



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MODELACE MEMBRÁN V JEDNOKANÁLOVÉM MIKROFLUIDNÍM CHIPU

MEMBRANE MODELING IN A SINGLE-CHANNEL MICROFLUIDIC CHIP

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Tesák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1993/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Petr Tesák**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Modelace membrán v jednonálovém mikrofluidním chipu

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat rešerši na téma design a aplikace mikrofluidních chipů. Zaměřit se na druhy chipů vhodné pro modelování membrán.
2. Osvojit si techniku přípravy mikrofluidních čipů, na základě rešerše vybrat vhodný modelový fosfolipid a vytvořit z něj v chipu modelovou membránu. Ověřit funkčnost jednonálového chipu pro modelaci membrán.
3. Na základě výsledků vyhodnotit vhodnost jednonálového chipu pro tvorbu modelových membrán, diskutovat případné problémy a navrhnout možná řešení.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Petr Tesák
student

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá modelací membrán v jednokanálovém mikrofluidním čipu. Popisuje podmínky tvorby modelových membrán v čípech s kanálky o různých šířkách. Byl vypracován nový postup plnění čipů při pozorování, který umožňuje kontrolu čipu z hlediska jeho průchodnosti a zároveň ho dokáže naplnit fyziologickým roztokem. Dále byla zpracována data na základě počtu vytvořených a prasklých membrán v mikrofluidních čípech. Tato statistika bere v potaz stav biomembrán u každé velikosti kanálku při všech zvolených rychlostech průtoků. I přes velké množství komplikací jsou na základě těchto výsledků popsány výhody i nevýhody všech vybraných kanálků.

ABSTRACT

This work deals with the modelation of artificial cellular membranes in a single channel microfluidic chip. It describes the conditions under which the model membranes are created in channels that are of three different widths. A new method of filling such chips was developed where it is possible to check if the chip is ready to use and at the same time fill it up with saline solution. Furthermore data based on the number of created and burst membranes in microfluidic chips was processed. This statistic takes into consideration the state of these artificial membranes in correlation with all of the chosen sizes and flow rates. Although there were many complications while gathering this data it is still possible to use it to describe all the benefits and disadvantages of these channels.

KLÍČOVÁ SLOVA

Průtok, mikrofluidní čip, kanálek, šířka, PDMS, modelová buněčná membrána

KEYWORDS

Flow, microfluidic chip, channel, width, PDMS, artificial cell membrane

TESÁK, Petr. Modelace membrán v jednobanálním mikrofluidním chipu. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156644>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Tereza Venerová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Chtěl bych poděkovat paní Ing. Tereze Venerové, Ph.D. za vedení práce, přátelský a vlídný přístup. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě v průběhu podporovali.

OBSAH

1	Úvod.....	5
2	Teoretická část.....	6
2.1	Buněčná membrána.....	6
2.1.1	Struktura membrány	6
2.1.2	Semipermeabilita membrány	7
2.2	Mikrofluidika	8
2.2.1	Proudění kapalin.....	8
2.2.2	Navier-Stokesova rovnice.....	9
2.2.3	Tvorba toku	9
2.3	Detekce membrán	10
2.3.1	Metoda světelného pole	10
2.3.2	Fluorescenční mikroskopie.....	10
2.4	Výroba mikrofluidního čipu	12
2.4.1	Materiály pro mikrofluidní čipy	12
3	Současný stav řešené problematiky.....	14
3.1	Příprava fosfolipidových membrán.....	14
3.1.1	Metody přípravy	14
3.2	Metody pozorování struktur.....	16
3.2.1	Modely buněčných membrán	16
3.3	Praktické využití mikročipů.....	16
3.3.1	Využití v analytické chemii.....	17
4	Experimentální část	18
4.1	Použité chemikálie.....	18
4.2	Přístroje a pomůcky	18
4.3	Metody	19
4.3.1	Výroba mikrofluidního čipu	19
4.3.2	Příprava pumpy.....	20
4.3.3	Roztoky.....	20
4.3.4	Pozorování membrán pod mikroskopem	20
5	Výsledky a diskuze.....	21
5.1	Neprůchozí kanálky	21
5.2	Charakterizace čipů při různých rychlostech průtoku.....	21
5.3	Průtok $500 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$	24
5.4	Průtok $300 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$	25

5.5	Průtok $100 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$	25
5.6	Problémy objevené během pozorování	26
6	Závěr.....	29
7	Zdroje	30
8	Seznam použitých zkratek.....	34

1 ÚVOD

Buňka je základní složkou organismu. Je ohraničena dvojvrstvou fosfolipidů, která ji chrání a zajišťuje různé interakce s okolím, jako například transport živin a odpadních látek či komunikaci s ostatními buňkami. Na základě vnějších a vnitřních faktorů se mění její složení a struktura, což značně komplikuje její pozorování a charakterizaci.

Mikrofluidní čipy jsou vhodné pro výzkum buněčných membrán, protože poskytují ideální prostředí pro sledování jejich chování a vlastností v různých podmínkách. To vše lze v mikrofluidních kanálcích přesně matematicky modelovat. Zároveň je možné snadno měnit potřebné parametry, což umožňuje lépe definovat podmínky vzniku membrán.

Tato práce se zabývá rešerší na téma modelace membrán v jednonálovém mikrofluidním čipu. Popisuje složení, strukturu a různé modely membrán na mikrofluidních čipech a jejich charakteristiku v mikrofluidním prostředí. Experimentální část zahrnuje vznik a stabilitu těchto membrán v rámci různých rychlostí průtoků a šířek kanálků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčná membrána

Buňka je základní stavební a funkční jednotka živých organismů. Je to nejmenší živý útvar schopný samostatné existence a rozmnožování. Je vždy ohraničena membránou, která reguluje pronikání látek dovnitř a ven. Také uděluje buňce tvar a poskytuje jí ochranu. Každá buňka má svůj vlastní proteosyntetický aparát a metabolický systém, umožňující vytvářet a využívat energii. Podle stavby rozdělujeme buňky na dva odlišné typy: prokaryotická a eukaryotická. Na rozdíl od prokaryotických buněk jsou eukaryotické buňky větší, složitější a také mají organely, které jsou odděleny membránou, což umožňuje regulaci metabolických drah. Eukaryotické buňky slouží i jako funkční jednotky. Mezi prokaryota se řadí např. bakterie, sinice, prochlorofyty a mezi eukaryotické organismy patří: rostliny, houby a živočichové. [1]

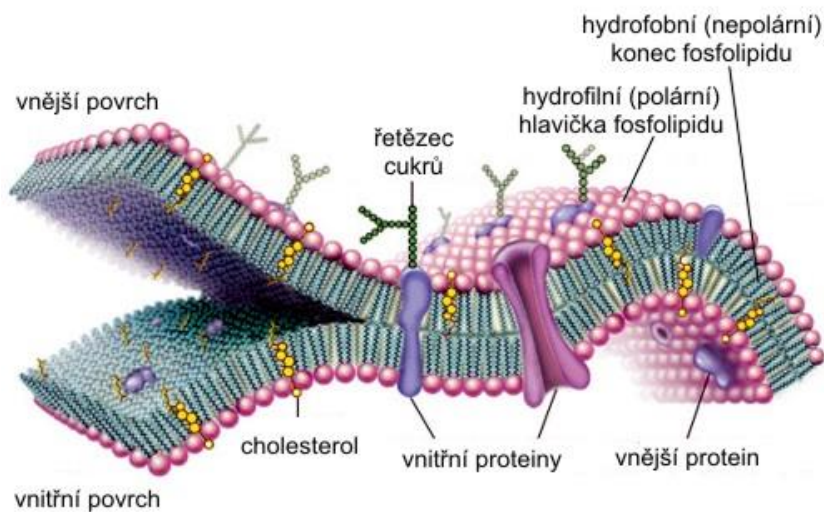
2.1.1 Struktura membrány

Buněčná membrána je převážně složena z dvojvrstvy fosfolipidů uspořádaných tak, že řetězce mastných kyselin (hydrofobní konce) směřují k sobě a hydrofilní hlavičky složené z cholinu, fosfátu a glycerolu, směřují od sebe, a z molekul bílkovin, které mohou být buď zčásti nebo úplně zanořené do dané dvojvrstvy fosfolipidů. Toto uspořádání umožňuje molekulám lipidů volný pohyb po celé ploše membrány, a tak popřípadě zaplňovat volná místa (poškození buňky). Proto jsou tyto membrány považovány za vysoce flexibilní a fluidní. Obsahuje také cholesterol, který napomáhá tomu, aby se fosfolipidy příliš neprohýbaly a zbytečně nepřemísťovaly. [1]

Lipidy obsahující molekuly cukru a glycerolu neboli takzvané glykolipidy jsou součástí vnější části fosfolipidové dvojvrstvy. Na povrchu membrány jsou asymetricky rozloženy a tvoří spolu vrstvu zvanou glykokalyx. Ta je tvořena z vodíkových vazeb (mezi cukry) a van der Waalových sil (mezi uhlovodíkovými řetězci). Hlavní funkcí glykolipidů je komunikace s okolním prostředím. Umožňují tak v podstatě vzájemné rozpoznávání mezi buňkami a také chrání buňku před potencionálními hrozbami (např. viry, degradativní enzymy, nízké pH, atd.). [2]

Jak již bylo zmíněno, tak bílkoviny nebo také proteiny jsou velkou součástí buněčné membrány a jsou rozděleny do tří kategorií. Proteiny na povrchu membrány, částečně ponořené bílkoviny a transmembránové proteiny, které prochází skrze obě vrstvy fosfolipidů. Tyto proteiny lze dále rozdělit podle funkce na katalytické, transportní a receptorové. [3,4]

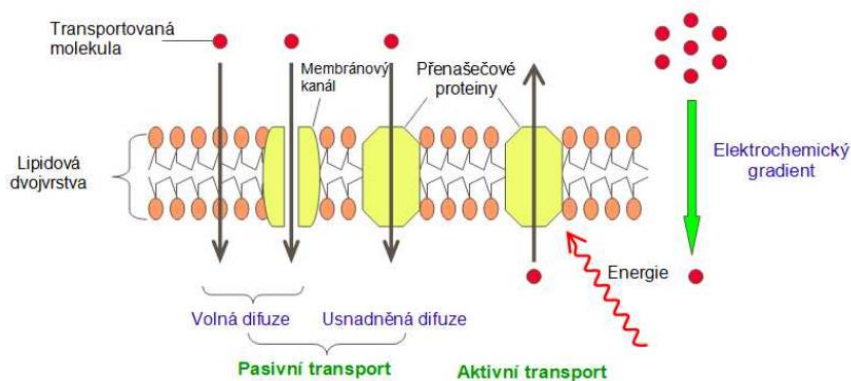
Další důležitou složkou je lecitin, který je součástí vnější buněčné membrány. Jeho molekula se skládá z glycerolu, aktivované kyseliny fosforečné, cholinu a dvou acylových zbytků mastných kyselin, od čehož se odvíjí jeho triviální název fosfatidylcholin. Slouží k poskytování opory, udržování permeability a buněčné signalizaci. [4]



Obrázek 1: Struktura buněčné membrány [5]

2.1.2 Semipermeabilita membrány

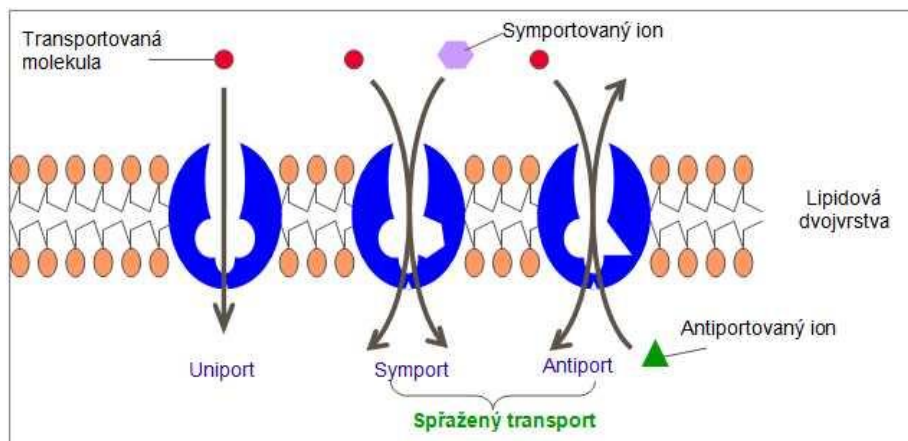
Nejdůležitější vlastností membrány je však její polopropustnost, která umožňuje průchod živinám dovnitř, či odpadním látkám ven z buňky. Existují dva způsoby transportu látek skrz buněčnou membránu – pasivní a aktivní transport. Pasivně mohou některé molekuly přes membránu prostupovat jednoduše, jako například molekuly rozpustné v lipidech, které do určité velikosti mohou projít přímo přes dvojvrstvu, a kyslík, který přes plazmatickou membránu může difundovat. Při difúzi není třeba dodávat žádnou energii, jelikož je to spontánní pohyb molekul z oblastí o vyšší koncentraci do oblastí s nižší koncentrací neboli tzv. ve směru koncentračního gradientu. Zvláštním případem difúze je osmóza, při které přes membránu za pomoci speciálních proteinů pronikají molekuly vody, avšak bez spotřeby energie. Je tak regulováno množství vody procházející membránou, čímž se udržuje určitý osmotický tlak v buňce.



