

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2023

Bc. Kateřina Haluzová



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

VÝVOJ MIKROFLUIDNÍHO ČIPU PRO MODELOVÁNÍ FOSFOLIPIDOVÝCH MEMBRÁN

MICROFLUIDIC CHIP DEVELOPMENT FOR PHOSPHOLIPID MEMBRANE MODELING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA HALUZOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. TEREZA VENEROVÁ, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1841/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Haluzová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vývoj mikrofluidního čipu pro modelování fosfolipidových membrán

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma využití mikrofluidních čipů pro modelování a výzkum fosfolipidových membrán. Zaměřit se na složení modelových membrán a metody jejich vytvoření uvnitř čipu.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodné postupy vedoucí k vytvoření modelové membrány uvnitř funkčního mikrofluidního čipu. Ověření těchto postupů v praxi.
3. Zhodnocení výsledků z hlediska úspěšnosti tvorby modelové membrány. Návrh navazujících experimentů, případně návrh řešení problémů při vytváření membránových modelů.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Kateřina Haluzová
studentka

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou fosfolipidových membrán a jejich modelací v mikrofluidním prostředí. Popisuje složení a jeho vliv na strukturu buněčných membrán a definuje matematicko-fyzikální model pro charakterizaci prostředí mikrofluidních kanálků. V experimentální části je popsána výroba mikrofluidního čipu a aparatury potřebné pro spolehlivou tvorbu membrán tvořených L- α -fosfatydlcholinem rozpuštěným v hexadekanu. Hlavní důraz je poté kladen na optimalizaci podmínek vzniku tohoto modelu membrány pozorovaným pod fluorescenčním mikroskopem. Povedlo se prokázat správnost matematického modelu a částečně popsat podmínky, za který membrána vzniká i přes velké množství komplikací více popsanych v diskuzi této práce.

SUMMARY

The diploma thesis deals with the issue of phospholipid membranes and their modeling in a microfluidic environment. It describes the composition and its effect on the structure of cell membranes and defines a mathematical-physical model for characterizing the environment in microfluidic channels. Experimental part describes the production of a microfluidic chip and equipment required for reliable formation of membranes formed by L- α -phosphatidylcholine dissolved in hexadecane. The main emphasis is then placed on optimizing the conditions for the formation of this specific membrane model observed under a fluorescence microscope. We have succeeded in proving the correctness of the mathematical model and in partially describing the conditions under which the membrane is formed despite a large number of complications described in more detail in the discussion of this thesis.

KLÍČOVÁ SLOVA

fosfolipidová membrána, mikrofluidní čip, matematický model

KEYWORDS

phospholipid membrane, microfluidic chip, mathematical model

HALUZOVÁ, K. *Vývoj mikrofluidního čipu pro modelování fosfolipidových membrán*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2023. 53 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

Bc. Kateřina Haluzová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní Ing. Tereze Venerové, Ph.D. za vedení celé práce a přátelský přístup, za podporu a nadhled, když to nebylo lehké, a za humor a smích, který celou práci provázel ať už se dařilo více nebo méně. Déle děkuji panu Filipu Volfovi za natočení a zpracování návodného videa v příloze této práce. Poděkování patří také studentům, které jsem učila postup výroby čipů, díky kterým jsem se naučila lépe vysvětlovat a více přemýšlet nad různými částmi problematiky v mikrofluidice, a kteří přinesli hodnotné nápady pro další vylepšení čipů. Děkuji také své rodině, příteli a přátelům, kteří při mě celou dobu studia stáli a pomáhali mi. Bez vás by to nešlo, děkuji.

Bc. Kateřina Haluzová

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Buněčná membrána	7
2.1.1	Složení	7
2.1.2	Struktura	9
2.2	Mikrofluidika	12
2.2.1	Fyzikální vlastnosti - proudění kapalin	12
2.2.2	Mikrofluidní čip	14
2.3	Fluorescenční mikroskopie	16
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
3.1	Modely membrán	21
3.2	Složení membrán	22
3.3	Typy membrán	22
3.4	Membrány na čipu	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.2	Použité přístroje	27
4.3	Metody	28
4.3.1	Kompletace čipu a aparatury	28
4.3.2	Roztoky	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1	Výroba čipu a sestavení aparatury	30
5.1.1	Kompletace čipu	30
5.1.2	Spoj mezi stříkačkou a hadičkou	30
5.1.3	Manipulace s roztoky v hadičce	31
5.2	Optimalizace napouštění čipu	32
5.2.1	Optimální výsledky	32
5.2.2	Narušení toku roztoků v čipu	36
5.2.3	Rychlost napouštění roztoků	40
5.3	Roztoky	41
5.3.1	Vodná fáze	43
5.3.2	Organická fáze	43
5.4	Geometrie čipu	44
6	ZÁVĚR	47
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	52
9	SEZNAM PŘÍLOH	53

1. ÚVOD

Fosfolipidová membrána je unikátní struktura, která ohraničuje buňku a zajišťuje transport živin a odpadních látek či komunikaci s okolím. V závislosti na jejím umístění a potřebných funkcích se mění její složení i struktura. Výsledkem je důmyslný, ale velmi komplikovaný systém, který je náročné pozorovat a charakterizovat.

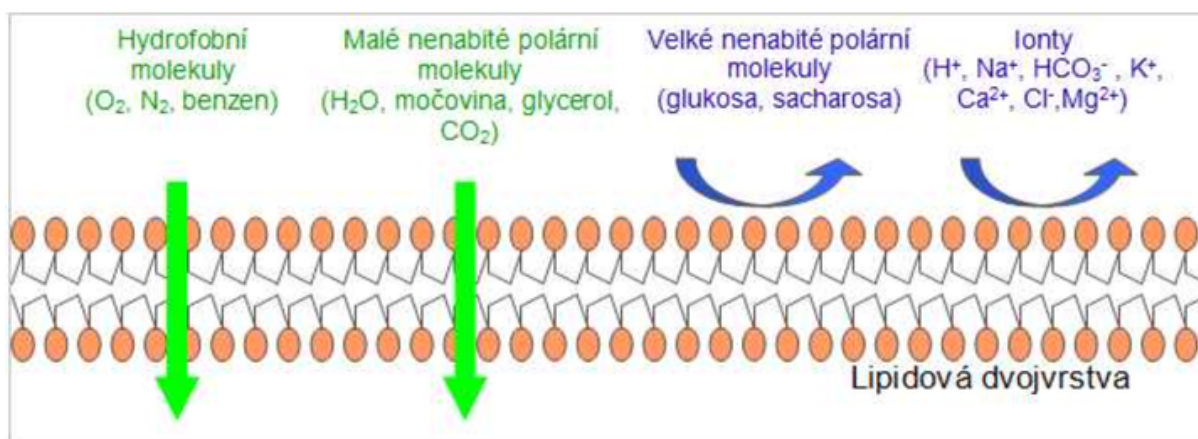
Mikrofluidika a mikrofluidní čipy se nabízí jako vhodná metoda pro výzkum membrán a jejich mechanických vlastností, chemické odolnosti nebo transportu látek. Jejich geometrii lze nastavit podle jevu, který je potřeba měřit, a následně je možné dění v mikrofluidních kanálcích přesně matematicky modelovat.

Tato práce se zabývá rešerší na téma složení a struktura buněčných membrán, charakteristika mikrofluidního prostředí a tvorba zjednodušených fosfolipidových modelů. Pokračuje ve vývoji mikrofluidního čipu a optimalizaci podmínek pro vznik fosfolipidové membrány ve struktuře kanálek a komůrek kolmo k rovině snímání. V tomto uspořádání vytváří zázemí pro studium transportu látek přes transmembránové proteiny, který je jednoduše pozorovatelný pod fluorescenčním mikroskopem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Buněčná membrána

Buňky jsou ohraničeny strukturou, která se označuje jako buněčná nebo plazmatická membrána [1]. Jejím nosným základem je dvojvrstva z lipidů o tloušťce přibližně 8 nm. Podstatou membrány je vytvoření výběrově propustné vrstvy, která odděluje obsah buňky, nebo jejích kompartmentů, od okolí. Tato vlastnost se nazývá selektivní permeabilita a je umožněna díky struktuře a interakcím lipidů. Obsahují hydrofilní hlavičku (např. glycerol s navázaným fosfátem) a hydrofobní konce (mastné kyseliny). Jednotlivé oblasti se na základě hydrofobních interakcí drží při sobě [2]. Dochází tak ke vzniku trojvrstvého systému s hydrofobní oblastí uprostřed, který je po energetické stránce nejvýhodnější. Pokud by membrána neobsahovala další složky, mohly by tak přes ni procházet jen malé nenabitě molekuly (např. kyslík, oxid uhličitý) a buňka by byla po materiální stránce téměř izolována od svého okolí. Hydrofilní, polární molekuly neprojdou přes hydrofobní část, a naopak hydrofobní nepolární látky se zastaví před částí hydrofilní (obrázek 2.1).



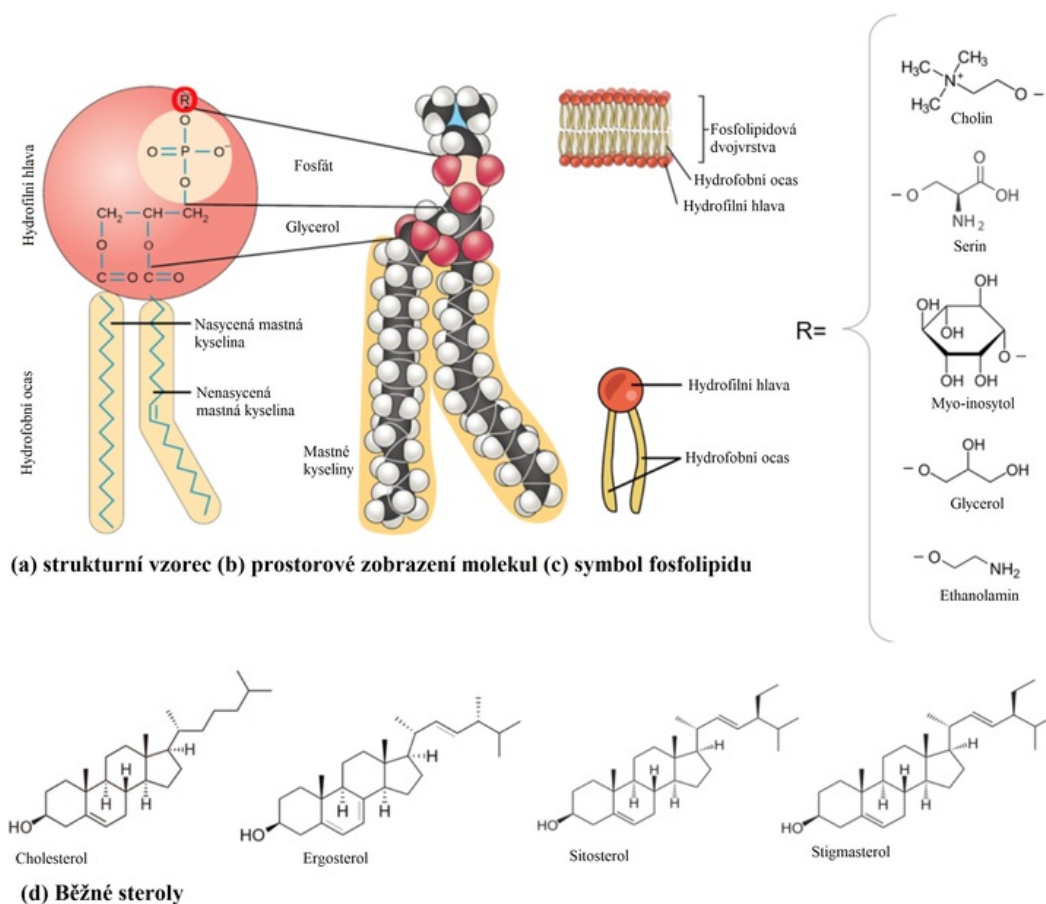
Obrázek 2.1: Transport látek přes membránu pomocí volné difuze [3]

2.1.1. Složení

Vlastnosti a funkce membrány jsou velmi ovlivněny jejím složením. Lipidy jsou zastoupeny v největším počtu a představují základní stavební desku, na kterou se připojují další složky [4]. Nejčastějšími typy lipidů v membránách jsou fosfolipidy, glykolipidy a steroly (obrázek 2.2) [5].

Základem pro většinu molekul lipidů je diacylglycerol (DAG) [5]. Ten se skládá z glycerolu a dvou esterových vazeb na mastné kyseliny, třetí místo může obsahovat např. fosfátovou skupinu nebo sacharid. Počet a struktura mastných kyselin v diacylglycerolu ovlivňuje tvar fosfolipidové vrstvy (podrobněji v kapitole 2.1.2).

Základ tvořený kyselinou fosfatidovou (DAG + fosfátová skupina) na sebe může navázat další složky. Vznikají tak molekuly fosfatidylcholinu, fosfatidylserinu nebo třeba fosfatidylethanolaminu, které všechny spadají do skupiny fosfolipidů.



Obrázek 2.2: Struktura fosfolipidů a běžných sterolů [5]

Skupina fosfatidylcholinu nebo taky lecitinu se nachází hlavně v membránách eukaryotických buněk [5]. Jedná se o fosfolipidy, kde mastné kyseliny zastupují hlavně kyselina stearová a oleová [6]. Jeho hlavová část neobsahuje donory, které by byly schopné tvorby vodíkových můstků a převládají tak elektrostatické interakce [5]. Jedná se například o přitahování mezi pozitivně nabitým cholinem a negativně nabitým fosfátem nebo o odpuzování stejně nabitých částic, přestože se v základě jedná o neutrální molekulu. Lecitin je možné izolovat ze dvou hlavních zdrojů – z vajíček a ze sóji [6]. Hlavní rozdíl je ve složení mastných kyselin a následně jejich vlastnostech nebo zbylých nečistotách po izolaci. Například lecitinu z vaječného žloutku obsahuje 32 % oleové kyseliny, zatímco lecitin ze sóji má 61 % linolové kyseliny. Sójový lecitin mimo základní složky dále obsahuje glukosidované steroly, další triacylglyceroly nebo stopová množství riboflavinu, biotinu a dalších vitamínů. Lecitin jako takový je rozpustný v chloroformu, etheru, minerálních olejích a mastných kyselinách. Naopak nerozpustný je ve vodě a acetonu.

Molekulu alkoholu však nemusí představovat pouze glycerol, ale také např. sfingosin [5]. Na ten se dokáže navázat jedna molekula mastné kyseliny a na centrální dusíkatý

atom se může navázat fosfát. Následně tak vznikají molekuly sfingomyelinu, který je v savčích membránách obsažen ze 2–15 % a v buňkách nervové soustavy je jeho obsah ještě vyšší.

Výměnou fosfátové skupiny za sacharid vznikají glykolipidy, které se nacházejí převážně na vnějším listu fosfolipidové dvouvrstvy [5]. Jejich úkolem je tvořit charakteristickou stopu, která se liší mezi jednotlivými druhy buněk a umožňují organismu rozeznat buněčné struktury od sebe a adekvátně na ně reagovat [1]. Příkladem mohou být druhy krevních skupin A, B, AB a 0 [7]. Na povrchu se vyskytuje skupina sacharidů – antigen, který určuje, zda se jedná o skupinu A, B či jejich kombinaci. Pokud tato skupina přítomna není, jedná se o skupinu 0. V momentě, kdy se do těla dostane krvinka s jiným antigenem, než je tělu vlastní, imunitní systém organismu na základě přítomnosti/absence daného antigenu reaguje tvorbou protilátek a likvidací cizích buněk. Celý proces je možný jen díky přítomnosti sacharidů na povrchu membrány a schopností organismu je rozpoznat.

Steroly jsou skupina lipidů vyskytující se v živočišných a rostlinných buňkách, ale také v houbách [5]. Jedná se o steroidní tetracyklickou strukturu s bočními řetězci a navázanou hydroxylovou skupinou. Čím větší tyto řetězce jsou, tím více je molekula hydrofobní. V živočišných buňkách se vyskytuje cholesterol, který zvyšuje fluiditu membrán při nízkých teplotách. Při fyziologické teplotě zajišťuje naopak jejich tuhost (viz. kapitola 2.1.2). Mimo to cholesterol také zastává regulační funkci v buněčné komunikaci a v transmembránovém přenosu signálu. V eukaryotických buňkách může koncentrace cholesterolu dosahovat až 50 mol.% [8].

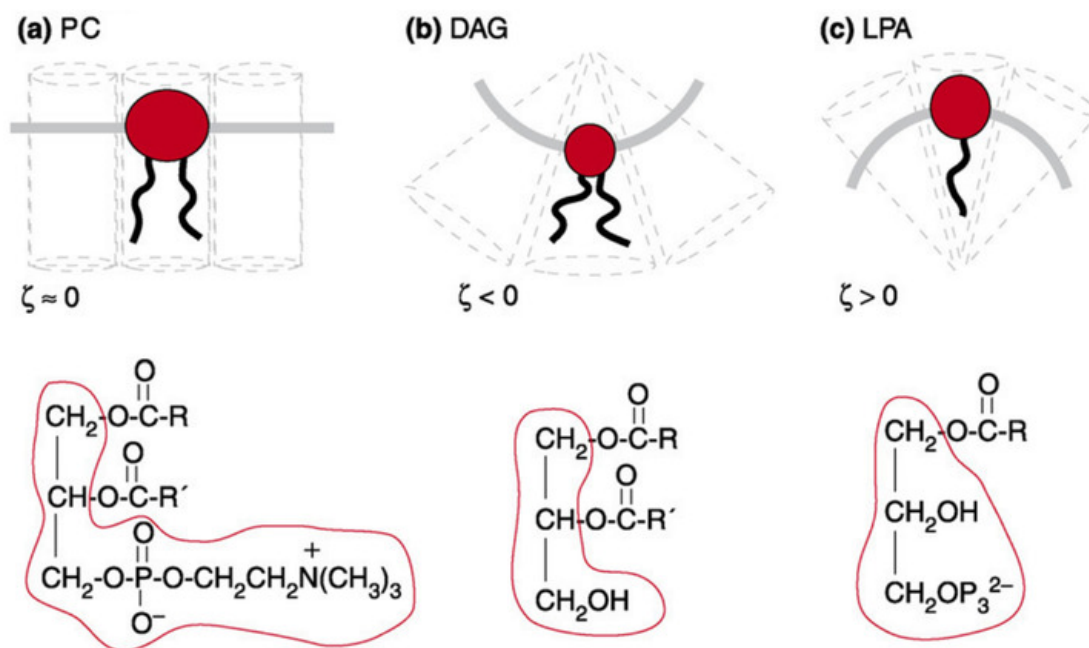
Komunikace buňky s okolím je umožněna i díky přítomnosti proteinů [9]. Existují proteiny přisedlé na membráně – periferní nebo takové, které jsou více zanořené do membrány – integrální [10]. Pokud má protein strukturu β -skládaného listu, často funguje jako pór [9]. Proteiny s α -helikální šroubovicí mohou protínat membránu na více různých místech do různé hloubky v závislosti na množství a délce hydrofobních oblastí. Díky tomu je možný i jiný transport živin a odpadních látek přes membránu než volná difuze (obrázek 2.1). Jedná se o pasivní a aktivní transport (viz. kapitola 2.1.2).

2.1.2. Struktura

Struktura a složení buněčné membrány není u všech buněk stejné [7]. Liší se nejen mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou, ale i na základě svého umístění. Jednodušší prokaryotická membrána na rozdíl od té v eukaryotické buňce například neobsahuje cholesterol a mitochondriální membrána bude mít jiné zastoupení různých lipidů a proteinů než plazmatická membrána na povrchu buňky.

