

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Adéla Vodáková

Studium liposomů pomocí Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná Fyzika

Praha 2011

Děkuji RNDr. Evě Kočišové, Ph.D. za trpělivost a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Děkuji Doc. RNDr. Marku Procházkovi, Dr. za konzultace a objasnění některých pojmů. Děkuji Mgr. Janu Palackému za ochotné a obšírné vysvětlení jeho programu na zpracování dat. A v neposlední řadě děkuji příteli a rodině za silnou podporu v mém studiu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 19.5.2011

Adéla Vodáková

Název práce: *Studium liposomů pomocí Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků*

Autor: *Adéla Vodáková*

Katedra (ústav): *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.*

e-mail vedoucího: *Eva.Kocisova@mff.cuni.cz*

Abstrakt: *Cílem bakalářské práce je optimalizace přípravy liposomálních membrán s různým složením pro metodiku Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR), proměření DCDR spekter z vyschnutých kapek a jejich interpretace. Metoda DCDR spočívá v nanesení malého množství suspenze (~ μ l) s nízkou koncentrací na speciální povrch a proměření Ramanových spekter z kroužku vytvořeného na okraji kapky. Ukázalo se, že metoda DCDR je velmi dobře použitelná ve studiu biologických membrán s různým složením. Kvůli porovnání byly ke studiu vybrány dva lipidy umělé a jeden přírodní extrakt. Zjistili jsme, že spektra získaná z kroužku vyschlé kapky se neliší od spekter naměřených ze suspenze. Důležitým rysem spekter je zachování stejné fáze lipidu ve vyschlé kapce jako v suspenzi. Měření spektrálních map prokázalo dobrou reprodukovatelnost signálu uvnitř kroužku.*

Klíčová slova: liposom, Ramanova spektroskopie, DCDR

Title: *Study of liposomes by using of drop coating deposition Raman spectroscopy*

Author: *Adéla Vodáková*

Department: *Institute of Physics UK*

Supervisor: *RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.*

Supervisor's e-mail adress: *Eva.Kocisova@mff.cuni.cz*

Abstract: *Goal of the Bachelor Thesis was an optimization of liposome membrane preparation with different composition for the drop coating deposition Raman (DCDR) method, measuring of the DCDR spectra from dried droplets and their interpretation. The DCDR method lies in deposition of small volume of suspension (~ μ l) on special surface and measuring of Raman spectra from the ring formed at the edge of the dried droplet. The main advantage of used method is the possibility of measuring spectra from the sample with low concentration. Our results show that the DCDR method is very useful in studies of biological membranes with different composition. Two synthetic lipids and one natural extract were chosen for making a comparison. We have found out that spectra obtained from the ring of dried droplet are not different from the spectra measured in the suspension. The important characteristic of spectra is that dried droplet keeps the same lipid phase as in suspension. Spectral mapping proved good reproducibility of the signal inside the ring.*

Keywords: liposome, Raman spectroscopy, DCDR

Obsah

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Liposomy	2
2.1.1 Struktura liposomů.....	2
2.1.2 Fáze lipidů.....	3
2.2 Ramanova spektroskopie.....	5
2.3 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)..	7
2.3.1 Popis metody DCDR.....	7
2.3.2 Podložky SpectRIM™.....	9
2.4 Konfokální mikroskop.....	10
2.5 Metody zpracování naměřených dat.....	12
2.5.1 Faktorová analýza.....	12
2.5.2 Metoda ortogonálních diferencí.....	13
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	14
3.1 Použité vzorky.....	14
3.2 Příprava liposomů.....	16
3.2.1 Obecný postup.....	16
3.2.2 Připravené vzorky.....	17
3.3 Integrovaný Ramanův systém HR800.....	19
3.3.1 Součásti Integrovaného Ramanova systému HR800.....	19
3.3.2 Popis optické dráhy svazku.....	19
3.4 Použité objektivy a nastavení aparatury.....	21
4. ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH VÝSLEDKŮ.....	22
4.1 Syntetické fosfolipidy – DSPC a DPPC.....	22
4.2 Přírodní lipid – Asolektin.....	31
5. ZÁVĚR.....	35

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

V bakalářské práci jsme si kladli za cíl následující body:

- Zvládnutí a optimalizace přípravy vzorků liposomů pro Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků (DCDR).
- Proměření série Ramanových spekter z vyschlých kroužků a přímo ze zásobní suspenze, jejich kvalitativní porovnání.
- Interpretace spekter, identifikace fáze lipidů na základě tohoto přiřazení.
- Změření spektrálních DCDR map z kroužků vyschlých kapek a ověření reprodukovatelnosti signálu.

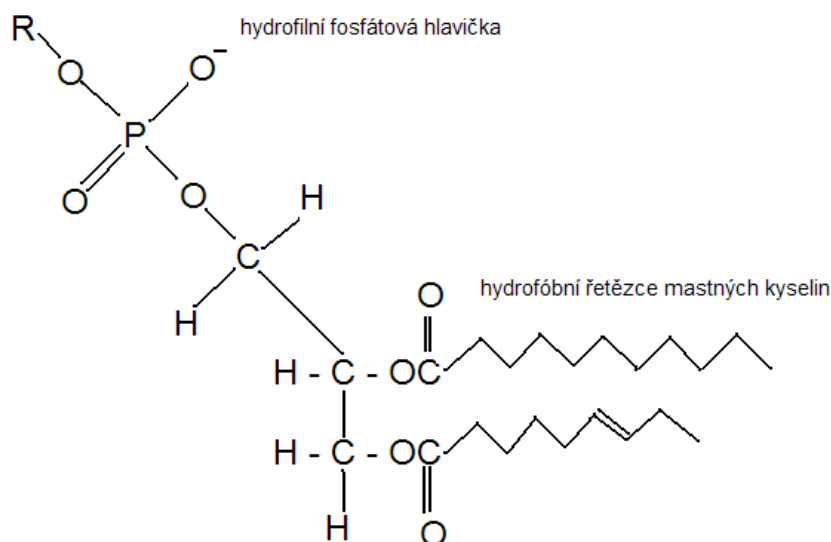
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Liposomy

2.1.1 Struktura liposomů

Liposomy jsou kulovité váčky neboli vesikuly (z anglického vesicle – váček) tvořené lipidní dvojvrstvou membránou [Rickwood, Hames, 1990]. Nejčastěji jsou tvořeny fosfolipidy. Po vložení lipidů do vodního prostředí se spontánním způsobem utvářejí lipidové struktury. Velikost liposomů se může pohybovat od desítek nanometrů po desítky mikrometrů v průměru. Používají se jako modelový systém biologických membrán.