Obrázek 2: Aktivní a pasivní transport [6]

Aktivní transport na membránách probíhá za spotřeby energie a buňka k němu využívá bílkovinných přenašečů jako jsou například iontové pumpy, jelikož nabitě ionty nemohou procházet přes membránu. Tento způsob transportu také umožňuje průběh i proti koncentračnímu spádu. Aktivní transport se dělí na primárně a sekundárně zprostředkovaný aktivní transport. Primární transport látek využívá energii ve formě ATP na přenašečovém proteinu, který například tvoří Na^+/K^+ pumpu, a závisí na počtu těchto proteinů na membráně a jejich transportní rychlosti. Sekundárně aktivní transport je tzv. spřažený, což

znamená že je kombinací pasivního a aktivního transportu. Jsou známé dva typy spřaženého průniku. Symport, kdy dvě molekuly prochází ve stejném směru, a antiport, kde jeden druh molekuly proniká dovnitř a druhý prochází ven z buňky. Tyto iontové kanály umožňují průchod jen specifickým iontům, jsou tedy iontově selektivní, avšak fungují na bázi volné difúze. Mají schopnost se otevírat či uzavírat, což umožňuje regulaci přijímaných nabitých částic. Póry jsou iontové kanály, které nejsou schopné se uzavírat, a tudíž jsou stále otevřené. Průchodnost iontů těmito póry je tedy závislá na jejich tvaru, poloměru, a na tom, zda jsou kladně či záporně nabitě. Dále existují kanály řízené napětím, u kterých jejich průchodnost závisí na potenciálu vzniklém na obou stranách membrány, a kanály řízené ligandem, které jsou uzavřené, dokud se na ně nenaváže daná molekula. [1,3]



Obrázek 3: Symport a antiport [6]

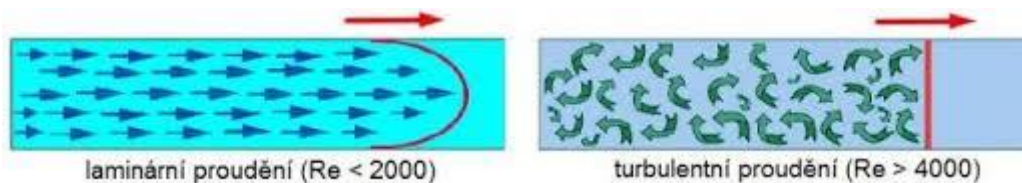
2.2 Mikrofluidika

Mikrofluidika se zabývá průtokem kapaliny skrze kanálky, které musí být alespoň v jednom směru v rozmezí jednoho až několika desítek mikrometrů. Můžeme ji považovat za samotný vědecký obor, který studuje chování kapalin v mikrokanálcích anebo jako technologii výroby mikrofluidních zařízení typu „lab-on-a-chip“ (miniaturní zařízení, na kterém mohou být provedeny více vzorkové analýzy). Mezi běžně používané kapaliny patří směsi elektrolytů s přidavkem biomolekulárních komponent. Mikrofluidika tudíž zahrnuje práci s nabitými částicemi, což z ní dělá multidisciplinární obor spojující fyziku, biochemii, chemii, nanotechnologie a biotechnologie. [4,7,8]

Mikrofluidní čipy jsou výhodné, jelikož dokážou zkondenzovat několik postupů v laboratoři do jednoho malého zařízení, které je levnější, energeticky méně náročné, přenosné, a hlavně lehce aplikovatelné. Z hlediska použitého objemu roztoku jsou tyto čipy velice ekologické, jelikož je třeba jen malé množství (nano až pikolitr) k provedení různých chemických procesů. To je činí výhodné pro analytické využití. Můžou být použity i ke komplexním analýzám. [7,8]

2.2.1 Proudění kapalin

Proudění je pohyb kapalin, kde převažuje posun částic tekutiny jedním směrem. Trajektorie těchto molekul se vyznačuje proudnicemi, přičemž každá molekula má určitou rychlost. Existují dva typy proudění: turbulentní a laminární. Turbulentní proudění je chaotické a nedokážeme předvídat pozici částice v čase, protože v kapalině vzniká vír. Jednotlivé vrstvy se náhodně promíchávají, a proto můžou některé molekuly ztrácet rychlost. Laminární proudění je naopak předvídatelné a proudnice jsou v tomto případě rovnoběžné, což znamená, že dokážeme určit polohu částic v čase. Tento typ je preferovaný i z toho důvodu, že se souvislým proudem lze lépe manipulovat. [4,9]



Obrázek 4: Laminární a turbulentní proudění [10]

Na základě takzvaného Reynoldsova čísla (Re) rozlišujeme typ proudění. Je to bezrozměrná veličina a pokud je hodnota Re nižší jak 2300 tak je proudění považováno za laminární. Vychází-li hodnoty vyšší jak 2300 tak jde o proudění turbulentní. V případě mikrofluidních čipů se vždy bude jednat o laminární proudění, vzhledem k velikosti kanálků. [7,9]

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

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

2.2.2 Navier-Stokesova rovnice

V mikrokanálcích vzniká tlaková ztráta, způsobená třením vzhledem k jejich malým rozměrům. Proto se využívá Navier-Stokesova rovnice, která popisuje proudění nestlačitelné newtonské kapaliny, která proudí mikrokanálky. [4,11]

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

kde F_m je silové působení vnějších hmotnostních sil, F_p silové působení tlakových sil, F_t je silové působení třecích sil a F_s je silové působení setrvačných sil, z čehož je odvozena následující rovnice:

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

kde ρ je hustota, v je rychlost, t je čas, p je tlak, η je kinetická viskozita a f je součet objemových sil.

2.2.3 Tvorba toku

K vytvoření proudu v mikrofluidních čípech může být využito dvou existujících metod: elektrokinetický tok a tlakem poháněný tok. Elektrokinetický tok využívá elektroosmotického pumpování kapaliny, při kterém se vytvoří elektrická dvojvrstva na povrchu kanálku, přičemž daný povrch musí být elektricky nabitý. Pohyb kapaliny je poté vyvolán působícím elektrickým polem, načež se ionty ve dvojvrstvě budou pohybovat k opačně nabitě elektrodě. V případě, že je kanálek zavřený, tak kapalina začne recirkulovat a rychlost průtoku kapaliny se významně zmenší. Proto je v tomto případě výhodnější mít kanálek otevřený, jelikož pro tento případ je tok jednotný po celé šířce kanálku. Tlakem poháněný tok zahrnuje pumpování kapaliny mikrokanálky za pomoci injekční pumpy. Tento typ čerpadla má pozitivní posun, což napomáhá v kanálku vytvářet parabolický rychlostní profil, který souvisí se základním zákonem mechaniky, kde rychlost kapaliny na stěně musí být nulová. Je to výhodná a levná metoda vzhledem k tomu, že je lehce reprodukovatelná a aplikovatelná v porovnání s metodou elektrokinetického toku. [11]

2.3 Detekce membrán

Optická mikroskopie je rozsáhlý obor, který využívá teorie i aplikací optiky k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem. K tomu se používají mikroskopy, které se skládají z objektivu, což je soustava čoček, které fungují jako jedna spojná čočka, okuláru, sestávajícího opět ze soustavy čoček, a zdroje světla. Zobrazovací metody optické mikroskopie se dělí buď podle způsobu uspořádání optické soustavy, nebo na podle druhu použitého záření. Konkrétně se jedná o metody: fázový kontrast, konfokální mikroskopie, fluorescenční mikroskopie, ultrafialová a infračervená mikroskopie atd. [12,13]

2.3.1 Metoda světelného pole

Jedná se o metodu, která má v porovnání s lidským okem schopnost 1000krát lépe rozlišit pozorovaný objekt. Díky vlastnostem objektivu a typu záření, které jím prochází, je tento mikroskop schopen rozpoznat dva body ve vzdálenosti až 0,15 μm . [4]

Světelný mikroskop se skládá z mechanické a optické části. Mechanická část sestává ze stativu a stolku. Optická část je složena ze tří spojných soustav, a to ze zdroje světla (kondenzoru), objektivu s malou ohniskovou vzdáleností, který zobrazuje skutečný, převrácený předmět, a okuláru naopak vytvářejícího zdánlivý, přímý obraz. [12,13]

Světlé pole je základní metoda, která využívá světelného kuželu procházejícího nebo odraženého vzorkem. V objektivu se následně vytvoří skutečný, převrácený a zvětšený obraz, který lze pozorovat přes okulár. Metoda se takto nazývá, protože obrys objektu se v okuláru jeví jako obklopený světlým polem. [13]

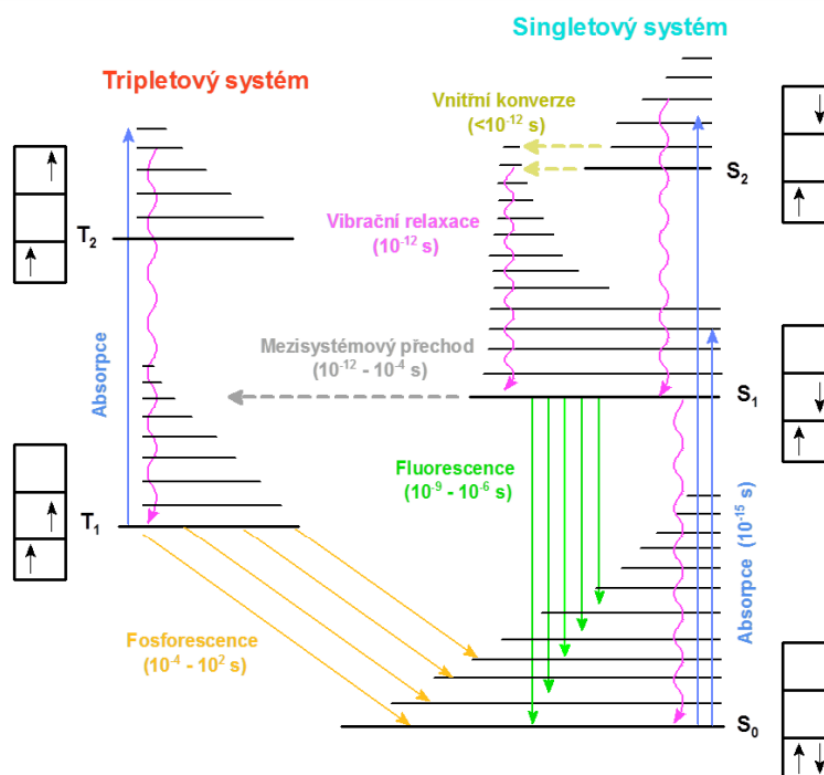
2.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Základem fluorescenční mikroskopie jsou chemické látky zvané fluorochromy, které se navážou na pozorované molekuly a poté excitují světlem o určité vlnové délce. Po ozáření jsou pak schopny sami vyzařovat světlo o vyšší vlnové délce. Proto nachází využití při zkoumání vzorků například v mikrobiologii nebo medicíně. [14]