Zakřivení fosfolipidové membrány závisí na složení diacylglycerolu a poměru místa, které zabírá polární hlava a nepolární ocas [5]. Pokud je tento poměr vyrovnaný (např. u fosfatidylcholinu), jedná se o cylindrickou molekulu a molekuly se ve vodném prostředí samovolně uspořádají do lamel. Pokud je však poměr značně nevyrovnaný, membrána se

prohne a spontánně vytváří liposomy. Další faktory, které ovlivňují samovolné uspořádání, jsou také hodnota pH, teplota, iontová síla a délka, počet a nasycenost mastných kyselin (obrázek 2.3).



Obrázek 2.3: Různé možnosti struktury lipidů a následné zakřivení membrány pro (a) fosfatidylcholin a vznik membrány, (b) diacylglycerol a tvorbu inverzní micely, (c) kyselina lysofosfatidová a útvar micely [5]

Biologické membrány neustále mění svůj tvar, což buňkám umožňuje pohyb z místa na místo, buněčné dělení nebo tvorbu vezikul [8]. Tato vlastnost závisí na složení membrány. Jednotlivé lipidy a proteiny nejsou tedy pevně ukotvené, ale dochází u nich k rotacím, laterální difuzi v rovině membrány nebo translokaci mezi oběma vrstvami ("flip-flop" pohyb) [11]. Pro popis těchto pohybů se využívá difuzní koeficient D_L , rotační koeficient D_R a poločas translokace $t_{\frac{1}{2}}$.

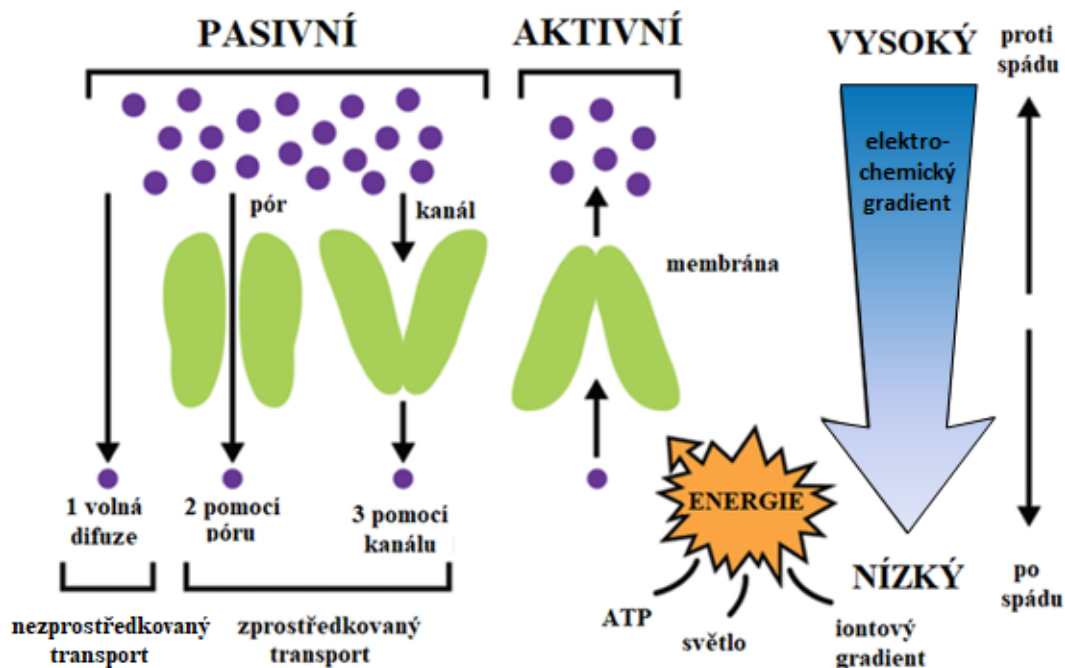
Pevnost membrány je ovlivněna složením lipidů, nasyceností mastných kyselin a také přítomností cholesterolu [8]. Se zvyšující se koncentrací cholesterolu roste i tloušťka membrány, zatímco poměr plochy, kterou zabírají hlavy molekul se zmenšuje [12]. Prostor pro amfoterní částice a esterové skupiny je menší, a tak dochází k tvorbě větších elektrostatických interakcí. Vlivem toho je pohyb lipidů vrstvou membrány náročnější a membrána je tužší. Membrány bohaté na cholesterol jsou tak odolnější vůči různým ohybům a deformacím, kdy tato odolnost lineárně roste od 20 mol.% do 40 mol.% a při 50 mol.% je jen mírně vyšší [8]. Další stabilizace probíhá v momentě, kdy dojde k tvorbě komplexu mezi fosfatidylcholem a cholesterolem za pomoci vodíkových můstků. Na druhou stranu však cholesterol zajišťuje i fluiditu membrány, kdy díky malé velikosti je schopen rychleji laterálně difundovat mezi molekulami lipidů a fluidita se tak zvyšuje.

Kromě složení membrány však záleží i na teplotě a prostředí, ve kterém se nachází [13]. Při experimentu v dvakrát destilované vodě o 27 °C rostl model ohebnosti membrány také od 20 mol.% do 40 mol.%. Pokud však experiment probíhal při teplotě 30-33 °C, tato hodnota významně rostla jen do 30 mol%.

Na buněčné membráně dochází ke vzniku membránového potenciálu, který lze rozdělit na tři části [5]. Povrchový potenciál vzniká mezi vodným roztokem a povrchem membrány jako následek nabitých hlav fosfolipidů a iontů adsorbovaných na povrch membrány. Dipólový potenciál je následkem interakcí mezi molekulami vody a fosfolipidů. Negativní náboj pochází z hlavy fosfolipidu a pozitivní z molekul vody na rozhraní membrána/voda. Transmembránový potenciál je dán rozdílem nábojů mezi roztoky na obou stranách membrány. To způsobuje průchod selektivní iontů transmembránovými proteiny, kdy tyto ionty dorovnávají rozdíl mezi vnějším a vnitřním prostředím.

Jak již bylo zmíněno (kapitola 2.1.1), aktivní a pasivní transport přes membránu je umožněn díky proteinům a jejich struktuře [9]. Pasivní transport probíhá po koncentračním spádu a nevyžaduje dodání energie. Proteinové kanály jsou naplněny vodou a vytvářejí tak hydrofilní prostředí, kterým mohou putovat ionty. Ne všechny jsou však propuštěny. Záleží na jejich velikosti, náboji nebo elektrochemickém gradientu (obrázek 2.4). Kanál také nemusí být vždy otevřený, pokud není např. vytvořený dostatečný membránový potenciál nebo na protein není navázána specifická molekula.

Aktivní transport probíhá proti koncentračnímu gradientu a vyžaduje přísun energie nejčastěji v podobě hydrolýzy ATP [9]. Příkladem takového proteinu může být vápníková pumpa – Ca^{2+} -ATPáza, která odčerpává vápenaté kationty z cytoplazmy do extracelulárního prostoru.



Obrázek 2.4: Znázornění pasivního a aktivního transportu přes membránu [9]

2.2. Mikrofluidika

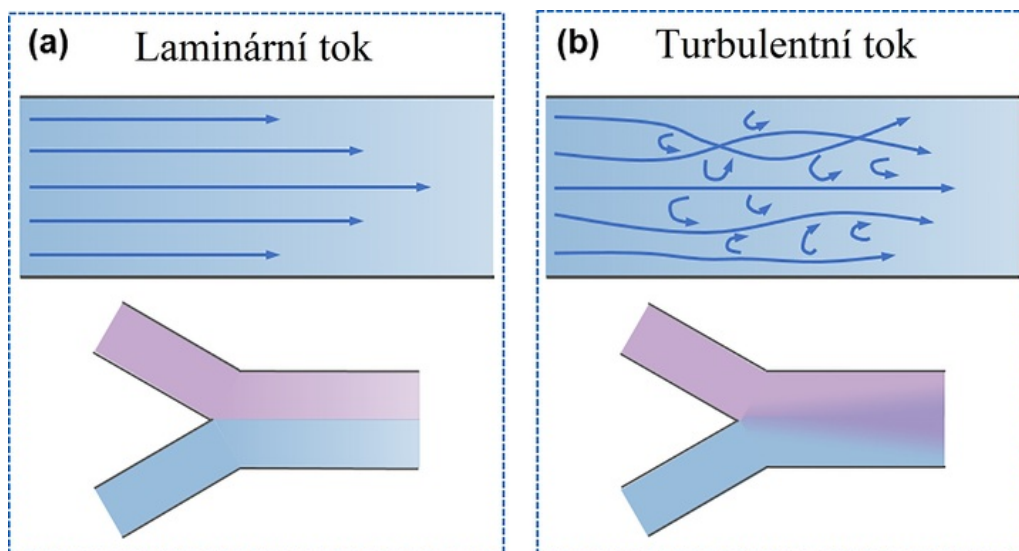
2.2.1. Fyzikální vlastnosti - proudění kapalin

Kapaliny lze dělit na ideální a reálné, kdy ideální kapalina nemá vnitřní tření, není stlačitelná, vypařitelná ani objemově roztažitelná [14, 15]. Další možností dělení kapalin je na newtonovské a neneutronovské. Viskozita newtonovské kapaliny je při daném tlaku a teplotě konstantní a tudíž nezávislá na tečném napětí vyvolaném posunem částic během proudění. Neneutronovské kapaliny mají naopak viskozitu proměnnou a jsou závislé nejen na tečném napětí, ale i na rychlostním spádu.

Proudění kapalin se dá zjednodušeně popsat pomocí velikosti Reynoldsova kritéria (rovnice 2.1) [16]. Pokud je jeho hodnota větší než 2000, jedná se o turbulentní proudění, pro které jsou charakteristické nepravidelné proudnice a dochází k intenzivnímu míchání obsahu kapaliny (obrázek 2.5). V mikrofluidním prostředí je však Reynoldsovo kritérium menší než 2000, což umožňuje laminární tok a kontrolovatelnější prostředí. Nedochozí k míchání proudnic a tudíž vedle sebe mohou proudit dvě různé kapaliny aniž by došlo k jejich vzájemnému promísení.

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu} \quad (2.1)$$

kde Re je Reynoldsovo kritérium, ρ hustota kapaliny, v rychlost kapaliny, d charakteristický protékající průřez (výška kanálku) a μ viskozita kapaliny.



Obrázek 2.5: Porovnání laminárního a turbulentního toku [17]

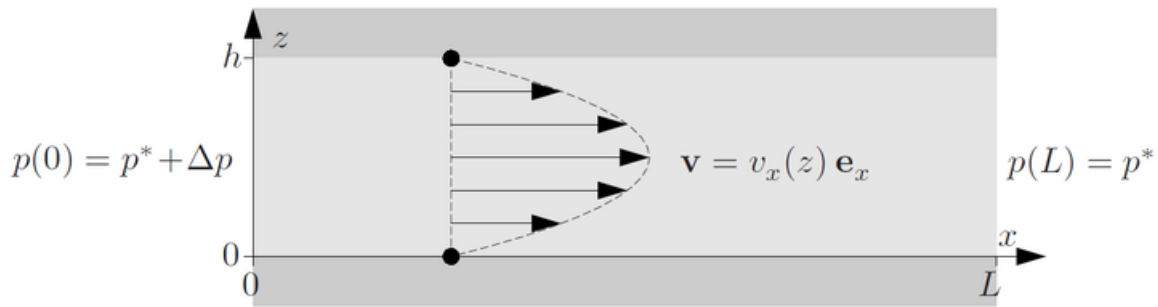
Na popis chování newtonovské nestlačitelné kapaliny v laminárním proudění je možné použít Navier-Stokesovu rovnici (rovnice 2.2) [17]. Rychlost proudící kapaliny se následně vypočítá ze zrychlení kapaliny ($\frac{D\vec{v}}{Dt}$), intenzity objemových sil \vec{E} , gradientu tlaku p , prostorovém rozložení rychlosti \vec{v} , hustoty ρ a koeficientu dynamické viskozity μ .

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = \rho \vec{E} - \text{grad } p + \mu \text{div grad } \vec{v} + \frac{1}{3} \mu \text{grad div } \vec{v} \quad (2.2)$$

Pro využití Navier-Stokesovy rovnice v mikrofluidním systému je však třeba zavést několik úprav [18]. Při proudění kapaliny v nehybném potrubí jakéhokoli tvaru je rychlost kapaliny u stěny nulová, jinak by docházelo ke ztrátě kinetické energie vlivem tření. Gravitační zrychlení působící ve směru osy z je menší než působící gradient hydrostatického tlaku a proto jej lze zanedbat.

Pokud na Navier-Stokesovu rovnici aplikujeme další podmínky, které předpokládají tok kapaliny dlouhým, rovným a pevným potrubím, jež je poháněn rozdílem tlaků na počátku a konci, dostaneme Poiseuilleho tok [18]. Pro charakteristiku jeho chování existuje několik modelů. Pro mikrofluidní čipy používané v této práci je relevantní model dvou paralelních, nekonečných desek. Obě desky jsou nehybné a mezi jejich vstupem a výstupem kapaliny je udržován stabilní tlakový rozdíl. Vlivem všech aplikovaných podmínek vzniká v čele kapaliny rychlostní profil ve tvaru paraboly (obrázek 2.6 a rovnice 2.3).

$$v_x(z) = \frac{\Delta p}{2\eta L}(h-z)z \quad (2.3)$$



Obrázek 2.6: Průřez čela toku kapaliny mezi dvěma nekonečnými, nehybnými deskami v rovině xz o výšce h . Kapalina teče ve směru osy x jako důsledek tlakového spádu mezi počátkem v bodě 0 a délkou desky L [18]

Díky tomu lze vyjádřit objemový průtok Q přes sekci o šířce w jako rovnicí (2.4), což se nazývá Poiseuilleova rovnice. Negativním následkem všech zjednodušení a předpokladů je, že výsledek z takto získané rovnice může dosahovat chyb o velikosti až 23 % pro poměr $(\frac{1}{3}) : (h = \frac{w}{10})$. Pokud se tento poměr dostane na $(\frac{1}{10}) : (h = \frac{w}{10})$, je možné se dostat na odchylku 7 %. Při dalších aplikacích uvedených v literatuře [18] je možné se dostat na odchylku pod 1 %.

$$Q = \int_0^w dy \int_0^h dz \frac{\Delta p}{2\eta L}(h-z)z = \frac{h^3 w}{12\eta L} \Delta p \quad (2.4)$$

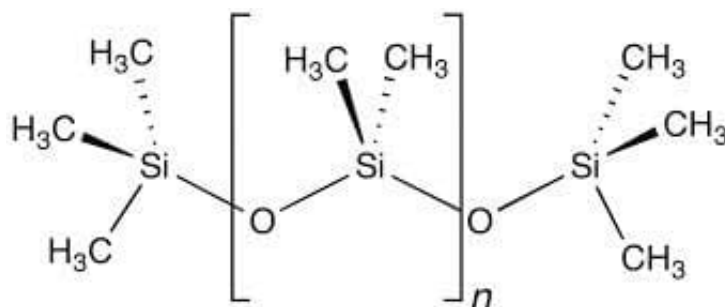
kde Q je objemový průtok, h výška kanálku, w šířka kanálku, η dynamická viskozita, L délka kanálku a Δp tlaková změna.

2.2.2. Mikrofluidní čip

Z předchozí kapitoly (2.2.1) vyplývá, že mikrofluidika a mikrofluidní čipy se zaměřují na manipulaci s tekutinami [18]. Jejich hlavní výhoda spočívá v obrovské redukci objemu vzorku, který je třeba analyzovat. Z litrů a mililitrů se při vhodném nastavení čipu mohou stát mikro- a nanolitry. Nejenže to výrazně snižuje cenu experimentů, ale i umožňuje analýzu tam, kde se vzorky ve větších objemech nedají získat. Se zmenšujícím se objemem následně roste rychlost, za kterou dané měření proběhne. Tato metoda analýzy získává stále větší popularitu ve vědě a jejích různých oblastech - vývoj orgánů na čipu [19], konstrukce mobilního analytického zařízení ovládaného pomocí chytrého telefonu [20] nebo syntéza kvantových teček [21].

Struktura mikrofluidního čipu spočívá ve struktuře kanálků, komůrek nebo jamek, které jsou v široké maximálně několik desítek mikrometrů [22]. Tělo čipu je vyrobeno z různých materiálů (viz. dále v kapitole 2.2.2) a sklíčka. Pomocí systému hadiček a konektorů je čip připojen k mikrofluidní pumpě, která pumpuje roztoky do kanálků. Celková velikost mikrofluidního čipu se pohybuje v rozmezí 1-10 cm a je tak jednoduše přenosný.

Běžným materiálem, ze kterého je možné efektivně a levně vyrobit mikrofluidní čip, je polydimethylsiloxan (PDMS, obrázek 2.7) [23]. Jedná se o elastický polymer, který je zároveň biokompatibilní [24]. Mimo uhlík a vodík obsahuje vazbu mezi křemíkem a kyslíkem, která mu dává vysokou teplotní a chemickou stabilitu. V rozmezí vlnových délek 240–1100 nm je opticky transparentní a díky tomu jej lze aplikovat v optické a fluorescenční mikroskopii. PDMS má velmi nízkou volnou povrchovou energii, což jej dělá hydrofobním a může tak docházet k pasivní adsorpci proteinů a hydrofobních molekul na stěny polymeru. Tento jev je možné snížit pomocí působení plazmatu na povrch PDMS a následným skladování ve vodě až na dobu tří týdnů. PDMS také mohou prostupovat organická rozpouštědla jako triethylamin a pentan, která způsobují jeho bobtnání. Naopak voda, nitromethan nebo acetonitril tento efekt nezpůsobují. PDMS je také permeabilní pro plyny jako O_2 nebo CO_2 . Komerčně dostupná je sada Sylgard 184, která se skládá z polymeru a příslušného síťovacího činidla. Výrobce neuvádí přesné složení, ale článek [24] tvrdí, že směs obsahuje především oligomery dimethylsiloxanu s vinylovými skupinami a platinový katalyzátor.

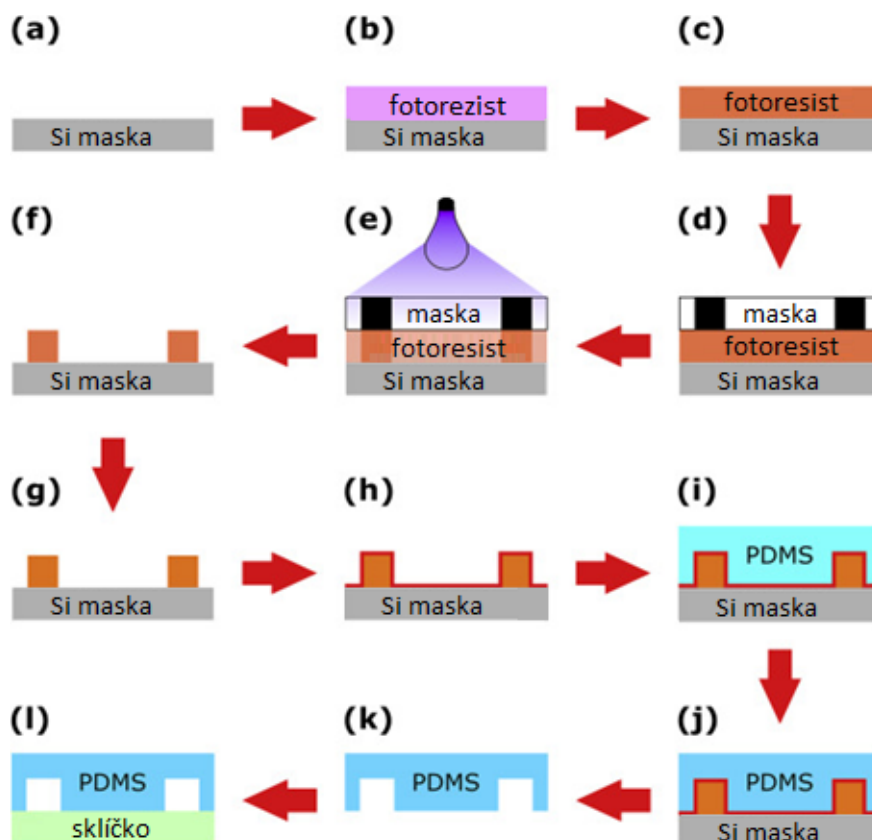


Obrázek 2.7: Vzorec PDMS [25]

Další častou variantou pro materiál mikrofluidního čipu je sklo [23]. Jedná se o je materiál s výbornou transparentností a chemickou i tepelnou odolností. Využívá se pro čipy, ve kterých probíhají vysoce exotermní chemické reakce ($> 1400\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo tam, kde je potřeba zakomponovat elektrické obvody s elektrodami. Mikrofluidní struktura se ve skle vytváří pomocí leptání, které může být buď mokré nebo suché. Při mokřém leptání je na sklo nanesena kyselina fluorovodíková, při suchém je sklo vystaveno proudu plazmy za velmi nízkého tlaku. Tato metoda je však méně používaná, protože vytváří teplotní gradient v materiálu, který ztěžuje kontrolu leptání.