Fosfolipidy patří mezi hlavní strukturní jednotky biologických membrán. Tvoří 40-90% váhy většiny membrán [Levin, 1984]. Sestávají z polární hlavičky a nepolárního konce tvořeného dvěma uhlovodíkovými řetězci (Obr.2.1.1). V liposomech jsou lipidy uspořádány tak, že polární hlavičky směřují ven do vodního prostředí z obou stran membrány a hydrofóbní konce jsou ukryty uvnitř membránové dvojvrstvy. V biologických membránách jsou většinou různé lipidy namíchány.

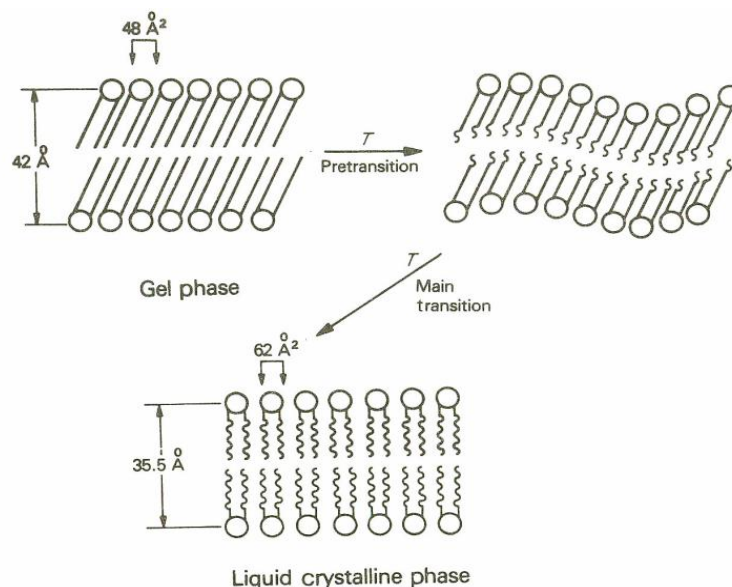


Obr.2.1.1 – Chemická struktura fosfolipidu. Na fosfátu v místě R může být navázán například etanolamin, serin či cholin.

Liposomy rozdělujeme podle velikosti a typu váčku. Rozlišujeme liposomy jednovrstevné, neboli unilamelární, a mnohovrstevné, multilamelární. Na základě velikosti dělíme liposomy na malé - SUVs (small unilamellar vesicles) s průměrem pohybujícím se v řádu desítek nanometrů, velké - LUVs (large unilamellar vesicles) s velikostí kolem jednoho mikrometru a obrovské GUVs (giant unilamellar vesicles) od několika jednotek až do pár desítek mikrometrů. Oligovesikulární liposomy OVLs (oligovesicular vesicles) jsou tvořeny více váčky zanořenými do sebe. Velikosti se pohybují v širokém rozmezí od stovek po tisíce nanometrů. Struktura výsledných vesikul úzce souvisí se způsobem jejich přípravy [Rickwood, Hames, 1990].

2.1.2 Fáze lipidů

V závislosti na teplotě se lipidní membrány mohou vyskytovat ve dvou různých fázích [Rickwood, Hames, 1990]. Pod teplotou fázového přechodu je membrána v gelové neboli pevné fázi, poté s rostoucí teplotou přechází do fáze kapalného krystalu. Toto skupenství nemá tak pevně srovnanou strukturu jako fáze pevná, ale stále je zde zachován určitý stupeň zarovnání. Na Obr.2.1.2 je znázorněn fázový přechod z gelové fáze do fáze kapalného krystalu přes mezistav. Jak je vidět, při tomto přechodu dojde k uvolnění uspořádanosti membrány. Fáze má také vliv na tloušťku membrány a vzdálenosti mezi jednotlivými molekulami lipidů.



Obr.2.1.2 –Fázový přechod z gelové fáze do fáze kapalného krystalu. Na obrázku je také vidět uspořádání lipidů v dvojvrstvé membráně. Uvedené charakteristiky membrány jsou pro dimyristoyl fosfatidylcholin. Převzato z Levin, 1984.

Teplota fázového přechodu se u různých typů membrán velice liší. U membrán vytvořených z lecithinu extrahovaného z vaječného žloutku, se pohybuje v rozmezí od -15°C do -7°C . Oproti tomu membrány v buňkách savců mají tuto teplotu mezi 0°C až 40°C [Rickwood, Hames, 1990].

2.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je spolu s infračervenou absorpcí fundamentální metodou molekulární optické spektroskopie. Používá se k získání informace o struktuře a vlastnostech molekul. V našem experimentu byla použita na studium liposomů. Změny ve frekvenci, intenzitě a šířce spektrálních čar jsou velmi citlivé na změny ve struktuře zkoumaného vzorku (proměnlivost polohy polárních hlaviček a změny v uhlovodíkových řetězcích) [Levin, 1984].

Ramanův jev byl poprvé pozorován roku 1928 C. V. Ramanem. Již před tímto pozorováním byl Ramanův efekt předpovězen teoretickými fyziky (Kramers a Heisenberg, Dirac, Schroedinger, Smekal), kteří aplikovali kvantovou mechaniku na molekuly [Lewis, Edwards, 2001].

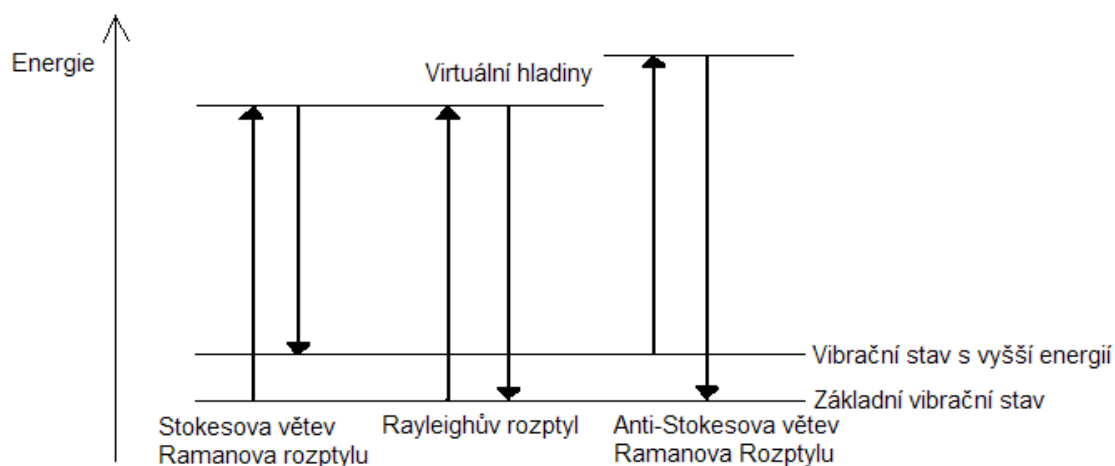
Ramanova spektroskopie je typem vibrační spektroskopie. Při dopadu záření na látku se část fotonů může absorbovat, část se elasticky rozptýlí – Rayleighův rozptyl – a jen velmi malá část se rozptýlí neelasticky – Ramanův rozptyl. Při neelastickém rozptylu monochromatického záření je část energie fotonu využita na přechod molekuly mezi vibračními stavy a zbývající energie se vyzáří jako foton buď s větší vlnovou délkou než foton původní, nebo naopak. Ramanův rozptyl je tedy dvou-fotonový jev.