Fluorescenční mikroskop je speciální typ optického mikroskopu, který využívá rtuťových nebo xenonových výbojek a fluorescenčních filtrů k zobrazení různých struktur. Existují i dvě metody pozorování – v odráženém světle (epifluorescence) a v procházejícím světle (diafluorescence), přičemž se spíše využívá epifluorescenčních mikroskopů. Excitační světlo u nich prochází objektivem a dopadá na vzorek ze shora. Fluorescenční filtr rozhoduje o tom, které vlnové délky budou na preparát dopadat. Je to kostka složená z excitačního filtru, dichroického zrcadla a emisního filtru. Excitační filtr propouští pouze krátké pásy vlnových délek, které jsou potřebné k excitaci vzorku. Dichroické zrcadlo odráží dlouhé emisní vlnové délky do okuláru a krátkovlnné záření odráží na vzorek. Emisní filtr propouští záření emitované vzorkem a zachycuje zbytkové vlnové délky. V kostce jsou tyto složky uspořádány tak, že stěny jsou tvořeny filtry a dichroické zrcadlo je umístěno do úhlopříčky. V závislosti na studovaném vzorku lze kostky měnit dle potřeby. [13,14]

Fluorescence

Je to typ luminiscence, což je děj, při kterém látka emituje světlo, ve formě viditelného, infračerveného nebo ultrafialového záření, díky svému excitovanému stavu. Excitace, stav při kterém elektrony začnou obsazovat vyšší energetické hladiny, lze dosáhnout několika různými způsoby. V případě excitace elektromagnetickým zářením se jedná o fotoluminiscenci, která se dále dělí podle toho, jestli elektron přechází z tripletového či singletového stavu na fosforescenci a fluorescenci. [14,15]



Obrázek 5: Jablonskiho diagram [16]

Fluorescence má relativně krátkou dobu dohasínání v porovnání s fosforescencí, která je řádově delší. Vzniká, když excitovaný elektron ve vyšší vrstvě přechází na nižší hladinu, kde se přebytečná energie přemění na záření. Z důvodu krátké doby trvání je třeba při sledování fluorescence neustále excitovat použitou chemickou látku. Princip fluorescence (i fosforescence) nejlépe popisuje Jablonski diagram, kde je průběh fluorescence zaznamenán jako přechod elektronu ze singletového stavu S₁ do původního stavu S₀. Popisuje také chování elektronu při celém procesu, který má tři stupně. Prvním stupněm je excitace, druhým je excitovaný stav, který trvá jen velmi krátkou dobu, a třetím stupněm je emise. [14,15]

Fluorescenční barviva

Organické molekuly většinou nemají schopnost fluorescence. Ta se spíše vyskytuje jen u aromatických sloučenin jako jsou molekuly aromatických uhlovodíků a heterocyklů. Mezi ně patří například rhodamin B, chinin a fluorescein. Fluorescenční barviva neboli fluorofory lze také dělit na vnitřní a vnější. Vnitřní fluorofory jsou schopné fluorescence, přičemž jsou také i vlastní buňce (přirozeně se v ní vyskytují), což jsou například proteiny nebo chlorofyl. Vnější fluorofory jsou využívány k označování biologických vzorků, které nejsou schopny samostatné fluorescence. Ty pak rozdělujeme podle typu vazby, které vznikají mezi vzorkem a fluoroforem, na fluorescenční sondy a značky. Sondy vytváří nekovalentní vazby, přičemž mění i své fluorescenční vlastnosti. Jsou velice specifické a existují například sondy citlivé na polaritu prostředí a proteinové sondy. Značky se naopak vážou kovalentně a nejčastěji se používají k označování proteinů, což je významné například pro imunologii nebo histologii. [14,15]

Fluorescein je jeden z nejpoužívanějších fluoroforů. Je to syntetická organická látka, která se využívá v mnoha oborech například v biochemii, fotochemii a medicíně. Ve vodě má excitační maximum při 489 nm a emisní maximum při 512 nm. Jeho schopnost absorbovat záření závisí na pH prostředí ve

kterém se nachází, což je vcelku nevýhodné, jelikož to znamená, že je použitelný pouze v prostředí, kde se pH pohybuje kolem 3-6. V tomto aspektu jsou lepší jiná barviva například Oregonová zeleň nebo Rhodaminová zeleň. [17,18]

2.4 Výroba mikrofluidního čipu

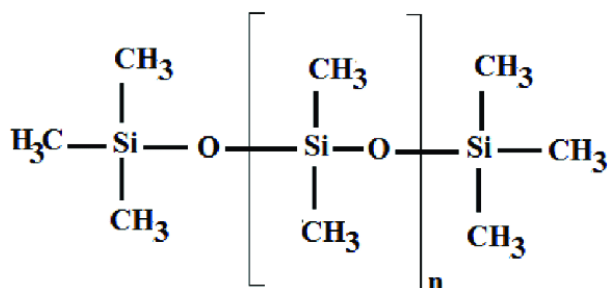
Při výrobě mikročipů je možno využít velkého množství různých materiálů či procesních kroků. Díky této rozmanitosti může být připraveno mnoho různorodých zařízení, avšak v současnosti se spíše využívá měkké litografie PDMS (polydimethylsiloxanu). Proces výroby sestává ze čtyř kroků. Prvním krokem je fotolitografie neboli vzorování, při kterém se vzor přeneše na materiál. Druhým krokem je depozice tenké vrstvy, při kterém je na materiálu vypěstována nebo na něj nanese tenká vrstva. V třetím kroku probíhá leptání, kde jsou podle vzoru selektivně odstraněny části materiálu. Posledním krokem je spojování, při kterém se spojí dva materiály dohromady. [19]

2.4.1 Materiály pro mikrofluidní čipy

Nejdůležitějšími faktory při výrobě čipů jsou fyzikálně-chemické vlastnosti jako například pružnost, prostupnost, toxicita nebo také průhlednost. Mimo to jsou významné i faktory jako cena, trvanlivost, dostupnost a náročnost zpracování. Mezi první materiály využívané pro výrobu mikrofluidních čipů byly sklo a křemík, a to z toho důvodu, že byly vhodné, dostupné a v tehdejší době osvědčené. Sklo je také výhodné z hlediska jeho optické průhlednosti. Je to stálá amorfní látka, která reaguje pouze s malou skupinou vybraných chemických látek. [9,19]

Dalším použitelným materiálem jsou plasty, a to převážně z toho důvodu, že jsou levné a lze je využít k velkovýrobě jednorázových čipů. Jsou však nevýhodné z hlediska stability a autofluorescence. Proto se spíše využívají v klinických aplikacích. [19]

Dále se využívá polymerů jako jsou například polystyren, který je biokompatibilní a dostatečně průhledný, ale těžký na výrobu, cyklické olefinové kopolymery (COC), polymethylmetakrylát (PMMA) a polydimethylsiloxan (PDMS). Polykarbonátové čipy jsou velmi odolné vůči teplu a jsou transparentní. Jejich nevýhodou je však to, že snadno reagují s organickými rozpouštědly, a proto se spíše využívají jako elektrochemické biosenzory, pro PCR a detekce patogenů. PMMA čipy jsou levné, opticky čiré a málo hydrofobní. Používají se jako jednorázové čipy pro elektroforézy a DNA sekvencování. [9,19,21]



Obrázek 6: Molekula polymeru PDMS [20]

Nejčastěji se však využívá PDMS, který je chemicky vysoce stabilní a velmi tepelně odolný díky svým vazbám mezi kyslíkem a křemíkem. Čipy z něj lze vyrábět masově, jelikož je jejich výroba jednoduchá a relativně levná. Polydimethylsiloxan se jednoduše přichytává na sklo a je opticky čirý. Taky je ve své původní formě hydrofobní, což může být problém při plnění mikrokanálek. Stává se hydrofilním pouze v případě, kdy je ošetřen plazmou. Je vhodný pro kultivaci buněk a tvorbu fosfolipidových membrán. Avšak je také porézní, což znamená, že může nasávat do určité kapacity roztoky. Lze však využít

deionizované vody, do které se PDMS vloží na několik hodin, aby se stěny zaplnily a nevstřebávaly používané roztoky. Tento efekt však vydrží pouze několik dní, takže je po ošetření ideální využít připravený čip co nejdříve. Takto ošetřené čipy jsou jen jednorázové. [21,22]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Příprava fosfolipidových membrán

Lecitin, jiným názvem fosfatidylcholin, je jednou ze základních složek buněčných membrán. Je složen z 19-21 % fosfatidylcholinu, 8-20 % fosfatidylethanolaminu, 20-21 % inolfosfatidů, 5-11 % jiných fosfatidů, 2-5 % sterolů a 5 % sacharidů. Vyrábí se ze sójových bobů nebo žloutků slepičích vajec. Směs lecitinu, sefalinu, fosfatidylinositolu, které jsou zhruba ve stejném poměru, a malého množství fosfolipidů tvoří takzvaný asolecitin, který je schopen tvořit složitější, ale méně stabilní membrány na mikrofluidním čipu. [4,23,25]

Pro fyziologická měření na membráně se používá syntetický lipid 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC), který disponuje velkou elektrickou rezistencí. Membránové systémy obsahující DPhPC se vyznačují vhodnými elektrickými vlastnostmi a nízkou propustností iontů a vody. [26]

3.1.1 Metody přípravy

Mezi první objevené způsoby přípravy patří metoda roztírání dvojvrstvy z lipidového rezervoáru, kde se tvoří fosfolipidové dvojvrstvy skrze otvor v teflonové přepážce, která odděluje dvě vodná prostředí. Po přidání monovrstvy lipidů drátem či štětcem na obě vodné fáze se pak obě hladiny přiblíží k sobě za pomoci van der Waalsových sil a začnou tak v otvoru tvořit lipidovou dvojvrstvu. Přítomnost organického rozpouštědla po dokončení spojování vrstev však může ovlivnit tloušťku membrány, což je v celku nevýhodné. [27,28]

Při metodě vezikulární fúze unilamelární vezikuly adsorbují na povrch pevné podložky. Vezikul může vzniknout v roztocích s vysokou koncentrací lipidů, které se později uspořádají do kulovitého tvaru. Po nanesení na pevnou podložku poté vezikuly praskají kvůli rozdílným nábojům mezi nimi a podložkou. Začne tím tak vznikat spojitá fosfolipidová dvojvrstva, která je však nehomogenní a nepokrývá tak celý povrch podložky. Může také docházet ke vzniku mnohovrstevnatých oblastí, jestliže vezikuly budou v příliš malé vzdálenosti od sebe. [28,29]

Langmuir-Blodgettova technika

Langmuir-Blodgettova technika je založena na přenesení lipidové vrstvy z rozhraní vzduch-voda na pevný podklad. Monovrstva se přemístí z povrchu vody tažením vzhůru z roztoku a umístí se na hydrofilní povrch. Substrát s monovrstvou se poté ponoří do roztoku, který má na svém povrchu též monovrstvu lipidů a vzniká tak fosfolipidová dvojvrstva. Jako substráty s hydrofilním povrchem se nejčastěji používají borosilikátové sklo a tavený oxid křemičitý. S takto připravenými membránami však nelze provádět další výzkum, a to z toho důvodu, že do nich nemůžeme přidat žádné transmembránové proteiny. Ty by se totiž mohli při kontaktu se vzduchem denaturovat. [28,30]