Polymerní čipy lze vyrábět pomocí odlévání na předem vytvořené formy a následného přilepení krycího nebo podložního sklíčka (obrázek 2.8). Metoda, kterou se taková forma vytváří, se nazývá měkká litografie [26]. Na křemíkovou masku se nanese vrstva fotorezistu (obrázek 2.8, část b), která se lehce vytvrdí (obrázek 2.8, část c) a je na ni umístěna tenká folie s předem natištěnou mikrofluidní strukturou (obrázek 2.8, část d). Působením UV světla se požadované části rezistu upraví a přebytečné části se následně odstraní (obrázek 2.8, části e, f). Zbývá struktura se vytvrdí úplně (obrázek 2.8, část g) a maska je připravena k opakovanému použití. Časová náročnost výroby je kolem 24 h. Výhodou této metody je vysoká míra rozlišení a přesnost a také možnost odlévat opakovaně na stejné masce. Velkou nevýhodou je však potřeba čistých prostor a zručný a zkušený personál.

Tato práce se zabývá výrobou a použitím mikrofluidních čipů z polydimethylsiloxanu, proto bude v dalších částech o polymerních čipech zmiňováno jen PDMS. Odlévání polydimethylsiloxanu je jednoduchá metoda, jak získat přesnou kopii mikrofluidní struktury z masky. Po smíchání elastomeru PDMS s patřičným síťovacím činidlem se směs nalije na předem vyčištěnou křemíkovou masku (obrázek 2.8, část i). Během těchto kroků však vznikají ve směsi vzduchové bubliny, které je třeba odstranit [26]. Teoreticky nejsnazší variantou je PDMS vytvrdit v sušárně. Bublínky by díky zvýšenému tlaku uvnitř měly samy stoupat k povrchu PDMS a tam prasknout. Tato varianta je však prakticky nevhodná. PDMS je vysoce viskózní látka, což stoupání bublin výrazně zpomaluje a může se stát, že se PDMS vytvrdí dříve, než se všechny bubliny dostanou pryč. V praxi se tak používá odstranění bublin pomocí vakua, které vytvoří dostatečný tlakový rozdíl mezi bublinami a okolím nad maskou s tekutým polymerem, aby bubliny mohly uniknout.



Obrázek 2.8: Graficky shrnutý postup výroby mikrofluidního čipu z PDMS. (a-h) výroba fotomasky a struktury pro (i-k) odlévání repliky z polydimethylsiloxanu a (l) následné přilepení sklíčka [26]

Vytvrzení PDMS má také několik možných postupů [26]. Nejsnazší a nejlevnější je nechat reagovat polymer se síťovacím činidlem na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 48 h. Rychlejší a preferovanější možností je vytvrzovat PDMS v sušárně při teplotách kolem 100 °C (obrázek 2.8, část l). V takovém případě se jedná o záležitost maximálně několika hodin v závislosti na tloušťce vrstvy polymeru.

Závěrečný krok výroby funkčního mikrofluidního čipu je přilepení sklíčka pomocí plazmy (obrázek 2.8, část j, k) [27]. Podle dostupného vybavení laboratoře je možné použít přístroj, který pracuje za sníženého tlaku a se specifických složením plynů [28] nebo difuzní koplánární povrchový barierový výboj, který funguje za atmosferického tlaku [27]. Oplazmování PDMS i sklíčka vytvoří na jejich povrchu volné radikály, které se po přiložení těchto dvou vrstev na sebe propojí a vytvoří stabilní vazby. Následné umístění do sušárny s vysokou teplotou tuto stabilitu prodlouží až na několik dní.

2.3. Fluorescenční mikroskopie

Atomy a molekuly jsou schopné absorbovat a následně emitovat určitá množství energie [29, 30]. Při absorpci fotonu s vhodnou vlnovou délkou (vhodným množstvím energie) dochází k excitaci elektronu do vyšší energetické hladiny (S_x , T_x) nebo jejich vibračních

2.3. FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

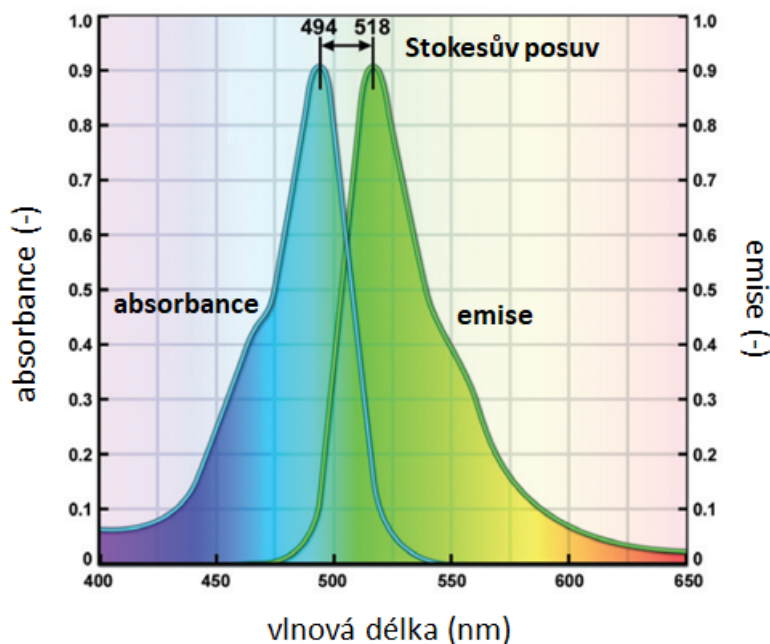
hladin. Toto uspořádání je však nestabilní a elektron se vrací do základního stavu S_0 za emise nyní již přebytečné energie v podobě světla nebo tepla, což vyjadřuje rovnice 2.5. Při světelné emisi dochází k vylovení fotonu o konkrétní vlnové délce a energii. Ta je však vždy nižší nebo rovna původní absorbované energii, protože v průběhu celého procesu dochází k jejím ztrátám. Tento jev se na fluorescenčních spektrech projevuje jako Stokesův posuv, kdy se absorpční a emisní spektra nepřekrývají zcela, ale jen částečně (obrázek 2.9).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.5)$$

kde E je energie, h Planckova konstanta, c rychlost světla a λ vlnová délka.

Obecný název pro výše popsané chování atomů a molekul v reakci na světlo je luminescenční jev a je možné jej rozdělit na fluorescenci a fosforescenci [30]. Ty se od sebe odlišují na základě multiplicity excitovaného stavu, která se u fluorescence zachovává, ale u fosforescence ne. Následkem změny multiplicity je delší doba trvání fosforescence, protože elektron prochází do kvantově-mechanicky zakázaného stavu. Prakticky to znamená, že tento přechod je velmi nepravděpodobný, ale i tak probíhá. Zároveň je tento krok, kdy dochází k inverzi spinu elektronu, nejdéle trvající a určuje tak rychlost celého procesu.

Fluorescence je možnou cestou molekuly, jak přejít z nestabilního excitovaného stavu do stabilního základního stavu aniž by došlo k chemické reakci [30]. Aby molekuly mohly fluoreskovat, musí dojít ke splnění několika předpokladů. Světlo, které má být absorbováno, musí mít takovou vlnovou délku, aby nedošlo k disociaci molekuly. Mezisystémový přechod musí být dostatečně pomalý, aby nezpůsobil velký odliv excitovaných elektronů, které by se mohly deaktivovat fluorescencí. A zároveň je třeba, aby molekula měla vhodnou geometrii – obsahovala delokalizovaný systém π elektronů.



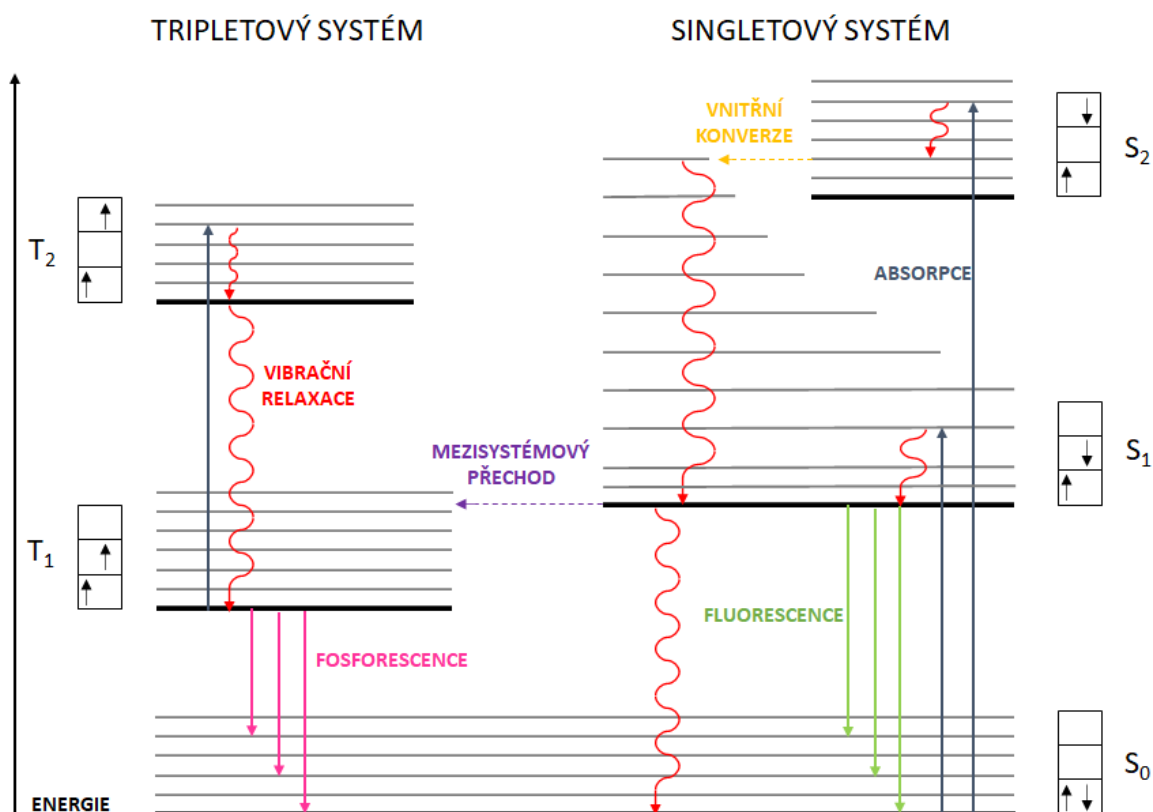
Obrázek 2.9: Absorpční a emisní spektrum se Stokesovým posuvem [29]

2.3. FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Jabloňského diagram (obrázek 2.10) schématicky zobrazuje cesty, kterými se elektron může vydat [31, 30]. Na začátku se nachází v základním stavu o nejnižší energii S_0 , odkud je excitován pomocí dodané energie do vyšších vibračních hladin S_1 nebo S_2 . Může se jednat i o vyšší hladiny, ale pro jednoduchost znázornění jsou uvažovány jen dvě vyšší vibrační hladiny. Pokud se nachází ve vyšších vibračních hladinách, tak následně pomocí vibrační relaxace přejde za částečné ztráty energie na nejnižší možnou vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 . Odtud se vrací zpět na některou z hladin základního stavu S_0 , kdy dochází k emisi fluorescenčního fotonu. Pokud dojde k překryvu S_1 a S_2 hladin, může se stát, že pomocí vnitřní konverze přejde z vyšší hladiny do nižší a odtud opět vibrační relaxací přejde na základní hladinu S_1 odkud vyzáří foton. Tyto cesty se dějí v takzvaném singletovém systému, který obsahuje elektrony s opačným spinem a vyzáření světla se nazývá fluorescence.

Druhou variantou je mezisystémový přechod do tripletního systému na hladinu T_1 , během kterého dochází k přetočení spinu tak, že jsou k sobě paralelní. Poté elektron opět pomocí vibrační relaxace putuje na nejnižší vibrační hladinu stavu T_1 a následně přechází do základního stavu S_0 za emise fotonu. Protože se však jedná o zakázaný spinový přechod, emise fotonu je výrazně opožděná za absorpcí a tento konkurenční proces fosforescence v čase řádově delší než fluorescence [29].

Vnitřní konverze je nezářivý přechod mezi hladinami o stejné energii [30]. Nejrychlejší je v momentě, kdy dochází k přechodu z vyšších hladin S_n (T_n) do hladiny S_1 (T_1). Při přechodu z hladiny S_1 do S_0 je rychlost výrazně menší a pro molekulu je výhodnější energii vyzářit v podobě fotonu. Vnitřní konverze bývá často doprovázena vibrační relaxací, během které dochází k uvolnění energie v podobě tepla.



Obrázek 2.10: Jablonskiho diagram

Pro fluorescenci a fosforescenci existuje pár základních pravidel – Kashovo a Vavilovo [30]. Kashovo pravidlo tvrdí, že *fluorescence je následkem přechodu ze stavu S_1 do S_0 a fosforescence ze stavu T_1 do S_0 . Emise záření z vyšších excitovaných stavů jsou vzácné [30].* Prakticky to znamená, že zářivý přechod z vyšší hladiny než S_1 (T_1) je velmi nepravděpodobný a molekula ve většině případů preferuje nezářivé přechody z vyšších vibračních hladin na nejnižší možnou a teprve odtud vyzáří foton o charakteristické energii pro danou molekulu. Proto je důsledkem Kashova pravidla Vavilovo pravidlo, které popisuje velikost kvantového výtěžku fluorescence a fosforescence a říká, že je nezávislá na energii excitujícího záření.

Látky schopné fluorescence se dělí na fluorescenční molekuly, fluorescenční barviva a fluorochromy [29]. V momentě, kdy je na makromolekulu navázán fluorochrom, celá struktura se označuje jako fluorofor a je schopna fluorescence. Fluorochromy jsou látky, jejichž excitační a emisní spektra závisí na jejich atomové struktuře a elektronové rezonanci. Fluorescenční barviva obsahují několik nekonjugovaných dvojných vazeb a v cyklu obsahují heteroatomy jako dusík, síru nebo kyslík.

Látky standardně používané ve fluorescenční mikroskopii mají velký Stokesův posun mezi absorpčním a emisním spektrem [29]. Tato výhodná vlastnost znamená, že je jednodušší rozeznat obě spektra a izolovat je pomocí interferenčních filtrů. Další faktor je molární extinkční koeficient, který definuje potenciál fluorochromu absorbovat foton. Mezi běžná fluorescenční barviva patří fluorescein nebo Rhodamin B. Dále existují i sondy jako

2.3. FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Alexa Fluor, které mají vylepšené vlastnosti jako je např. fotostabilita, absorpční spektra odpovídají vlnovým délkám běžně dostupných laserů, jsou stabilní ve velkých intervalech pH nebo jsou velmi dobře rozpustné ve vodě.

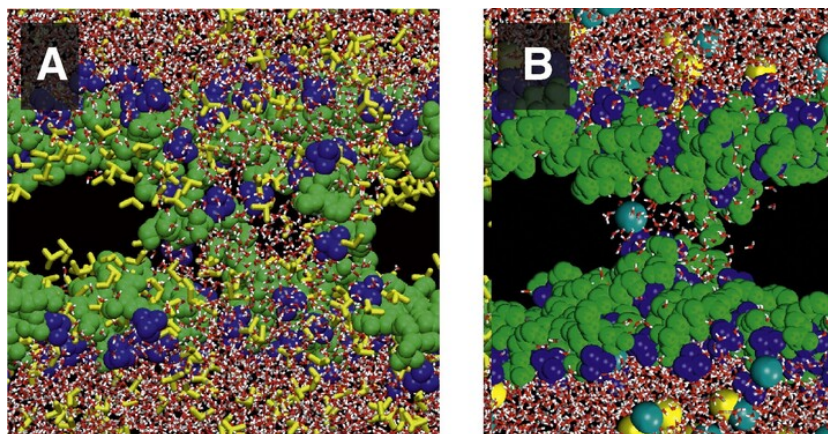
Mikroskopy používané pro pozorování fluorescence mají oproti klasickým optickým několik modifikací, aby byly schopné zobrazovat vzorky ve vysoké kvalitě a jasů [29]. Používají jasný zdroj světla jako jsou xenonové nebo rtuťové lampy, které emitují úzké pásmo vlnových délek vhodné pro excitaci fluoroforů. Aby byly snímky zachyceny ve vysoké kvalitě a kontrastu, je iluminátor i objektiv umístěn na stejné straně vzorku. Tato sestava se pak nazývá *epi-iluminátor*. Objektiv plní funkci kondenzoru, který osvětluje vzorek a zároveň se chová jako zobrazovací čočka, která sbírá fluorescenční záření a vytváří obraz pozorovaného vzorku. Mikroskop také obsahuje několik fluorescenčních filtrů – excitační filtr, dichromatické zrcadlo a emisní filtr. Excitační filtr umožňuje selektivní výběr krátkého pásu vlnových délek pro excitaci fluoroforu. Dichromatické zrcadlo odráží vybrané vlnové délky do objektivu a na vzorek a zároveň umožňuje průchod fluorescenčního záření ze vzorku na detektor. Emisní filtr blokuje zbytkové krátké excitační záření a zároveň přenáší fluorescenční záření, které pak tvoří obraz na oku nebo v kameře.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Modely membrán

Pro studium buněčných membrán lze využít mnoho různých přístupů a metod jako jsou počítačové modelace (obrázek 3.1), tvorba liposomů nebo mikrofluidní modely membrán. Počítačové modely umožňují pozorovat například počátky interakcí mezi buněčnou membránou a nanočásticemi, které jsou obtížně popsatelné na základě laboratorních experimentů [32]. Teto metoda se na základě složitosti reakcí dělí na dva přístupy - kompletní molekulární model a hrubozrnné modely (*coarse-grained models*). První přístup poskytuje dokonale vykreslený model reakce se všemi atomy, které jsou aproximovány na tvar koule se silovým polem. Pomocí tohoto pole je možné modelovat inter- i intramolekulární interakce pro vazby a vazebné úhly nebo nevazebné van der Waalsovi interakce a elektrostatické síly. Naopak hrubozrnné modely neuvažují okolní prostředí a jeho vliv na sledovanou reakci, aby snížily objem dat, která musí počítač zpracovat, a aby složitější reakci bylo vůbec možné modelovat. Na složitosti reakce a jejích komponentů pak závisí, jestli lze zobrazit například skupinu aminokyselin, celý protein nebo mikročástici.

Zjednodušení reakcí pro počítačovou modelaci způsobuje jejich efektivní použití v omezeném rozsahu. Ve farmacii se například využívají pro rychlou selekci a identifikaci nadějných léčiv tak, že predikují jejich toxicitu nebo farmakokinetické vlastnosti [33]. Léčiva, která po tomto testu mají požadované vlastnosti, je však již nutné testovat na reálnějších modelech jako jsou jednoduché modely membrán. Jednou z možností jsou liposomy. Umožňují pozorovat a pochopit specifické interakce jako je fúze, buněčná adheze nebo molekulární rozpoznávání.