Při Rayleighovu rozptylu nedochází k výměně energie mezi dopadajícím fotonem a molekulou. Tedy foton si zachová svoji frekvenci ν_0 . U Ramanova rozptylu rozlišujeme dva výše zmíněné případy. V prvním je molekula vybuzena na virtuální energetickou hladinu fotonem o energii $E_0 = h\nu_0$. Poté se molekula vrací do vibračního stavu s vyšší energií a vyzáří při tomto přechodu foton o energii $E = h(\nu_0 - \nu_1)$. Jde o tzv. Stokesův rozptyl. V druhém případě je molekula z vyššího vibračního stavu dále vybuzena do stavu virtuálního. Pak přejde zpět na základní energetickou hladinu a je vyzářen foton o energii $E = h(\nu_0 + \nu_1)$. Mluvíme o tzv. anti-Stokesově rozptylu (Obr.2.2.1).

Při Ramanově rozptylu musí být splněn zákon zachování energie:

$$h\nu_1 = h\nu_0 \pm (E - E_0) \quad (2.1)$$

kde znaménko „+“ odpovídá anti-Stokesově a „-“ Stokesově větvi Ramanova spektra.



Obr.2.2.1 – Energetická situace při Ramanově a Rayleighově rozptylu

Čáry anti-Stokesovy větve a Stokesovy větve jsou tedy ve spektru rozmístěny symetricky kolem světla rozptýleného Rayleighovým rozptylem. Avšak mají různou intenzitu. Pravděpodobnost nalezení částice v daném energetickém stavu se řídí Boltzmannovým rozdělením $e^{-E/kT}$. Podle tohoto rozdělení nalezneme s větší pravděpodobností částici ve stavu s nižší energií. Z tohoto důvodu je Stokesova větev intenzivnější.

Ramanův rozptyl je citlivý na všechny excitované stavy molekuly. Pokud se energie dopadajícího fotonu rovná energii přechodu molekuly mezi základním a excitovaným elektronovým stavem, mluvíme o rezonančním Ramanově rozptylu. Při tomto jevu dochází k nárůstu intenzity o několik řádů.

Potřebujeme-li zvýšit poměr signál-šum při měření spektra Ramanova rozptylu, používá se často akumulace spekter a získaná spektra jsou postupně průměrována. Při N provedených opakováních se úroveň šumu sníží \sqrt{N} -krát. Výsledné spektrum je závislost intenzity Ramanova rozptylu na Ramanově posuvu (angl. Raman shift), což je absolutní hodnota rozdílu mezi vlnočtem rozptýleného a dopadajícího záření [Prosser a kol., 1989].

2.3 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)

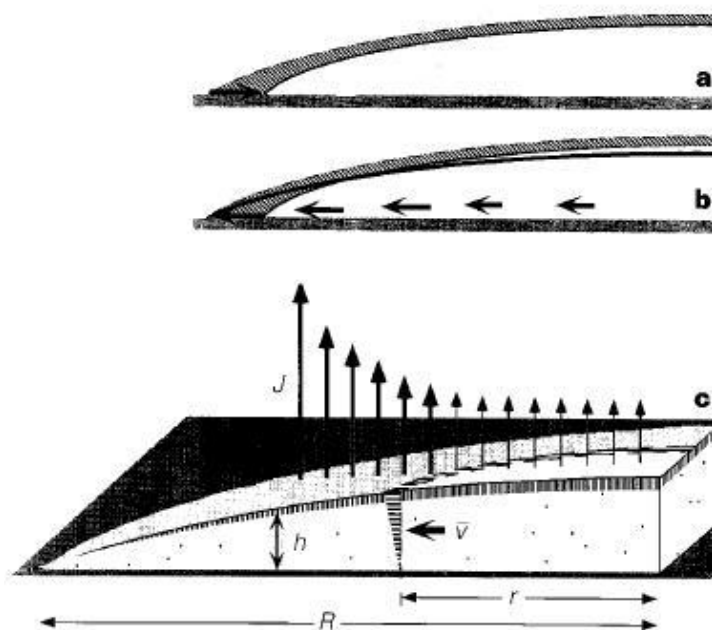
2.3.1 Popis metody DCDR

Užitečnou metodou k získání kvalitního Ramanova spektra je metoda kapkově nanášených povlaků – drop coating deposition Raman (DCDR). Tato metoda umožňuje měření spekter biomolekul v roztoku s velmi nízkou koncentrací, čím se můžeme přiblížit koncentracím přítomným ve fyziologickém prostředí. Tato skutečnost je výhodou i v případech, kdy máme k dispozici jen malé množství syntetizované zkoumané látky. Byla naměřena spektra proteinu s koncentrací menší než 1 μM (cca 0,01 mg/ml) [Kopecký, Baumruk, 2006].

Podstatou metody je nakápnutí malého množství roztoku (typicky jednotky μl) na teflonem potažený ocelový povrch s téměř nulovým Ramanovým signálem. Hydrofóbní povrch umožňuje vysychání vzorku s efektem kávového kroužku, který je popsán níže.

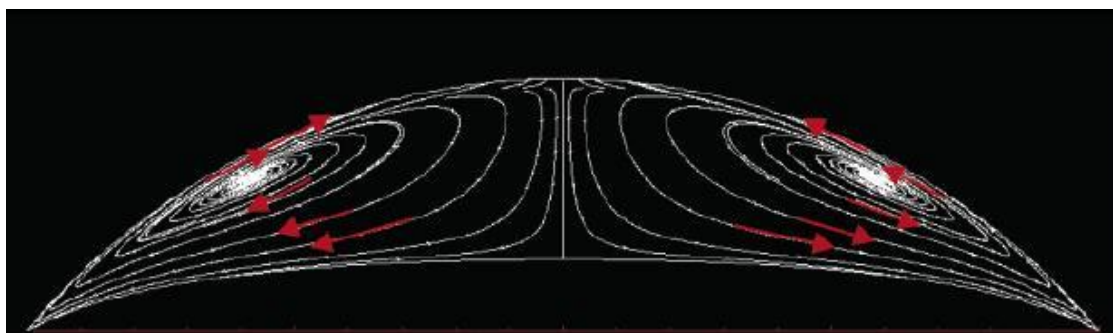
Při procesu vysychání kapky vzniká mezi středem kapky a okrajem fixní kontaktní linie zajišťující kapilární proudění. Díky němu je kapalina vypařující se z okrajů kapky postupně nahrazována kapalinou z vnitřku. Výsledkem tohoto proudění je nahromadění pevných částic rozpuštěných v roztoku po obvodu kapky. Tím vznikne charakteristický kávový kroužek [Deegan at al., 1997]. Bylo experimentálně ověřeno, že i po vyschnutí se struktura vzorku zachovává a Ramanova spektra z vyschnuté kapky a roztoku jsou identická.