Metoda lift-off

Při metodě lift-off se obdobně jak u Langmuir-Blodgettovy techniky pracuje s pevným podkladem. Nejdříve je třeba vytvořit unilamelární vezikuly v roztoku lipidů rozpuštěných v chloroformu, které jsou následně upraveny na stejnou velikost a usušeny dusíkem. Dále se použije roztok HEPES, který je hydratuje a za intenzivního míchání jsou zahuštěny na koncentraci 2 mM. Dalším krokem je mražení, které rozdělí směs lipidů a připraví ji tak na následnou filtraci za vysokého tlaku polykarbonátovými filtry. Posledním krokem je naředění roztoku fosfátovým pufrem. Menší množství takto připraveného roztoku se poté aplikuje na silikonovou podložku s parylenovou vrstvou, která ji střídavě zakrývá. Po mechanickém odstranění této vrstvy se v mezerách vytvoří dvojvrstva fosfolipidů. [31]

Vázaná lipidová membrána

„Tethered bilayer lipids membranes“ ve zkratce tBLMs, jsou modely membrán, do kterých lze zavádět transmembránové proteiny, což nebylo možné u předchozích metod. Tento způsob tvorby lipidových membrán je založen na kotvících lipidech, díky nimž je možné vytvořit vrstvu mezi pevným podkladem a membránou. Proteiny jsou tak lépe chráněné před denaturací, která je často způsobena třením o pevný podklad. Kotvící lipidy neboli telechely jsou složeny ze tří molekulárních částí: z amfifilu, který se stane proximální částí monovrstvy ve finální fosfolipidové dvojvrstvě, z distanční jednotky, jejíž funkce je udržovat prostor mezi pevnou podložkou a membránou a ze substrátově specifické hlavičky založené na thiolech, disulfidech, zlatu nebo stříbru. [32]

Prvním krokem při přípravě tímto způsobem je aplikace roztoku s kotvícími lipidy na pevnou podložku, kde se tyto lipidy kovalentně navážou na její povrch. Dalším krokem je přidavek vezikul, které se rozprostřou a naváží jak na amfifilní část kotvících lipidů, tak i na spodní vrstvu membrány. V těchto vezikulech mohou být obsaženy zkoumané zakomponované proteiny. Nicméně tato metoda je velmi limitovaná vzhledem k integraci membránových proteinů s velkými podjednotkami. [32]

Vázané lipidové membrány jsou významné z hlediska rekonstrukce a funkčnosti membránových proteinů i signálních molekul. Avšak způsob výroby těchto membrán závisí na postupu dané laboratoře, a je tedy omezená z technického hlediska, jelikož nelze využít specifických lipidů. Zatím proto nebyly vyvinuty modely, které by lépe napodobovali biologické membrány. [32]

Volně zavěšená membrána

Takto připravené membrány vznikají vytvořením fosfolipidové dvojvrstvy přes otvor mezi dvěma vodnými prostředími. Aby s nimi šlo dále pracovat, musí být tyto membrány vysoce stabilní, proteiny nesmí být schopné se přemisťovat a hlavně musí být schopné vydržet déle jak 3 hodiny, aniž by se rozpadly. [33]

Jeden způsob jejich výroby objevili Pantoja et al., kteří použili směs fosfolipidů a dekanu, a vytvořili tak přes 200 μm tlustý pór v křemíkovém waferu fosfolipidovou dvojvrstvou, která byla horizontálně orientovaná. Aby dosáhli pórů o rozměrech 100-200 μm , kterými by mohli vést draselné kanálky, tak silanizovali vrstvu křemíku, což zvýšilo hydrofobicitu povrchu a zároveň podpořilo adhezi fosfolipidové směsi. Takto připravený mikročip lze využít pro měření elektrických vlastností iontových kanálků. [34]

Skupina Górzny et al. vyrobila čip z PDMS a nitridu křemičitého, na kterém se poté vytváří dvojvrstva fosfolipidů. Čipy sestávají ze dvou kanálků, co se navzájem kolmo kříží a slouží k napuštění čipu roztokem fosfolipidů v n-dekanu a roztokem elektrolytu, přičemž každý kanálek náleží jednotlivé směsi. N-dekan je však nevhodné rozpouštědlo, jelikož díky němu bobtná PDMS, což může vést k poškození čipu. I přesto se v tomto případě úspěšně podařilo vytvořit membránu. [35]

Obdobný mikročip z PDMS vyrobila skupina Ota et al., který ale poskytuje možnost vytvářet několik membrán najednou. Sestává ze čtyř rovnoběžně jdoucích mikrokanálků s postranními komůrkami. Nejdříve se kanálky napustí fosfátovým pufrům a následně se do nich napumpuje roztok lipidů

v hexadekanu o koncentraci 10 mg/ml. Posledním krokem je opětovný výplach kanálků fosfátovým pufrům, díky čemuž vzniknou dvě monovrstvy mezi pufrům a hexadekanem. Tím, že se kanálky naposled napustí pufrům, dochází ke spojování monovrstev na hranicích komůrek ve dvojvrstvu, což je možné sledovat za pomoci fluorescenčního mikroskopu díky označení fluoreskujícími lipidy. Je tak možné opticky zkoumat například iontové kanálky nebo receptory. [36]

3.2 Metody pozorování struktur

Mikročip vyrobený skupinou Liu a spol. z hydrogelu složeného z hovězího sérového albuminu, byl použit k pozorování manganistanových iontů. Hydrogel byl připravený metodou sprejového sušení, kde byl použit glutaraldehyd jako rozpouštědlo. Vznikly tak kapičky, které byly poté napuštěny do čipu a zachytily se v připravených komůrkách. Mikrokanálky se potom naplnily roztokem manganistanu o nízkém pH, který byl následně ozářen laserem, jehož vlnová délka byla 488 nm. Roztok byl zkoumán pod fluorescenčním mikroskopem a bylo zjištěno, že manganistan s rostoucí koncentrací zkracuje dobu života fluoroforů. [37]

Skupina Liao a spol. vyrobila čip tvořený nanomembránou z oxidu hlinitého, který slouží k detekci bakterií. Protilátky společně s membránou mohou zachytit dané bakterie. Přítomnost byla detekována na základě impedance za pomoci elektrochemického biosenzoru. V přítomnosti bakterií se impedance roztoku elektrolytů zvyšuje a v nepřítomnosti je naopak hodnota impedance nízká, jelikož je roztok schopen protéci mikrokanálkem, aniž by byl bakteriemi blokován. Detekční limit ve vzorcích byl kolem 10^5 CFU/ml během 25minutového měření. [38]

Pro zkoumání nádorových buněk byl skupinou Zhao et al. vyroben mikrofluidní čip, který byl schopen snímat teplotu těchto buněk. Čip byl složen z PDMS, ve kterém byly kanálky, tenkého filmu platiny, který fungoval jako tepelný senzor, na skleněné podložce a z vrstvy Si_3N_4 sloužící k tepelné izolaci. Nádorové buňky byly zachyceny ve struktuře typu C uvnitř mikročipu, kde díky statické adhezi mohly růst. Na základě odporu platinového filmu, který měl funkci elektrody, byla provedena kalibrace při různých teplotách ve známém rozsahu, což umožnilo převod odporu elektrody na teplotu. Takto sestrojený čip umožňuje snímat teplotu nádorových buněk, jelikož je s nimi ve styku platinový film, při reakci na různé podněty. [39]

3.2.1 Modely buněčných membrán

Skupina Ota et al. pozorovala umělé buněčné membrány na mikročipu za pomoci optické a fluorescenční mikroskopie, což se ukázalo být nejvhodnější technikou zkoumání těchto modelů. Fosfolipidové membrány pozorovali za pomoci zakomponování fluorescenční sondy do membránové dvojvrstvy, což v jejich případě byla texaská červeň. Ta byla excitována červeným laserem a poté emitovala červené záření. V případě, že v kanálcích a komůrkách vznikla fosfolipidová membrána, tak bylo při pozorování patrné již zmíněné červené záření. V opačném případě, kdy na rozhraní kanálek/komora membrána nevznikla, tak k vyzáření světla nedošlo a komora zůstala černá. [36]

3.3 Praktické využití mikročipů

Tien a Ottova vytvořili membránu, ve které byl vložený iontový kanálek. Ten byl do fosfolipidové dvojvrstvy implantován mikropipetou. Na takto připravené membráně mohly být zkoumány procesy transportů látek. Aktivita kanálku mohla být ovlivněna inositol-1,4,5-trifosfátem, nukleotidy a rutheniovou červení. [40]

Tento tým vytvořil i model vnitřní mitochondriální membrány za pomoci fosfolipidové dvojvrstvy s přidanými enzymy a cytochromy, které simulovaly vytváření energie v mitochondriích. Cytochrom c je malý membránový protein, který přenáší elektrony mezi cytochromem b-c a cytochrom peroxidáza komplexem v dýchacím cyklu mitochondrií. Lze tak za pomoci elektrod měřit oxidaci a redukci molekul a tím pozorovat samotný přenos elektronů. Bylo tak zjištěno, že vznik komplexu není nutný pro přenos elektronů a může být nahrazen membránovou dvojvrstvou lipidů. [40]

Skupina Ota et al pozorovala na volně zavěšené membráně průchodnost molekul. Mohli to tak zkoumat díky již zmíněnému čipu, co tato skupina vyrobila. Při pozorování využili α -hemolysinu, který byl přidán do pufru jako roztok v kalceinu. Vznikla tak membrána, která obsahovala α -hemolysin, který bylo možno sledovat díky fluorescenční mikroskopii, jelikož bylo v membráně zakomponované i fluorescenční barvivo. Zjistili, že intenzita fluorescence spolu s koncentrací barviva začala prudce klesat. [36]

Skupina Zhang a spol. vytvořila pomocí techniky mikrofluidních kapiček membrány, do kterých mohou být zakomponovány chloridové iontové kanálky (CLIC₁). Byla použita fluorescenční sonda 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium, která reaguje na halogenidové ionty změnou intenzity záření. Čím vyšší byla koncentrace Cl⁻ na druhé straně membrány, kam byly transportovány, tím méně zářila fluorescenční sonda SPQ. [41]

3.3.1 Využití v analytické chemii

Analytická chemie používá mikrofluidní zařízení v kombinaci s mikrooptickými prvky pro detekci a automatizaci bioanalytických procesů. Mikroelektromechanické systémy jsou výhodné z hlediska levné výrobní ceny a z důvodu nízké spotřeby vzorků. Lze je kombinovat s fluorescenčními mikroskopy například při zkoumání buněk, kde je možné pomocí fluoroforů označit buňky produkující specifické protilátky. [42]

Skupina Sández a spol. vyrobila mikrofluidní čip s mikroanalyzárem s automatizovaným průtokem ke stanovení kyselých složek ve víně. Mezi konvenční metody stanovení pH vína patří acidobazická titrace, kde se využívá potenciometrického nebo kolorimetrického (na fenolftalein nebo bromthymolovou modř) způsobu pro stanovení konce titrace. Detekce kyselin ve vzorku je založena na barevné změně bromthymolové modři v přítomnosti kyselého prostředí. Tato změna je detekována křemíkovou fotodiodou. Takto sestrojený čip má detekční limit 0,5 g/l a je tak vhodný jako náhrada více konvenčních metoda například titrace vína (neutralizací). [43]

Skupině Man et al se podařilo vyvinout mikročip s biosenzorem pro barevnou detekci Salmonella typhimurium v zeleninových produktech. Biosenzor se skládá ze zlatých nanočástic a thiolovaných polystyrenových kuliček. Zlaté nanočástice jsou ideální pro kolorimetrickou detekci, jelikož jsou senzitivní na plasmonovou rezonanci v agregátním stavu, což způsobuje zřetelnou barevnou změnu. Thiolované polystyrenové kuličky byly zvoleny kvůli jejich vysoké chemické stabilitě, velkému počtu funkčních skupin na povrchu a možnosti úpravy velikosti částic. Zároveň bylo využito mikroventilů, které řídily směr průtoku kapaliny. K čištění čipu bylo využito DNA-magnetických nanočástic, které zachytávaly nečistoty a umožňovaly tak opětovné použití mikročipu. Za pomoci mobilní aplikace je tento čip schopný během 45 minut detekovat bakterie při relativně nízké koncentraci $6 \cdot 10^1$ cfu/ml. [44]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Aceton, lach:ner, CAS: 67-67-1

HCl p.a., ≥ 35 %, lach:ner, CAS: 7647-01-0, č.š.: PP/2014/05946

Hexadekan, Sigma-Aldrich, Lot: #SHBG3884V

Hexadekan, Sigma-Aldrich, Lot: PS 06262LS

Chloroform AG., Penta, č.š.: 2805180523

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ p.a., Penta, CAS: 16788-51-1, č.š.: 18062906616

KH_2PO_4 p.a., Penta, CAS: 7778-77-0, č.š.: 1805180516

L- α -phosphatidilcholine (Egg, chicken), 1 g, Avanti, Lot: EPC-608

LED/UV FLEX gel, RUSCONA s.r.o.

