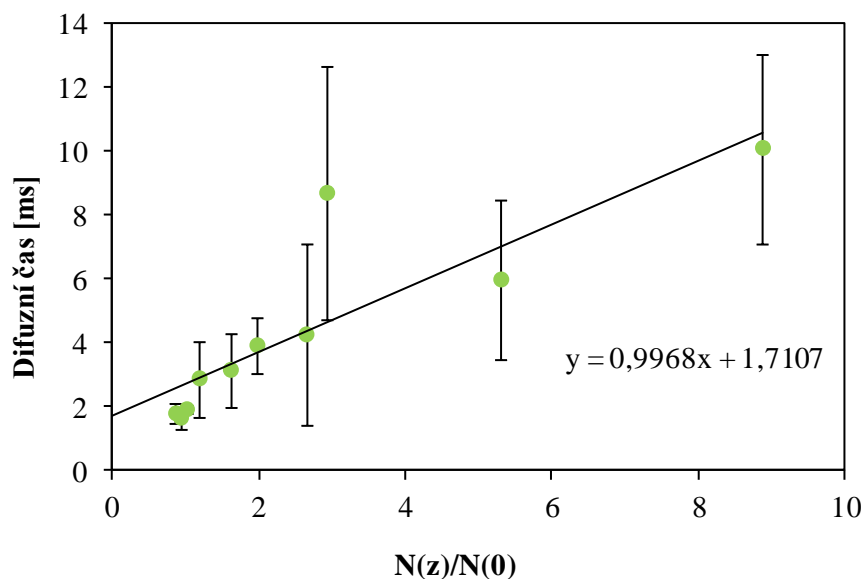
Data z tří měření Z-scan, které bylo možné vyhodnotit, byla v dalším kroku vyhodnocena proložením parabolou (Rovnice 8), čímž byl získán difuzní koeficient Oregonové zeleně DHPE v dvojvrstvě. Jeho hodnota byla $12,38 \pm 1,14 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Z proložení druhou parabolou (Rovnice 9) byl získán také počet molekul N_0 ($0,243 \pm 0,032$), který byl dále využit pro analýzu dat pomocí grafu Humpolíčkové (Obrázek 38).



Obrázek 36: Z-scan dvojvrstvy na sklíčku s DHPE značeným Oregonovou zelení jako fluorescenční sondou. Sken5 (zeleně) odpovídá nejlépe poloze dvojvrstvy v tzv. beam waist.



Obrázek 37: Vyhodnocení měření Z-scan ve fosfolipidové dvojvrstvě deponované na sklíčku s Oregonovou zelení DHPE jako fluorescenční sondou. Difuzní čas molekuly konfokálním objemem (graf vlevo, modře), počet molekul v tomto objemu (graf vpravo, červeně) a proložení matematickými modely (černě)



Obrázek 38: Vynesení dat pro lecitinovou dvojvrstvu s Oregonovou zelení DHPE do grafu Humpolíčkové

Po proložení dat přímkou byl, stejně jako při měření s Nilskou červení, zjištěn nenulový průsečík s osou y, v tomto případě ovšem s ještě výraznější kladnou hodnotou **1,7 ms**.

5.2.3 Použití DiO

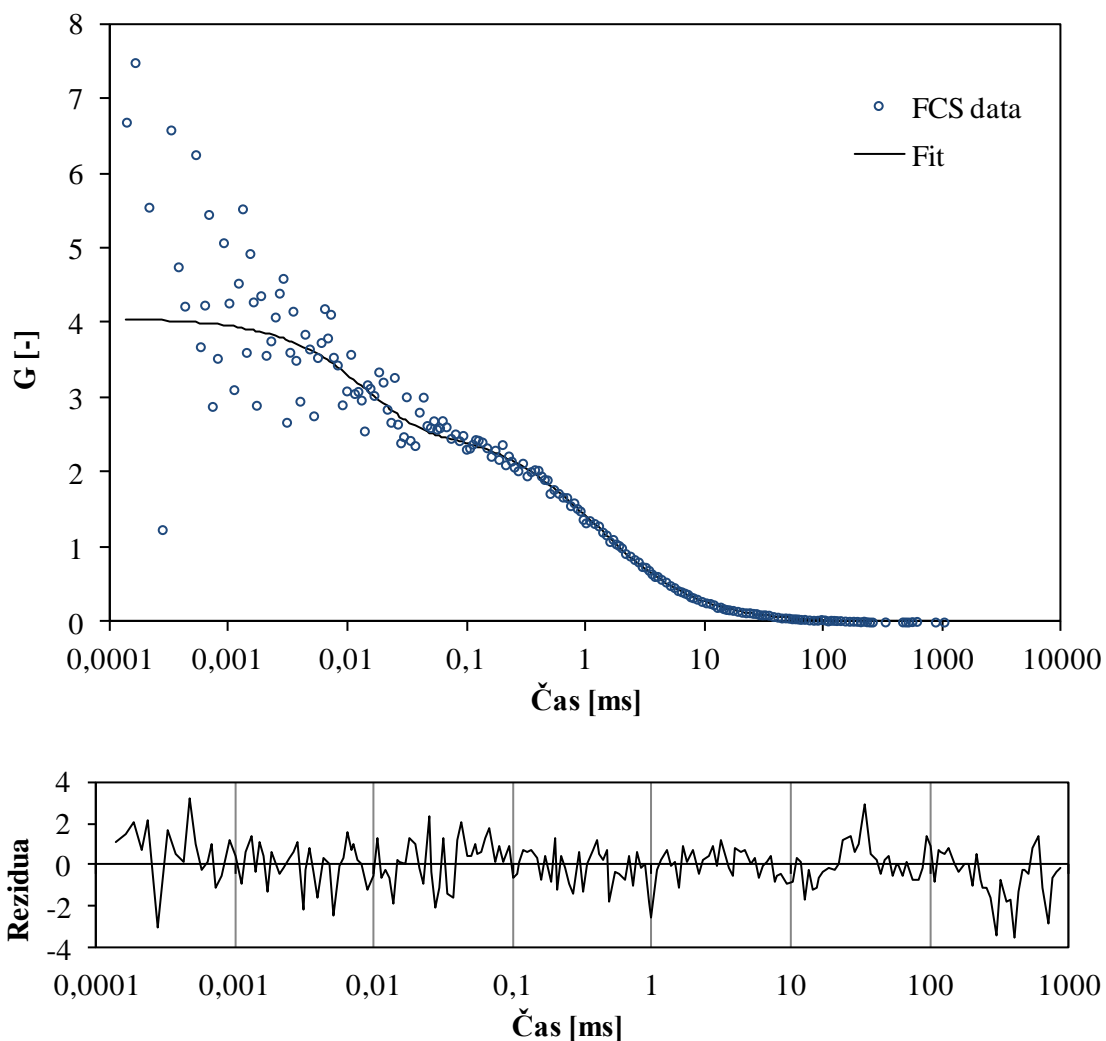
Jako třetí varianta byla použita membránová sonda DiO. Co se týče doby života, lze vyhasínací křivku DiO v liposomech nejlépe fitovat matematickým modelem se třemi dobami života, přičemž nejkratší z nich (kolem 0,5 ns) má největší zastoupení. Ve vrstvě deponované na substrátu postačuje k proložení dat matematický model se dvěma dobami života, kdy krátká doba života přetrvává, stejně tak jako její výraznější zastoupení (asi desetinásobně větší amplituda oproti τ_2).

Tabulka 6: Doby života DiO v liposomech a SLB

	doba života τ_1 [ns]	amplituda A_1 [kCnts]	doba života τ_2 [ns]	amplituda A_2 [kCnts]	doba života τ_3 [ns]	amplituda A_3 [kCnts]
Liposomy	0,46 ± 0,02	6,00 ± 0,22	0,96 ± 0,03	2,80 ± 0,30	4,98 ± 0,13	0,10 ± 0,01
SLB	0,51 ± 0,01	0,54 ± 0,01	2,70 ± 0,05	0,06 ± 0,01	x	x

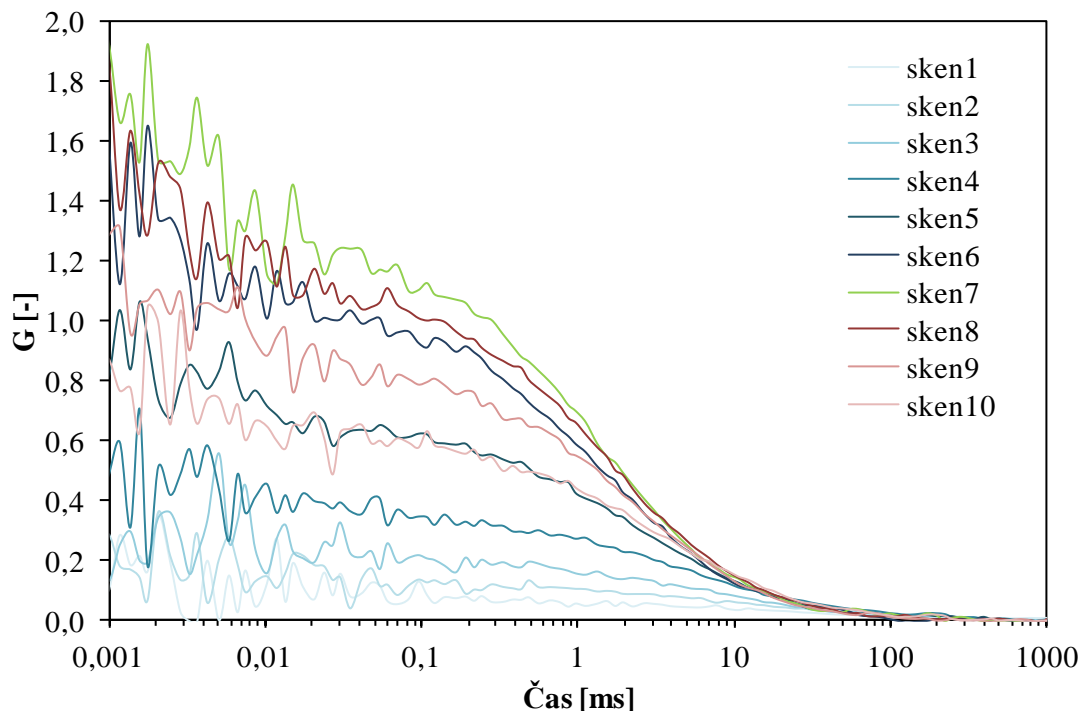
Výsledky měření difuzního koeficientu DiO v membráně liposomů jsou vyneseny v grafu na Obrázku 39, stejně jako proložení matematickým modelem. Difuzní koeficient byl zjišťován jako průměr ze tří měření jednoho vzorku. Při vyhodnocování byly zvažovány dvě možnosti fitování. První možností bylo proložení modelem s parametry popisujícími tripletní stav sondy a dva difuzní časy. Dle reziduální analýzy model datům z prvního provedeného měření dobře odpovídal a parametr χ^2 byl blízký jedničce. V následujících dvou případech ovšem klesl pod hodnotu jedna, což ukazuje na přeúčtenost fitu. Výsledky tří měření jednoho vzorku byly zároveň mezi sebou obtížně porovnatelné, kdy se jeden zjištěný difuzní čas opakoval u všech měření, ovšem druhý byl velmi odlišný. Podrobnější diskuze významu zjištěných difuzních časů – viz kapitola 5.2.4. Data byla tedy proložena modelem s jedním

parametrem pro triplet a jedním difuzním časem. Získané hodnoty odpovídaly jednomu z difuzních časů zjištěnému při předchozím fitování, který se vyskytoval u všech tří vzorků. Průměrná hodnota (se zohledněním jak směrodatné odchylky průměru, tak chyby fitování) byla $12,88 \pm 1,73 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.