Na Obr.2.3.1 je znázorněn princip vysychání kapky. Vypařování způsobuje ztenčení vrstvy v každém bodě. Kdyby nedocházelo k žádnému proudění uvnitř kapky, došli bychom k profilu na Obr.2.3.1a. Kapka by se tím smrškla. Ale poloměr kapky se nemůže zmenšit, protože kontaktní plocha kapky s podložkou je fixní. Aby se zmenšení poloměru kapky zabránilo, musí kapalina proudit z vnitřku kapky na okraj (Obr.2.3.1b). Celkový profil kapky při jejím vysychání je znázorněn na Obr.2.3.1c.



Obr. 2.3.1 – Princip vysychání kávové kapky. Převzato z Deegan et al., 1997.

Zmíněné kapilární proudění však není jediné, které se podílí na výsledném profilu vyschlé kapky. Během jejího vysychání se nerovnoměrně snižuje teplota na povrchu kapky. Teplota na rozhraní kapalina-voda je nejnižší na jejím vrcholku, povrchové napětí je v tomto místě největší. Díky tomu vzniká vnitřní proud při povrchu kapky – Marangoniho proud [Hu, Larson, 2006]. Deegan se svými kolegy pozoroval, že ve vodních kapkách je tento efekt velmi slabý. Pro čistá rozhraní bez povrchově aktivních látek však Marangoniho efekt může zvrátit efekt kávového kroužku a způsobit uložení rozpuštěných částic vprostřed kapky místo jejího okraje.



Obr. 2.3.2 – Marangoniho proudy v kapce. Převzato z Hu, Larson, 2006.

2.3.2 Podložky SpectRIM™

Velice vhodné pro měření kvalitních DCDR spekter jsou podložky SpectRIM™ vyrobené firmou Tienta Sciences, Inc. (Obr.2.3.3). Tyto podložky jsou tvořeny plastovým podstavcem, na kterém je umístěn leštěný nerezový plát potažený velmi tenkou (méně než 50 nm) vrstvou teflonu. Hydrofóbní povrch podporuje při vysychání kapky vznik „kávového“ kroužku. Výhodou vysychání kapky na tomto povrchu je nízká koncentrace a malý objem nakápnutého roztoku neboli suspenze. Již 2 μ l jsou dostačující pro vytvoření kapky.

Vrstva na povrchu podložek neprodukuje nežádoucí Ramanův, infračervený ani fluorescenční signál, a tak nedává žádné pozadí v měřených spektrech. Podložky SpectRIM™ umožňují zkoumání vzorku optickou mikroskopií, infračervenou spektroskopií a Ramanovou spektroskopií [Rothhaar et al., 2005]. Tyto podložky se však již přestaly vyrábět. Pro budoucí měření metodou DCDR proto hledáme jiný vhodný povrch pro vysychání kapek.

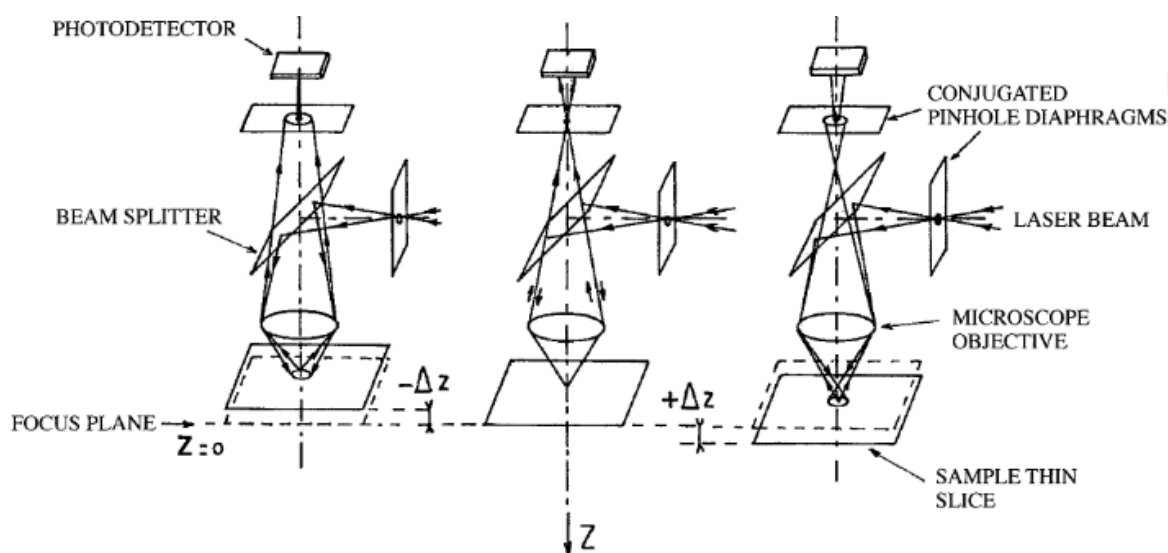


Obr. 2.3.3 – Podložka SpectRIM™ od firmy Tienta Sciences, Inc. Převzato z webové stránky www.sigmaaldrich.com

2.4 Konfokální mikroskop

Princip konfokální mikroskopie je ve vyčlenění světelného svazku odraženého pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Touto metodou tedy lze oddělit signály pocházející z různé hloubky vzorku.

Vzorek osvětluje bodovým zdrojem světla. Laserový paprsek je fokusován na clonku, která je objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek do bodu o průměru rovnající se rozlišovací schopnosti objektivu. Stejný objektiv sbírá světlo odražené či rozptýlené vzorkem. Obraz jde po průchodu objektivem před fotonásobič. Zde se nachází konfokální bodová clonka, která blokuje detekci záření z míst mimo ohniskovou rovinu [Plášek, 1995]. Schematické znázornění konfokálního mikroskopu je na Obr.2.4.1.



Obr. 2.4.1 – Princip konfokálního mikroskopu. Převzato z Lewis, 2001.

Rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu je dána poloměrem malého, tzv. Airyho kroužku, na který se zobrazí jeden bod vzorku. Airyho kroužky jsou difrakčním obrazem vznikající ohybem světla na čočkách objektivu. Při zobrazení blízkých bodů se mohou tyto kroužky překrývat a při jisté minimální vzdálenosti jsou již body nerozlišitelné [Plášek, 1995].