NaCl p.a., Penta, CAS: 7647-14-5, č.š.: 2106210616

NaOH mikropelety p.a., CAS: 1310-73-2, index.č.: 011-002-00-6

PDMS, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo, č. š.: (10)0008885206

PDMS, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo, č. š.: H047M3J067

Rhodamin 6G, 99 %, Aldrich, CAS: 989-38-8

4.2 Přístroje a pomůcky

Invertní mikroskop – Olympus IX71

Kamera – Olympus XM10

Lampa – X-Cite 120Q

Mikrofluidní pumpa – dLSP 500 Digital Syringe Pump; Longer

Předvážky – Scaltec SPB 52

Přístroj na oplazmování – CERPLANT RPS50+

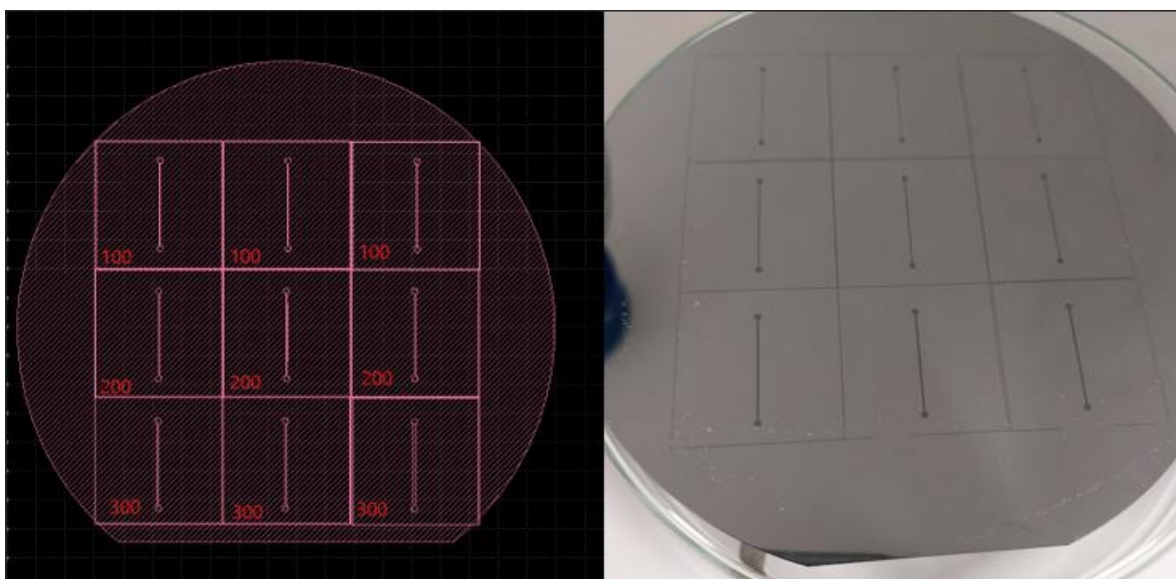
Ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H

UV/LED lampa – 48W/60W

4.3 Metody

4.3.1 Výroba mikrofluidního čipu

Nejdříve byla křemíková forma, která obsahovala strukturu kanálků o různých šířkách (100, 200 a 300 μm) umyta deionizovanou vodou a poté usušena stlačeným vzduchem. Následně byla Petriho miska vyložena třemi vrstvami alobalu, do kterých byla forma umístěna a na krajích zabalena. Potom byl do malé 50-100 ml kádinky odlit polydimethylsiloxan a síťovací činidlo v hmotnostním poměru 10:1. Směs byla míchána po dobu 1-2 minut skleněnou tyčinkou. Poté byla kádinka se směsí vložena do ultrazvukové čističky po dobu 10 minut, za účelem odstranění většiny vzduchových bublin. Směs byla posléze nalita na křemíkovou formu. Petriho miska s formou byla umístěna do exsikátoru, ve kterém byl za pomoci membránové vývěvy vytvořen podtlak. Po obnovení tlaku do původního stavu byly odstraněny zbývající bubliny.



Obrázek 7: Rozložení kanálku na křemíkovém waferu (vlevo – schéma waferu; vpravo – fotka waferu)

Petriho miska byla následně umístěna do sušárny po dobu 1 hodiny při teplotě 80 $^{\circ}\text{C}$. Poté bylo vytvrzené PDMS zchlazeno na laboratorní teplotu. Jednotlivá těla čipů byla potom vyřezána z formy a rozdělena podle velikosti kanálků. Původních 9 těl čipů bylo do jednotlivých skupin rozřazeno po 3 kusech. Následně byly do čipů vyhloubeny jehlou díry pro přívodní a odvodní konektory. Takto připravené PDMS části byly posléze sonifikovány v isopropylalkoholu.

Následně byly na přístroji CEPLANT RPS50+ oplazmovány PDMS části (strany s kanálky). K těmto částem byl posléze oplazmován stejný počet krycích sklíček, nejlépe do 30 minut od oplazmování PDMS části. Před každým ošetřením byla u plazmové hlavičky nastavena vzdálenost od PDMS nebo sklíčka na 1,5 mm. Na přístroji bylo nastaveno napětí 10 V, což odpovídá délce ošetření 84 sekund. Obě části byly po ošetření slepeny tak, že sklíčko bylo opatrně přiloženo a poté mírně přitlačeno k PDMS části. Takto připravené čipy byly posléze vyžihány v sušárně předehřáté na 150 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Poté byly do čipů zavedeny konektory, které k nim byly posléze i přilepeny. Po uplynutí 24 hodin (tuhnutí lepidla) byly čipy skladovány v nádobě s deionizovanou vodou.

4.3.2 Příprava pumpy

K výrobě pumpy byla použita inzulinová stříkačka (0,5 ml), která byla poté naplněna roztokem PBS (fosfátový pufr) o hodnotě pH 7,4. Ke stříkačce byla následně připojena hadička o délce 40 cm tak, že byly slepeny několika vrstvami gelu, který tuhne 1-2 minuty pod UV světlem. Poté byla hadička naplněna roztokem ze stříkačky tak, aby se předešlo tvorbě bublin vně hadičky. Potom byla hadička naplněna nejdříve roztokem lecitinu v hexadekanu a pak opět roztokem PBS.

4.3.3 Roztoky

Byl připraven fosfátový pufr o objemu 250 ml. Do cca 200 ml deionizované vody bylo naváženo 0,0768 g KH_2PO_4 ; 0,3371 g K_2HPO_4 a 2,194 g NaCl. Posléze bylo do roztoku po kapkách přidán 1 M roztok HCl nebo 1M roztok NaOH tak, aby měl pH rovno 7,4. Pufr se doplnil na 250 ml a výsledný roztok měl iontovou sílu 10 mM.

Byl připraven roztok lecitinu v chloroformu o koncentraci 250 g/l a objemu 1 ml. Za pomoci analytických vah bylo naváženo 0,25 g lecitinu, který byl následovně rozpuštěn ve vialce obsahující 1 ml chloroformu. Aby se lecitin rozpustil rychleji, tak byl použit vortex, který směs důkladně promíchal. Poté bylo odebráno 40 μl z roztoku lecitinu v chloroformu a dané množství bylo odpařeno v digestoři.

Roztok lecitinu v hexadekanu o koncentraci 10 g/l byl připraven tak, že se do vialky s odpařenými 40 μl roztoku lecitinu v chloroformu napipetoval 1 ml hexadekanu a lecitin ve směsi byl opět za pomoci vortexu rozpuštěn. Takto připravený roztok byl skladován za laboratorní teploty za stálého promíchávání.

4.3.4 Pozorování membrán pod mikroskopem

Čip byl vyjmut z nádoby s deionizovanou vodou a osušen. Stříkačka byla umístěna do mikrofluidní pumpy a za pomoci dvou kombinovaných kleští byla hadička připojena na konektor čipu. Čip byl poté upevněn v kovovém držáku. Mikroskop byl zapnut a zaostřen na mikrofluidní kanálek. Pro pozorování byla zvolena poloha č. 6, která neobsahuje filtr, a tak umožňuje sledování struktury kanálku pomocí transmise. Na mikrofluidní pumpě byl nastaven jeden z průtoků a parametry dané stříkačky. Po spuštění pumpy bylo možné pozorovat vznikající membrány.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Neprůchozí kanálky

Během napouštění čipů roztokem PBS bylo za pomoci mikroskopu zjištěno, že u velkého počtu čipů jsou kanálky neprůchozí. Při ražení otvorů do těla PDMS v nich totiž občas zůstane malý kousek polymeru, který nejde odstranit za pomoci čištění v ultrazvuku. Proto byly raznice nahrazeny jehlou, se kterou byly otvory tvořeny tak, že prošla skrz celou PDMS část. Bylo předpokládáno, že jehla projde, aniž by za sebou zanechávala jakékoliv zbytky polymeru. Takto připravené čipy sice byly průchodnější, ale k tomu, aby u některých čipů docházelo k průtoku, musela být stříkačka stlačena buď ručně nebo byl na pumpě nastaven větší průtok. Poté byly čipy průchozí, avšak takovéto čipy stále nebyly vhodné pro měření, a to z toho důvodu, že roztoky, které by procházely čipem v daném pořadí (viz kapitola 4.3.2), by jím prošly příliš velkou rychlostí na to, aby se v čipu vytvořily membrány.

Proto byl následovně upraven postup přípravy pumpy tak, že hadička stříkačky byla naplněna pouze roztokem lecitinu v hexadekanu (stříkačka byla stále naplněna PBS, nicméně jím nebyla plněna podruhé) a pro roztok PBS byla vyrobena samostatná stříkačka. Stříkačka pouze s PBS byla připojena k čipu a kanálek čipu byl ručně celý naplněn. Ihned poté byla na čip místo PBS stříkačky připojena stříkačka s lecitinem v hexadekanu, a potom už pozorování probíhalo tak, jak v původním postupu. Výhodou naplnění čipu roztokem PBS předem je to, že lze propláchnout kanálek a zároveň ho připravit k následujícímu měření. Tato část postupu byla do měření zavedena nově a nese s sebou určité výhody jako například to, že není třeba čekat, až se kanálek při malém průtoku nejprve naplní PBS a poté až lecitinem v hexadekanu. Další výhodou je, že v případě, kdy není kanálek z jakéhokoliv důvodu vůbec průchozí, tak je čip možné ihned vyměnit a pokračovat v měření s funkčním čipem.