Obrázek 3.1: Počítačový model fosfolipidové membrány s póry, které vznikly a) vlivem DMSO, b) iontovým gradientem [34]

Ponmalar a spol. [35] využili hned několika metod pro studium bakteriálních toxinů vytvářejících póry v buněčné stěně. Pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a modelace molekulové dynamiky (MD) pozorovali difuzi lipidů a reorganizaci cholesterolu v membráně. První metoda přinesla informace o difuzi a odchylkách od Brownova po-

hybu způsobených vznikem pórů. Počítačová modelace poté lépe objasnila, jaké interakce probíhají na molekulové úrovni mezi lipidy, cholesterolem a toxiny.

Liposomy jsou útvary složené ze dvou a víc vrstev fosfolipidů, které jsou orientované okolo vodného jádra [33]. Dělí se podle počtu membrán na multilamelární a unilamelární a podle velikosti na gigantické (GUV), velké (LUV) a malé unilamelární vezikuly (SUV). Liposomy se pohybují volně v roztoku a je proto náročné je pozorovat [36]. Skupina *Wang a spol.* na modelu SUV a GUV testovala možnost jejich uchycení v prostoru pomocí optické pinzety, což by umožnilo nový přístup ke studiu membránové dynamiky nebo interakcí membrány a proteinů.

3.2. Složení membrán

DOPC nebo také 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-fosfocholin je jedním z nejčastěji využívaných fosfolipidů pro tvorbu modelových membrán. Jedná se o lipid se dvěma nenasycenými řetězci kyseliny olejové. Článek [37] využil DOPC pro studium změny tloušťky membrány v závislosti na koncentraci cholesterolu obsaženého v ní. Mechanické namáhání bylo měřeno v článku [38]. Jiné využití našel v článku [39], kde byl pozorován transmembránový transport.

DOPG či sodná sůl 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosforac-1-glycerolu místo cholinu obsahuje glycerol. Ve směsi s DOPC jej využili v článku [40] pro zkoumání tloušťky membrány a jejich elektrických vlastností. Další experimenty byly provedeny v oblasti transmembránového transportu [41].

SOPC, celým názvem 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin, obsahuje dvě různé mastné kyseliny, čímž se liší od dvou předchozích lipidů. Články [37, 13] se zabývají opět tloušťkou membrány v kombinaci fosfolipidu a cholesterolu anebo elastickými vlastnostmi.

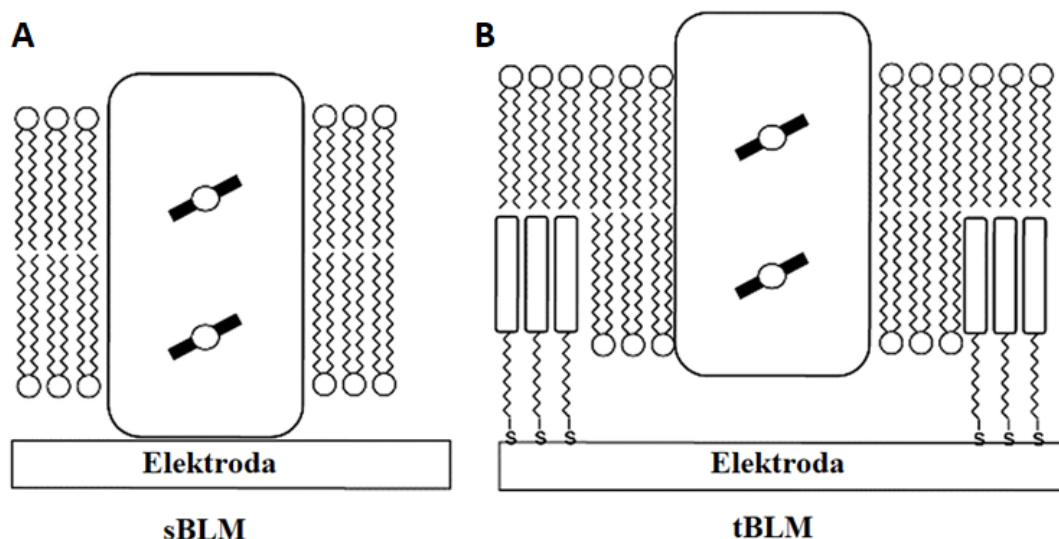
Lecitin využitý v článku [42] na rozdíl od DOPC, DOPG a dalších obsahuje více různých lipidů [43]. Využití našel opět ve studiu transportu molekul přes membránu.

3.3. Typy membrán

Existuje mnoho typů modelů membrán, které jsou využívány pro experimenty a ještě více způsobů, jak je vyrobit [36]. První model membrány (BLM - bilayer lipid membrane) vznikl v roce 1962 pomocí natření lipidů rozpuštěných v *n*-dekanu jemným štětcem na hydrofobní podklad. V membráně a jejím okolí však zůstávalo mnoho rozpouštědla, které mohlo denaturovat integrované membránové proteiny a vést k selhání experimentů. Byla proto zavedena Langmuir-Blodgettova technika spočívající v postupném nanášení lipidových monovrstev na tenkou teflonovou fólii s otvory pokrytou *n*-hexadekanem nebo skvalenem. Volně zavěšená membrána vznikala na rozhraní vzduchu a vody spojením obou monovrstev k sobě. Tím pádem nedocházelo k uzavření rozpouštědla uvnitř struktury a membrána byla stabilní 3–4 hodiny. Další vývoj BLM spočívá ve zmenšení otvorů v teflonové fólii nebo úpravě jejich okrajů tak, aby úhel mezi volně zavěšenou membránou

a fólií byl co nejmenší. BLM se využívá pro studium iontových transportů přes membránu, mechanických vlastností a interakcí mezi lipidy a proteiny [44].

Stabilnější variací BLM jsou membrány přichycené na podložce (sBLM – supported lipid bilayer na obrázku 3.2) [44]. Ta může být vyrobena z různých materiálů od polymerů přes kovy a jejich oxidy k nanočásticím jako je grafen a uhlíkové nanotrubičky. Na rozdíl od volně zavěšených BLM jsou stabilní i několik dní, pokud se skladují při 4 °C. Membrána může být modifikována velkou škálou proteinů sloužících jako receptory, kanálky nebo protilátky a je možné pozorovat jejich chování.

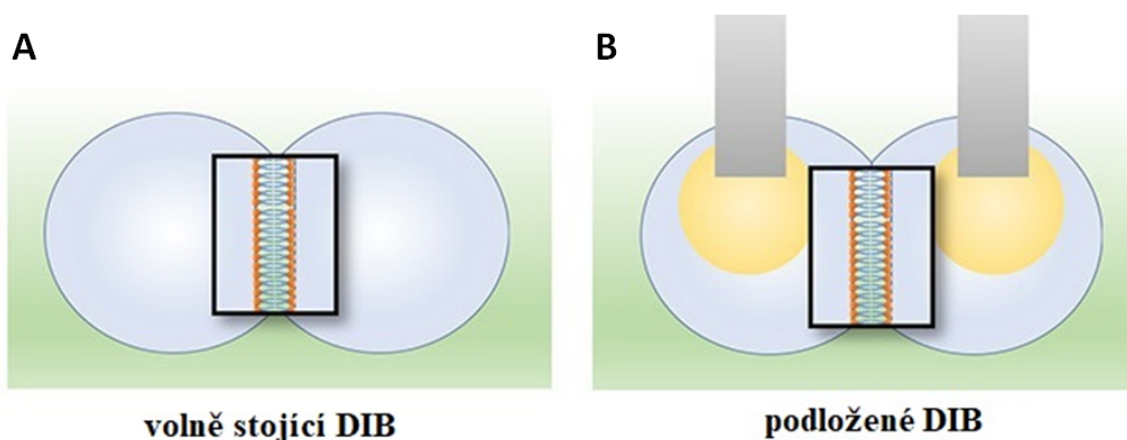


Obrázek 3.2: Schématické porovnání modelů a) přichycené (sBLM) a b) ukotvené (tBLM) membrány na podložce s integrovaným membránovým proteinem [45]

Jiný model využívající podložku jako fyzickou oporu je ukotvená BLM (tBLM – tethered lipid bilayer na obrázku 3.2) [46]. Na rozdíl od sBLM, která leží přímo na povrchu podložky, tBLM je kovalentně uchycena na kotvě, která ji udržuje v určité vzdálenosti a membrána je tak dál v prostoru [47]. Materiál podložky může tvořit oxid křemičitý, kotvu potom molekuly se silanovou skupinou. Membránu lze vytvořit pomocí fúze vezikul na povrch podložky, kde se rozbijí a spontánně vytvoří planární dvojvrstvu fosfolipidů. tBLM mají dobré elektrické vlastnosti a vysokou stabilitu. Tím, že se membrána nachází částečně v prostoru, umožňuje pozorování transmembránových proteinů. *T. Laftoglou a L. Jeuken* [45] tento model využily pro zkoumání transmembránového transportu nebo katalytické aktivity bakteriální hydrogenázy.

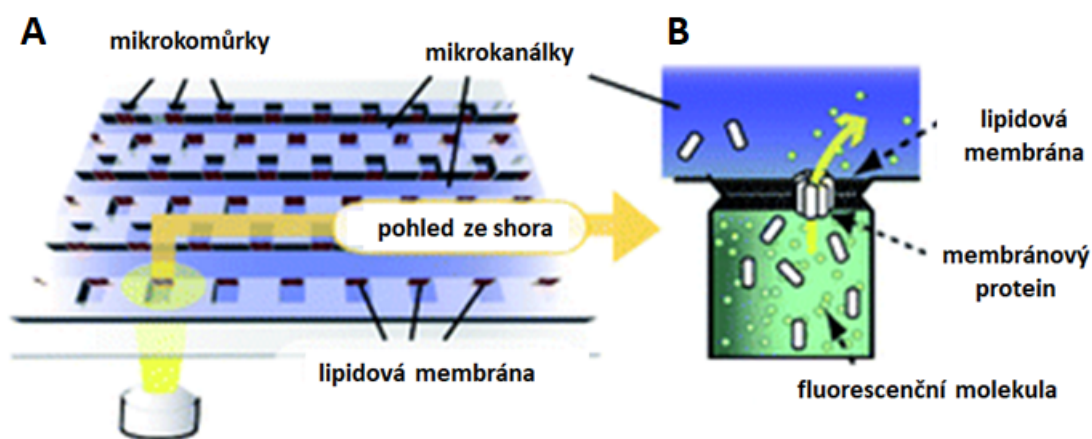
Membránový model založený na kontaktu mezi dvěma vodnými kapkami v olejové fázi (DIB – droplet interface bilayer) je další možností jak lépe poznat chování fosfolipidových membrán [48]. Snadno se vytvářejí, funkcionalizují a dají se dobře zobrazit. Jsou vhodné pro studium interakcí, reakcí na elektrické signály nebo transportních mechanismů. Obdobně jako existuje více variací na BLM, bylo vyvinuto také několik možností pro DIB (obrázek 3.3). Volně zavěšené DIB nejsou podepírány jakoukoli pevnou strukturou. Lze je vytvořit nekontaktními technikami jako je optická, magnetická nebo mikrofluidní manipu-

lace (viz. kapitola 3.4). A naopak podložené DIB jsou uchyceny na tenkých tyčinkách nebo elektrodách. Díky tomu jsou ideálním modelem pro charakterizaci elektrických vlastností, které lze pomocí elektrod dobře zaznamenat.



Obrázek 3.3: Modely a) volně zavěšené DIB vytvořené pomocí optické pasti a b) podložené DIB připojené k drátkům [48]

Další volně zavěšený model membrány vytvořili *Ota a spol.* [42], tentokrát však na mikrofluidním čipu (obrázek 3.4). Díky jeho geometrii jsou membrány vytvářeny kolmo k pozorovací rovině a tvoří předěl mezi dvěma rezervoáry pro roztoky, které tak mohou mít odlišné, dobře kontrolovatelné složení. Z toho důvodu je membrána vhodná pro studium transportních jevů na membráně za využití optických metod a fluorescenčních sond. V článku [42] to bylo demonstrováno na tvorbě pórů pomocí α -hemolysinu a následné difuze molekul kalceinu.

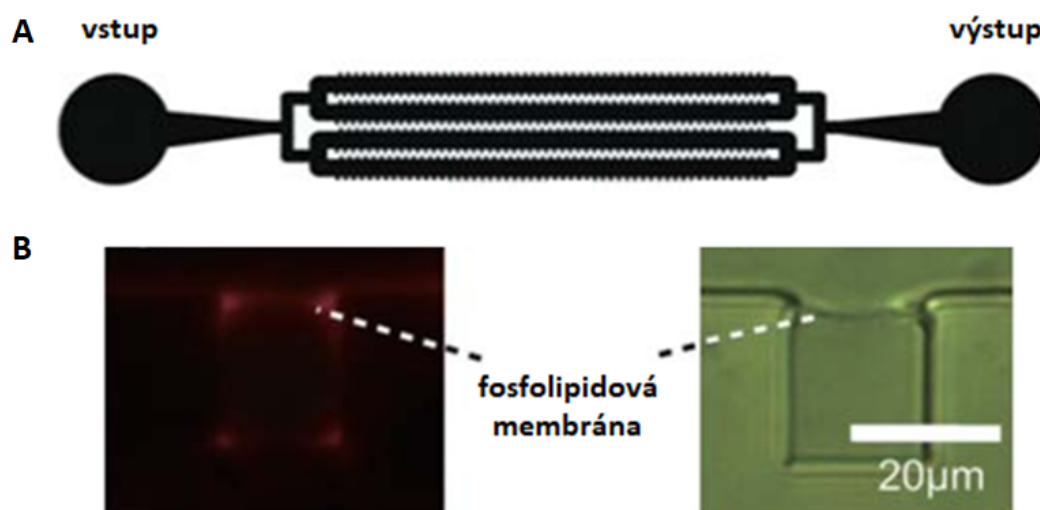


Obrázek 3.4: a) schématické zobrazení kanálků a komůrek s fosfolipidovými membránami v mikrofluidním čipu, b) znázornění dvou prostředí okolo membrány s inkorporovaným transmembránovým proteinem [42]

3.4. Membrány na čipu

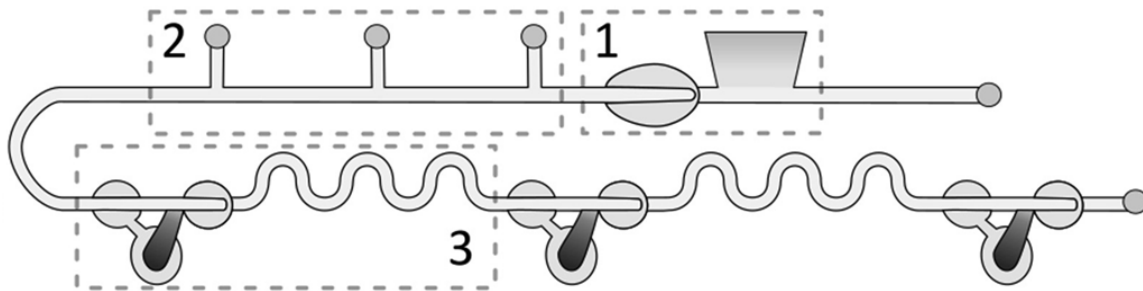
Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole (kapitola 3.3) některé druhy fosfolipidových membrán je možné vytvářet pomocí mikrofluidních čipů. Výhodou těchto zařízení je vytvoření mnoha stabilních membrán paralelně vedle sebe, které je možné pozorovat současně [39]. Mikrofluidní čip také nepotřebuje speciální externí vybavení kromě stříkačkové mikrofluidní pumpy, kterou lze jednoduše ovládat tok roztoků v hadičkách a kanálcích. Mikrofluidika tak poskytuje téměř zcela automatizovaný systém, který je efektivní, bezpečný a jednoduše ovladatelný.

Počet a natočení membrán závisí na struktuře čipu. *Ota a spol.* [42] využili takový systém, který umožňuje pozorovat membrány kolmo k rovině snímání. Mikrofluidní čip z PDMS a krycího sklíčka obsahoval celkem čtyři kanálky lemované komůrkami o velikosti $19 \times 17 \mu\text{m}$ (obrázek 3.5). Membrány vznikaly na rozhraní kanálků a komůrek díky fázovým rozhraním mezi roztoky. První byl do čipu napouštěn vodný roztok PBS pufru (pH 7.4), který zaplnil celou vnitřní strukturu. Následoval organický roztok hexadekanu s fosfolipidy o koncentraci 10 mg/ml, který vytlačil vodný roztok z kanálků a na rozhraní s komůrkami vznikla první monovrstva lipidů. Třetí roztok byl opět vodný a vytěsnil téměř všechnu organickou fázi. Druhá monovrstva na tomto rozhraní se následně spojila s první a vznikla tak stabilní fosfolipidová membrána. Malý objem komůrek umožnil jednoduché pozorování transportu fluorescenčních molekul přes proteinové kanály zavedené do membrány. Jak molekuly postupně procházely z komůrek přes membránu do kanálků, intenzita fluorescence v komůrkách rychle klesala a bylo možné ji kvantitativně měřit. Výhodou této geometrie čipu je tedy velké množství membrán na jednom místě, jednoduchá optická detekce fluorescenčních molekul při transportu přes membránu a možnost kontrolovat složení roztoků na obou stranách membrány zvlášť.



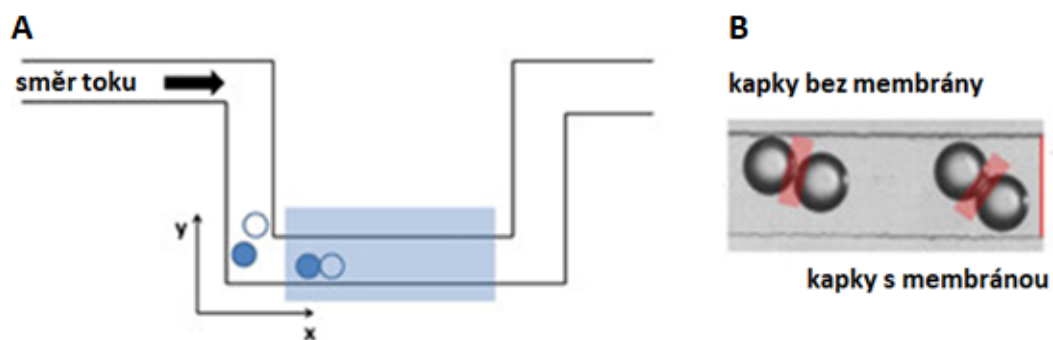
Obrázek 3.5: a) schéma vnitřní struktury mikrofluidního čipu vyrobeného skupinou *Ota a spol.* [42] b) snímky fosfolipidové membrány vytvořené v tomto systému

Model membrán vzniklých mezi dvěma vodnými kapkami v olejové fázi (DIB) je také možné vytvořit na čipu (obrázek 3.6) [39]. Skupina *Czekalska a spol.* [39] vyrobila čip ze dvou polykarbonátových destiček, který obsahoval 12 fosfolipidových membrán. První byl do kanálků pumpován organický roztok hexadekanu s fosfolipidy, který tvořil kontinuální fázi. Poté následoval první vodný roztok, který se rozdělil do stejně velkých kapiček o objemu asi 9 nl, jež byly následně zachyceny v pastech. Druhý vodný roztok, který byl také rozdělen na kapky a zachycen v pastech. Kapičky těchto dvou vodných roztoků se postupně přiblížily k sobě a na jejich rozhraní vznikla fosfolipidová membrána. Podobně jak předchozí model membrány i tento umožňuje pozorování transportu látek přes membránu a nabízí jednoduché měření.



Obrázek 3.6: Schématické zobrazení vnitřní struktury mikrofluidního čipu vyrobeného skupinou *Czekalska a spol.* [39].