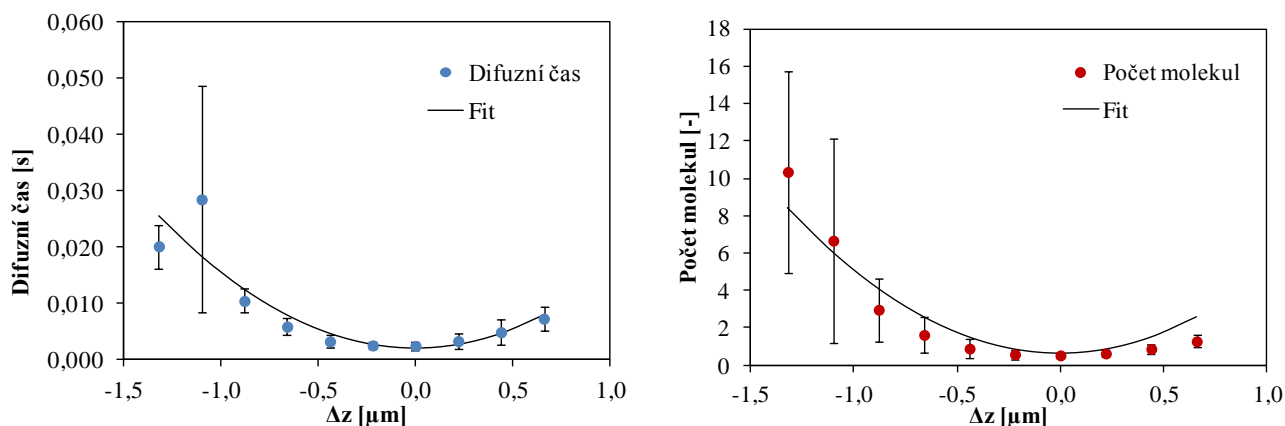
Obrázek 39: FCS analýza difuzního koeficientu DiO v liposomech ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lecitinu) ve fosfátovém pufru.

Roztok liposomů byl následně použit pro tvorbu dvojvrstvy na hydrofilizovaném sklíčku. Jedno z měření Z-scan provedených na pěti různých místech dvojvrstvy je uvedeno na Obrázku 40:



Obrázek 40: Z-scan lecitinové dvojvrstvy na sklíčku s DiO jako fluorescenční sondou. Sken7 odpovídá nejlépe poloze dvojvrstvy v tzv. beam waist.

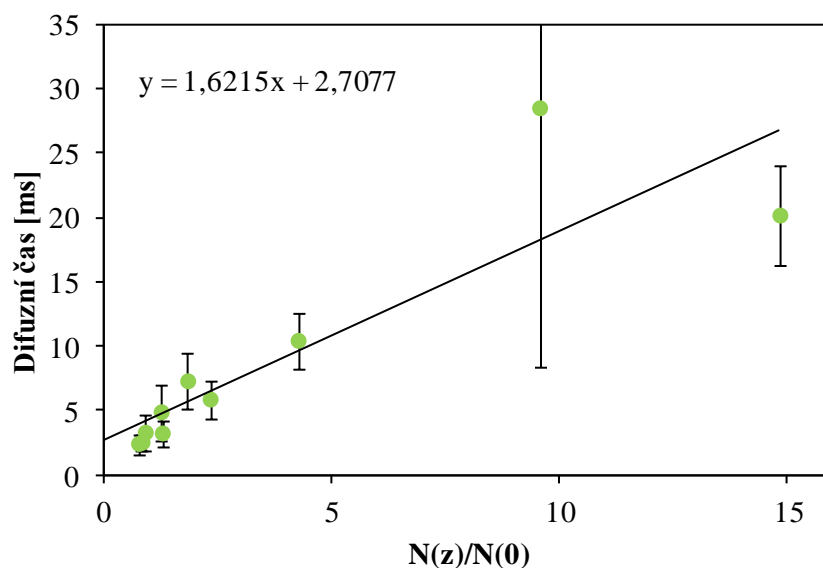
Naměřené autokorelační křivky byly proloženy matematickým modelem Triplet Extended 2D, pomocí kterého byly získány hodnoty τ_D a N_0 pro další vyhodnocení:



Obrázek 41: Vyhodnocení měření Z-scan ve fosfolipidové dvojvrstvě deponované na sklíčku s DiO jako fluorescenční sondou. Difuzní čas molekuly konfokálním objemem (horní graf, modře), počet molekul v tomto objemu (dolní graf, červeně) a proložení matematickými modely (černě)

Analýzou závislosti difuzních časů na poloze dvojvrstvy vzhledem k optické ose byl získán difuzní koeficient fluorescenční sondy DiO v SLB. V tomto případě byla zjištěna hodnota $7,13 \pm 0,78 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Druhou z uvedených analýz byla získána hodnota N_0 ($0,698 \pm 0,038$), tj. počet molekul v tzv. beam waist. Se znalostí této hodnoty byl sestaven graf Humpolíčkové

(viz Obrázek 42). Stejně jako ve vrstvách s předchozími fluorescenčními sondami, byl i v případě DiO zjištěn kladný průsečík s osou y o hodnotě **2,7 ms**.

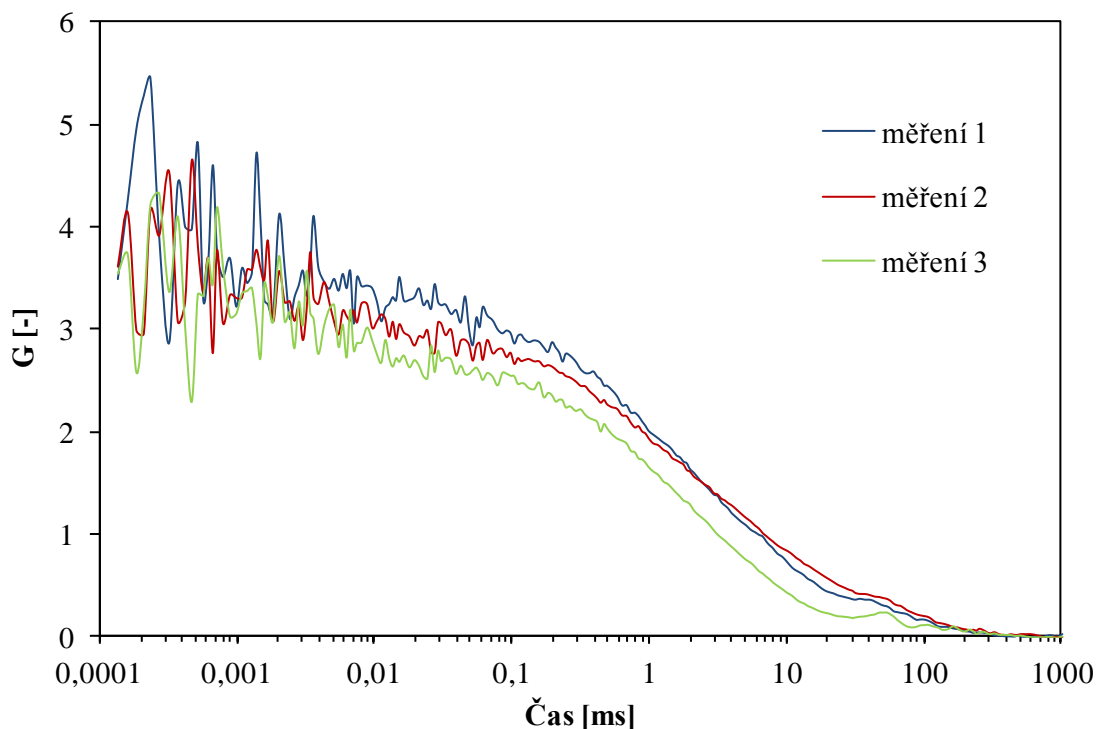


Obrázek 42: Vynesení dat do grafu Humpolíčkové.

5.2.4 Shrnutí – měření se třemi různými sondami

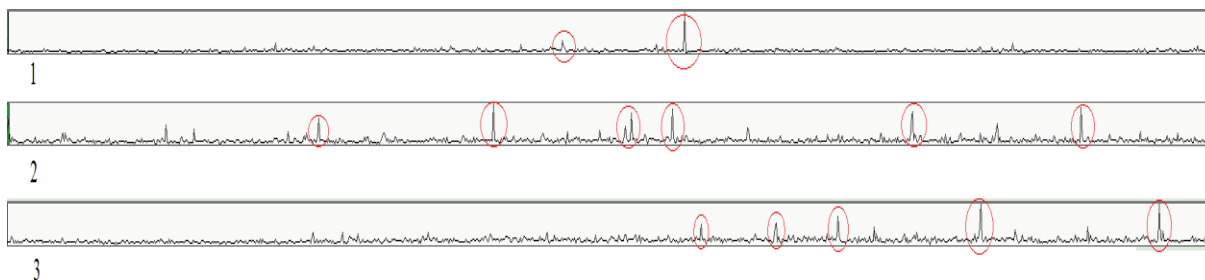
Měření liposomů bylo prováděno za účelem charakterizace systému, ze kterého vychází SLB a rovněž kvůli možnosti porovnání naměřených vlastností (zejména rychlosti difuze sondy, ale také doby života fluorescence) obou systémů. Teoretickým předpokladem bylo, že zdrojem fluktuací fluorescenčního signálu může být jak pohyb liposomu samotného, tak pohyb fluorescenční sondy zabudované v membráně liposomu. Tímto způsobem rozlišitelný fluorescenční signál ale nebylo možné spolehlivě získat, protože v mnoha případech datům dobře odpovídal model s pouze jedním difuzním časem. V rámci jednoho vzorku pak byla hodnota určitého difuzního času potvrzena, nicméně při měření jiného byly zjištěny difuzní časy odlišné, ovšem opět dobře opakovatelné. Výsledky tedy měly vypovídající hodnotu pro jednotlivé vzorky, nikoliv obecně pro systém liposomů s konkrétní sondou.