5.2 Charakterizace čipů při různých rychlostech průtoku

Měření bylo nastavené tak, že po připojení pumpy k čipu a následném uchycení do mikroskopu byla objektivem zachycena prostřední část kanálku neboli 1. místo. Po spuštění pumpy a následném vzniku membrán bylo nalezeno 2. místo, které se nacházelo v části nejbližší vstupnímu otvoru. Naposledy bylo mikroskopem zachyceno 3. místo, nacházející se u výstupního otvoru. Na každém místě proběhla kontrola deseti komůrek. Zaznamenávalo se, zdali byla natažena membrána a pokud ano, tak jak stabilní byla. Stabilita membrán byla pozorována po dobu 5 minut. Pro pozorování byly zvoleny průtoky 500, 300 a 100 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$. Měření bylo provedeno tak, že u jednotlivých šířek kanálků bylo pozorování provedeno třikrát pro každý průtok. Výsledky byly zaznamenány do tabulek, které vypadaly podobně jako Tabulka 1. Symbol \checkmark znamená, že se buď vytvořila, nebo zanikla membrána, jinými slovy vyjadřuje ANO. Naopak symbol X značí, že membrána nebyla natažena nebo nepraskla, vyjadřuje tak NE. V případě, že membrána nevznikla, nevyskytuje se v poli „Prasklo“ ani jeden ze symbolů. Tyto tabulky byly následovně zpracovány tak, že symbol \checkmark byl nahrazen číslem 1 a symbol X číslem 0. Z takto vzniklých tabulek byl poté spočítán průměr při daném průtoku a jednotlivých šířkách kanálků.

Tabulka 1: Příklad tabulky s výsledky

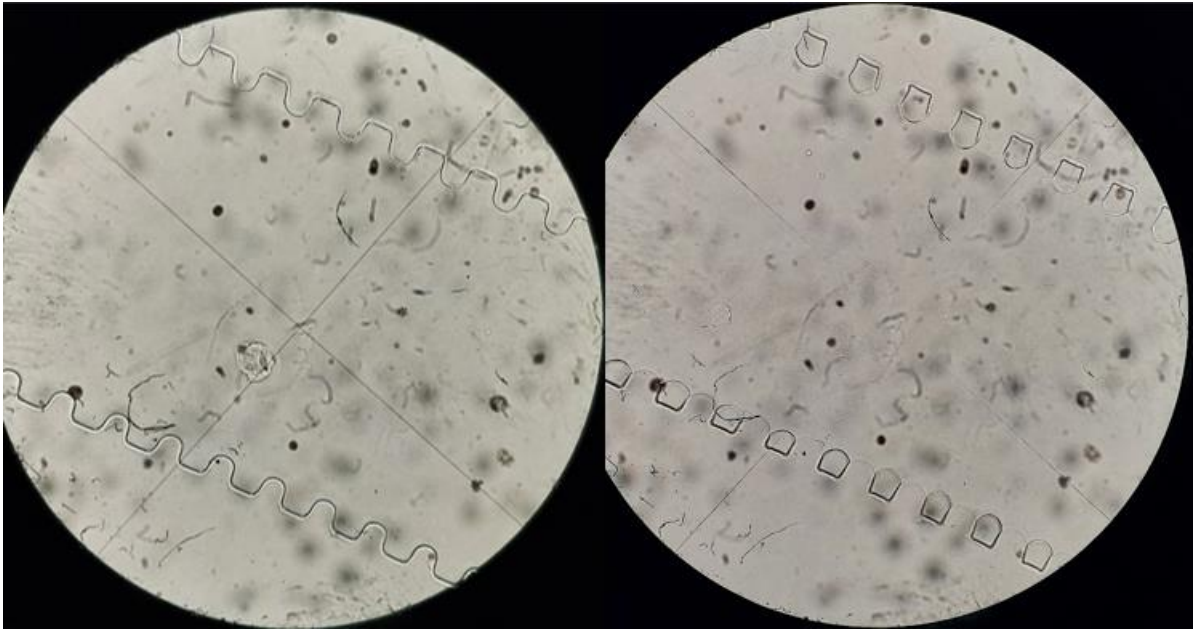
300 μm ; 500 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$						
Komůrky	1. místo		2.místo		3.místo	
1	✓	X	✓	X	X	-
2	✓	X	✓	X	X	-
3	✓	X	✓	X	X	-
4	✓	X	✓	X	X	-
5	✓	X	✓	X	X	-
6	✓	X	✓	X	X	-
7	✓	X	✓	X	X	-
8	✓	X	✓	X	X	-
9	✓	X	✓	X	X	-
10	✓	X	✓	X	X	-
	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo

Vzhledem k tomu, že data byla získána za pomoci vizuální kontroly komůrek, je třeba ukázat strukturu kanálků v čípech. Fotografie budou obsahovat kanálky nejprve naplněné roztokem PBS a poté kanálky v jejichž komůrkách vznikly membrány.



Obrázek 8: Kanálek o šířce 300 μm (vlevo – naplněný roztokem PBS; vpravo – s membránami)

Takto široké kanálky bylo obtížné zachytit celé, a to z toho důvodu, že je objektiv nastaven na příliš velké zvětšení. Avšak při tomto zvětšení lze dobře vidět rozhraní membrán.



Obrázek 9: Kanálky o šířce 200 µm (vlevo – naplněný roztokem PBS; vpravo – s membránami)

Na rozdíl od kanálků o šířce 300 µm, lze u těchto kanálků pozorovat jejich strukturu lépe, což také umožňuje lepší pohled na stav membrán.



Obrázek 10: Kanálky o šířce 100 µm (vlevo – naplněný roztokem PBS; vpravo – naplněný roztokem lecitinu v hexadekanu)

Kanálek vpravo je příklad toho, jak vypadá hexadekan, když prochází kanálkem. Je to vcelku vzácný obrázek, protože většinou hexadekan proteče dříve, než je možné ho vyfotit. U těchto kanálků nebyl pozorován vznik membrán.

5.3 Průtok 500 nl·min⁻¹

Při průtoku 500 nl·min⁻¹ se v komůrkách čipů o šířce kanálků 300 μm bez problémů a konzistentně tvořily membrány. Při takto nastaveném průtoku neměly vzniklé membrány žádnou tendenci praskat. Pro takto široký kanálek se daný průtok zdá být velice vhodný, a to díky vcelku rychlé tvorbě membrán a zároveň jejich dobré stabilitě. Avšak takto široké kanálky by mohly komplikovat pozorování při dalších experimentech, jelikož by se musely pozorovat s menším zvětšením.

U kanálku o šířce 200 μm už byl zvolený průtok příliš velký na to, aby byly nataženy jakékoliv membrány. Během pozorování to však vypadalo, že při průchodu hexadekanu čipem a následném průchodu PBS, by se membrány mohly utvořit, jelikož byl hexadekan zachycen na okrajích komůrek. To je pravděpodobně tím, že se daný průtok blíží mezní rychlosti, při které by se membrány už začaly tvořit.

U šířky 100 μm se opět žádné membrány nevytvořily z toho důvodu, že hexadekan vždy kanálkem prošel tak velkou rychlostí, že to bylo obtížné zaznamenat. Většinou se hexadekan s lecitinem rozdělil na více kusů (ve formě bublin nebo emulze – viz Obrázek 11) pravděpodobně z toho důvodu, že s takto nastaveným průtokem byl proud příliš turbulentní na to, aby mohl zůstat v jednom celku. Výjimkou bylo jedno měření, kdy hexadekan částečně reguloval průtok, což vedlo ke vzniku membrán.



Obrázek 11: Emulze v malém kanálku

Tabulka 2: Procentuální vyjádření vytvořených a prasklých membrán při rychlosti průtoku 500 nl·min⁻¹

Šířka [μm]	500 nl·min ⁻¹					
	1. místo		2.místo		3.místo	
100	33,33 %	100 %	33,33 %	100 %	16,67 %	100 %
200	0 %	-	0 %	-	0 %	-
300	100 %	16,67 %	100 %	6,67 %	60 %	0 %
	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo

5.4 Průtok 300 nl·min⁻¹

V čípech se šířkou kanálků 300 μm se při daném průtoku jednoduše tvořily membrány. V porovnání s průtokem 500 nl·min⁻¹ nebyl v podstatě žádný rozdíl, což znamená, že optimální průtoky pro kanálky s danou šířkou jsou v rozmezí 500-300 nl·min⁻¹. Avšak u některých měření hexadekan čipem neprotékal optimálně, což ovlivnilo tvorbu membrán. Proto výsledky vypadají v některých místech nekonzistentně.

V případě čipů s kanálky o šířce 200 μm se při průtoku 300 nl·min⁻¹ již začaly tvořit membrány a vznikaly vcelku rychle. Avšak obdobně jak u předchozí šířky se objevil problém ve formě fragmentovaného hexadekanu, který ve dvou případech narušil měření. Z pozorování, ale vyplývá, že při daném průtoku by za normálních podmínek membrány měly vznikat konzistentně a disponovat dobrou stabilitou. Problém fragmentovaného hexadekanu je dále diskutován v kapitole 5.6.

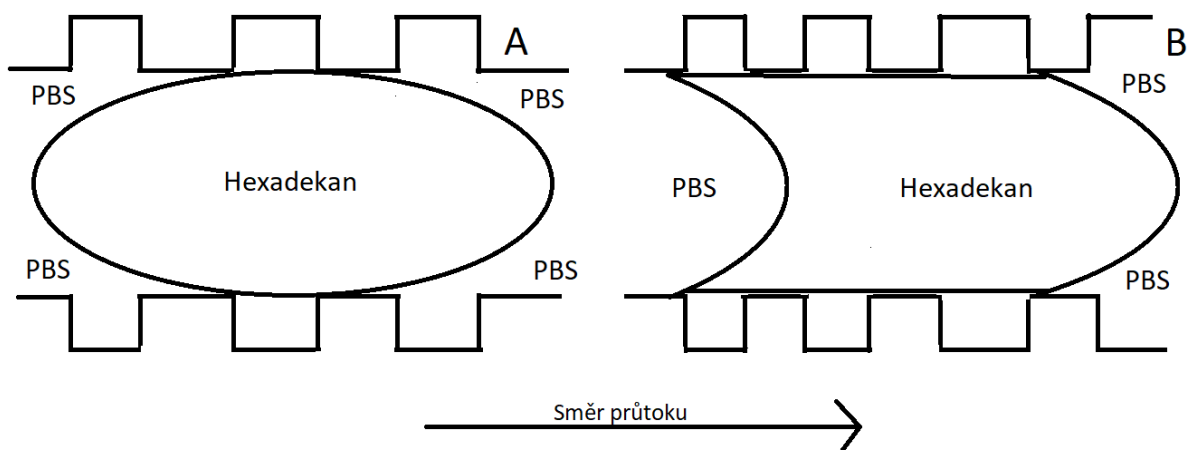
V kanálcích o šířce 100 μm se obdobně jak při průtoku 500 nl·min⁻¹ membrány nevytvářely. Avšak tentokrát bylo při pozorování možné spatřit procházející hexadekan s lecitinem. Opět nastávala fragmentace hexadekanu.