Upravenou variantu DIB membrán vytvořil tým *Walter a spol.* [38] pod názvem "membrána na rozhraní dvou proudících kapek" (FDIB – flowing droplet interface bilayer). Jejich geometrie čipu umožnila vytvořit 2 až 4 membrány za sekundu v kanálcích s volně se pohybujícími se kapkami. Ty se spojovaly v místě 90° ohybu, kdy první kapka byla zpomalena, následně do ní narazila druhá kapka a na jejich spoji vznikla membrána (obrázek 3.7). Tím, že celá struktura nebyla napevno uchycena v komůrce nebo pasti, ale volně se pohybovala kanálky, byl tento model vhodný pro měření mechanických vlastností membrány pomocí hydrodynamických interakcí.



Obrázek 3.7: Schéma struktury 90° ohybu a princip tvorby FDIB a porovnání kapek před a po vzniku membrány [38]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

Aceton, lach:ner, CAS: 67-67-1
ATTO 488, Sigma, Lot: #BCBV8900
BSA - lyophilized powder, ≥ 96 % Sigma, Lot: #SLCD0987
HCl p.a., ≥ 35 %, lach:ner, CAS: 7647-01-0, č.š.: PP/2014/05946
Hexadekan, Sigma-Aldrich, Lot: #SHBG3884V
Chloroform AG., Penta, č.š.: 2107210716
 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 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 -phosphatydilcholine (Egg, chicken), 1 g, Avanti, Lot: EPC-608
LED/UV FLEX gel, RUSCONA s.r.o.
Minerální olej - Viscosity Reference Standard, Paragon Scientific Ltd, Lot: 2153001039
NaCl p.a., Penta, CAS: 7647-14-5, č.š.: 2106210616
NaOH mikropelaty p.a., CAS: 1310-73-2, index.č.: 011-002-00-6
Nile red, ≥ 96 % (HPLC), Sigma, CAS: 7385-67-3
PDMS, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo, č. š.: 0008885206
Rhodamin 6G, 99 %, Aldrich, CAS:989-38-8

4.2. Použité přístroje

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 – CEPLANT RPS50+
Ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H
UV/LED lampa - RUSCONA 48W/60W

4.3. Metody

4.3.1. Kompletace čipu a aparatury

Odlévání, oplazmování a skladování mikrofluidního čipu z PDMS bylo provedeno podle postupu předchozí bakalářské práce [27], který byl optimalizován v navazující bakalářské práci [49]. Bylo smícháno potřebné množství PDMS a síťovacího činidla, které bylo sonifikováno ultrazvukem a následně nalito na přečištěnou křemíkovou masku. Nově vzniklé bubliny byly odstraněny v exikátoru za sníženého tlaku a polymer byl umístěn do sušárny vyhřáté na 80 °C po dobu 1 h. Z vytvrzeného polymeru byla vyřezána sada 9 těl čipů. Tyto části byly přečištěny sonifikací v isopropylalkoholu.

Na plazmovacím přístroji CEPLANT RPS50+ bylo nastaveno napětí 10 V. Na držák projíždějící pod plazmovací hlavicí byly postupně umístěny krycí sklíčka a polymerní těla tak, aby vzdálenost mezi částí čipu a hlavicí byla 1,5 mm. Následné oplazmování probíhalo po dobu 84 s. Takto ošetřené části byly přiloženy k sobě a uloženy do sušárny vyhřáté na 150 °C po dobu 30 min.

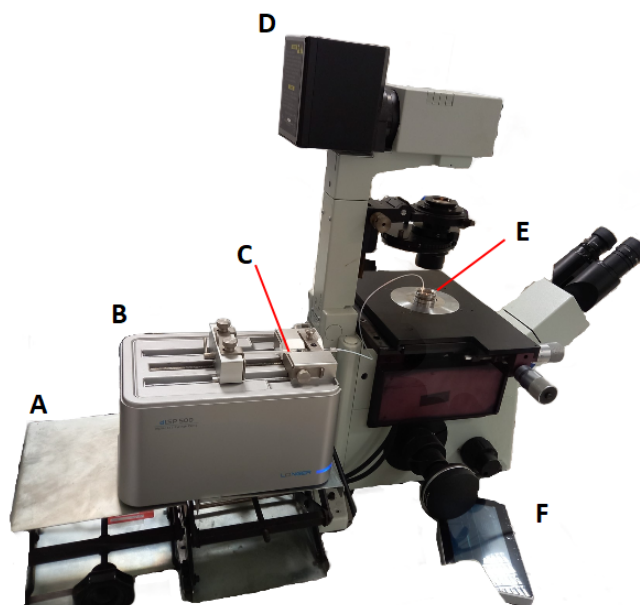
Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly k čipu pomocí lepidla Pattex GEL přilepeny kovové konektory. Toto lepidlo tuhlo po dobu 24 h, kdy byl čip skladován v suché, čisté a uzavřené nádobě.

Následně byl čip na 24 hodin ponořen do deionizované vody tak, aby vrchní konce konektorů zůstaly na vzduchu a tělo čipu ve vodě. Poté byl čip vytažen a osušen hadříkem, který nepouští vlákna.

Stříkačka byla naplněna vodným roztokem PBS (pH 7,4) a byla k ní připojena hadička. Tento spoj byl utěsněn pomocí několika vrstev gelu, který tuhne pod UV zářením po dobu 1 minuty. Hadička byla propláchnuta roztokem ze stříkačky, což eliminovalo tvorbu bublin.

Do hadičky se jednotlivé roztoky nabírají v opačném pořadí, než v jakém jsou napouštěny do čipu (první nabraný roztok je do čipu pumpován jako poslední) a je tak možné korigovat obsah kanálku a komůrek zvlášť. Jednotlivé roztoky byly pomocí čistých stříkaček nadávkovány do čistých, předem označených mikrozkmavek typu Eppendorf. Následně byla přiložena hadička se šikmo seříznutým koncem a pomocí drobného posuvu pístu stříkačky byly nasáty roztoky v potřebném pořadí. Poté byla hadička pomocí kleští připojena ke konektoru a připevněna k mikrofluidní injekční pumpě. Celá aparatura zahrnující mikroskop, mikrofluidní pumpu i čip je zobrazena na obrázku 4.1.

Na mikrofluidní pumpě byly nastaveny parametry příslušné stříkačky (šířka pístu a objem udávaný výrobcem) a potřebná rychlost pumpování roztoků do čipu. Z důvodu ochrání pumpy před poškozením byl také nastaven maximální možný objem, který pumpa mohla vypumpovat tak, aby byl vždy o několik desítek mikrolitrů menší než celkový objem roztoku ve stříkačce. Po vypumpování tohoto objemu se pumpa automaticky vypne a nedojde k zadření motoru tím, že by se snažil tlačit na prázdnou stříkačku.



Obrázek 4.1: Sestava aparatury skládající se z a) stojanů na pumpu, b) mikrofluidní pumpy, c) stříkačky s hadičkou, d) mikroskopu, e) mikrofluidního čipu v kovovém držáku a f) dotykového displeje pro ovládání pumpy

4.3.2. Roztoky

Byl namíchán fosfátový pufr PBS o objemu 250 ml. Bylo naváženo potřebné množství K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a NaCl tak, aby síla iontů byla 10 mM pro fosfát.

Byl připraven PBS roztok a bylo přidáno takové množství BSA, aby jeho koncentrace byla v intervalu 0,5–1 g/l.

Byl připraven zásobní roztok lecitinu v chloroformu o koncentraci 250 g/l a objemu 1 ml. Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství lecitinu, převedeno do vialky a byl přidán chloroform. Pro lepší rozpuštění lecitinu byl použit vortex. Takto vzniklý roztok byl skladován v mrazícím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro přípravu roztoku lecitinu v hexadekanu o objemu 1 ml bylo pipetováno takové množství lecitinu v chloroformu, aby výsledná koncentrace lecitinu v hexadekanu byla 10 g/l. Z pipetovaného objemu lecitinu v chloroformu bylo původní rozpouštědlo odpařeno v exikátoru za sníženého tlaku za dobu 30 min. Následně bylo pipetováno potřebné množství hexadekanu a roztok byl umístěn na vortex pro lepší a rychlejší rozpuštění lecitinu. Takto připravený roztok byl skladován při pokojové teplotě za stálého promíchávání.

Pro přípravu fluorescenčního roztoku hexadekanu bylo v 5 ml roztoku rozpuštěno potřebné množství Nilské červeně a následně byl připraven roztok lecitinu v hexadekanu podle výše zmíněného postupu. Při přípravě roztoků hexadekanu se Súdánskou oranží, minerálního oleje s Nilskou červení a minerálního oleje se Súdánskou oranží bylo postupováno stejně.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce navazuje na postupy předchozích bakalářských prací [27, 49], jak již bylo dříve zmíněno (kapitola 4.3.1). Princip tvorby membrány a geometrie čipu vychází z článku *Ota a spol.* [42]. Cílem této práce je optimalizovat postup tvorby membrány na mikrofluidním čipu z PDMS a krycího sklíčka, aby na tomto modelu bylo jednou možné spolehlivě zkoumat vlastnosti fosfolipidových membrán a transmembránový přenos látek.

5.1. Výroba čipu a sestavení aparatury

5.1.1. Kompletace čipu

Během výroby čipu a zapojování aparatury došlo k výskytu několika problémů, které byly částečně nebo zcela vyřešeny. Bylo zjištěno, že při ražení otvorů do polymerního těla čipu pomocí raznice někdy zůstává zbytek polymeru v otvoru a způsobuje jeho ucpání. Protože je však tento kousek velmi malý (≤ 1 mm) a průhledný, je náročné jej zpozorovat a odstranit. K jeho odhalení dochází z pravidla v momentě, kdy je celá aparatura zapojená a zapnutá, ale roztoky neprotékají, přestože je stříkačka funkční, lepidlo nezateklo mimo spoje nebo nebyla zalomená hadička.

U propojení polymerní části čipu a kovového konektoru bylo zvoleno lepidlo Pattex GEL. To po zaschnutí tvoří také poloprůhledný film, kterým je možné vidět. Nevýhodou však je, že jeho doba tuhnutí na vzduchu trvá 24 hodin od aplikace, což značně prodlužuje dobu výroby čipu. Ten je třeba ještě před vpravením roztoků na 24 hodin ponořit do superčisté vody, aby PDMS nasálo dostatek kapaliny a během experimentů nevstřebávalo roztoky z kanálek. Celkový minimální doba výroby čipu je potom na 3 dny.

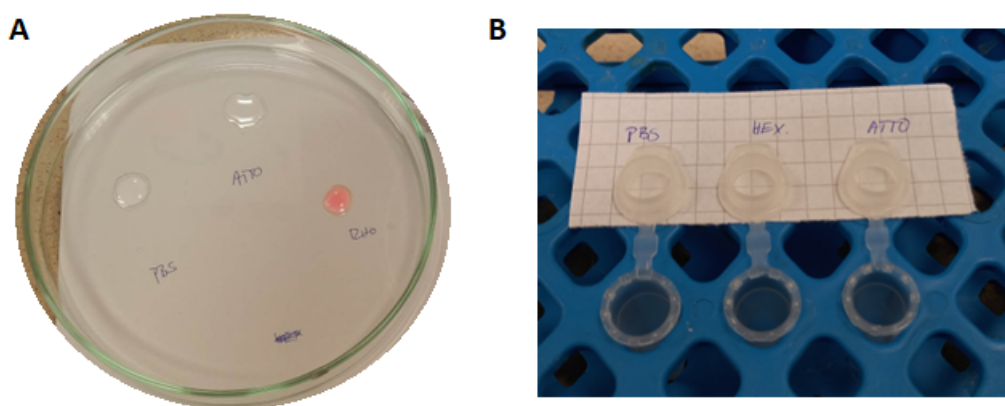
5.1.2. Spoj mezi stříkačkou a hadičkou

Spoj mezi stříkačkou s tenkou jehlou a hadičkou vyžadoval hned několik variant řešení. První bylo vyzkoušeno utěsnění spoje pomocí několika vrstev Parafilmu. Toto překrytí se ukázalo jako nedostačující. Kapalina hnaná hadičkou pod velkým tlakem proudila nejen požadovaným směrem dopředu, ale také se vracela zpět za jehlu, kde se dostávala skrze Parafilm pryč. Bylo proto navrženo utěsnění pomocí kombinace vteřinového lepidla a teprve potom překrytí Parafilmem. Ani tento návrh však nebyl přijatelný. Hadička i plastová část stříkačky, kde bylo lepidlo aplikováno, nejspíše poskytly příliš malou styčnou plochu a pravděpodobně byly tvořeny plastem s nevhodným povrchem pro vteřinové lepidlo, které na spoji ani nezatuhlo. Jako elegantní řešení se ukázalo využití polymerního gelu, který tuhne po ozáření UV světlem a vytváří průhlednou vrstvu, kterou lze pozorovat dění pod spojem.

Pro zvětšení plochy, na kterou je nanášen UV gel a tím pádem i jeho přilnavosti je vhodné přibližně dva centimetry povrchu hladké hadičky narušit kleštěmi. Vzniklé rýhy poskytují dostatečnou třecí plochu pro gel, aby udržel hadičku na místě při dalších manipulacích jako je nabírání roztoků a uchycení na mikrofluidní pumpě.

5.1.3. Manipulace s roztoky v hadičce

Nabírání roztoků do hadičky prošlo dvěma fázemi. První byly roztoky po kapkách dávkovány na čistou Petriho misku podloženou bílým papírem pro lepší viditelnost (obrázek 5.1, snímek A). Tato varianta však nebyla optimální, protože při dávkování roztoků do hadičky docházelo k nechtěnému nabírání vzduchových bublin. Kapky také nebyly nijak chráněny od okolního prostředí a mohl do nich padat prach, který následně mohl ucpat kanálky. Jako lepší řešení byly zvoleny uzavíratelné zkumavky typ Eppendorf (obrázek 5.1, snímek B). Při dostatečném množství roztoku na dně zkumavky do něj lze konec hadičky zcela ponořit, což zabráňuje nasátí vzduchových bublin. Tyto zkumavky také obsahují plastové víčko, kterým je možné zkumavku uzavřít a zabránit kontaminaci prachovými částicemi.



Obrázek 5.1: Rozmístění roztoků a) na Petriho misce b) ve zkumavkách typu Eppendorf

U napouštění čipu roztokem bylo zjištěno, jak moc velký rozdíl je mezi spojem tvořeným lepidlem s Parafilmem a gelem vytvrzeným UV zářením. Zatímco kompletní naplnění kanálků v prvním případě trvalo desítky minut, při použití UV gelu byl kanálek napuštěn do 5 minut rychlostí 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Gel po vytvrzení vytvořil dokonale neprostupnou vrstvu, která odolá tlaku uvnitř aparatury.

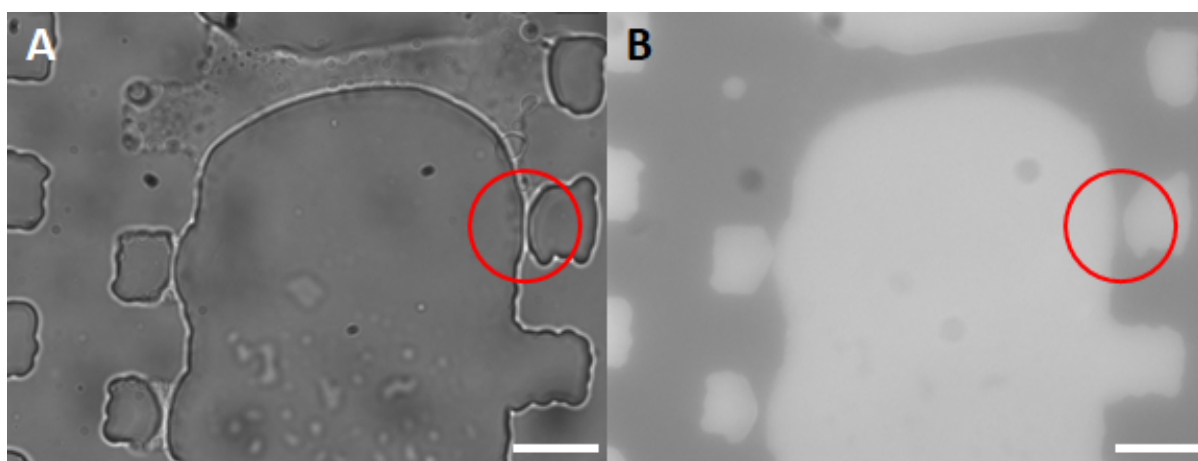
Při prvotních testech plnění čipu mimo mikroskop bylo zjištěno, že je lepší čip umístit na Petriho misku a uchytit ho páskem z Parafilmu, aby zůstal ukotven na místě. Petriho miska byla také podložena buď bílým nebo černým papírem (v závislosti na barvě roztoků), aby byly drobné kanálky lépe viditelné.

Pro lepší viditelnost postupu roztoků v hadičce je vhodné jednotlivá fázová rozhraní označit lihovým fixem na stěně hadičky. Při pomalém napouštění kanálků (několik desítek nl/min) je často náročné určit, zda se roztoky skutečně pohybují. Pevná ryska umožňuje zpozorovat posun roztoku i o zlomek milimetru a včas poznat, jestli je aparatura v pořádku a těsní. Pokud tomu tak není, tak se roztok prakticky nepohybuje a bez rysky je to možné zjistit až za několik desítek minut.

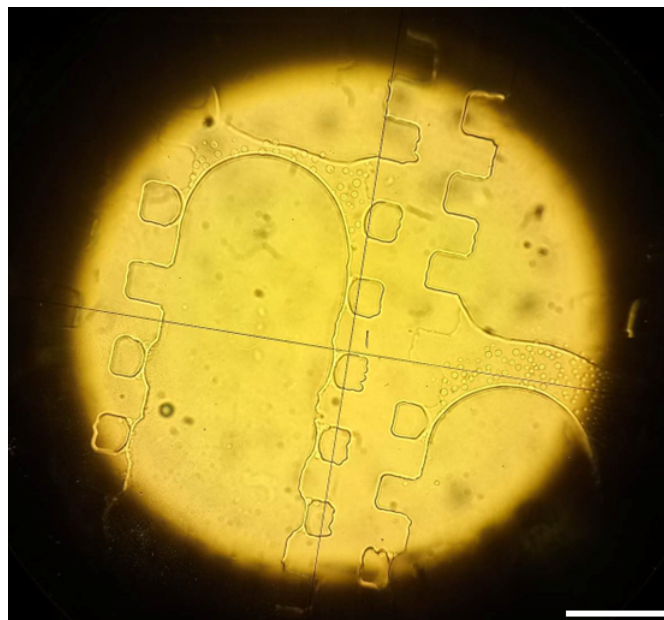
5.2. Optimalizace napouštění čipu

5.2.1. Optimální výsledky

Obrázek 5.2 zobrazuje kanálek s komůrkami naplněný třemi roztoky - fluorescenční sonda ATTO 488, hexadekan s rozpuštěným lecitinem a Rhodamin 6G. Díky odlišné hydrofobnosti hexadekanu došlo k vytvoření dvou fázových rozhraní, která je možné pozorovat na transmisním i fluorescenčním zobrazení. Ve vyznačené oblasti se pak nachází ideální model fosfolipidové membrány. Obrázek 5.3 ukazuje, jak velkou plochu kanálků je možné pozorovat okem přes okulár.