Hlavní výhodou konfokální mikroskopie je vysoká rozlišovací schopnost a možnost rozčlenění signálu z různých vrstev vzorku. Díky vysokému rozlišení však má konfokální mikroskop velice malé zorné pole. Pokud tedy chceme získat obraz rozlehlejší části vzorku, je nutné spektra proměřit bod po bodu.

2.5 Metody zpracování naměřených dat

2.5.1 Faktorová analýza

Faktorová analýza je statistická metoda, která umožňuje přehledně zpracovat velké série naměřených dat. Ukáže nejvýraznější rozdíly v naměřených spektrech, ale také naopak jejich společné rysy. Faktorovou analýzu jsme aplikovali na sérii Ramanových spekter z měření DCDR map.

Naměřené spektrum je m dvojic zahrnující vlnočety a odpovídající relativní Ramanovu intenzitu. Získáme tedy matici s m řádky a n sloupci. Ty představují počet naměřených spekter. Tuto matici A algoritmus faktorové analýzy SVD (singular value decomposition) rozloží na součin tří matic:

$$A = U W V^T \quad (2.2)$$

kde U je ortogonální matice typu $m \times n$, V je ortogonální matice typu $n \times n$ a W je diagonální matice typu $n \times n$. Prvky matice W jsou nezáporné a nazývají se singulární hodnoty.

Podle vztahu (2.2) lze každé i -té spektrum napsat jako lineární kombinaci subspekter, přičemž j -té subspektrum je j -tý sloupcový vektor matice U . Tato subspektra jsou ortogonální a normovaná. Jejich počet je minimum z počtu naměřených spekter a počtu dvojic vlnočety - odpovídající intenzita, tedy $\min\{m, n\}$. Koeficienty lineární kombinace i -tého spektra jsou dány i -tým řádkem matice V . Příslušné subspektrum však ještě musíme vynásobit váhovým faktorem v i -tém řádku matice W . Pro vyjádření i -tého spektra Y_i ze série m Ramanových spekter tedy platí vztah:

$$Y_i = \sum_{j=1}^m W_j V_{ij} U_j \quad (2.3)$$

Statistická váha jednotlivých subspekter velmi rychle ubývá. K celkovému signálu tedy nejvíce přispívá první subspektrum, které reprezentuje vážený průměr spektrální intenzity. Pomocí něj popíšeme nejdůležitější společné rysy všech spekter. Druhé subspektrum popíše nejlépe změny, které nejsou obsaženy v subspektru prvním. Použijeme-li první dvě subspektra, máme nejpřesnější vyjádření naměřených spekter pomocí dvou ortonormálních funkcí. Takto se pokračuje dále k vyšším subspektrům. Čím více subspekter započítáme do lineární kombinace, tím přesněji se přiblížíme

k experimentálně naměřeným závislostem. Avšak pokud vezmeme jen prvních několik, zbavíme se tak nežádoucího pozadí v naměřených spektrech [Palacký, 2006].

2.5.2 Metoda ortogonálních diferencí

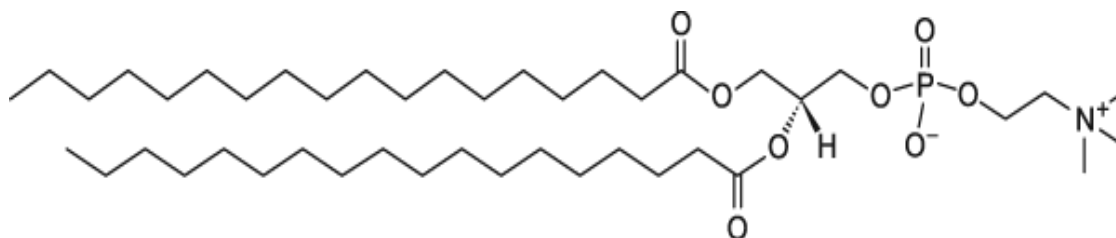
Metoda ortogonálních diferencí se používá k úpravě pozadí naměřených spekter. Naměřené Ramanovo spektrum můžeme rozdělit na součet spektra R, které nás zajímá a tzv. parazitního spektra P. Vygenerujeme sadu ortogonálních funkcí a pomocí odečtení jejich lineární kombinace ze spekter se zbavíme parazitní složky. Avšak této skutečnosti dosáhneme za tu cenu, že spektrum R máme v podobě ortogonalizovaného spektra R_{OG} . Tato spektra obecně nejsou totožná, ale ortogonalizací se zachovávají lineární vztahy mezi spektry. Tedy lze určit zastoupení složek ve spektru [Palacký, 2006].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vzorky

V bakalářské práci jsme proměřili Ramanova spektra různých typů lipidů. Všechny použité vzorky byly získány od firmy Avanti Polar Lipids, Inc. Vybrali jsme dva synteticky připravené fosfolipidy, a jeden přírodní extrakt - asolektin získaný ze sójové fazolky. Následující informace o složení lipidů a teplotě jejich fázového přechodu jsou převzaty z [Avanti Polar Lipids, Inc.].

Jako první ze syntetických fosfolipidů byl použit vzorek 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DSPC). Nepolární konce tohoto lipidu jsou nasycené uhlovodíky obsahující 18 uhlíků. Teplota fázového přechodu DSPC je 55°C. Očekáváme tedy, že za pokojové teploty bude DSPC v gelové fázi. Fosfatidylcholin je jednou z hlavních součástí buněčných membrán. Jeho hlavní rolí je vytvořit základní strukturu membrány, která podporuje selektivně propustní charakter bariéry. Fosfatidylcholin, označován i jako lecitin, se nachází v živočišných i rostlinných tkáních.



Obr. 3.1.1 – Chemická struktura DSPC. Převzato z webové stránky

www.avantilipids.com

Druhý měřený vzorek je 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DPPC). Jde o lipid s nasycenými uhlovodíkovými konci o délce šestnácti uhlíků. Jeho chemická struktura je tedy téměř stejná jako u DSPC, liší se pouze v délce uhlovodíkových řetězců. Teplota fázového přechodu DPPC je 41°C, za pokojové teploty je tedy rovněž v gelovém uspořádání.

Posledním použitým vzorkem a zástupcem přírodních lipidů je asolektin (Soy Extract Polar). Jde o lipidový extrakt ze sójové fazolky. Asolektin je směs lipidů a

liposomy z něj připravené jsou tedy svým složením blízké biologickým membránám. Obsahuje 45,7% fosfatidylcholinu, 22,1% fosfatidylethanolaminu, 18,4% fosfatidylinositolu a 6,9% fosfátové kyseliny, zbytek složení je neznámý. Protože jde o směs lipidů, teplota fázového přechodu představuje teplotní interval [O'Neill, Leopold, 1982]. Za pokojové teploty předpokládáme vzorek ve fázi kapalného krystalu.