Tabulka 3: Procentuální vyjádření vytvořených a prasklých membrán při 300 nl·min⁻¹

Šířka [μm]	300 nl·min ⁻¹					
	1. místo		2.místo		3.místo	
100	0 %	-	0 %	-	0 %	-
200	83,33 %	40 %	100 %	46,67 %	100 %	50 %
300	93,33 %	0 %	96,67 %	0 %	66,67 %	5 %
	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo

5.5 Průtok 100 nl·min⁻¹

Při tomto průtoku se v nejširších kanálcích membrány přestaly tvořit. Při pozorování byly kanálky ve dvou případech bez známek jakéhokoliv průtoku, a to i přesto, že byly předem napuštěny roztokem PBS a tím pádem funkční. Po měření byl proto přenastaven průtok na 500 nl·min⁻¹, načež hexadekan bez komplikací prošel čipem. V jednom případě však hexadekan kanálkem prošel, nicméně při jeho průchodu nenabýval svého běžného tvaru. Měl spíše konvexní tvar místo svého normálního konkávního tvaru. Dotýkal se komůrek, ale membrány se netvořily, jelikož se vždy od komůrek odtrhl, z toho důvodu, že PBS hnal hexadekan středem, a ne jeho okraji, což byl běžný případ. Bylo to pravděpodobně způsobeno tím, že hexadekan má rozdílnou hustotu a viskozitu od roztoku PBS, což znamená, že je třeba vynaložit více energie k tomu, aby hexadekan snadno protékal.



Obrázek 12: A – normální (konkávní) tvar hexadekanu; B – konvexní tvar hexadekanu (tvary se vztahují na první rozhraní ve směru průtoku)

U kanálků o šířce 200 μm se membrány tvořily, ale nekonzistentně. Opět se vyskytnul problém v podobě fragmentovaného hexadekanu, který značně narušoval pozorování, což vedlo k nepravidelným výsledkům. Avšak jedno měření proběhlo bez tohoto problému, přičemž membrány se utvořily na všech místech a byly vcelku stabilní. Na základě toho lze usoudit, že tento průtok je pro tyto kanálky stále vhodný.

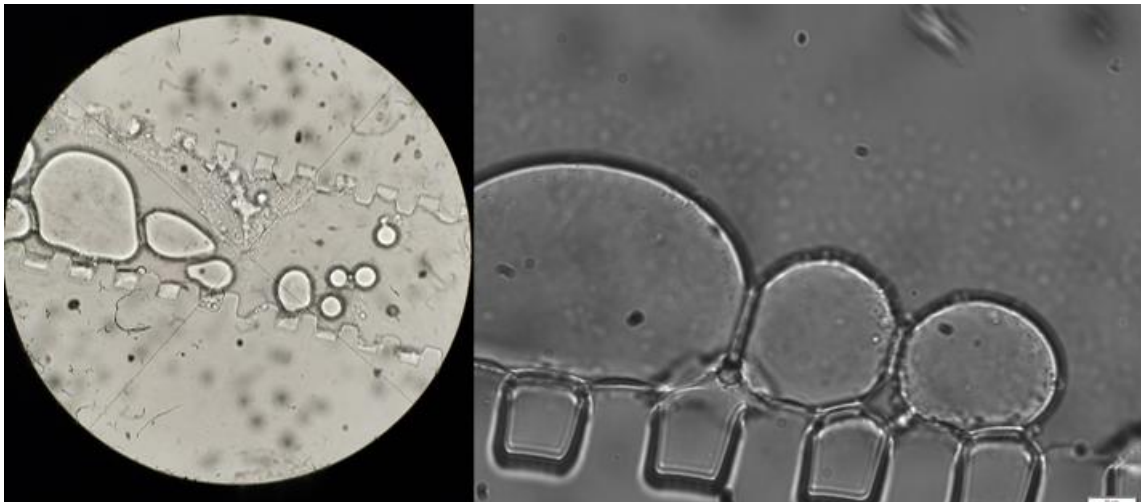
U šířky kanálků 100 μm se opět membrány neutvořily. To znamená, že všechny zvolené průtoky byly příliš velké na takto malé kanálky. Nicméně s těmito kanálky se špatně pracuje. Při zapojování pumpy byly velmi citlivé na jakoukoliv manipulaci se stříkačkou, což často znemožňovalo měření. Takto malé kanálky se na začátku pozorování hůře objektivem hledaly. Další nevýhodou je to, že k tomu, aby v nich byly nataženy membrány, by se muselo pracovat s velmi malým průtokem, který by se obtížně nastavoval.

Tabulka 4: Procentuální vyjádření vytvořených a prasklých membrán při $100 \text{ nl}\cdot\text{min}^{-1}$

Šířka [μm]	100 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$					
	1. místo		2.místo		3.místo	
100	0 %	-	0 %	-	0 %	-
200	100 %	0 %	33,33 %	30 %	33,33 %	70 %
300	0 %	-	0 %	-	0 %	-
	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo	Vytvořeno	Prasklo

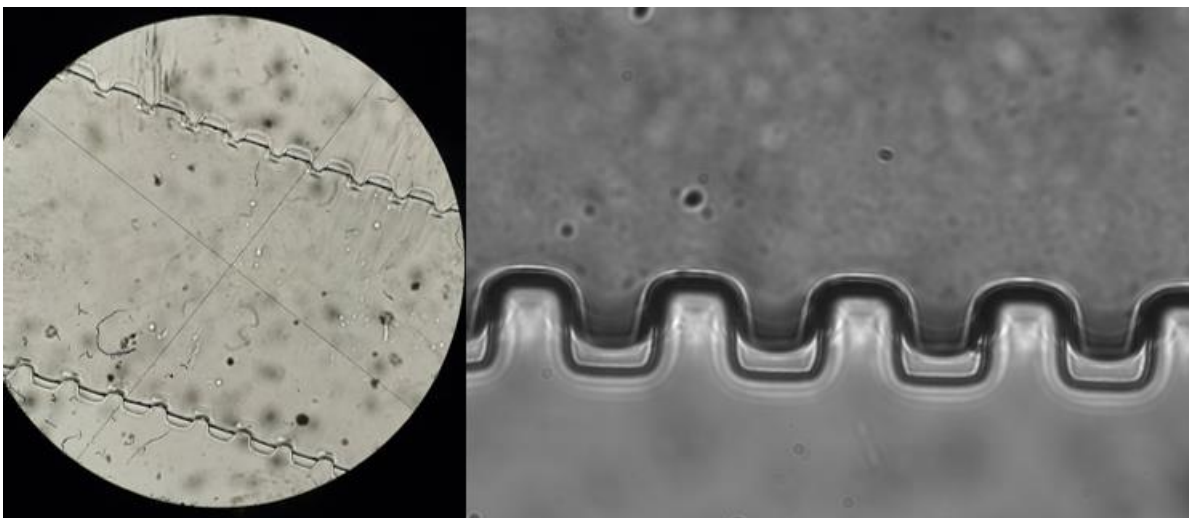
5.6 Problémy objevené během pozorování

Nejčastějším problémem byla fragmentace hexadekanu, která doprovázela značnou část měření. Hexadekan se rozděloval na menší části ve formě bublin nebo tvořil emulzi, která neměla schopnost tvořit membrány. Ve formě bublin tuto schopnost neměl, a to i když velmi často přicházel do kontaktu s komůrkami, a to z toho důvodu, že se při průchodu kanálkem od komůrek odtrhával, místo toho, aby byla správně natažena membrána. V případě, že se membrány utvořily, narušoval jejich stabilitu, čímž je přiměl předčasně prasknout.

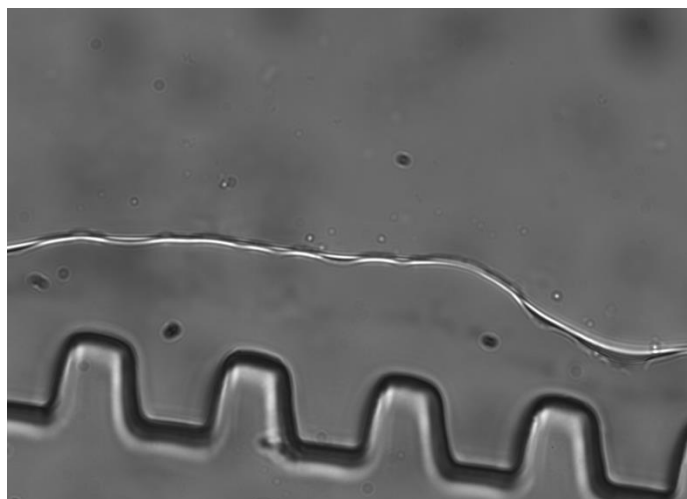


Obrázek 13: Části hexadekanu v kanálku

Nejvíce se tento problém objevoval u kanálků o šířce 100 μm , méně u 200 μm a málokdy u 300 μm . Tato fragmentace byla pravděpodobně způsobena tím, že hexadekan zablokoval vstupní otvor, čímž způsobil to, že vznikl nátlak, který po dosažení určité hranice protlačil hexadekan do čipu, a tím ho rozdělil na více částí. V jednom vzácném případě vyobrazeném na Obrázek 12 část hexadekanu regulovala průtok, zatímco druhá část prošla kanálkem a vytvořila membrány, přestože při žádném průtoku se membrány netvořily. Každopádně hexadekan byl občas schopný zablokovat i výstupní otvor, což způsobilo to, že hexadekan, který ještě procházel kanálkem se v něm zastavil a buď pod tlakem začal zaplňovat komůrky místo roztoku PBS (viz Obrázek 14) nebo proud roztoku PBS začal protékat kolem hexadekanu, a tak ho odtrhával od komůrek (viz Obrázek 15).



Obrázek 14: Hexadekan zablokovaný uvnitř kanálku



Obrázek 15: Roztok PBS, který protéká kolem hexadekanu

Méně častý problém se vyskytoval ve formě uzamykacího mechanismu pumpy. Při zapojování stříkačky k pumpě se musí uzamknout ta část, která posouvá její píst. Při uzamknutí této části byl píst občas posunut dozadu, což způsobilo to, že do hadičky byl zanesen vzduch, nebo dopředu, kdy byl z hadičky vypuštěn malý objem lecitinu v hexadekanu. Tento problém lze jednoduše vyřešit tak, že se při zapojování stříkačky její hadička nechá ponořená v roztoku hexadekanu, mechanismus se uzavře a stříkačka je buď naplněna menším objemem lecitinu v hexadekanu, nebo je opět vypuštěn malý objem tohoto roztoku. Nicméně tímto řešením, vzniká jiný problém, a to ten, že v hadičce bude nekonzistentní objem lecitinu v hexadekanu, což mění jeden z parametrů měření, který by měl zůstat neměnným.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provést statistiku vzniku a stability biomembrán natažených v mikrofluidních čípech o různých šířkách kanálků a při různých průtocích. Na základě tohoto zadání byla zpracována rešerše na strukturu a složení buněčné membrány, jejich mikrofluidních modelů a způsobů, jak ji vytvořit v mikrofluidních čípech. Na základě poznatků z předchozích prací [4,25] byl také sestaven i způsob výroby čipů a vhodných materiálů k této výrobě.

V experimentální části byla provedena statistika vzniku a stability buněčných membrán u kanálků o šířkách 300, 200 a 100 μm . Pro každou šířku byla získána data při průtocích 500, 300 a 100 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$. Bylo zjištěno, že pro kanálky o nejmenší šířce není vhodný ani jeden ze zvolených průtoků, jelikož se v nich membrány za těchto podmínek netvořily. S těmito kanálky se obtížně pracuje z důvodu jejich citlivosti k sebemenší interakci s pístem stříkačky. Byl u nich také pozorován větší odpor k průtoku od hexadekanu. U kanálků o šířce 200 μm se membrány tvoří při průtocích 300 a 100 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$, přičemž jsou relativně stabilní. Tento kanálek je vhodný pro pozorování několika buněčných membrán zároveň, díky své šířce, která je k tomu ideální. Pro kanálky o šířce 300 μm jsou průtoky 500 a 300 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$, optimální pro tvorbu stabilních membrán. Nicméně jejich velikost znemožňuje lepší pohled na vícero membrán v jeden moment, což může mít negativní vliv na pozorování v průběhu experimentu.