Tento závěr bylo možné vyvodit také při porovnání měření mírně zakalených roztoků liposomů, kdy bylo FCS křivky možné vyhodnotit pouze při použití modelu se dvěma difuzními časy, ale zároveň se zjištěné difuzní časy při opakovaném měření jednoho vzorku značně lišily (příklad na Obrázku 43). Pozorovaným negativním jevem v průběhu těchto měření byl vznik menších píků v časech desítek až stovek ms. Předpokládaným důvodem tohoto jevu byla přítomnost prachových částic v roztoku, což se ale nepotvrdilo poté, co byly roztoky přefiltrovány přes filtr s póry o velikosti 200 nm, který by měl prachové částice spolehlivě odstranit, ale k eliminaci píků nedošlo.



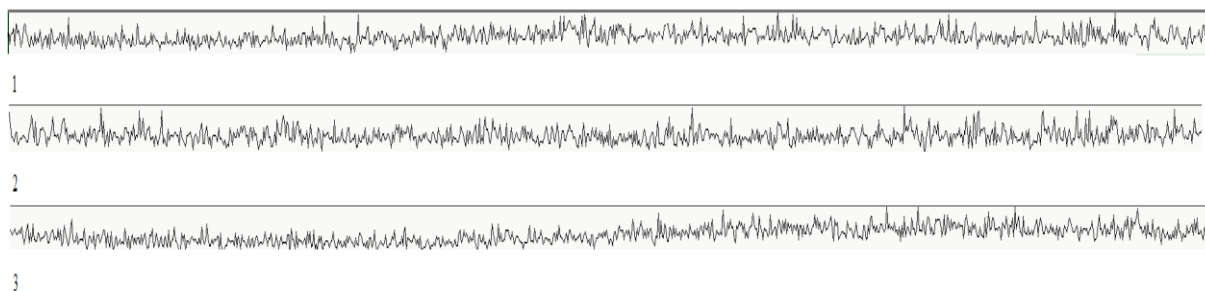
Obrázek 43: Ukázka problematického měření liposomů ($500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ lecitinu) v systému s Oregonovou zelení DHPE.

Další možností tedy byla přítomnost malých frakcí různě velikých částic v roztoku, které při průchodu detekčním objemem způsobí náhlý nárůst intenzity fluorescence. Tento průběh je dobře patrný na záznamech Time Trace (Obrázek 44), kdy na přítomnost velkých částic poukazují jednotlivé píky.



Obrázek 44: Time Trace – zaznamenaná intenzita tří různých měření fluorescenčního signálu (na ose y) v průběhu měření difuze Oregonové zeleně DHPE v liposomech (čas na ose x). Červeně jsou zvýrazněna problematická místa.

Ve vzorcích, které nebyly dostatečně dlouhou dobu sonifikovány, zůstala tudíž určitá (zřejmě ale početně menší) frakce částic s větším poloměrem, které způsobovaly jednotlivé výkyvy signálu a tím pádem i špatnou reprodukovatelnost měření. Pro porovnání je na Obrázku 45 uveden záznam Time Trace měření zcela čirého vzorku liposomů s Oregonovou zelení DHPE, kde zřejmě došlo k vytvoření méně polydisperzního systému a které bylo i velmi dobře opakovatelné.



Obrázek 45: *Time Trace – zaznamenaná intenzita tří různých měření fluorescenčního signálu (na ose y) v průběhu měření difuze Oregonové zeleně DHPE v pravděpodobně méně polydisperzním systému liposomů (čas na ose x).*

Také výsledky z měření a vyhodnocování difuze v systému liposomů se sondou DiO (kapitola 5.2.3) odpovídají navržené interpretaci naměřených difuzních koeficientů. FCS data bylo možné proložit (kromě parametru popisujícího triplet) modelem s jedním nebo dvěma difuzními časy, přičemž jeden z časů byl společný pro oba způsoby proložení. V případě fitování dvěma difuzními časy se druhý z časů pro jednotlivé vzorky velmi lišil – zdá se tedy, že v systému byla dominující frakce (s časem zjištěným oběma způsoby vyhodnocení) a menší množství různě velkých částic, jejichž vliv se při měření projevil spíše náhodně.

Závěrem lze tedy říci, že difuzní koeficienty zjištěné v systémech liposomů pravděpodobně odpovídají pohybu celých liposomů a nemohou být tudíž srovnávány s difuzními koeficienty fluorescenčních sond v membráně SLB. V případech, kdy byla data fitována modelem s dvěma difuzními časy se zřejmě jednalo o dvě výrazné velikostní frakce liposomů a nikoliv o signál vycházející z pohybu celého liposomu a pohybu sondy uvnitř membrány liposomu. Difuzních koeficienty v liposomech ($29,24 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ s Oregonovou zelení DHPE, $15,41 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ s Nilskou červení a $12,88 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ s DiO) byly přepočteny na odpovídající velikost difundujících částic pomocí Einstein-Stokesovy rovnice (uvedené jako Rovnice 1):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Bylo zjištěno, že hodnoty odpovídají částicím o poloměru 7 až 16 nm. Toto rozpětí současně řádově odpovídá výsledkům měření dynamického rozptylu světla, kdy přepočet distribuční funkce z intenzitní na objemovou ukázal významnou frakci liposomů s velikostí v řádu několika desítek nm.

Co se týká doby života, byly ve všech případech zjištěny odlišné hodnoty pro sondu v liposomech a sondu zakomponovanou v membráně. Obecným trendem je snižování doby života sondy v SLB deponované na sklíčku.

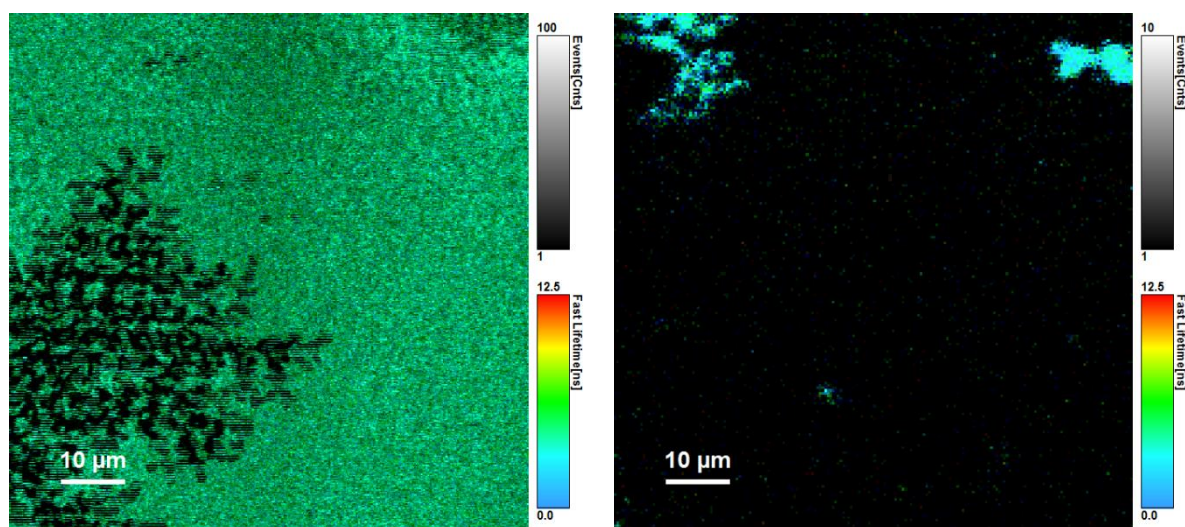
Vliv použité fluorescenční sondy - výhodou Nilské červeně je dobře popsitelná fluorescence vykazující v SLB jednu dobu života a také možnost proložit FCS data modelem, který nezahrnuje parametr popisující triplet. Rovněž dle provedených xy skenů (viz dále, Obrázek 47) se zdá, že fluoreskující molekuly jsou v rámci vrstvy rozmístěny poměrně homogenně, což zajišťuje dobrou opakovatelnost měření v různých, náhodně vybraných, částech vrstvy. Při některých měřeních se ovšem objevily problémy s intenzitou fluorescenčního signálu, který molekuly Nilské červeně poskytují, což lze při měření sledovat jako parametr „Molecular Brightness“. Čím je jeho hodnota nižší, tím nižší fluorescenční signál určitý počet molekul v konfokálním objemu poskytuje. Vzhledem k požadavku

nanomolárních koncentrací pro kvalitní měření FCS nelze nízký fluorescenční signál vylepšit pouhým navýšením koncentrace fluorescenční sondy a tím pádem se právě parametr „Molecular Brightness“ stává klíčovým pro kvalitu naměřených dat. Při měření SLB je navíc citelně omezena doba záznamu signálu (a to na 60 sekund pro jeden sken), což ve výsledku vede k obtížnějšímu vyhodnocování takto naměřených dat. Další možnou nevýhodou Nilské červeně by též mohla být její velikost a to, že pravděpodobně neprostopuje membránou i přes její hydrofilní část a je solubilizovaná pouze uprostřed v oblasti acylových řetězců. Její pohyb v rámci membrány tak zřejmě nevypovídá přesně o laterálním pohybu molekul fosfolipidů v rámci membrány.