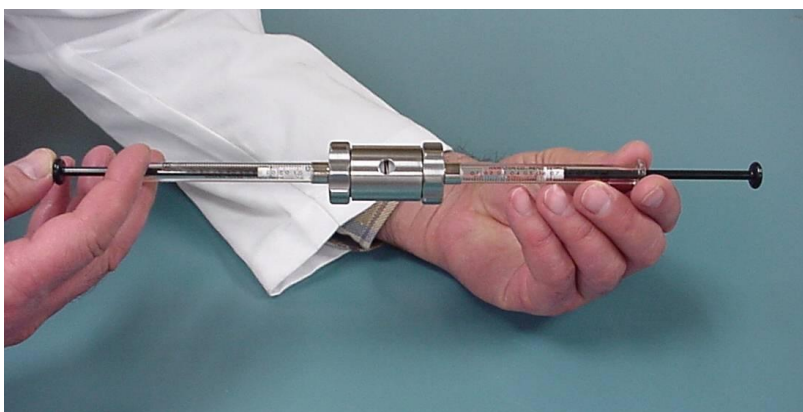
3.2 Příprava liposomů

3.2.1 Obecný postup

Při přípravě liposomů jsme vycházeli z návodů a rad uvedených v publikaci [Rickwood, Hames, 1990] a z protokolu uveřejněného firmou [Avanti Polar Lipids, Inc.].

Nejprve je třeba výchozí lipid ve formě prášku rozpustit v chloroformu. Po důkladném rozmíchání vzniklé suspenze chloroform odpaříme. K odpařování jsme použili plynný dusík, který zabrání znehodnocování vzorku lipidů oxidací vzdušným kyslíkem a umožní kompletní odpaření chloroformu. Za vstupu dusíku pomalu otáčíme baňkou a nakláníme ji, aby se na jejím povrchu vytvořila co nejtenčí vrstva lipidů. Takto připravený film již můžeme rozpustit v definovaném množství rozpouštědla (pufry nebo vody). Takto si připravíme suspenzi o požadované koncentraci.

Dostatečného rozpuštění lipidů v pufry většinou nedosáhneme pouhým třesením baňkou. Způsob jak ho zajistit nabízí sonikace. Tato metoda rozbíjí vzniklé multilamelární vesikuly a velké agregáty na menší kusy pomocí ultrazvuku, v našem případě ve vodní lázni. V laboratoři jsme k sonikaci používali přístroj Tesla UC005AJ1.



Obr. 3.2.1 – Zařízení LiposoFast-Basic od firmy Avestin. Převzato z webové stránky www.avestin.com

Pro získání vzorku pouze s liposomy požadované velikosti lze použít extrudér. Připravená suspenze je protlačována skrz membránu s otvory definovaného průměru.

Mechanicky tedy získáme pouze vesikuly, které potřebujeme pro daný experiment. V našem případě byl použit přístroj LiposoFast-Basic™ od firmy Avestin (Obr.3.2.1). Při přípravě všech vzorků jsme použili polykarbonátovou membránu s póry o průměru 400 nm. Důležité je udělat lichý počet protlačení suspenze skrz membránu. Zabráníme tak tomu, aby se různé nehomogenity, které neprojdou membránou, dostaly do našeho výsledného vzorku. Výrobce doporučuje protlačit suspenzi alespoň 19krát. S rostoucím počtem protlačení získáváme homogennější suspenzi.

Při přípravě liposomů je vhodné vzorek nechat po přidání vody či pufru přibližně 30 minut hydratovat za teploty vyšší než je teplota fázového přechodu lipidu. Také protlačování přes membránu by mělo probíhat za takto zvýšené teploty. Některé vzorky jsme proto připravovali v pídce Binder.

V měřeném Ramanově spektru vzorku nám někdy může překážet signál z pufru. Abychom se zbavili tohoto problému, necháme nakonec vzorky dialyzovat. Naplníme kádinku vodou, na hladinu položíme dialyzační filtr a nakápneme na něj kapku ze vzorku. Voda z kádinky nám tak v kapce nahradí pufr. Doba dialýzy nesmí být moc krátká, aby se stihl veškerý pufr nahradit, ale také nesmí být naopak příliš dlouhá, protože z dialyzačních papírků se pak začnou do vzorku uvolňovat vlákna. Tuto dobu volíme přibližně 20 minut.

Připravený roztok lze následně naředit pro Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků (DCDR), nebo naopak zkoncentrovat, pokud chceme měřit Ramanova spektra přímo z roztoku. Při koncentrování jsme používali přístroj Eppendorf Concentrator 5301 s možností nastavení teploty na 30, 45 nebo 60°C. Nechali jsme probíhat centrifugaci za zvýšené teploty. Velikost výsledné koncentrace suspenze nelze určit přesně, můžeme ji však odhadnout z výsledného množství vzorku.

3.2.2 Připravené vzorky

Jak již bylo řečeno výše, pro bakalářskou práci jsme vybrali tři lipidy - DSPC, DPPC a asolektin. Vzorky suspenzí byly připraveny buď ve vodě, nebo ve fosfátovém pufru (5 mM KH_2PO_4 pH 7.4).

Připravili jsme dialyzované vzorky DSPC o koncentraci 1 mg/ml za pokojové teploty a při teplotě nad fázovým přechodem lipidu (55°C), dále vzorky suspenzí s deionizovanou vodou o koncentracích 1 mg/ml, 0,3 mg/ml a 0,2 mg/ml - všechny za

teploty nad fázovým přechodem DSPC. Z každého vzorku jsme nakápli jednu nebo dvě kapky na podložku SpectRIM™. Ze zásobní suspenze s deionizovanou vodou jsme část také zkoncentrovali pro měření spekter ze suspenze. Odhadovaná koncentrace je 100 mg/ml.

Vzorky DPPC byly připravovány za teploty 50°C, což je teplota nad fázovým přechodem lipidu. Získali jsme vzorek rozpuštěný v pufru a následně dialyzovaný o koncentraci 1 mg/ml a vzorek rozpuštěný v deionizované vodě o koncentraci 0,3 mg/ml. Z obou vzorků byly nakápnuty dvě kapky pro proměření DCDR spekter. Výsledná koncentrace pro měření ze suspenze je odhadnuta u vzorku s vodou přibližně 40 mg/ml, u vzorku s pufrém 25 mg/ml.

Suspenze asolektinu byla připravována v deionizované vodě za pokojové teploty. Připravili jsme vzorky o koncentracích 1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 0,3 mg/ml. Zásobní roztok jsme pro měření ze suspenze zkoncentrovali na přibližně 50 mg/ml.