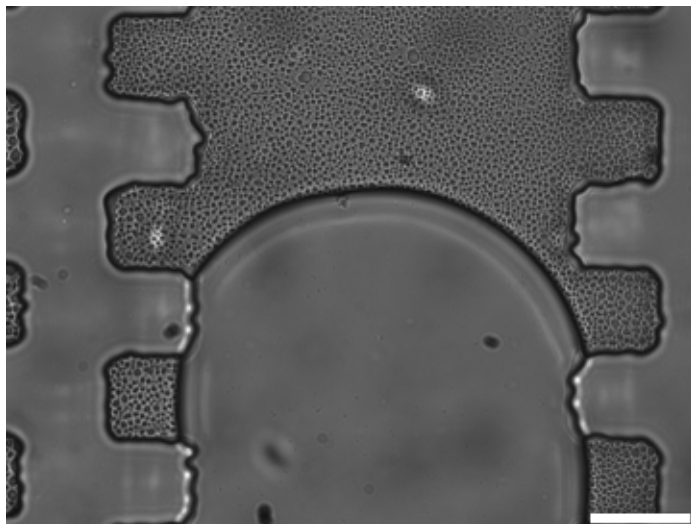
Obrázek 5.2: Lecitinové membrány (označené červenou) a rozhraní mezi roztoky: nahoře ATTO 488, uprostřed hexadekan, dole Rhodamin 6G. Měřítko má 20 μm .



Obrázek 5.3: Pohled na lecitinové membrány z obrázku 5.2 přes okulár. Měřítko má 50 μm .

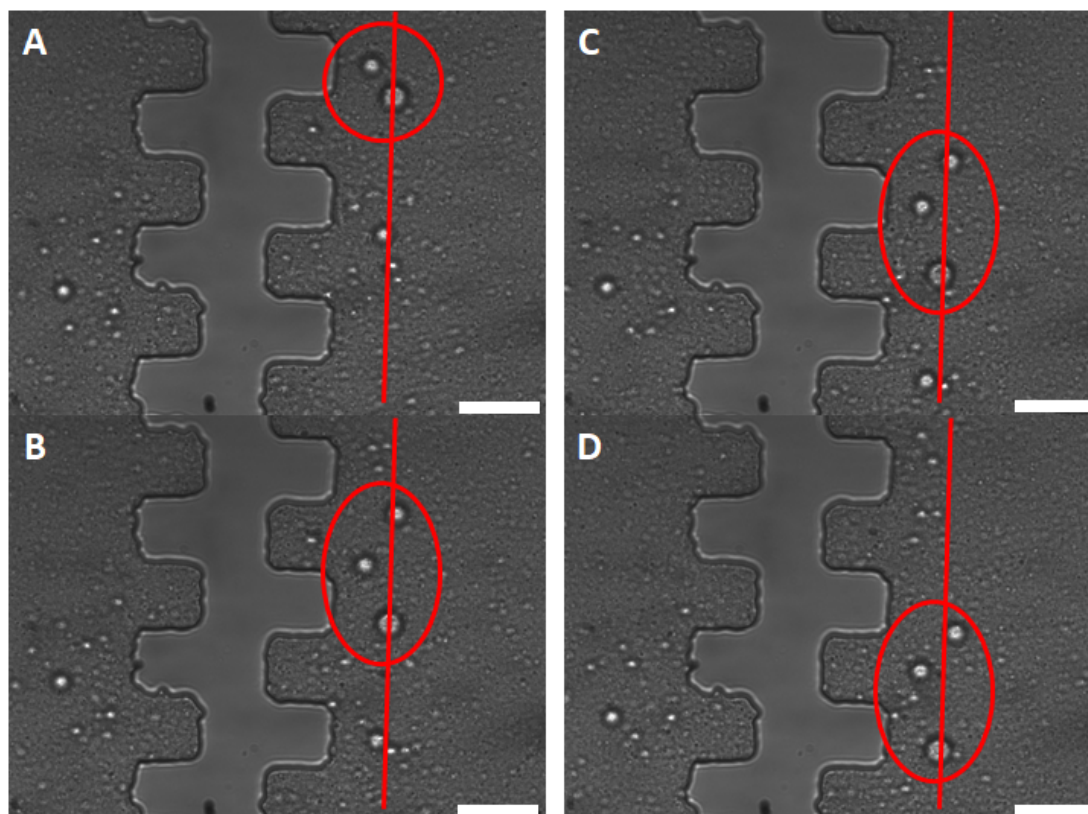
5.2. OPTIMALIZACE NAPOUŠTĚNÍ ČIPU

Obrázek 5.4 zobrazuje ideální čelo napouštěného roztoku PBS do prázdného, předem namočeného čipu. Jeho tvar odpovídá předpokládanému průřezu čela kapaliny, která protéká mezi dvěma nekonečnými, nehybnými deskami (kapitola 2.2, obrázek 2.6). Z toho lze usoudit, že tento teoretický model a následné výpočty pro modelace proudění v kanálcích byly zvoleny správně.



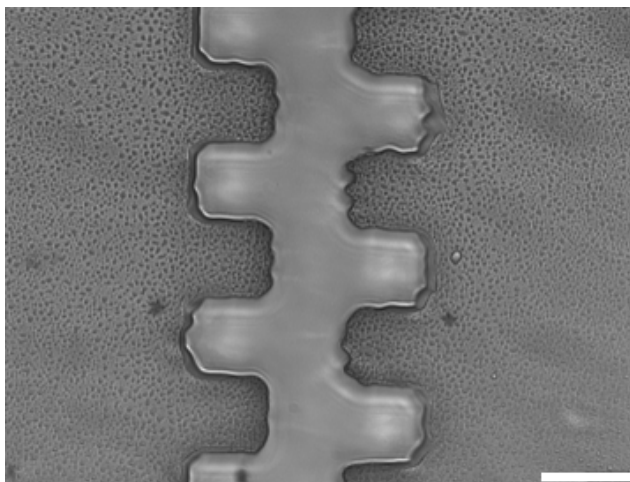
Obrázek 5.4: Čelo roztoku PBS v kanálku. Měřítko má 20 μm .

Na správný výběr teoretického modelu navazuje i laminární proudění v kanálcích. Na snímcích obrázku 5.5 je možné pozorovat posun světlých kapek hexadekanu v roztoku PBS. Snímky byly pořízeny ze stejného místa kanálku. Kapky se během měření pohybovaly jedním směrem bez kliček a je proto možné jejich dráhu porovnat s červenou přímkou vedenou rovnoběžně se stěnou kanálku. Díky tomu, že se kapky prakticky neodchylují z této dráhy, jedná se o potvrzení laminární proudění v mikrofluidních kanálcích.



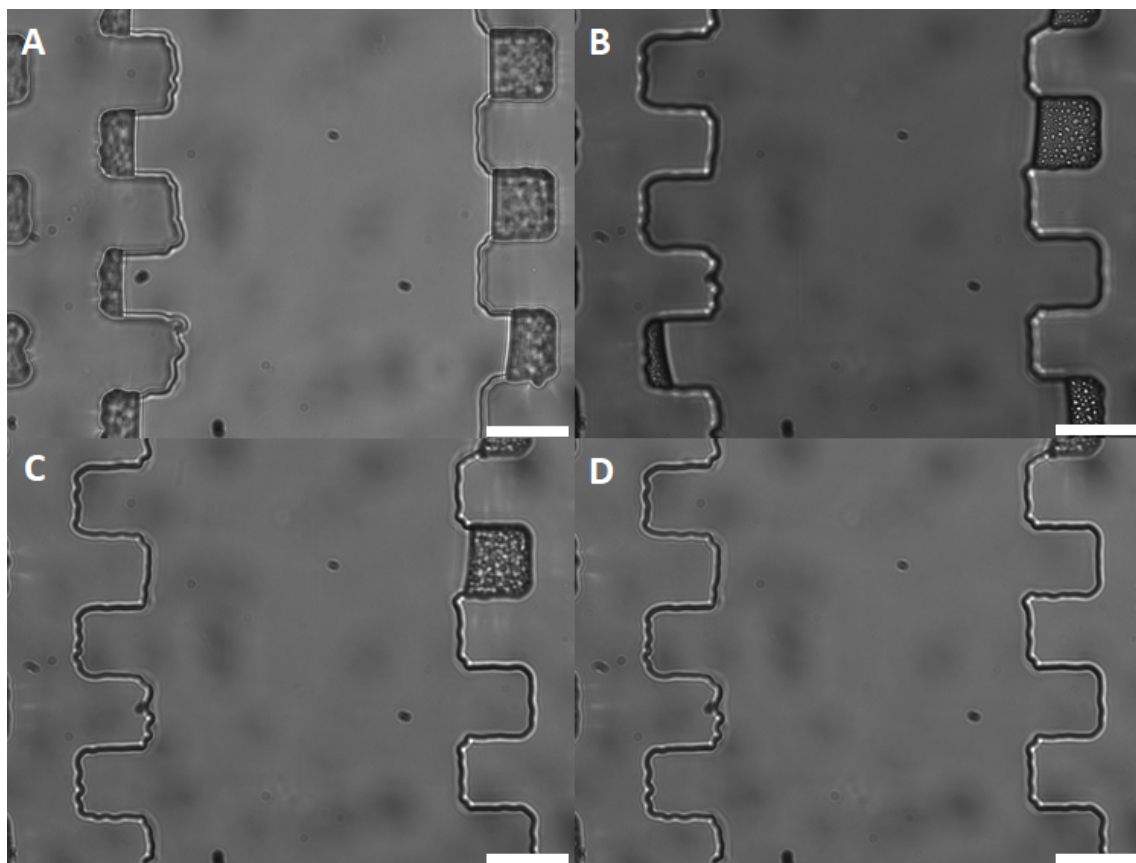
Obrázek 5.5: Zobrazení laminárního toku v kanálku pomocí několika kapek hexadekanu v roztoku PBS. Snímky A-D zobrazují časový posun během měření. Měřítko má 20 μm .

Na obrázku 5.6 je ideální vzhled kanálku před měřením. Pokud byl čip namočen alespoň po dobu 24 hodin, PDMS nasálo vodu, která se následně částečně vysrážela na podložním sklíčku. Čím déle byl čip namočen, tím větší množství vody se dostalo do kanálku a vytvářelo strukturu podobnou kresbě na kůži geparda. Pokud je tato struktura v kanálcích přítomna, tak je PDMS dostatečně nasyceno vodou a nenasává roztoky z kanálků.



Obrázek 5.6: Kanálky se strukturou "geparda", která dokazuje dostatečné nasycení PDMS vodou. Měřítko má 20 μm .

Napouštění čipu prvním roztokem je klíčovým momentem, který má zásadní vliv na vznik fosfolipidových membrán. Pokud se kanálek s komůrkami zcela nezaplní vodným roztokem PBS, zůstávají v komůrkách vzduchové kapsy, které mohou značně zkrátit dobu stability membrán. Na obrázku 5.7 je možné vidět jejich postupné zaplňování. V prvním snímku je roztok hlavně v kanálku a jen části komůrek a postupně dochází k jeho zatlačení až na jejich dno jak je vidět na snímku čtyři. Pro takové zaplnění je však třeba vyvinout dostatečný tlak, který roztok do komůrek dostane. Tlak v kanálcích je řízen rychlostí toku roztoků, která se pohybuje v rozmezí 1–1000 nl/min. Problém nastává v momentě, kdy jsou roztoky pumpovány rychlostí, která umožňuje vznik stabilních membrán, ale nestačí na to, aby vytvořila dostatečný tlak na zatlačení roztoku PBS do komůrek. Kvůli tomu je nutné na začátku experimentu pumpovat roztoky ve vyšších rychlostech a následně je zpomalit, aby bylo možné zaplnit komůrky a následně natáhnout fosfolipidové membrány. Nevýhodou počátečních velkých rychlostí však je přetlakování kanáleků, protože po zpomalení rychlosti roztoků (a tím pádem i zmenšení vyvíjeného tlaku) dochází ke zpětnému toku poháněného přetlakem, který je následně velmi náročné zastavit. Proto je nutné velmi opatrně volit počáteční rychlost a následně postupně zpomalovat, aby nedošlo k přetlakování kanáleků a zpětnému toku.

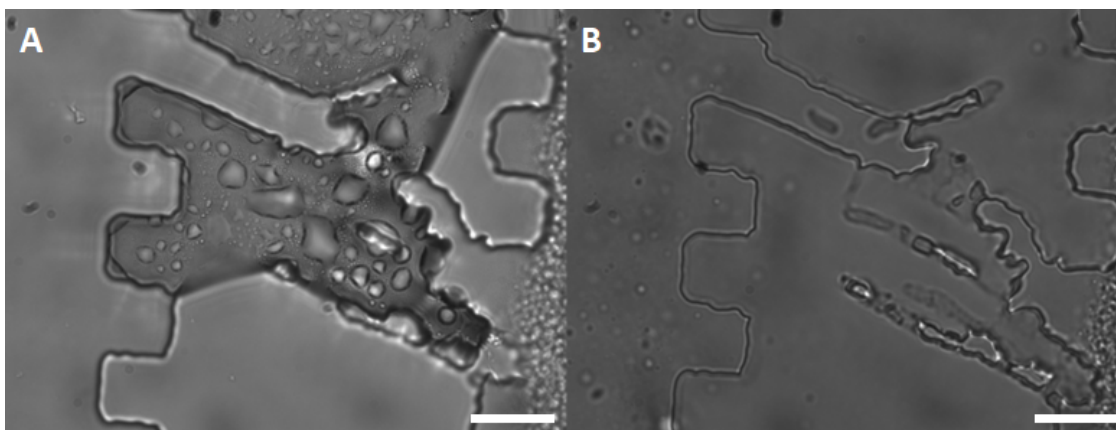


Obrázek 5.7: Postupně zaplňované komůrky od snímku A, kde žádná z komůrek není zaplněna až do snímku D, kde jsou všechny komůrky zaplněny. Měřítko má 20 μm .

5.2.2. Narušení toku roztoků v čipu

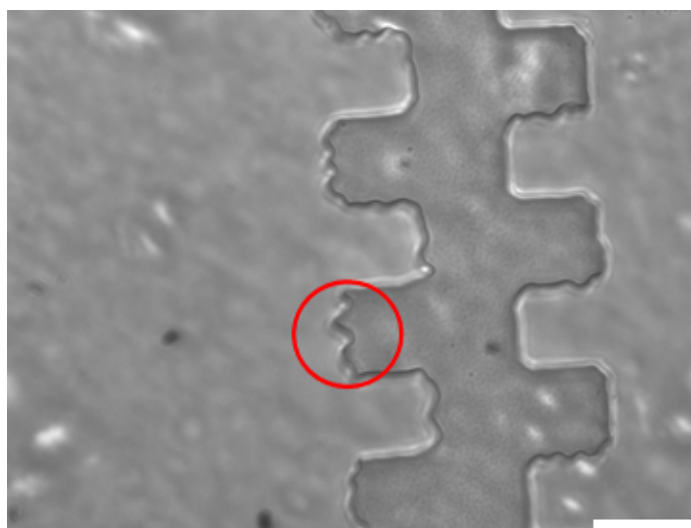
Stejně jako během kompletace aparatury (kapitola 5.1) však docházelo ke vzniku mnoha problémům. Na obrázku 5.8 je možné pozorovat fyzickou překážku tvořenou kousky polymeru PDMS. Před odléváním PDMS pro tento čip pravděpodobně došlo k poškození struktury kanálků na křemíkové masce během jejího čištění. Struktura slouží jako negativ pro odlévání kanálků, kdy polymer zateče okolo a po odloupenutí vzniká dutý obtisk. Takto překážka v kanálku zabraňuje plynulému průtoku roztoků a může mít také vliv na prostředí několik stovek μm v kanálku. Před překážkou se můžou roztoky hromadit pod zvýšeným tlakem a naopak za překážkou mohou proudit příliš rychle, než opět zpomalí na požadovanou rychlost. Díky tomu nemusejí vznikat stabilní membrány.

Druhým možným problémem této překážky ve tvaru hráze je výrazné narušení rozhraní mezi jednotlivými roztoky, která jsou potřeba pro tvorbu membrán. Díky zúžení rovného kanálku dochází ke vzniku turbulentního proudění a promíchání jednotlivých roztoků. Následně může dojít ke vzniku emulze a zřetelná rozhraní zaniknou. Membrány tak není možné vytvořit ani po opětovném vzniku laminárního proudění dál v kanálku.



Obrázek 5.8: Překážka v kanálku zabraňující hladkému průtoku roztoků. (A) roztok se nachází ve spodní polovině kanálku, v horní je překážka z polymeru; (B) celý kanál je zaplaven roztokem a je možné vidět všechny překážející části polymeru. Měřítko má 20 μm .

Narušení laminárního toku roztoků může být také způsobeno hrbolatými stěnami kanálků (obrázek 5.9). Tento problém má na tok pouze lokální vliv (jednu až dvě komůrky za hrboly), ale pokud by se na stěnách vyskytoval často, mohl by významně ovlivnit tvorbu membrán. Ke vzniku takto hrbolatých stěn muselo dojít pouze během výroby křemíkové masky na externím pracovišti a nelze je nijak opravit.

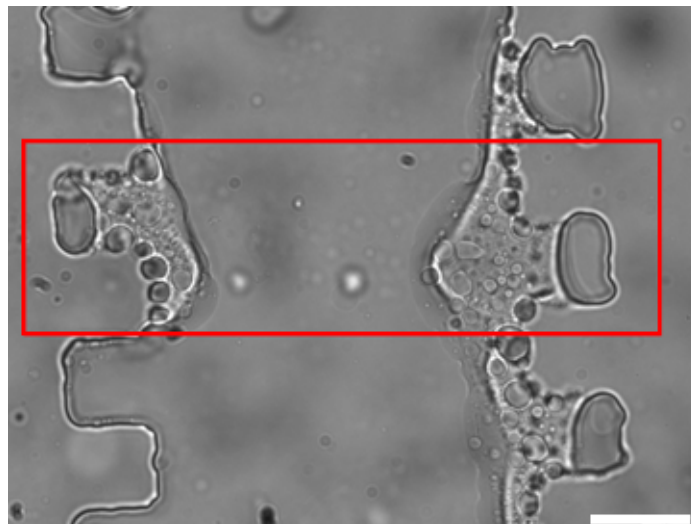


Obrázek 5.9: Hrbolatá stěna kanálku i komůrek. Měřítko má 20 μm .

Během pumpování roztoků do čipu může dojít k porušení rozhraní i jinak než vznikem turbulentního toku. Obrázek 5.10 ukazuje, jak je roztok hexadekanu s obsahem lecitinu rozdělen na dvě jednotlivé části, které přilnuly ke stěnám kanálku. Původně bylo ve vyznačené oblasti pozorováno zřetelné rozhraní mezi třemi roztoky jako je na obrázku 5.2. Kombinací velké rychlosti pumpování roztoků do čipu a příliš malého množství hexadekanu v kanálku došlo ke stlačení už tak tenké prostřední vrstvy na ještě tenčí. Následně tato vrstva praskla a první a poslední roztoky se slily dohromady. V případě kompletního

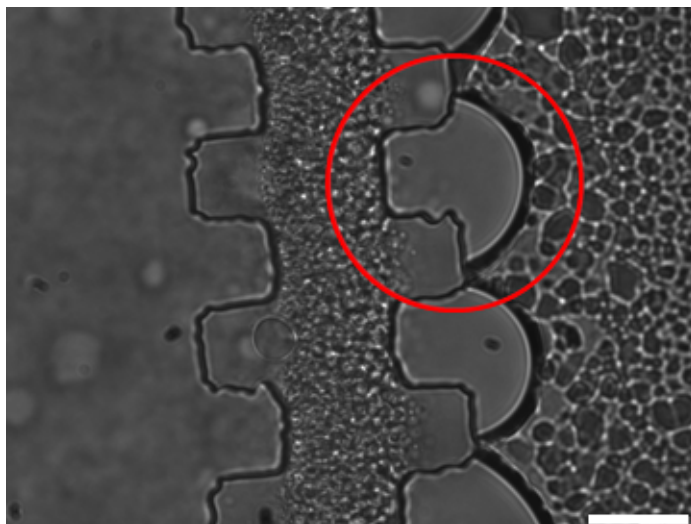
5.2. OPTIMALIZACE NAPOUŠTĚNÍ ČIPU

přerušení hexadekanové vrstvy již není možné ji opětovně vytvořit a nemůže tak dojít ke vzniku membrán ve zbytku kanálku. Je však možné tomu předejít zpomalením rychlosti pumpování a nasátím většího množství roztoku hexadekanu do hadičky, odkud se pumpuje do čipu a distribuuje do čtyř kanálků ve větší vrstvě.