Difuze **Oregonové zeleně DHPE** by měla nejlépe odpovídat difuzi molekul fosfolipidů tvořících membránu, měření s touto sondou bylo ovšem mnohdy problematické. Zdá se, že sonda byla ve vytvořené dvojvrstvě rozmístěna nehomogenně, ve shlucích vykazujících silný fluorescenční signál oproti jiným místům, která byla prakticky bez signálu. Měření Z-scan v rámci jedné dvojvrstvy tedy nebylo opakovatelné a bylo možné vyhodnotit například jenom některé z měření dané série. V jiných případech zase nebylo možné data uspokojivě proložit modelem Triplet Extended 2D. Možným vysvětlením nehomogenní distribuce sondy v rámci membrány by mohla být vyšší teplota fázového přechodu molekuly DHPE, která dosahuje 63 °C [12]. Obecně přitom platí doporučení, že všechny použité lipidy by měly být nad svou teplotou fázového přechodu. [29]

Membránová sonda **DiO** má ve své struktuře dva dlouhé uhlíkaté řetězce, které se zabudovávají do membrány, měla by tudíž imitovat difuzi fosfolipidů v rámci dvojvrstvy. Její spektrální chování v roztocích fosfolipidů je ovšem složitější – v SLB lze její vyhasínací křivku proložit dvěma časy, které odpovídají dobám života, přičemž při rozdělení signálů pomocí filtrů FLCS byla zjištěna korelace pro obě doby života, což znamená, že obě frakce molekul DiO s různou dobou života fluorescence se pohybují. V liposomech je potom nutné k proložení vyhasínací křivky použít časy tři. Podobně jako u Nilské červeně byly u některých měření pozorovány problémy s „Molecular Brightness“, což vedlo ke zhoršení kvality zaznamenaných dat.

Měření SLB



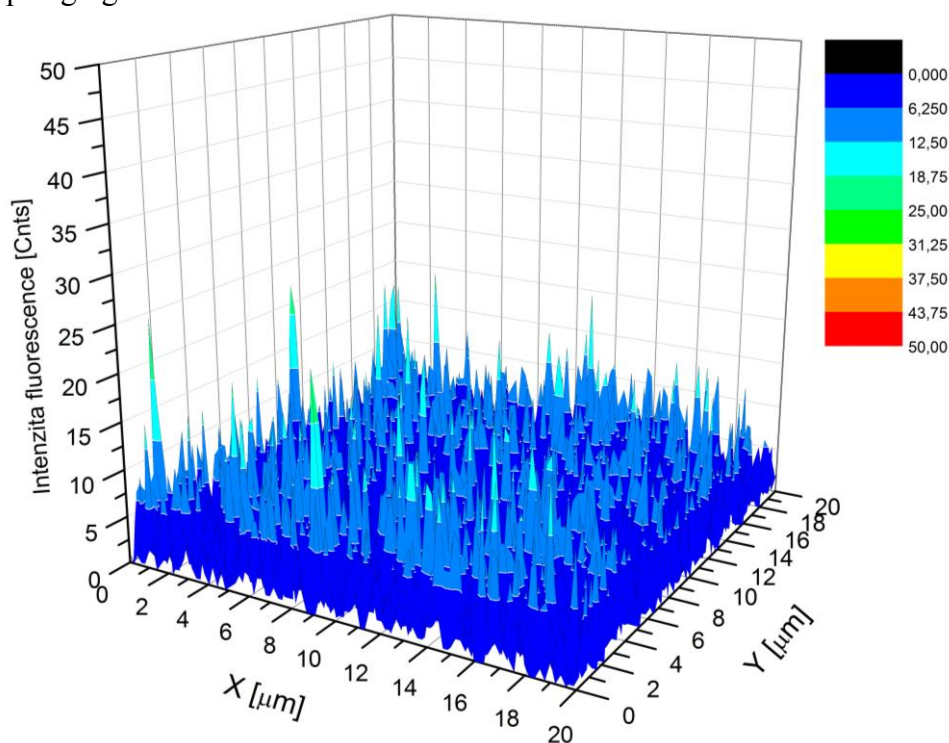
Obrázek 46: *Nehomogenity vytvořené lecitinové dvojvrstvy, vlevo s Oregonovou zelení DHPE, vpravo měření se sondou DiO*

V případě lecitinových dvojvrstev bylo klíčovým momentem vytvoření dvojvrstvy na sklíčku, čehož bylo v některých případech obtížné dosáhnout. Zásadní roli nejspíš hraje kvalita sklíček, respektive jejich čistota před úpravou plazmatem. V některých případech byly pozorovány velmi nehomogenní vrstvy (při provedení *xy* skenu), kdy v některých místech buď k vytvoření vrstvy vůbec nedošlo, i když zbytek se jevil poměrně homogenní, nebo byly pozorovány ostrůvky o velmi výrazné intenzitě fluorescence, kde zřejmě došlo k nahromadění sondy (oba příklady na Obrázku 46).

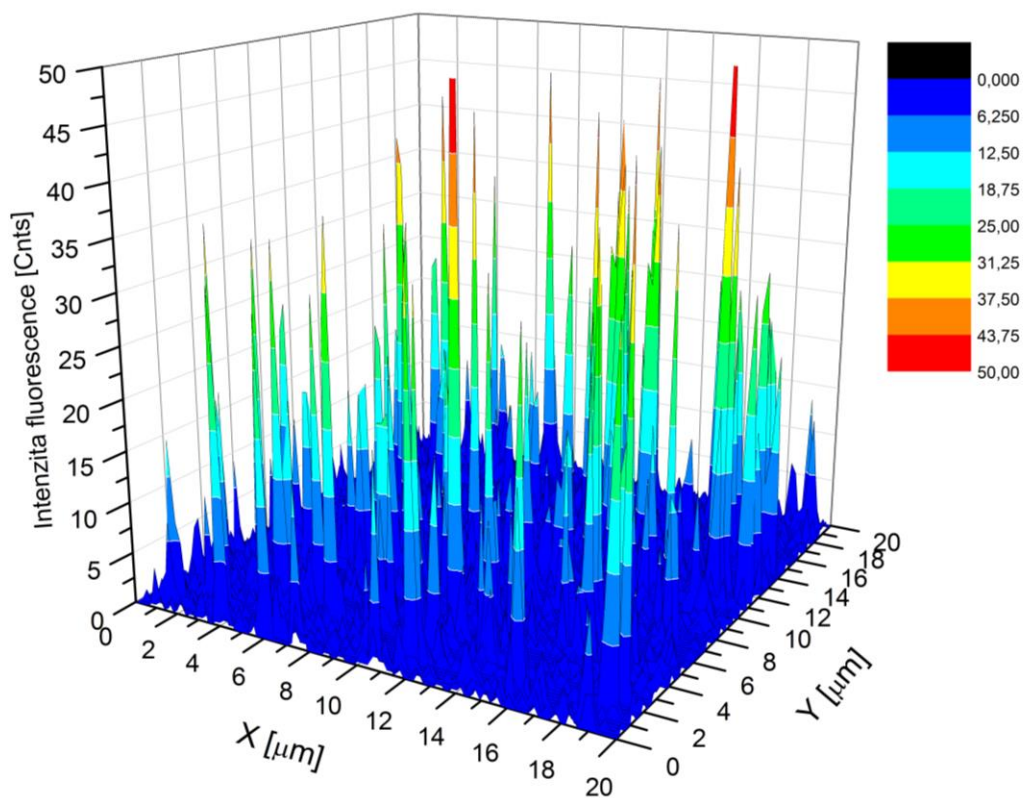
Homogenitu vrstvy bylo možné také hodnotit pomocí plošného *xy* skenu, kdy byly hodnoty intenzity fluorescence vyneseny do 3D grafu. Zobrazená oblast odpovídá ploše $20 \times 20 \mu\text{m}$, která byla nasnímána pomocí 100×100 bodových měření, přičemž v každém bodě byla intenzita fluorescencí snímána 1,2 ms.

Na 3D grafu intenzity fluorescence Oregonové zeleně (Obrázek 48) lze rozlišit jednotlivé body o velmi vysoké intenzitě fluorescence oproti bodům, které prakticky nefluoreskují. Rozdíl je patrný při porovnání například s 3D grafem dvojvrstvy se sondou DiO (Obrázek 49), kdy se sice vyskytují místa o výrazně vyšším signálu, zbytek vrstvy je však relativně homogenní a dosahuje určité intenzity fluorescence. Přítomnost míst s velmi vysokou intenzitou fluorescence oproti místům s intenzitou nízkou u dvojvrstvy s Oregonovou zelení by mohla ukazovat na možnost, že molekuly sondy agregují do větších shluků, které se v rámci membrány nechovají (zejména nedifundují) standardně jako jiné molekuly fosfolipidu tvořící membránu. Nilská červeň (na Obrázku 47) se v rámci dvojvrstvy rovněž jeví jako homogenně distribuovaná, ovšem celková intenzita signálu je relativně nízká. To je způsobeno právě již zmiňovanou „Molecular Brightness“, která právě při tomto měření dosahovala velmi nízké hodnoty.

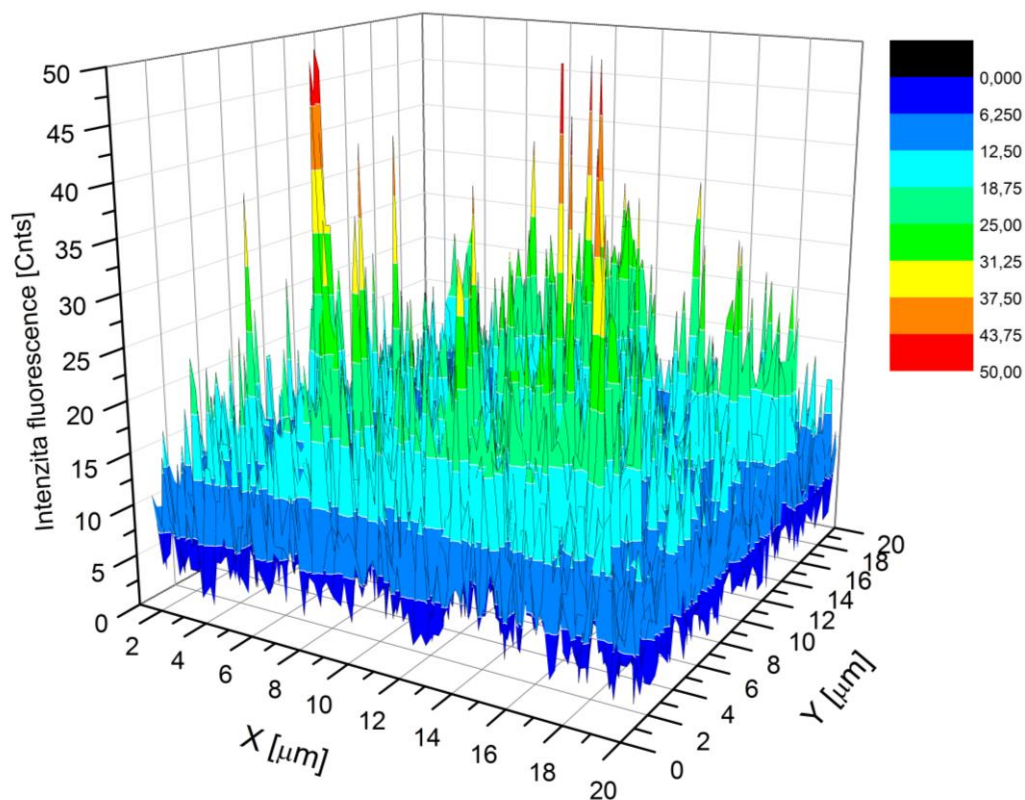
Z tohoto porovnání vyplývá, že molekuly Oregonové zeleně DHPE zřejmě nejsou v rámci lecitinové dvojvrstvy zcela rovnoměrně distribuovány, ale shlukují se spíše k sobě za tvorby nějakého typu agregátů.