3.3 Integrovaný Ramanův systém HR800

Měření DCDR spekter připravených vzorků probíhalo na přístroji LabRam HR800 vyrobeném firmou Horiba Jobin-Yvon. Jde o integrovaný Ramanův systém, v němž je mikroskop konfokálně spojen se spektrografem o ohniskové vzdálenosti 800 mm a mřížkou 600 vrypů na milimetr.

3.3.1 Součásti integrovaného Ramanova systému HR800

V systému je zabudován standardní helium-neonový laser o vlnové délce 632,817 nm a výkonu 20 mW. Dále je k dispozici externí laser Ar⁺ o vlnové délce 514,532 nm.

Konfokální štěrbinu vybírá ze svazku přicházejícího ze vzorku jen tu část, která přichází z roviny, do které je mikroskop zaostřen. V HR 800 je nastavitelná mezi 0 a 1000 μm . Poměr velikostí mezi vzorkem a konfokální štěrbinou závisí na zvětšení použitého objektivu vynásobeném faktorem 1,4.

Další součástí je takzvaný Notch filtr. Jde o holografickou mřížku, která filtruje excitovaný svazek a je specifická pro každou vlnovou délku. Tuto vlnovou délku Notch filtr totálně odráží, zatímco ostatní propouští.

Mikroskop v základní sestavě systému HR800 je BX 40 od firmy Olympus a je vybaven třemi objektivy – 10x NA 0,25, 50x NA 0,7 a 100x NA 0,9 ($NA = n \cdot \sin \alpha$ je numerická apertura, n index lomu čočky (objektivu) a α sběrný prostorový úhel). Mikroskop je dále vybaven makroadaptérem pro instalaci objektivu o ohniskové vzdálenosti 40 mm a hlavicí pro optické vlákno, pokud je laser vázaný do vlákna. U mikroskopu je k dispozici i barevná kamera a motorizovaný stolek pohyblivý v rovině XY. Díky němu lze provádět automatické skenování vzorku bod po bodu.

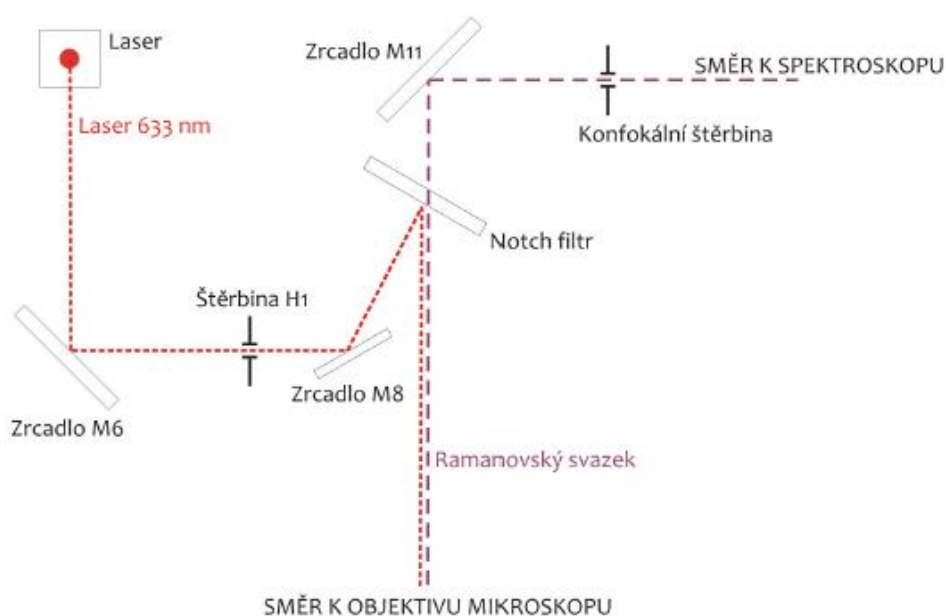
Jako spektrograf je použit spektrograf s asymetrickou montáží Czerny-Turner, který dává na výstupu rovnoměrné rozložení intenzity.

3.3.2 Popis optické dráhy svazku

Laserový paprsek je nasměrován dvěma zrcadly k interferenčnímu filtru. Tento filtr je používán, aby odfiltroval plazmové čáry v laserovém svazku. Paprsek je dále zfokusován na štěrbinu (na Obr.3.3.1 označeno jako H1), která je zobrazena jako bod

na vzorek. Před touto štěrbinou jsou v aparatuře zabudovány filtry redukující sílu laserového svazku a jejich výměna je řízena softwarem. K dispozici jsou filtry o optické hustotě 0,3, 0,6, 1, 2, 3 a 4. Po průchodu svazku zmíněnou clonkou je svazek reflektován pomocí systému zrcadel a Notch filtru na vzorek.

Ramanův signál je sbírán objektivem mikroskopu a jde zpět po stejné dráze jako příchozí paprsek. Záření rozptýlené Rayleighovým rozptylem je Notch filtrem odraženo zatímco Ramanův svazek projde a čočka následně vytvoří obraz Ramanova svazku na konfokální štěrbině. Před konfokální štěrbinou je možnost položit do dráhy svazku polarizační filtry.



Obr.3.3.1 – Schéma integrovaného Ramanova systému HR800. Převzato z Šípová, 2006.

3.4 Použité objektivy a nastavení aparatury

Při měření DCDR spekter jsme použili objektiv zvětšující 100x. Objektivy se zvětšením 5x, 10x a 50x byly použity na zachycení fotografií kapek. Pomocí objektivu se stonásobným zvětšením jsme přesně zamířili na vybrané místo v kapce a mohli jsme tak sbírat spektra přímo z kávového kroužku či mimo něj. Posledním typem užívaného objektivu je 100x zvětšující objektiv s vodní imerzí. Ten jsme použili při měření spekter ze suspenzí.

Spektra vzorku DSPC rozpuštěného v pufru jsou měřena se zelenou excitací na vlnové délce $\lambda = 514,532$ nm. Ostatní jsou naměřena s červenou excitací na vlnové délce $\lambda = 632,817$ nm. Ke změně použité excitace došlo v důsledku poruchy Ar⁺ laseru.

Používali jsme konfokální režim spektrometru HR800. Konfokální štěrbina byla u všech naměřených DCDR spekter otevřena na průměr 400 μm . Při nabírání spekter z roztoků jsme však od konfokálního režimu upustili, protože bylo mnohem obtížnější získat kvalitní silný signál i při několikanásobně vyšší koncentraci liposomů v suspenzi oproti kapce. Konfokální štěrbinu jsme pak otevřeli na 1000 μm . Tím došlo k nabírání signálu z více vrstev roztoku.