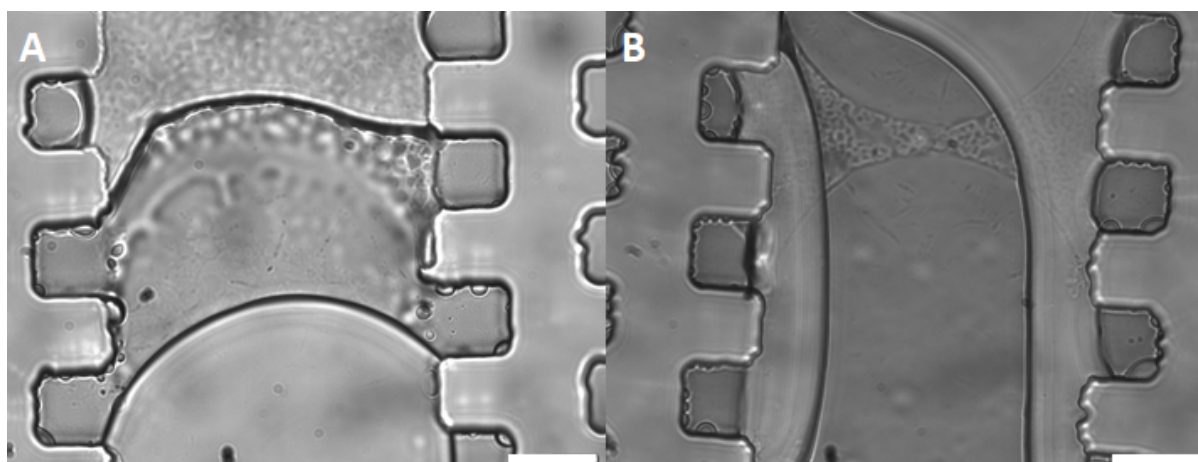
Obrázek 5.10: Přerušené rozhraní mezi třemi po sobě jdoucími roztoky. Měřítko má 20 μm .

Pokud dojde k chybě během lepení PDMS a krycího sklíčka plazmou nebo je čip příliš starý, dochází k jeho podtékání. Pokud je vazba mezi PDMS a sklíčkem jen slabě narušená, může dojít k nežádoucímu protečení roztoku z jednoho kanálku do druhého. V případě, že by v druhém kanálku již byly membrány, může dojít k jejich prasknutí vlivem kolmo vyvíjeného tlaku. Na obrázku 5.11 je vlevo možné vidět kanál naplněný fluorescenční sondou ATTO, která podtéká pod stěnou z PDMS do prázdného pravého kanálu. V červeném kolečku je znázorněno čelo roztoku, který následně tek l doprava, dokud nedošlo ke spojení všech takto vzniklých toků a k zaplnění kanálu.



Obrázek 5.11: Podtékání roztoku mezerou mezi polymerem a krycím sklíčkem. Měřítka má 20 μm .

Na obrázku 5.12 je možné pozorovat co se stane, pokud jsou do hadičky kromě roztoků nasáty i vzduchové bubliny. Na snímku A je uprostřed kanálku vidět vzduchová kapsa mezi dvěma částmi roztoku PBS, která blokuje plynulý průtok. Snímek B pak zobrazuje variantu, kdy se vzduch dostal skrz roztok a rozdělil jej na dvě části. Při malých průtokových rychlostech nedochází k vytvoření dostatečného tlaku, který by vzduch posouval kanálkem pryč a ten se tak zablokuje. Pokud ke vzniku takové vzduchové kapsy dojde na začátku napouštění čipu ještě než se do kanálků dostane roztok hexadekanu, je možné dočasně zvýšit rychlost průtoku a vzduch tak vytlačit. V momentě, kdy ke vzniku vzduchové kapsy dojde později, není možné ji odstranit aniž by nedošlo k poškození vznikajících membrán. Vzduchové rozhraní následované dalším roztokem vytváří na model membrány vytvářený v této práci příliš velký tlak a membrána praskne.



Obrázek 5.12: Vzduchové bubliny mezi roztoky v kanálku. Měřítka má 20 μm .

5.2.3. Rychlost napouštění roztoků

Rychlost napouštění roztoků do čipu má na tvorbu fosfolipidových membrán největší vliv. Jedná se o parametr, který je možné nastavit na mikrofluidní pumpě a dá se v průběhu měření přizpůsobit podle potřeby. Pokud se roztoky do čipu dostanou příliš rychle, pouze kanálky protečou a membrány nevzniknou. Pokud roztoky proudí příliš pomalu, je vysoce pravděpodobné, že se do kanálek nedostanou kvůli vysokému odporu čipu - nedojde k vytvoření dostatečného tlaku, který by roztoky do kanálek protlačil.

V tabulce 5.1 jsou uvedeny počáteční rychlosti pumpování roztoků do několika ukázkových čipů. Byl sledován čas toku roztoku (t_1) od zapnutí pumpy po první vtečení do čipu. Příslušné počáteční rychlosti pumpování do každého čipu jsou v tabulce 5.1 znázorněny barevnými políčky. Čas t_1 pro první roztok je vztažen k reálné rychlosti toku roztoků v čipu a poté je přepočítán na čas t_{700} pro rychlost 700 nl/min, aby jednotlivé časy bylo možné porovnat. Poslední řádek tabulky 5.1 uvádí, jestli byla tvorba membrány úspěšná.

Z těchto dat je zřejmé, že membrány vznikaly pouze při vysokých počátečních rychlostech (1000, 700 a 500 nl/min) a objemu hexadekanu v intervalu 1,5 - 5 μ l. Dále z této tabulky vyplývá, že nejvyšší čas pro natečení prvního roztoku PBS do čipu se pohybuje kolem 10 min. Pokud se tento čas prodlouží, zvyšuje se pravděpodobnost, že je ucpaný čip nebo je problém jinde v aparatuře.

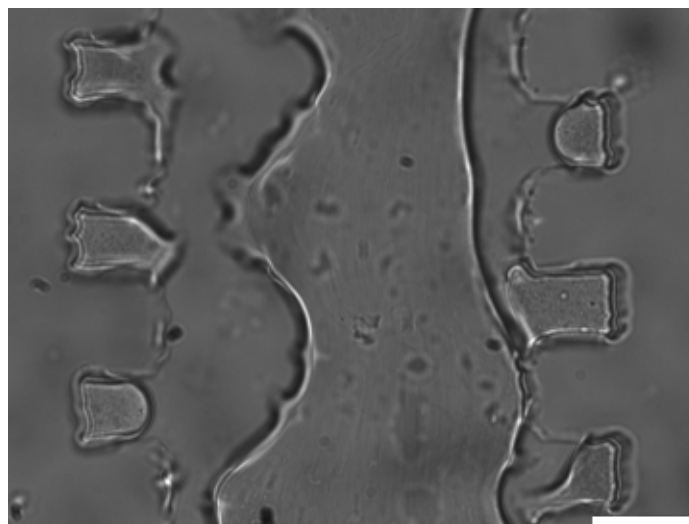
U nižších rychlostí (500 a 300 nl/min) docházelo k časté tvorbě zpětného toku v důsledku nedostatečného natlakování roztoků v hadičce. Tyto rychlosti nedodají hexadekanu dostatečnou hybnost, aby se dostal až do kanálek. V momentě, kdy se rychlost pumpování zpomalí těsně před jeho nástupem, aby byla jasná fázová rozhraní a mohly bezpečně vzniknout membrány, tlak v hadičce se sníží a je menší než tlak potřebný pro úspěšné napumpování roztoků. To způsobí proudění roztoků proti směru pumpování a znemožní tvorbu fosfolipidových membrán. Druhou variantou je ucpaní krajních kanálek, které je více popsáno v kapitole 5.4.

S tlakem uvnitř aparatury souvisí i objem hexadekanu, který je do čipu pumpován. Pokud je jeho množství příliš velké (tabulka 5.1, čip č.1), musí být vysoká rychlost pumpování roztoků. Následný vysoký tlak však poškozuje aparaturu v jejích spojích nebo rovnou způsobuje oddělení polymeru a krycího sklíčka. Více o vlastnostech a problémech hexadekanu je popsáno v kapitolách 5.3 a 5.3.2.

Vysoké rychlosti průtoku roztoků kanálky mohou způsobit promíchání rozhraní mezi jednotlivými roztoky jak je možné vidět na obrázku 5.13. Tmavší roztok hexadekanu uzavřel roztok PBS v komůrkách, ale protože rychlost průtoků nebyla včas snížena z 1 μ l/min na maximálně pár desítek nl/min prorazil za roztokem hexadekanu světlejší roztok rhodaminu. Původně hladké rozhraní bylo narušeno a membrány tak nemohly vzniknout. Naopak vrstva lipidů, která už byla natažena z prvního rozhraní mezi PBS a hexadekanelem byla vzniklým proudem rozbita.

Tabulka 5.1: Tabulka počátečních rychlostí roztoků ve vybraných čípech s časovými údaji o prvním vtečení roztoku do kanálek. Komentář vyjadřuje vyhodnocení, jestli byly nataženy membrány nebo jestli došlo ke komplikacím.

číslo čipu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V hexadekan [μl]	10	5	1,5	1,5	5	5	5	5	1,5
v [$\frac{\text{nl}}{\text{min}}$]	1000								
	700								
	500								
	300								
t₁ [min]	-	-	11:00	5:20	4:23	>35:00	11:40	21:00	>25:00
t₇₀₀ [min]	-	-	11:00	5:20	3:08	25:00	8:20	9:00	10:43
komentář	poškození aparatury	membrána	membrána	membrána	membrána	ucpaný čip	zpětný tok	zpětný tok	ucpaný čip



Obrázek 5.13: Roztok hexadekanu vytlačený roztokem rhodaminu. Měřítko má 20 μm .

5.3. Roztoky

Roztoky se do mikrofluidního čipu dostávají pomocí systému *mikrofluidní pumpa-stříkačka-hadička*, který zajišťuje plynulý tok roztoků. Roztoky jsou do stříkačky s připojenou hadičkou nabírány ručně, což znamená, že objem roztoků je v každém čipu trochu jiný. Rysky na stupnici stříkačky používané v této práci mají rozlišení 10 μl . Okem lze jednotlivé dílky dělit na poloviny a čtvrtiny rysky, což umožňuje nabírat i menší množství než 10 μl , ale výsledný objem je poté velmi orientační. Pro získání přesných objemů roztoků, které by byly spolehlivě opakovatelné, je třeba vyvinout novou metodu. Ta by umožnila v teoretických modelech a ve vyhodnocení počítat s veličinou objemu jako s konstantou a získat spolehlivějších dat.

Zajímavý problém vytvořily samotné roztoky PBS a hexadekanu, kdy docházelo ke změně jejich pořadí v hadičce oproti původnímu dávkování. Samo nabírání do hadičky

vyžaduje manuální zručnost operátora, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin nebo ulpívání přebytku roztoků na vnější stěně hadičky. Ten totiž může snadno stéct na okraj hadičky a následně být nasán dovnitř, což způsobí vznik několika segmentů s roztoky o neurčitém pořadí a také vznik mnoha fázových rozhraní. Princip vzniku membrány je založen na jednom segmentu roztoků *PBS-hexadekan-PBS* a k tomu patřících dvou fázových rozhraní (viz. kapitola 3.4, článek *Ota a spol.* [42]). Více segmentů sice nevyklučuje vznik membrán, ale má zásadní vliv na jejich časovou stabilitu. Síla nárazu nového rozhraní do membrány způsobí její zánik, přestože se jinak jedná o stabilní strukturu.

Vznik několika segmentů roztoků však nevzniká jen lidským faktorem. Při pozorování roztoků v hadičce proti světlu bylo zjištěno, že se jednotlivé roztoky mezi sebou rozdělily na více částí, které kolem sebe protekly, a ze správně nabraného jednoho segmentu časem vytvořily dva a více. Důvod tohoto problému spočívá v odlišné hustotě jednotlivých roztoků. Roztok hexadekanu se normálně nachází mezi dvěma vodnými roztoky PBS ve svislé hadičce. Hustota hexadekanu je však nižší než hustota vody, takže část horního, těžšího roztoku PBS proteče kolem části prostředního, lehčího hexadekanu a vytlačí ji nahoru. Tomuto ději lze částečně předejít volbou hadičky o malé vnitřním průměru, i tak ale k prohazování roztoků dochází. Vhodnějším řešením je nalezení lepšího rozpouštědla, které by mělo hustotu blízkou vodě (viz. kapitola 5.3.2).

V článku [42], ze kterého vychází tato práce, byl ve stříkačce obsažen roztok tetradekafluorhexanu, který však nikdy nedoputoval až do čipu. Jeho využití spočívalo v tlumení nárazů způsobených cykly motoru mikrofluidní pumpy, které vytvářely tlakové vlny a měly negativní vliv na tvorbu membrán. V této práci však takovýto tlumící roztok nebyl potřeba, protože pod mikroskopem byl pozorován pouze hladký tok jednotlivých roztoků i posun fázových rozhraní. Pokud by v budoucnu došlo k opakujícímu se trhanému posunu kterékoli části roztoku, bylo by vhodné zvážit opětovné přidání tetradekafluorhexanu do stříkačky.

Existují dvě varianty, jak fluorescenčně značit roztoky. Buď je možné sondu rozpustit ve vodném roztoku nebo fluorescenčně označit lipidy. Za účelem naučit se nabírat roztoky do hadičky a pod mikroskopem umět rozpoznat jednotlivé roztoky je lepší fluorescenčně značit vodný roztok. Při výběru látky, která výrazně obarví roztok i na denním světle, je možné ho pozorovat i ve velmi malém objemu v hadičce. Díky tomu dokáže i nový operátor spolehlivě určit, zda jsou roztoky nabrané správně, bez bublin a zda se mezi sebou nepromíchaly.

Fluorescenční značení lipidů je vhodné pro samotné zkoumání membrán. Zatímco značení lipidů umožňuje pozorovat přímo membránu a s jistotou určit její polohu, označený vodný roztok ukazuje pouze světlé plochy tam, kde se nachází. Nelze tak vždy spolehlivě určit, jestli membrána vznikla a brání prostupu sondy do komůrky, pokud je sonda v kanálku (do kanálku, pokud je sonda v komůrce), nebo se na druhé straně místo domnělé membrány nachází vzduchová bublina. Ta je totiž, stejně jako neoznačený roztok, ve fluorescenčním zobrazení černá a může tak zmást operátora.

5.3.1. Vodná fáze

Vodné fáze roztoků jako jsou roztoky fluorescenční sondy ATTO 488, Rhodamin 6G, PBS a další se chovají podle předpokladů a potvrzují teoretické modely (viz. kapitola 5.2.1). Obecný vzhled vodné fáze je možné vidět na obrázku 5.4 a 5.7 (kapitola 5.2.1). Roztoky jsou bez viditelných částic nebo bublin a po zatečení do komůrek je možné jasně rozeznat předěl mezi polymerní stěnou a kanálkem.

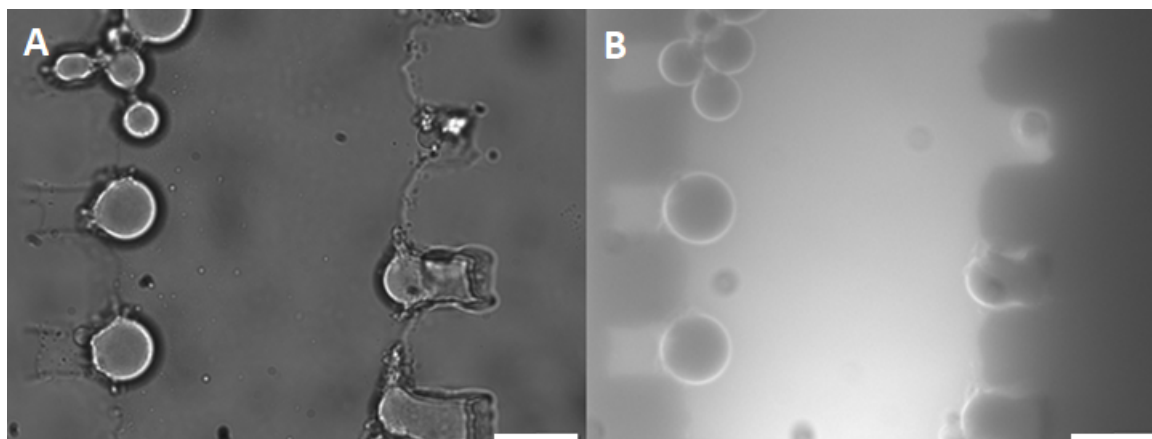
5.3.2. Organická fáze

Hexadekan je organické rozpouštědlo hojně využívané pro tvorbu modelů lipidových membrán. Je-li s ním nakládáno za správných podmínek, poskytuje dobré prostředí pro rozpuštění lipidů a následnou tvorbu membrán v mikrofluidním čipu. Tyto správné podmínky je potřeba ještě více prozkoumat a optimalizovat i v dalších bakalářských nebo diplomových pracích, aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků.

Část problémů již byla rozebrána v kapitole 5.3, kde se jednalo o promíchání segmentů vodné a organické fáze v hadičce na základě odlišné hustoty. Další komplikace použití hexadekanu spočívají v jeho vysoké viskozitě v porovnání s vodou (návaznost na kapitolu 5.2.3). V praxi to znamená, že mikrofluidní pumpa roztoky velmi obtížně a pomalu pumpuje do kanálků, čímž se prodlužuje doba trvání experimentu. Aby se hexadekan do kanálků dostal, musí pumpa vytvořit obrovský tlak v celé aparatuře. Při snaze zkrátit tento čas z potenciálních hodin na desítky minut byla dočasně zvýšena rychlost dávkování roztoků do čipu a tím i vnitřní tlak. Těsně před vstupem hexadekanu do čipu byla tato rychlost opět zpomalena, aby hexadekan nevytlačil vodný roztok PBS z komůrek namísto vytvoření první vrstvy fosfolipidů. Toto zpomalení však na reálnou rychlost roztoků nemá vliv. V momentě, kdy na hexadekan působí dostatečná síla, je velmi obtížné jej zpomalit a zabránit jeho velmi rychlému vtečení do kanálků. Tím vytlačí PBS z komůrek a znemožní vznik zřetelného fázového rozhraní potřebného pro vznik membrán.

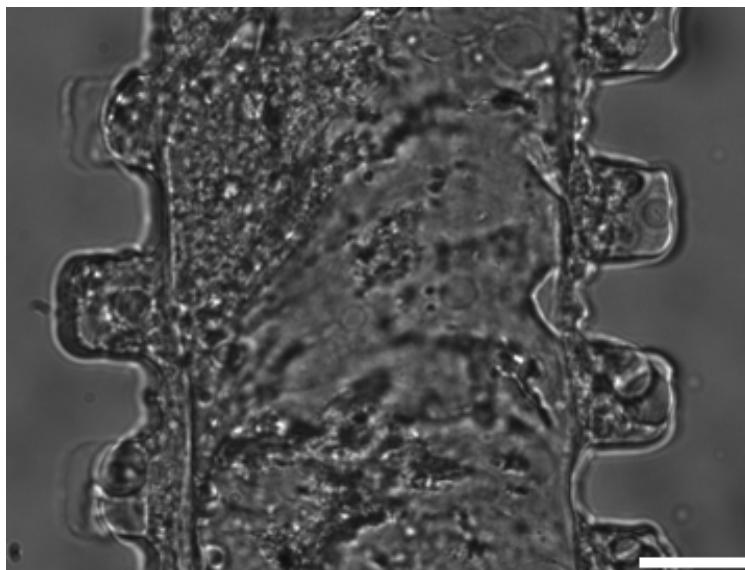
Vzhledem k četnosti problémů s hexadekánem a jejich neúspěšnému vyřešení bylo zvoleno nové rozpouštědlo pro fosfolipidy – minerální olej. Jeho použití se však neslo v podobném duchu, ale s ještě obtížněji řešitelnými problémy a nakonec byl opět zvolen hexadekan.