Obrázek 47: 3D graf fosfolipidové dvojvrstvy s Nilskou červení jako fluorescenční sondou.

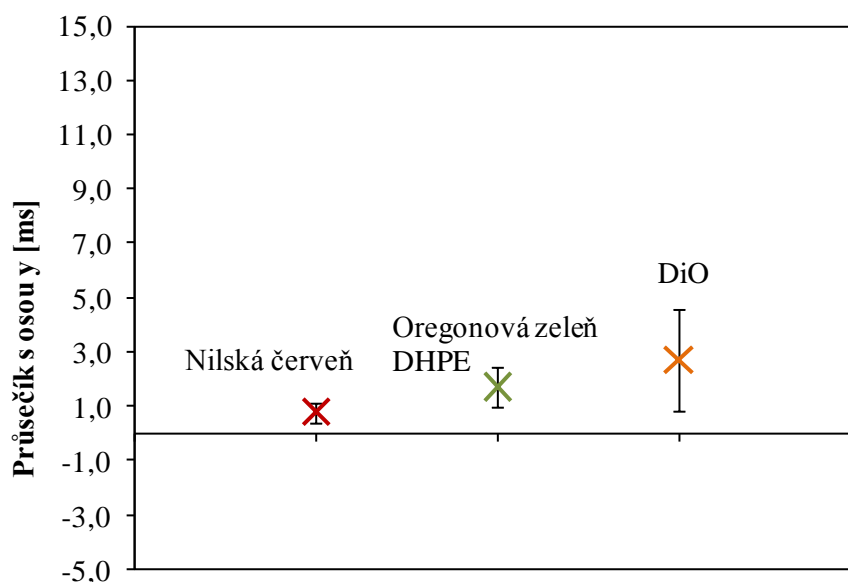


Obrázek 48: 3D graf fosfolipidové dvojvrstvy s Oregonovou zelení DHPE jako fluorescenční sondou.



Obrázek 49: 3D graf fosfolipidové dvojvrstvy s DiO jako fluorescenční sondou.

Vyhodnocení grafu Humpolíčkové vytvořených lecitinových dvojvrstev v prostředí fosfátového neposkytlo očekávané výsledky. Předpokladem bylo, že sonda se v rámci membrány bude pohybovat zcela volně bez omezení. Výsledky ovšem naznačují u všech tří vrstev připravených s různými sondami nějaký typ bráněné difuze. Z důvodu zpřesnění výsledků byly vypočítány i chyby parametrů lineární regrese a pro přehlednost byly výsledky vyneseny do grafu (Obrázek 50).



Obrázek 50: Porovnání výsledků analýzy pomocí grafu Humpolíčkové pro měření SLB

I v rámci chyby se všechny tři zjištěné hodnoty pohybují v oblasti kladných čísel. Možným vysvětlením je složení lecitinu, kdy převládající strukturou je sice DOPC, nicméně se jedná o směs derivátů fosfatidylcholinu s různě dlouhým mastným řetězcem, který může být jak nenasycený, tak v některých případech nasycený. Molekuly s nasycenými uhlíkatými řetězci budou mít ovšem vyšší teplotu fázového přechodu a nemusí se tedy při pokojové teplotě (při které měření probíhalo) vyskytovat ve fluidním stavu. Tyto molekuly by pak teoreticky mohly mít tendenci vytvářet mikrodomény, v nichž by byla pohyblivost fluorescenční sondy omezena.

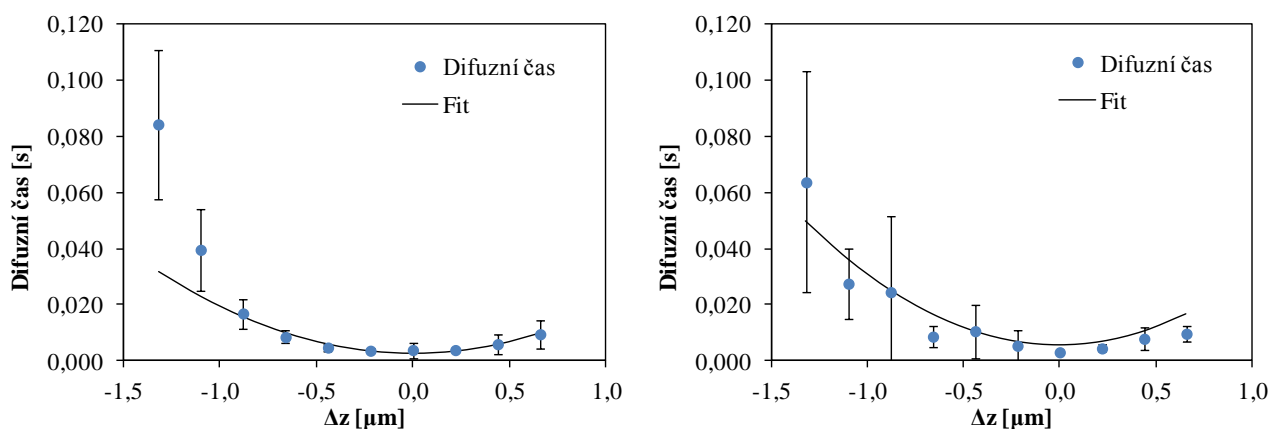
5.3 Interakce SLB s kyselinou hyaluronovou

Po optimalizaci procesu přípravy a charakterizace modelových dvojvrstev deponovaných na sklíčku bylo provedeno studium interakce dvojvrstvy s roztokem kyseliny hyaluronové. Nejprve byla proměřena vrstva samotná a následně byla ponechána interagovat s kyselinou hyaluronovou ve fosfátovém pufru a opětovně proměřena. Z vyzkoušených sond byly vybrány dvě, které se osvědčily lépe, a to Nilská červeň a DiO.

5.3.1 Dvojvrstva značená Nilskou červení

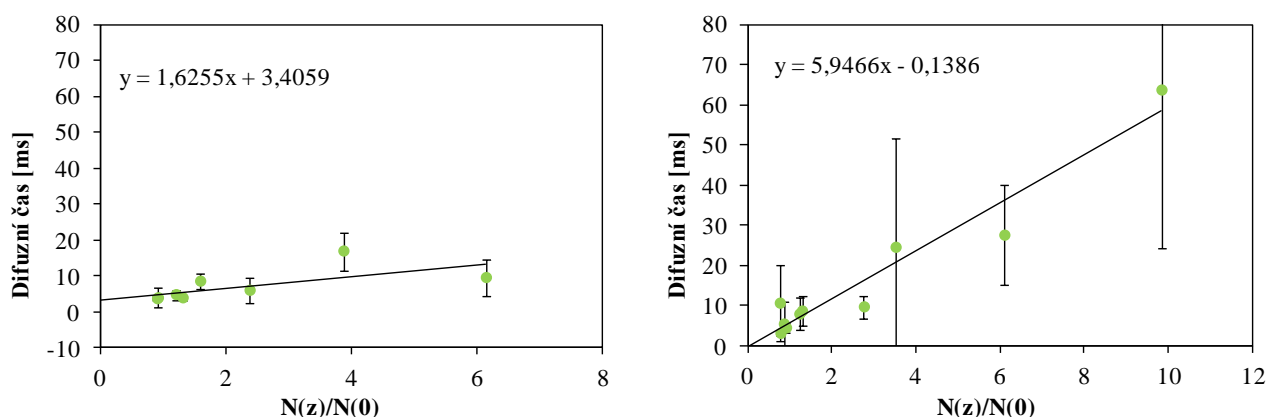
Vyhodnocením naměřených Z-scanů byly získány difuzní koeficienty pro dvojvrstvu v prostředí fosfátového a pufru a pro prostředí s kyselinou hyaluronovou. Hodnoty difuzních koeficientů byly rovny $6,04 \pm 0,46 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro vrstvu bez HyA a $3,30 \pm 0,31 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro vrstvu s HyA (data na Obrázku 51). Hodnoty N_0 se pak rovnaly $0,432 \pm 0,021$, respektive $0,545 \pm 0,038$. V případě dat pro dvojvrstvu bez HyA byly proloženy pouze body 3-10, v opačném případě data nebylo možné správně proložit matematickým modelem. Stejně body

byly následně použity také v grafu Humpolíčkové. Zaznamenané snížení difuzního koeficientu naznačuje zpomalení difuze molekul fluorescenční sondy působením kyseliny hyaluronové.