Při pozorování došlo k problémům ve formě neprůchozích čipů, ačkoliv byly předem zkontrolovány a bylo u nich potvrzeno, že jsou průchozí. To bylo způsobeno zablokováním vstupního otvoru hexadekanem, jelikož kladl odpor ke vstupu do menších kanálků. Dalším problémem bylo to, že při uzamčení jedné část pumpy došlo k pohybu pístu stříkačky, čímž ji buď naplnila vzduchem nebo vypustila malé množství roztoku z hadičky.

Možným řešením problému fragmentace hexadekanu by mohlo být definování přesného objemu lecitinu v hexadekanu, při kterém tento problém vzniká. Dále by bylo třeba prozkoumat rozpouštědla, která by dokázala nahradit hexadekan. Ideálně rozpouštědla, která mají viskozitu a hustotu, blízkou se fyziologickému roztoku neboli pufru PBS. Potom je ještě důležité zjistit celý interval rychlostí průtoků, ve kterém jsou membrány schopny být nataženy. Potom by bylo třeba najít způsob, jak zlepšit opakovatelnost měření. To by zahrnovalo přesnější dávkování hexadekanu do hadičky a další měření, která by nám pomohla definovat při jaké kombinaci šířky kanálku a rychlosti průtoku vznikají stabilní membrány.

7 ZDROJE

- [1] BENEŠOVÁ, Marika. *Odmaturuj! z biologie. 2., přeprac. vyd.* Brno: Didaktis, c2013. *Odmaturuj!*. ISBN 978-80-7358-231-9.
- [2] ALBERTS, B., A. Johnson, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER. *The Lipid Bilayer. Molecular Biology of the Cell 4th edition* [online]. 2002 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- [3] HRSTKA, Miroslav. *Biologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, 135 s.
- [4] VARGOVÁ, A. *Pokročilé membránové systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [5] BAILEY, Regina. *Cell Membrane Function and Structure*. Online. ThoughtCo. 2019, 7.10.2019. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/cell-membrane-373364>. [cit. 2024-03-28].
- [6] TEPLÁ, Milada. *Studiumbiochemie*. Online. 2013. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/bunka4.html>. [cit. 2024-04-13].
- [7] COLINKS, A. Terrence. *Essentials of micro- and nanofluids: With Applications to the Biological and Chemical Sciences* [online]. 32 Avenue of the Americas, New York, NY 10013-2473, USA: Cambridge University Press, 2013 [cit. 2023-05-19]. ISBN 978-0-521-88168-5. Dostupné z: https://books.google.com/books?id=fWeXMwX1x8C&printsec=frontcover&hl=cs&source=gsb_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [8] *Microfluidics and microfluidic devices: a review* [online]. Elveflow. [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>
- [9] OBRÁTIL, V. *Využití mikrofluidních systémů pro studium živočišných buněk* [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/otzh0/BP_Obratil_IS.pdf
- [10] Člověk a energie. Online. 2019. Dostupné z: https://home.zcu.cz/~novakm42/clovek_a_energie-KKE-CE_2019_2020/CE_4_cviceni_podklady.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [11] HOLMES, DP. *Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity* [online]. [cit.2023-05-19]. Dostupné z: http://www.bu.edu/moss/files/2015/08/Sapienza2015_Microfluidics.pdf
- [12] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss, 2001. ISBN 0-471-25391-X.
- [13] PLÁŠEK, Jaromír. *Nové metody optické mikroskopie. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie* [online]. 1996, **41**(1), 1-24 [cit. 2023-05-23]. Dostupné z: https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf
- [14] SEDLMAJEROVÁ, Aneta. *Fluorescenční mikroskopie živých buněk* [online]. 2014 [cit. 2023-05-24]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/57770/SedlmajerovaA_Fluorescenc%4%8dn%c3%ad%20mikroskopie_KK_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Bakalářská. Fakulta chemicko-technologická: Univerzita Pardubice. Vedoucí práce RNDr. Karel Královec, Ph.D.
- [15] PELC, Pavel. *STUDIUM DOBY ŽIVOTA A SPEKTRÁLNÍCH ZMĚN FLUORESCENCE NANOČÁSTIC V BUNĚČNÉ BIOLOGII* [online]. 2015 [cit. 2023-05-24]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/112699970-Studium-doby-zivota-a-spektralnich-zmen-fluorescence-nanocastic-v-bunecne-biologii.html>. Diplomová. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Vedoucí práce Ing. Vratislav Čmiel.

- [16] VENEROVÁ, Tereza. *INTERAKCE HYALURONANU A AMFIFILNÍCH MOLEKUL*. Dizertační. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013.
- [17] HWANG, Jun Yeon, Prof. Dr. Sangdeok SHIM a Prof. Dr. Gil Tae HWANG. 4',5'-Bis(dimethylamino)fluorescein Exhibits pH-Dependent Emission Behavior Distinct From That of Fluorescein. *Asian Journal of Organic chemistry*. 2018, **7**(1). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/ajoc.201700577>
- [18] Spectrum [Fluorescein]. *AAT Bioquest* [online]. [cit. 2023-05-24]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fluorescein>
- [19] VOLDMAN, Joel, Martha L. GRAY a Martin A. SCHMIDT. Microfabrication in Biology and Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 1999, **1999**(1), 401-425 [cit. 2023-05-27]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.1.1.401>
- [20] HAMOUNI, Samia; AROUS, Omar a ABDESSEMED, D. Alcohol and Alkane Organic Extraction Using Pervaporation Process. Online. *Macromolecular Symposia*. 2019, roč. 386, č. 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/masy.201800247>. [cit. 2024-03-28].
- [21] MALÝ, Jan. *Biosensory a mikrofluidní systémy* [online]. 2018 [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: https://moodle.fzp.ujep.cz/pluginfile.php/10217/mod_resource/content/1/F6_Biosensory%20a%20mikrofluidn%C3%AD%20syst%C3%A9my.pdf. Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem.
- [22] WOLF, Marc P., Georgette B. SALIEB-BEUGELAAR a Patrick HUNZIKER. PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2018, (83), 97-134 [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.001>
- [23] SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists Society* [online]. 1981, (58), 889–892 [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02659652>
- [24] *Soy Phospholipids* [online]. [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/11145>
- [25] HALUZOVÁ, Kateřina. *Mikrofluidní modely buněčných membrán*. 2021. Bakalářská. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. Ing. Miloslav Pekař CSc.
- [26] KARA, Sezgin, Sergii AFONIN, Oleg BABII, Anton N. TKACHENKO, Igor V. KOMAROV a Anne S. ULRICH. Diphytanoyl lipids as model systems for studying membrane-active peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2017, (1859), 1828-1837 [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.003>
- [27] MONTAL, M. a P. MUELLER. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1972, **69**(12), 3561-3566 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3561>
- [28] KONGSUPHOL, Patthara, Kok Boon FANG a Zhipeng DING. Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2013, **185**, 530-542 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.119>
- [29] TAMM, L. K. a H.M. MCCONNELL. *Supported Phospholipid Bilayers* [online]. 1985, **47**(1), 105-113 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: [https://www.cell.com/biophysj/pdf/S0006-3495\(85\)83882-0.pdf](https://www.cell.com/biophysj/pdf/S0006-3495(85)83882-0.pdf)
- [30] CASTELLANA, Edward T. a Paul S. CREMER. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* [online]. 2006, **61**(10), 429-444 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>

- [31] ORTH, R.N., J. KAMEOKA, W.R. ZIPFEL, W.W. WEBB a T.G. CLARK. Creating Biological Membranes on the Micron Scale: Forming Patterned Lipid Bilayers Using a Polymer Lift-Off Technique. *Biophysical Journal* [online]. 2003, **85**(5), 3066-3073 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74725-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74725-0)
- [32] REBAUD, Samuel, Ofelia MANITI a Agnès P. GIRARD-EGROT. Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie* [online]. 2014, **107**(Part A), 135-142 [cit. 2023-05-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>
- [33] ZAGNONI, Michele. Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(6), 1026-1039 [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1039/C2LC20991H>
- [34] PANTOJA, Rigo, Daniel SIGG, Rikard BLUNCK, Francisco BEZANILLA a James R. HEATH. Bilayer Reconstitution of Voltage-Dependent Ion Channels using a Microfabricated Silicon Chip. *Biophysical Journal* [online]. 2001, **81**(4), 2389-2394 [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75885-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75885-7)
- [35] GÓRZNY, M.L., N.L. OPARA, V.A. GUZENKO, H. SCHIFT a C. PADESTE. Microfabricated silicon chip as lipid membrane sample holder for serial protein crystallography. *Micro and Nano Engineering* [online]. 2019, **3**, 31-36 [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.03.002>
- [36] OTA, Sadao, Hiroaki SUZUKI a Shoji TAKEUCHI. Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays. *Lab on a Chip* [online]. 2011, **11**(15), 2485-2487 [cit. 2023-06-02]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1039/C1LC20334G>
- [37] GUANGMING, Li, Guangming LI, Nan XIANG, Xing HUANG a Kota SHIBA. Microfluidic Production of Autofluorescent BSA Hydrogel Microspheres and Their Sequential Trapping for Fluorescence-Based On-Chip Permanganate Sensing. *Sensors* [online]. 2020, **20**(20), 5886 [cit. 2023-06-03]. Dostupné z: doi:10.3390/s20205886
- [38] LIAO, Zerong, Jianfeng WANG, Pengjie ZHANG, Yang ZHANG, Yunfei MIAO, Shimeng GAO, Yulin DENG a Lina GENG. Recent advances in microfluidic chip integrated electronic biosensors for multiplexed detection. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **121**, 272-280 [cit. 2023-06-03]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.061>
- [39] ZHAO, Xuefei, Wanlei GAO, Jiawen YIN, et al. A high-precision thermometry microfluidic chip for real-time monitoring of the physiological process of live tumour cells. *Talanta* [online]. 2021, **226**, 122101 [cit. 2023-06-03]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122101>
- [40] TIEN, H. Ti a Angelica L. OTTOVA. The lipid bilayer concept and its experimental realization: from soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. *Journal of Membrane Science* [online]. 2001, **189**(1), 83-117 [cit. 2023-06-04]. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00394-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00394-5)
- [41] ZHANG, Yu, Hazel BRACKEN, Cheryl WOOLHEAD a Michele ZAGNONI. Functionalisation of human chloride intracellular ion channels in microfluidic droplet-interface-bilayers. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, **150**, 111920 [cit. 2023-06-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111920>
- [42] YANG, Hui a Martin A.M. GIJS. Micro-optics for microfluidic analytical applications. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, **47**(4), 1391-1458 [cit. 2023-06-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1039/C5CS00649J>
- [43] SÁNDEZ, Natália, Antonio CALVO-LOPEZ, Susan S.M.P. VIDIGAL, Antonio O.S.S. RANGEL a Julián ALONSO-CHAMARRO. Automated analytical microsystem for the

- spectrophotometric monitoring of titratable acidity in white, rosé and red wines. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1091**, 50-58 [cit. 2023-06-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.052>
- [44] MAN, Yan, Meijing BAN, An LI, Xinxin JIN, Yuanfang DU a Ligang PAN. A microfluidic colorimetric biosensor for in-field detection of Salmonella in fresh-cut vegetables using thiolated polystyrene microspheres, hose-based microvalve and smartphone imaging APP. *Food Chemistry* [online]. 2021, **354**, 129578 [cit. 2023-06-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129578>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CLIC ₁	Chloridové iontové kanálky
COC	Cyklické olefinové kopolymery
DPhPC	1,2-difytanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
PBS	Phosphate buffer saline; Fosfátový pufr
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMMA	Polymethylmetakrylát
SPQ	6-Methoxy-N-(3-Sulfopropyl)Quinolinium
tBLM	Tethered bilayer lipids membranes; Vázané lipidové membrány