Minerální olej o podobné hustotě i viskozitě jako voda se sice s vodnými roztoky v hadičce nepromíchal, ale zato vytvořil novou překážku pro vznik membrán. Díky tomu, že tento olej tvoří větší kontaktní plochu s vodným roztokem než hexadekan, snadněji vytlačuje roztok PBS z komůrek. Obrázek 5.14, snímek A zobrazuje moment, kdy se olej dostal kolem roztoku PBS v komůrce (vpravo uprostřed). Následně PBS vytvořilo kouli a zůstalo na hraně komůrky (vlevo u všech komůrek). Na snímku B je stejná situace zobrazena pomocí fluorescence. Minerální olej obsahoval rozpuštěnou nilskou červeň, která na snímku svítí, zatímco vodný roztok PBS a polymerní stěna kanálku zůstávají tmavé.



Obrázek 5.14: A) transmissní a B) fluorescenční zobrazení nežádoucí vytlačení vodného roztoku PBS z komůrek minerálním olejem. Měřítko má 20 μm .

Další problém způsobený minerálním olejem byl pracovně pojmenován "ropa" (obrázek 5.15). Z neznámých důvodů olej vytváří s vodou emulzi, přestože nikde v aparatuře není možnost, aby se tyto dva roztoky mezi sebou promíchaly. Takto vzniklá hmota se kanálkem pohybuje velmi pomalu a s obtížemi, čímž připomíná tím ropnou skvrnu. Nejenže tak zaniká rozhraní potřebné pro tvorbu membrán, ale dochází k úplnému ucpání kanálků a experiment je nutné ukončit.



Obrázek 5.15: Emulze vodného roztoku PBS a minerálního oleje, která znemožňuje úspěšnou tvorbu fosfolipidových membrán. Měřítko má 20 μm .

5.4. Geometrie čipu

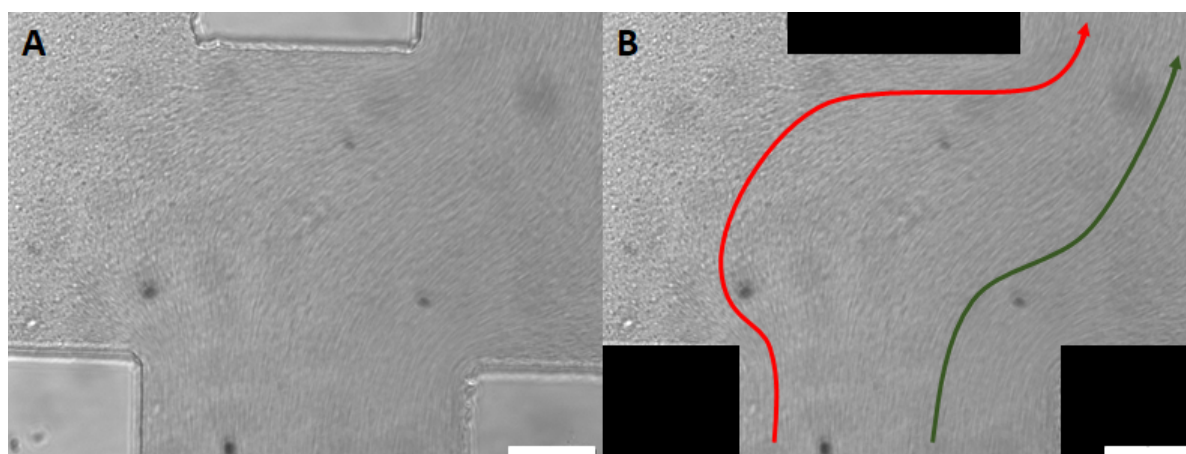
Během některých měření se stávalo, že se krajní kanálky ucpaly, přestože nikde nebyla viditelná překážka, která by bránila toku. Při zobrazení vstupní struktury, kde se jeden vstupní kanálek dělí do dvou, bylo zjištěno, že se roztok ve vnitřním kanálku pohybuje

rychleji. Kvůli tomu dorazí na výstupní sloučení kanálků dříve a teče nejen do výstupního konektoru, ale i se krajním kanálkem vrací zpět, čímž jej zablokuje. Tento děj je schématicky znázorněn na obrázku 5.16.



Obrázek 5.16: Schéma struktury kanálků v mikrofluidním čipu. Zelená šipka znázorňuje správný tok roztoků kanálkem i spojovacím místem. Červená šipka představuje nežádoucí tok roztoků do krajního kanálku z výstupní strany. Červený rámeček je místo, kde byl pořízen obrázek 5.17.

Obrázek 5.17, snímek a ukazuje místo, kde by se roztok měl rozdělit na dvě části a každá by měla téct do jednoho kanálku - vnitřního vpravo a vnějšího vlevo. Reálně však veškerý roztok teče pouze do pravého vnitřního kanálku, jak je znázorněno na snímku B červenou šipkou, což se děje kvůli problému znázorněnému na obrázku 5.16. Zelená šipka představuje správný tok pravé části roztoku do pravého vnitřního kanálku.



Obrázek 5.17: Počátek kanálků v mikrofluidním čipu; a) neupravený snímek toku roztoku, b) grafické dokreslení toku roztoku pro lepší zobrazení. Měřítko má 20 μm .

Vracení roztoků krajními kanálky významně ztěžuje tvorbu fosfolipidových membrán. V kanálkách se před napuštěním roztoku PBS nachází vzduch, který za běžných podmínek odchází výstupním otvorem a v čipu nezůstává. Když však dojde k proniknutí roztoku z vnitřního kanálku do vnějšího (obrázek 5.16, červená šipka), dochází k polapení vzduchu, který nestačil odejít výstupním otvorem a který je následně nemožné vytlačit. Důsledkem toho je již zmíněný jev z obrázku 5.17. Tlak, který by musel být vytvořen, by pravděpodobně dříve poškodil samotný čip než by stihl uvolnit kanálek.

Mimo ucpání jednoho až dvou kanálků, které jsou následně nepoužitelné, je výrazně těžší regulace rychlosti toku v čipu. Tím, že zbývajících kanálek protéká až dvojnásobný objem kapaliny, dochází k výraznému zrychlení toku, které je téměř nemožné regulovat. Řešením by mohla být redukce počtu kanálek ze čtyř na dva, jako je na obrázku 5.18. Oba kanálky budou stejně dlouhé a roztoky se dostanou od vstupního k výstupnímu rozvětvení stejně rychle.



Obrázek 5.18: Návrh struktury čipu se dvěma kanálky

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat postup pro tvorbu fosfolipidových membrán na mikrofluidním čipu. Byla zpracována rešerše na složení buněčné membrány, na její různé modely a způsoby jak ji vytvořit v mikrofluidním čipu. S využitím poznatků předchozích bakalářských prací [27, 49] a článku [42] byl následně sestaven postup pro výrobu polymerního čipu a byla sestavena aparatura pro napouštění roztoků do jeho vnitřní struktury.

V rámci experimentální části bylo úspěšně ověřeno sestavení aparatury. Bylo vyrobeno těsnící propojení injekční stříkačky, hadičky a mikrofluidního čipu pomocí UV gelu a byl optimalizován postup plnění hadičky roztoky. Byl potvrzen laminární tok v kanálcích a parabolické čelo roztoků, což svědčí o správně zvoleném teoretickém modelu pro matematickou modelaci jevů v kanálcích. V několika čípech se také povedlo vyrobit a popsat vzhled fosfolipidové membrány tvořené L- α -fosfatydilcholinem rozpuštěným v hexadekanu (kapitola 5.2.1). Zatím je možné říct, že lecitinová membrána v čipu vzniká při relativně vysokých počátečních rychlostech roztoků (500–1000 nl/min) a objemu hexadekanu v intervalu 1,5–5 μ l.

Tvorba membrány však byla provázána mnoha komplikacemi jako například vzduchové bubliny v kanálcích, náročná práce s organickými rozpouštědly nebo správná rychlost napouštění roztoků do kanálek. Tyto komplikace jsou více zdokumentovány, popsány a zcela nebo částečně vysvětleny a vyřešeny v jednotlivých kapitolách části "Výsledky a diskuze" (kapitola 5).

Pro úspěšnou tvorbu fosfolipidových membrán v mikrofluidním čipu je potřeba dokonalit systém zapisování dat během měření, jako je například objevení komplikací v průběhu měření, jejich vliv na rychlost toku a tvorbu membrán. Potom je důležité více prozkoumat vliv rychlosti napouštění roztoků do čipu, aby nedocházelo ke zpětnému toku roztoků. Dále je třeba více optimalizovat vliv hexadekanu a jeho vlastností na tok hadičkou a kanálky nebo najít jiné, vhodnější rozpouštědlo pro fosfolipidy. Možným řešením problému, kdy se roztoky vrací zpět krajními kanálky by mohla být jiná geometrie čipu s menším počtem kanálek. Co se týká zobrazování a fotodokumentaci kanálek, mohlo by být vhodné vyzkoušet objektiv s menším zvětšením než 60x. Umožnilo by to pozorování a zaznamenání více komůrek zároveň, což by znamenalo jednodušší vyhodnocování úspěšnosti tvorby membrán. Aby mohl být tento model membrán úspěšně využíván na příklad pro výzkum transportu látek pomocí proteinových kanálů, je také třeba zjistit spolehlivost vzniku membrán a jejich časovou stabilitu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. CAMPBELL, Neil A.; REECE, Jane B. *Biologie*. Computer Press, a. s. Brno, 2006. ISBN 80-251-1178-4.
2. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie*. Espero publishing, 1998. ISBN 80-902906-0-4.
3. TEPLÁ, Milada. *Biochemie - základní kapitoly - Transport látek pes membrány*. Dostupné také z: <http://www.studiumbiochemie.cz/bunka4.html>.
4. VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biologie*. Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
5. RAMOS-MARTÍN, Francisco; D'AMELIO, Nicola. Biomembrane lipids: When physics and chemistry join to shape biological activity. *Biochimie*. 2022.
6. FIUME, Z. Final Report on the Safety Assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *International Journal of Toxicology*. 2001, roč. 20, č. 1, s. 21–45. Dostupné z DOI: [10.1080/109158101750300937](https://doi.org/10.1080/109158101750300937).
7. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. Galén, 2005. ISBN 80-7262-311-7.
8. ARRIAGA, Laura R; RODRÍGUEZ-GARCÍA, Ruddi; MOLEIRO, Lara H; PRÉVOST, Sylvain; LÓPEZ-MONTERO, Iván; HELLWEG, Thomas; MONROY, Francisco. Dissipative dynamics of fluid lipid membranes enriched in cholesterol. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017, roč. 247, s. 514–520.
9. WATSON, Helen. Biological membranes. *Essays in Biochemistry*. 2015, roč. 59, s. 43–69. ISSN 0071-1365. Dostupné z DOI: [10.1042/bse0590043](https://doi.org/10.1042/bse0590043).
10. OTOMAR, Kittnar et al. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing as, 2011.
11. SANDERSON, John M. Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes. *Molecular Membrane Biology*. 2012, roč. 29, č. 5, s. 118–143. Dostupné z DOI: [10.3109/09687688.2012.678018](https://doi.org/10.3109/09687688.2012.678018).
12. STEVENSON, P; TOKMAKOFF, A. Infrared insights into the effect of cholesterol on lipid membranes. *Chemical Physics*. 2018, roč. 512, s. 146–153.
13. GENOVA, J; BIVAS, I; MARINOV, R. Cholesterol influence on the bending elasticity of lipid membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, roč. 460, s. 79–82.
14. HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
15. YAHIA, A.; MANTELLATO, S.; FLATT, R.J. 7 - Concrete rheology: A basis for understanding chemical admixtures. In: AÏTCIN, Pierre-Claude; FLATT, Robert J (ed.). *Science and Technology of Concrete Admixtures*. Woodhead Publishing, 2016, s. 97–127. ISBN 978-0-08-100693-1. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100693-1.00007-2>.

16. CHENG, Sha; CHEN, Wen; ZHANG, Pengchao. Developing advanced polymer films based on microfluidic laminar flow. *Giant*. 2022, s. 100091.
17. HAVRDA, Jiří. *Silikátové inženýrství I*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987.
18. BRUUS, Henrik. *Theoretical Microfluidics*. 2008. ISBN 978-0-19-923509-4.
19. YAN, Jiasheng; LI, Ziwei; GUO, Jiuchuan; LIU, Shan; GUO, Jinhong. Organ-on-a-chip: A new tool for in vitro research. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022, roč. 216, s. 114626.
20. GARG, N; VALLEJO, D; BOYLE, D; NANAYAKKARA, I; TENG, A; PABLO, J; LIANG, X; CAMERINI, D; LEE, AP; FELGNER, P. Integrated on-chip microfluidic immunoassay for rapid biomarker detection. *Procedia engineering*. 2016, roč. 159, s. 53-57.
21. LI, Guangming; LIU, Chen; ZHANG, Xingcai; ZHAI, Peng; LAI, Xinyi; JIANG, Wenxiao. Low temperature synthesis of carbon dots in microfluidic chip and their application for sensing cefquinome residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*. 2023, roč. 228, s. 115187.
22. UFLUIDIX. *Microfluidic Chips: definition, functions, applications* [online]. 2022. [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.ufluidix.com/microfluidics/microfluidic-chip/>.
23. ARALEKALLU, Shambhulinga; BODDULA, Rajamouli; SINGH, Vijay. Development of glass-based microfluidic devices: A review on its fabrication and biologic applications. *Materials and Design*. 2023, roč. 225, s. 111517. ISSN 0264-1275. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111517>.
24. WOLF, Marc P; SALIEB-BEUGELAAR, Georgette B; HUNZIKER, Patrick. PDMS with designer functionalities-Properties, modifications strategies, and applications. *Progress in Polymer Science*. 2018, roč. 83, s. 97-134.
25. ELVEFLOW. *PDMS: a review* [online]. 2019. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/>.
26. MORBIOLI, Giorgio Gianini; SPELLER, Nicholas Colby; STOCKTON, Amanda M. A practical guide to rapid-prototyping of PDMS-based microfluidic devices: A tutorial. *Analytica chimica acta*. 2020, roč. 1135, s. 150-174.
27. HALUZOVÁ, Kateřina. *Mikrofluidní modely buněčných membrán*. 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131357>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

28. VARGOVÁ, Alžběta. *Pokročilé membránové systémy*. 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
29. MURPHY, Douglas B; DAVIDSON, Michael W. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. 2. vyd. Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 047169214X.
30. KLÁN, Petr. *Organická fotochemie*. Vydavatelství MU, 2001. ISBN 80-210-2526-3.
31. LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2006.
32. CASALINI, Tommaso; LIMONGELLI, Vittorio; SCHMUTZ, Mélanie; SOM, Claudia; JORDAN, Olivier; WICK, Peter; BORCHARD, Gerrit; PERALE, Giuseppe. Molecular modeling for nanomaterial–biology interactions: Opportunities, challenges, and perspectives. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019, roč. 7, s. 268.
33. ANDRADE, Stephanie; RAMALHO, Maria J; LOUREIRO, Joana A; PEREIRA, Maria Carmo. Liposomes as biomembrane models: Biophysical techniques for drug-membrane interaction studies. *Journal of Molecular Liquids*. 2021, roč. 334, s. 116141.
34. MARRINK, Siewert J.; DE VRIES, Alex H.; TIELEMAN, D. Peter. Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009, roč. 1788, č. 1, s. 149–168. ISSN 0005-2736. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.006>. Lipid Interactions, Domain Formation, and Lateral Structure of Membranes.
35. ILANGUMARAN PONMALAR, Ilanila; SARANGI, Nirod K; BASU, Jaydeep K; AYAPPA, K Ganapathy. Pore forming protein induced biomembrane reorganization and dynamics: a focused review. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021, s. 786.
36. HAN, Won Bae; KANG, Dong-Hyun; KIM, Tae Song. 3D Artificial Cell Membranes as Versatile Platforms for Biological Applications. *BioChip Journal*. 2022, roč. 16, č. 3, s. 215–226.
37. HUNG, Wei-Chin; LEE, Ming-Tao; CHEN, Fang-Yu; HUANG, Huey W. The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophysical journal*. 2007, roč. 92, č. 11, s. 3960–3967.
38. WALTER, Cornelia; SEEMANN, Ralf; FLEURY, Jean-Baptiste. Flowing droplet interface bilayers: A microfluidic tool to control droplet trajectories and to study mechanical properties of unsupported lipid bilayers. *Biomicrofluidics*. 2020, roč. 14, č. 4, s. 044109.
39. CZEKALSKA, Magdalena A.; KAMINSKI, Tomasz S.; MAKUCH, Karol; GARS-TECKI, Piotr. Passive and parallel microfluidic formation of droplet interface bilayers (DIBs) for measurement of leakage of small molecules through artificial phospholipid membranes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, roč. 286, s. 258–265. ISSN 0925-4005. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.143>.

40. LIU, Paige; ZABALA-FERRERA, Oscar; BELTRAMO, Peter J. Fabrication and electromechanical characterization of freestanding asymmetric membranes. *Biophysical Journal*. 2021, roč. 120, č. 9, s. 1755–1764.
41. WATANABE, R; SOGA, N; HARA, M; NOJI, H. Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis. *Lab on a Chip*. 2016, roč. 16, č. 16, s. 3043–3048.
42. OTA, Sadao; SUZUKI, Hiroaki; TAKEUCHI, Shoji. Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays. *Lab on a Chip*. 2011, roč. 11, č. 15, s. 2485–2487.
43. AVANTI. *Soy PC (95%)* [online]. 2023. [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/441601>.
44. NIKOLELI, Georgia-Paraskevi; NIKOLELIS, Dimitrios P; EVTUGYN, Gennady; HIANIK, Tibor. Advances in lipid film based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, roč. 79, s. 210–221.
45. LAFTSOGLU, Theodoros; JEUKEN, Lars JC. Supramolecular electrode assemblies for bioelectrochemistry. *Chemical Communications*. 2017, roč. 53, č. 27, s. 3801–3809.
46. PARK, Soohyun; AVSAR, Saziye Yorulmaz; CORNELL, Bruce; FERHAN, Abdul Rahim; JEON, Won-Yong; CHUNG, Minsub; CHO, Nam-Joon. Probing the influence of tether density on tethered bilayer lipid membrane (tBLM)-peptide interactions. *Applied Materials Today*. 2020, roč. 18, s. 100527.
47. ATANASOV, Vladimir; KNORR, Nikolaus; DURAN, Randolph S; INGEBRANDT, Sven; OFFENHÄUSSER, Andreas; KNOLL, Wolfgang; KÖPER, Ingo. Membrane on a chip: A functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophysical journal*. 2005, roč. 89, č. 3, s. 1780–1788.
48. HUANG, Y.; FULLER, G.G.; CHANDRAN SUJA, V. Physicochemical characteristics of droplet interface bilayers. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022, roč. 304, s. 102666. ISSN 0001-8686. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102666>.
49. VEJROSTA, Jakub. *Charakterizace mikrofluidních čipů*. 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138981>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
BLM	dvojvrstvá lipidová membrána
DAG	diacylglycerol
DIB	membrána na rozhraní dvou kapek
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-fosfocholin
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfo- <i>rac</i> -1-glycerol
GUV	gigantické unilamelární vezikuly
LUV	velké unilamelární vezikuly
MD	molekulová dynamika
PBS	fosfátový pufr
PC	fosfatidylcholin
PDMS	polydimethylsiloxan
PE	fosfatidylethanolamin
PS	fosfatidylserin
sBLM	membrána přichycená na podložce
SOPC	1-stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
SUV	malé unilamelární vezikuly
tBLM	membrána ukotvená na podložce

9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Video záznam *Videonávod pro výrobu mikrofluidního čipu pro tvorbu fosfolipidových membrán.mp4*