Obrázek 51: *Závislost difuzního času molekuly Nilské červeně lecitinovou dvojrivrstvou na poloze vzhledem k ose z. Vlevo data před přidáním HyA, vpravo po přidání HyA.*

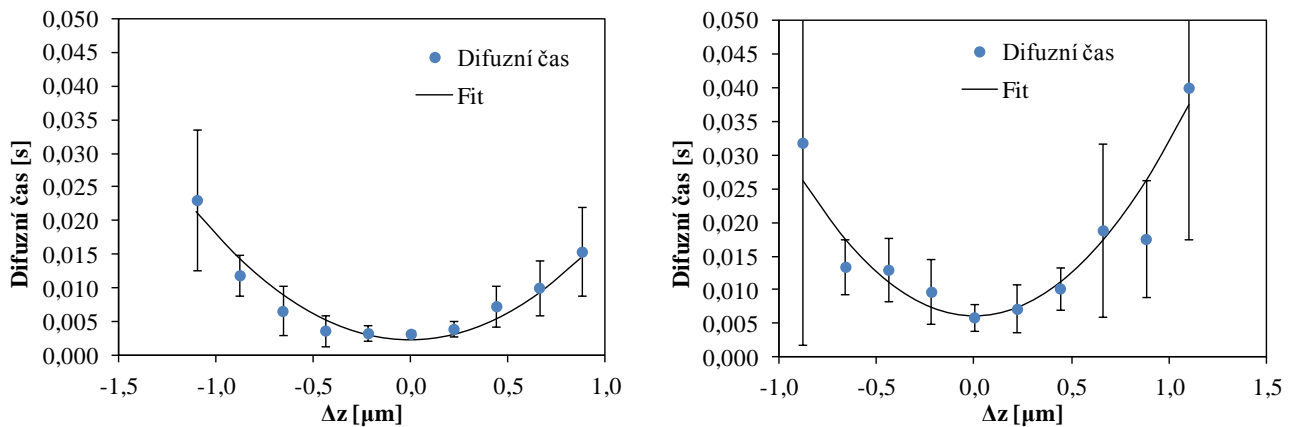
Výsledky analýzy pomocí grafu Humpolíčkové (Obrázek 52) naznačují v případě samotné dvojrivrstvy bráněnou difuzi, zatímco po interakci s kyselinou hyaluronovou se hodnota průsečíku s osou y snižuje až pod nulu.



Obrázek 52: *Vyhodnocení dat pomocí grafu Humpolíčkové. Vlevo data před přidáním HyA, vpravo po přidání HyA. Použitá sonda: Nilská červeně*

5.3.2 Dvojrivrstva značená DiO

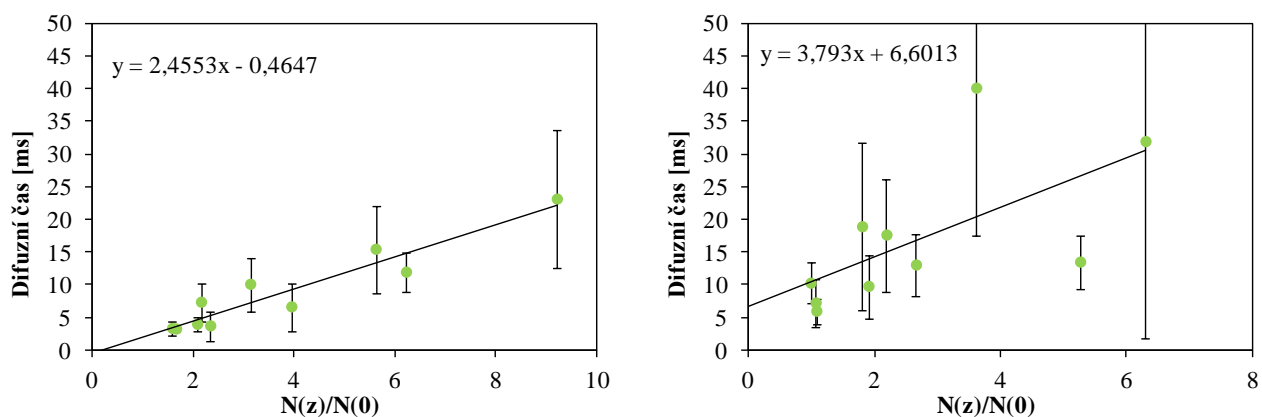
Stejný experiment byl proveden i s dvojrivrstvou obsahující fluorescenční sondu DiO. Výsledkem měření samotné dvojrivrstvy bez HyA byl difuzní koeficient $6,06 \pm 0,87 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, počet molekul v tzv. beam waist N_0 byl roven $0,352 \pm 0,012$. Po přidání roztoku kyseliny hyaluronové klesla hodnota zjištěného difuzního koeficientu na $2,95 \pm 0,35 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, počet molekul v tzv. beam waist N_0 byl stanoven na $0,524 \pm 0,025$. Byl tedy pozorován stejný trend jako při měření SLB s Nilskou červení, a to že přítomnost HyA zpomaluje difuzi sondy v rámci dvojrivrstvy.



Obrázek 53: Závinnost difuzního času molekuly DiO lecitinovou dvojvrstvou na poloze vzhledem k ose z. Vlevo data před přidáním HyA, vpravo po přidání HyA.

Efekt snížení difuzního koeficientu membránové sondy DiD (nebo DiO) v přítomnosti kyseliny hyaluronové lze nalézt i v literatuře [44], kdy byla pomocí metody FCS zkoumána dvojvrstva složená z 95 %_{mol} DOPC a 5 %_{mol} DOTAP, což je fosfolipid s kladným nábojem. V této práci byl ovšem efekt zpomalení difuze vysvětlován elektrostatickou interakcí mezi záporně nabitým řetězcem HyA a kladným nábojem DOTAP. Membrána složená pouze z DOPC se sondami DiD nebo DiO nevykazovala po přidání kyseliny hyaluronové (použitá molekulová hmotnost 3,6 kDa) snížení difuzního koeficientu fluorescenční sondy, čímž byl zároveň vyloučen i vliv kladného náboje použitých sond. Efekt snížení difuzního koeficientu byl pozorován pro roztoky HyA o molekulové hmotnosti 3,6 a 95,0 kDa, přičemž pro řetězec o nižší molekulové hmotnosti byly interakce výraznější, což se projevilo větším rozdílem mezi difuzními koeficienty. Naopak u roztoku vysokomolekulární HyA s molekulovou hmotností 1 000 kDa nebyl pokles difuzního koeficientu pozorován.

Další z článků [45] byl zaměřen na interakce kyseliny hyaluronové s liposomy tvořenými zwitterionickými fosfolipidy (DOPC). Adsorpce řetězce kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 708 kDa na membránu liposomů byla sledována pomocí měření změn zeta potenciálu v systému. Měření byla provedena při pH 3,5 (kdy byl fosfolipid kladně nabitý) a také při pH 6 (kdy převládá záporný náboj fosfolipidu) a v obou případech byla zaznamenána interakce mezi kyselinou hyaluronovou a liposomy. Je tedy možné, že i v případě SLB dochází k interakci mezi kyselinou hyaluronovou a lecitinem, což vede ke snížení difuzního koeficientu použité sondy.



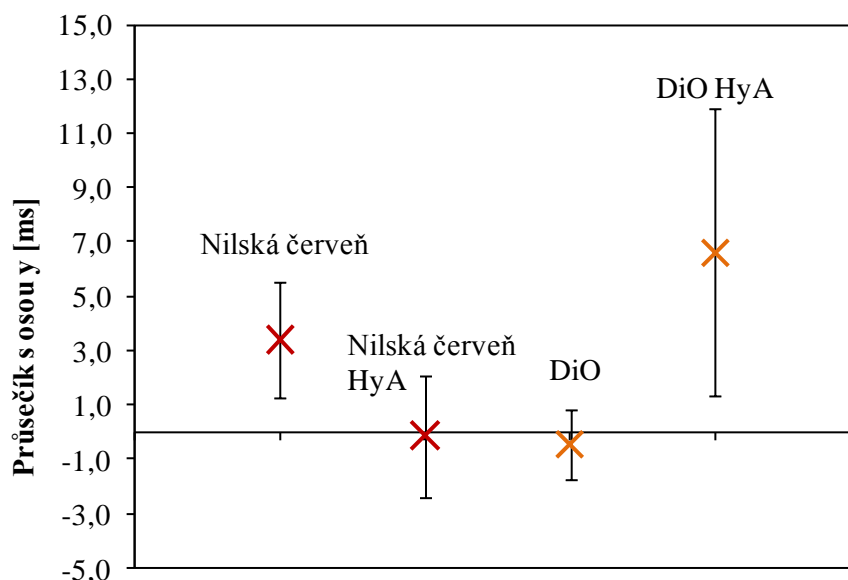
Obrázek 54: Graf Humpolíčkové. Vlevo před přidáním HyA, vpravo po přidání HyA.

Vyhodnocení grafu Humpolíčkové ale dává zcela opačný výsledek, než jaký vyplynul z měření s Nilskou červení. Zde dvojvrstva před přidavkem kyseliny hyaluronové vykazovala zápornou hodnotu průsečíku s osou y , zatímco po přidavku HyA byla data metodou nejmenších čtverců proložena tak, že vycházel kladný průsečík s osou y .

5.3.3 Shrnutí – interakce SLB s kyselinou hyaluronovou

Naměřené difuzní koeficienty fluorescenční sondy ve fosfolipidové membráně obklopené roztokem kyseliny hyaluronové byly porovnány s difuzními koeficienty získanými pro tyto dvojvrstvy před přidavkem HyA. Při použití Nilské červeně i DiO bylo shodně zjištěno, že difuzní koeficient sondy po přidavku HyA klesne asi na polovinu své původní hodnoty, což svědčí o určitém typu interakcí mezi polymerním řetězcem HyA a fosfolipidy tvořícími membránu.

Problématictější bylo ovšem vyhodnocení charakteru difuze pomocí grafu Humpolíčkové. Vzhledem k velmi výrazným chybám měření byly pro parametry a, b lineární regrese zjištěny také jejich chyby a výsledné hodnoty i s odchylkami byly pro srovnání vyneseny do grafu (Obrázek 55):



Obrázek 55: Grafické porovnání výsledků analýzy pomocí grafu Humpolíčkové pro měření interakce lecitinové SLB s kyselinou hyaluronovou

Jak je z grafu patrné, výsledky z měření SLB s Nilskou červení se v rámci chyby do značné míry překrývají, nelze proto jednoznačně říci, jestli přidavek kyseliny hyaluronové k fosfolipidové dvojvrstvě měl vliv na charakter difuze sondy v rámci membrány, nebo jestli pouze její pohyb celkově zpomalil, jak vyplývá ze zjištěných hodnot difuzních koeficientů. Vyhodnocení dvojvrstvy se sondou DiO po přidavku hyaluronanu je zatíženo obrovskou chybou, takže se zřejmě ani v tomto případě nejedná o spolehlivý popis chování sondy v dvojvrstvě. Značná nejistota výsledků by přitom mohla být způsobena nedostatečnou „Molecular Brightness“, což výrazně zhoršilo detekovaný signál a tím pádem i množství dat nasbíraných během měření a následně vyhodnocovaných. To vše mohlo negativně ovlivnit statistiku výsledků a tím pádem i nejistotu výsledku.

5.4 Optimalizovaný postup přípravy a měření SLB

Poznámky k přípravě prekursoru SLB, tj. liposomů:

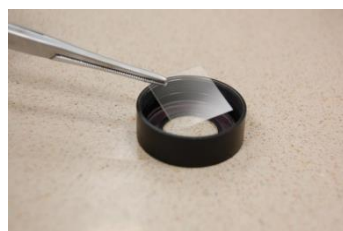
1. Liposomy je vhodné připravovat metodou rehydratace z tenké vrstvy dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1.
2. Při použití ultrazvuku s vodní lázní je lepší sonifikovat menší množství roztoku (5 ml v jedné vialce), při použití tyčového UZV je doporučený objem alespoň 10 ml.
3. Po provedení sonifikace je vhodné roztoky přefiltrovat přes membránový filtr, například o velikosti pórů 200 nm. Roztok se tímto krokem zbaví případných nečistot a prachových částic.
4. Roztoky liposomů používat k tvorbě SLB v ideálním případě během jednoho až dvou týdnů od přípravy. Skladovat tyto roztoky je možné jak při laboratorní teplotě, tak v lednici.

Poznámky k přípravě a měření SLB:

1. Základní doporučený postup přípravy je uveden v kapitole 4.3.4.
2. Čistotu krycího sklíčka je vhodné před použitím zkontrolovat a případně nečistoty nebo prachové částice odstranit například proudem vzduchu nebo dusíku.
3. Oplach přebytečných volných liposomů, které by po vytvoření SLB mohly zůstat na povrchu dvojvrstvy, je lépe provádět v druhé nízké kádince nebo Petriho misce s čistým pufrem. Krycí sklíčko se opatrně vezme pomocí kleštěček a nechá se chvíli splývat na hladině pufru.
4. Po tomto kroku se sklíčko umístí do držáku s nasorbovanou lecitinovou dvojvrstvou směrem nahoru, upevní se a opatrně se zalije pufrem tak, aby se zabránilo vyschnutí dvojvrstvy.



1



2



3

5. Provede se první měření, při kterém se identifikuje fluorescenční signál. V ideálním případě je viditelný pás fluorescence v oblasti blízko povrchu sklíčka. V případě většího signálu i v roztoku nad povrchem sklíčka je možné pomocí pipety opatrně odsát pufr a vyměnit za čerstvý.
6. Před začátkem samotného měření je vhodné provést kontrolní xy sken v poloze z s maximální intenzitou signálu s dostatečným rozlišením (80 x 80 μm , 400 x 400 pixelů s dobou záznamu 1,2 ms) kvůli identifikaci možných nehomogenit membrány.
7. Po nalezení vhodného místa k měření a nastavení automatického měření Z-scan pokud možno nehýbat s držákem a vyvarovat se dotýkání optické lavice, na které je umístěn přístroj.
8. Pro studium interakcí dvojvrstvy s jinými látkami pouze pomocí pipety nahradit fosfátový pufru, který zamezuje vyschnutí dvojvrstvy, roztokem zkoumané látky.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou modelů buněčné membrány vytvořených na krycím sklíčku od jejich přípravy, přes charakterizaci až po studium interakcí s kyselinou hyaluronovou. První část je zaměřena na výběr vhodné fluorescenční sondy, jejíž difuzní koeficient v rámci modelové membrány lze stanovit pomocí metody FCS, a který následně slouží ke kvalitativnímu popisu vytvořené dvojvrstvy. Ze tří navržených fluorescenčních značek – Nilské červeně, Oregonové zeleně DHPE a DiO – se nejméně osvědčil fosfolipid DHPE značený Oregonovou zelení, přestože se k popisu na základě provedené rešerše jevil jako nejvhodnější, jelikož se do membrány začleňuje přímo jako jeden ze stavebních prvků a jeho difuze by tedy měla nejlépe odpovídat pohybu řadových (nefluoreskujících) fosfolipidů vytvářejících dvojvrstvu. Z provedených měření ale vyplývalo, že v rámci dvojvrstvy není rozmístěn homogenně, ale tvoří spíše větší shluky o vysoké intenzitě fluorescence, což podstatně zhoršilo (a v některých případech až znemožnilo) zpracování naměřených dat. Tento problém mohl být způsoben vyšší teplotou fázového přechodu DHPE, což mohlo hrát roli při distribuci jednotlivých molekul v rámci vznikajících liposomů a následně i dvojvrstvy. Oproti tomu sondy Nilská červeně a DiO se ukázaly jako dobře využitelné, kdy bylo v obou případech pozorováno jejich homogenní rozmístění v rámci dvojvrstvy. Nicméně ani měření s těmito sondami se neobešlo bez problémů – při některých měřeních byla pozorována nízká intenzita fluorescence připadající na jednu molekulu (parametr „Molecular Brightness“), což výrazně komplikovalo sběr FCS dat a jejich následné vyhodnocení.

Při pokusu zjistit difuzní koeficient fluorescenčních sond v prekurzoru SLB, tj. v liposomech, bylo zjištěno, že výsledky popisují pouze pohyb liposomu jako celku a nikoliv difuzi sondy v rámci jeho membrány. Pomocí metody Z-scan FCS navržené speciálně pro měření planárních vzorků byly tedy stanoveny difuzní koeficienty všech tří zkoumaných fluorescenčních sond přímo ve dvojvrstvách vytvořených z lecitinu v prostředí fosfátového pufru. Pro Nilskou červeně byl získán difuzní koeficient $10,24 \pm 1,95 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, pro Oregonovou zeleně DHPE $12,38 \pm 1,14 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a pro sondu DiO pak $7,13 \pm 0,78 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Vzhledem k různým velikostem molekul jednotlivých sond nebylo možné očekávat stejné výsledné hodnoty difuzních koeficientů, přestože byly měřeny v totožném prostředí. Poněkud překvapivý je ovšem zjištěný difuzní koeficient Oregonové zeleně DHPE, která se v porovnání se zbývajícími dvěma pohybovala nejrychleji, přestože je zřejmě stericky nejobemnější. Vzhledem k problémům, které se vyskytovaly během měření, ovšem nemusí být tato hodnota zcela odpovídající. Naopak porovnání výsledků Nilské červeně a DiO vychází dle očekávání – menší molekula Nilské červeně se v rámci membrány dle získaných difuzních koeficientů pohybuje rychleji. Výsledek analýzy pomocí grafu Humpolíčkové naznačoval bráněnou difuzi fluorescenční sondy v rámci membrány, což může být způsobeno příměsí fosfolipidu s vyšší teplotou fázového přechodu (než odpovídá laboratorní teplotě) v lecitinu. Dvojvrstva se sondou DiO vykazovala přitom tento výsledek nejvýrazněji, což by bylo možné interpretovat jako preferenci DiO s uhlíkatým řetězcem o délce 18 uhlíků zdržovat se právě v gelovité části dvojvrstvy. [34]

V závěrečné části byly studovány interakce lecitinové dvojvrstvy s kyselinou hyaluronovou (300 – 500 kDa, koncentrace $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí fosfátového pufru s využitím sond Nilské červeně a DiO. V obou případech došlo po přidání HyA k poklesu difuzního koeficientu sondy v rámci dvojvrstvy – v systému s Nilskou červení z hodnoty $6,04 \pm 0,46 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

na $3,30 \pm 0,31 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a v systému se sodnou DiO z původních $6,06 \pm 0,87 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ na $2,95 \pm 0,35 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ze závěrů publikovaných v literatuře [45] vyplývá, že interakce kyseliny hyaluronové a zwitterionických fosfolipidů je možná i při takovém pH, kdy je fosfolipid záporně nabitý. Určitá interakce polymerního řetězce HyA s molekulami tvořícími fosfolipidovou dvojvrstvu se tedy projevila zpomalením pohybu fluorescenčních sond v rámci této dvojvrstvy. Výsledky získané pro dvojvrstvy bez HyA je zároveň možné porovnat s výsledky předchozího měření. V případě Nilské červeně se dvě zjištěné hodnoty i při zohlednění experimentální chyby mírně liší a bylo by tedy vhodné provést další měření a porovnat mezi sebou více výsledků. Zjištěné difuzní koeficienty pro dvojvrstvu s DiO se v rámci experimentální chyby shodují, lze tedy předpokládat, že hodnota byla stanovena správně, nicméně i v tomto případě by bylo žádoucí měření zopakovat s cílem potvrdit zjištěnou hodnotu.

Závěrem lze říci, že se podařilo úspěšně připravit a pomocí metody Z-scan FCS charakterizovat SLB sloužící jako zjednodušený model buněčné membrány a oba procesy optimalizovat. Zároveň byl navržen také postup pro studium interakcí vzniklé dvojvrstvy s roztokem biopolymeru, konkrétně kyselinou hyaluronovou. Do budoucna je proto na Fakultě chemické možné široké využití této techniky pro modelaci biomembrány různých typů buněk a studium jejich interakcí s rozličnými látkami.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ALBERTS, B.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, 630 p. ISBN 80-902-9060-4.
- [2] Cytoplazmatická membrána. *Biologie* [online]. 2008 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: <http://biology.webnode.cz/news/cytoplazmaticka-membrana/>
- [3] CHAN, Y. H. M. a BOXER, S. G.: Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2007, vol. 11, issue 6, p. 581-587 [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593107001457>
- [4] RELINI, A.; MARANO, N. a GLIOZZI, A.: Probing the interplay between amyloidogenic proteins and membranes using lipid monolayers and bilayers. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2014, vol. 207, p. 81-92 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868613001309>
- [5] MAKKY, A.; MICHEL, J.P.; MAILLARD, Ph. a ROSILIO, V.: Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2011, vol. 1808, issue 3, p. 656-666 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527361000413X>
- [6] STEINEM, C.; JANSHOFF, A.; VON DEM BRUCH, K.; REIHS, K.; GOOSSENS, J. a GALLA, H. J.: Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* [online]. 1998, vol. 45, issue 1, p. 17-26 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302459898000737>
- [7] MCMURRY, J.. *Organická chemie*. 1. vyd. V Brně: VUTIUM, 2007, 1260 s. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [8] POHL, J.; ERDÉLYI, A. P.; STICHER, O. a SHIBATA, S.: *Lecithin: Technological, Biological, and Therapeutic Aspects*. Chicago: Springer, 1986. ISBN 978-1-4757-1935-2.
- [9] VOET, D. a VOET, J. G.: *Biochemistry*. 3rd edition. Hoboken: John Wiley, 2004, 1591 p. ISBN 04-713-9223-5.
- [10] VEMURI, S. a RHODES, C.T.: Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae* [online]. 1995, vol. 70, issue. 2, p. 95-111 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031686595000107>
- [11] MONTEIRO, N.; MARTINS, A.; REIS, R. L. a NEVES, N. M.: Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2014, vol. 11, č. 101, [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2014.0459>
- [12] Avanti Polar Lipids - Physical properties/solubility: What is the transition temperature of the lipid? *Avanti Polar Lipids* [online]. 2014 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: http://www.avantilipids.com/index.php?view=items&cid=8&id=24&option=com_quikfaq&Itemid=385
- [13] Avanti Polar Lipids – Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids. *Avanti Polar Lipids* [online]. 2014 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1700&Itemid=419

- [14] NECAS, J., BARTOSKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, vol. 53, č. 8, s. 397-411.
- [15] KOGAN, G.; ŠOLTÉS, L.; STERN, R. a GEMEINER, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006-12-8, vol. 29, issue 1, p. 17-25 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [16] MA, Z.; JANMEY, P. A.; SHARP, K. A. a FINKEL, T. H.: Improved method of preparation of supported planar lipid bilayers as artificial membranes for antigen presentation. *Microscopy Research and Technique*. 2011, vol. 74, issue 12 Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.21012>
- [17] HARDY, G. J.; NAYAK, R. a ZAUSCHER, S.: Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vol. 18, issue 5, p. 448-458. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029413000915>
- [18] HARATAKE, M.; OSEI-ASANTE, S.; FUCHIGAMI, T. a NAKAYAMA, M.: Fluorescence microscopic characterization of ionic polymer bead-supported phospholipid bilayer membrane systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, vol. 100, p. 190-196. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512003165>
- [19] RICHTER, R. P.; BÉRAT, R. a BRISSON, A. R.: Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir*. 2006, vol. 22, issue 8, p. 3497-3505. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la052687c>
- [20] BURNS, A. R.; FRANKEL, D. J. a BURANDA, T.: Local Mobility in Lipid Domains of Supported Bilayers Characterized by Atomic Force Microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. 2005, vol. 89, issue 2, p. 1081-1093 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505727569>
- [21] ŠTĚPÁNOVÁ, V.; SKÁCELOVÁ, D.; SLAVÍČEK, P. a ČERNÁK, M.: Diffuse coplanar surface barrier discharge for cleaning and activation of glass substrate. *Chemické listy* [online]. 2012, issue 106 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_s5_s1495-s1516.pdf
- [22] DCSBD Technologie, Ceplant. *Ceplant* [online]. 2014 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: http://www.ceplant.cz/research/equipment/plasma_generators/DCSBD_technology_de tails/
- [23] Dynamic light scattering. *Quantachrome UK* [online]. 2007-2015 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.quantachrome.co.uk/en/dynamic-light-scattering.asp#dlsimage>
- [24] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *ZetaSizer Nano Serier: User Manual*. 2004, 270 s.
- [25] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2. vyd. New York: Kluwer Academic Publishers, 1999. 698 s. ISBN 0-306-46093-9.
- [26] GORE, M. G.: *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 2000. 368 p. ISBN 0-19-963812-8.
- [27] FIŠAR, Z.: *Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2009 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [28] VALEUR, B. a BERBERAN-SANTOS, M.: *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2. vyd. Weinheim: Wiley, 2012, 569 p. ISBN 978-3-527-65003-3.
- [29] STEINBERGER, T., MACHÁŇ, R.; a HOF, M.: Z-Scan Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Tool for Diffusion Measurements in Planar Lipid Membranes. ENGELBORGHIS, Y. a VISSER, A. J. Fluorescence spectroscopy and microscopy:

- methods and protocols [online]. New York: Springer, 2014, p. 617-634. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), ISBN 978-1-62703-649-8.
- [30] Mobility and Interaction Measurements. *BioQuant: University of Heidelberg* [online]. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/methods/mobility/mobility.html>
- [31] Akademie věd ČR. *Akademie věd ČR* [online]. 2014 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: http://www.cas.cz/o_avcr/zakladni_informace/dokumenty/anotace/2006/4_sekce_chemicky_ved.html
- [32] MACHÁŇ, R. a HOF, M.: Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* [online]. 2010, vol. 1798, issue 7, p. 1377-1391 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273610000544>
- [33] WAWREZINIECK, L.; RIGNEAULT, H.; MARGUET, D. a LENNE, P. F.: Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Laws to Probe the Submicron Cell Membrane Organization. *Biophysical Journal* [online]. 2005, vol. 89, issue 6, p. 4029-4042 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505730447>
- [34] SPENCE, M. T. a JOHNSON, I. D.: *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies* [online]. 11th ed. Carlsbad, CA: Live Technologies Corporation, 2010, xiv, 1160 p. [cit. 2015-03-25]. ISBN 09-829-2790-8. Dostupné z: <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
- [35] MUKHERJEE, S.; RAGHURAMAN, H. a CHATTOPADHYAY, A.: Membrane localization and dynamics of Nile Red: Effect of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2007, vol. 1768, issue 1, p. 59-66 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273606002665>
- [36] ANDERSON, T. H.; MIN, Y.; WEIRICH, K. L.; ZENG, H.; FYGENSON, D. a ISRAELACHVILI, J. N.: Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates. *Langmuir* [online]. 2009-06-16, vol. 25, issue 12, s. 6997-7005 Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900181c>
- [37] SEEGER, H. M.; Di CERBO, A.; ALESSANDRINI, A. a FACCI, P.: Supported Lipid Bilayers on Mica and Silicon Oxide: Comparison of the Main Phase Transition Behavior. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2010, vol. 114, issue 27, p. 8926-8933 [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp1026477>
- [38] PRZYBYŁO, M.; SÝKORA, J.; HUMPOLÍČKOVÁ, J.; BENDA, A.; ZAN, A. a HOF, M.: Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions. *Langmuir* [online]. 2006, vol. 22, issue 22, p. 9096-9099. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la061934p>
- [39] MACHÁŇ, R. a HOF, M.: Recent Developments in Fluorescence Correlation Spectroscopy for Diffusion Measurements in Planar Lipid Membranes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2010, vol. 11, issue 2, p. 427-457 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/427/>
- [40] MACHÁŇ, R.; HOF, M.; CHERNOVETS, T.; ZHMAK, M. N.; OVCHINNIKOVA, T. V. a SÝKORA, J.: Formation of arenicin-1 microdomains in bilayers and their specific lipid interaction revealed by Z-scan FCS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, vol. 399, issue 10, p. 3547-3554. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-4694-z>

- [41] MISZTA, A.; MACHÁŇ, R.; BENDA, A.; OUELLETTE, A. J.; HERMENS, W. Th. a HOF, M.: Combination of ellipsometry, laser scanning microscopy and Z-scan fluorescence correlation spectroscopy elucidating interaction of cryptdin-4 with supported phospholipid bilayers. *Journal of Peptide Science* [online]. 2008, vol. 14, issue 4, p. 503-509 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/psc.938>
- [42] Olympus FluoView Resource Center: Introduction to Confocal Microscopy. Olympus Microscopy Resource Center [online]. 2012 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.olympusfluoview.com/theory/confocalintro.html>
- [43] SZEWIECZKOVÁ, J.: *Fosfolipidy jako základ biodegradabilních nosičových systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, 67 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [44] SAHOO, H. a SCHWILLE, P.: Influence of glycosaminoglycans on lipid dynamics in supported phospholipid bilayers. *Soft Matter* [online]. 2013, vol. 9, issue 14, p. 3859-3864 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3sm26906j>
- [45] QUEMENEUR, F.; RINAUDO, M a PÉPIN-DONAT, B.: Influence of Polyelectrolyte Chemical Structure on their Interaction with Lipid Membrane of Zwitterionic Liposomes. *Biomacromolecules* [online]. 2008, vol. 9, issue 8, p. 2237-2243 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm800400y>

8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomových sil (z anglického <i>atomic force microscopy</i>)
DHPE	1,2-dihexadekanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylethanolamin
DiD	1,10-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodikarbokyanin
DiO	3,3'-dioktadecykloxakarbokyanin perchlorát (DiO)
DLS	dynamický rozptyl světla (z anglického <i>dynamic light scattering</i>)
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DOPC	1,2-di-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DOTAP	1,2-di-oleoyl-3-trimethylamonium-propan
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DSPC	1,2-distearyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie (z anglického <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FLCS	<i>fluorescence lifetime correlation spectroscopy</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GPMV	obrovské vezikuly plasmatické membrány (z anglického <i>giant plasmatic membrane vesicles</i>)
GUV	obří unilamelární vezikuly (z anglického <i>giant unilamellar vesicles</i>)
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital (z anglického <i>highest occupied molecular orbital</i>)
HyA	kyselina hyaluronová
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (z anglického <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
LUV	velké jednodamelární vezikuly (z anglického <i>large unilamellar vesicles</i>)
MLV	multivrstevné vezikuly (z anglického <i>multilamellar vesicles</i>)
MVV	multivezikulární váčky (z anglického <i>multivesicular vesicles</i>)
NIR	blízké infračervené záření (z anglického <i>near infra-red</i>)
PCS	fotonkorelační spektroskopie (z anglického <i>photon correlation spectroscopy</i>)
POPC	palmitoyl-oleoyl-fosfatidylcholin
POPE	palmitoyl-oleoyl-fosfatidylethanolamin
POPG	palmitoyl-oleoyl-fosfatidylglycerol
QCM	křemenné mikrováhy (z anglického <i>quartz crystal microbalance</i>)
QELS	kvazielastický rozptyl světla (z anglického <i>quasi-elastic light scattering</i>)
SA FCS	<i>supercritical angle FCS</i>
SFA	<i>surface forces apparatus</i>
SLB	fosfolipidová dvojvrstva na podpůrném substrátu (z anglického <i>supported lipid bilayer</i>)
SP	<i>streamin potential</i>
SUV	malé jednodamelární vezikuly (z anglického <i>small unilamellar vesicles</i>)
TCSPC	<i>time-correlated single photon counting</i>
TIR FCS	<i>total inner reflection FCS</i>
ULV	jednodamelární vezikuly (z anglického <i>unilamellar vesicles</i>)
UV	ultrafialové záření (z anglického <i>ultraviolet</i>)
VIS	viditelné světlo