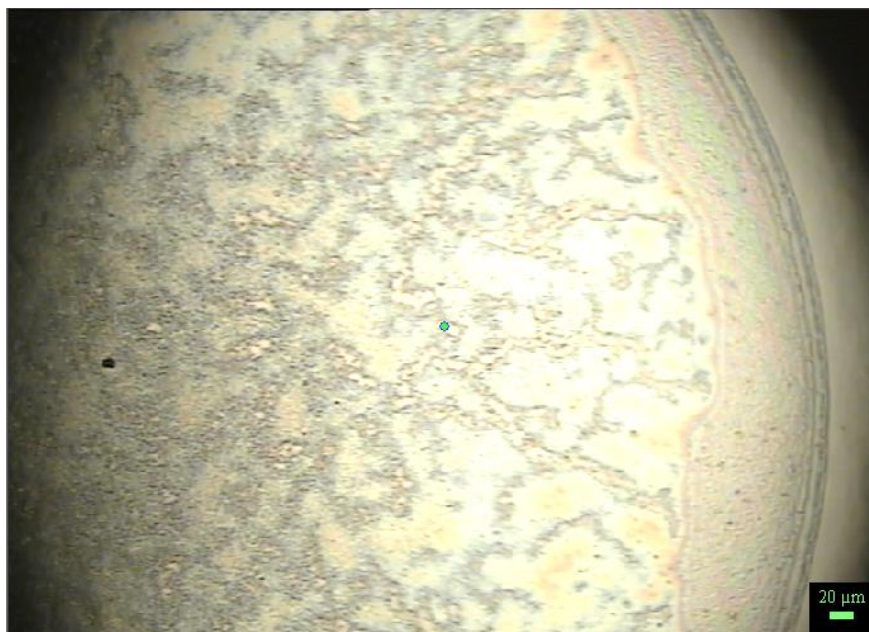
Před každým měřením byla provedena kalibrace spektrometru na čáře křemíku o vlnočtu $520,7$ cm^{-1} . Doby akumulace spekter vzorků lipidů byly 5 x 60 s, v případě spektrálního mapování 1 x 60 s.

4. ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH VÝSLEDKŮ

4.1 Syntetické fosfolipidy – DSPC a DPPC

DSPC a DPPC jsou synteticky připravené lipidy. Do bakalářské práce byly vybrány jako modelové vzorky s rozdílnou délkou uhlovodíkových řetězců. Teploty fázového přechodu těchto fosfolipidů se od sebe liší právě díky rozdílné délce jejich řetězců. Avšak v obou případech si můžeme být jisti, že za pokojové teploty tvoří membrány v gelovém uspořádání.

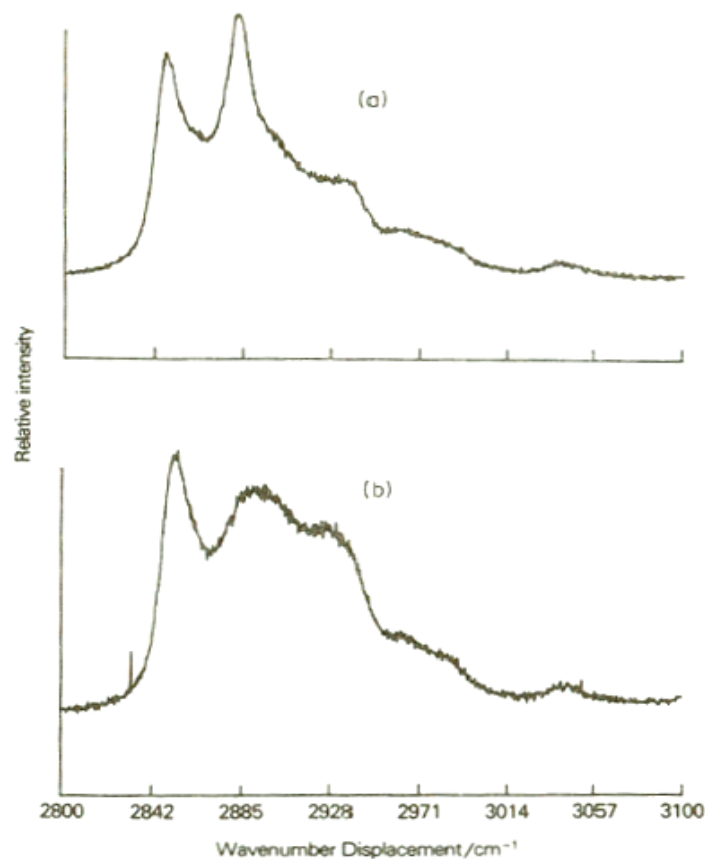
Velikost a tvar vyschnutých kapek se u různých vzorků liší. Vždy byly na podložku nakápnuty 2 μl zásobní suspenze. V případě DSPC jsou kapky relativně velké. Kapka na Obr. 4.1.1 má v průměru 1140 μm , další kapky DSPC mají velikost 600 μm a 560 μm . U vzorků DPPC je velikost vyschnutých kapek 740 μm , 880 μm , 700 μm a na Obr.4.1.2 je kapka o průměru 1300 μm . Všechny kapky vyschly do kruhového tvaru. Zjistili jsme, že nejlepší postup pro přípravu liposomů ze syntetických lipidů je příprava v pufru za teploty nad fázovým přechodem lipidu a následná dialýza vzorku. V těchto případech měla vyschlá kapka vždy patrný homogenní „kávový“ kroužek po celém svém obvodu a v její struktuře se neobjevovaly výrazné nehomogenity. Díky dialýze se uprostřed vysychající kapky nevytvářely krystalky z fosfátové soli pufru a nebyly tak v Ramanových spektrech patrné jeho pásy.



Obr.4.1.1 – Část kapky DSPC zobrazená objektivem zvětšujícím 50x. Vzorek byl připraven ve fosfátovém pufru za teploty 60°C a následně dialyzován.



Obr.4.1.2 – Kapka DPPC připravená ve fosfátovém pufru za teploty 50°C následně dialyzovaná. Kapka je zobrazena objektivem zvětšujícím 5x. Na okraji je patrný efekt kávového kroužku.



Obr.4.1.3 – Ramanova spektra 1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu v oblasti C-H valenčních vibrací a) v gelovém uspořádání (51,4°C), b) ve fázi kapalného krystalu (75,4°C). Teplota fázového přechodu pro tento systém je 64,7°C. Převzato z Levin, 1984.

Zdrojem následujících informací o přiřazení spektrálních pásů je [Levin, 1984]. Při popisu naměřených Ramanových spekter se nejprve zaměříme na oblast vyšších vlnočtů (2800-3100 cm^{-1}). Se změnou teploty se mění relativní poměr intenzit pásů na hodnotách ~ 2845 , ~ 2880 a $\sim 2936 \text{ cm}^{-1}$. Tyto spektrální změny jsou způsobeny symetrickými a antisymetrickými C-H valenčními vibracemi metylenu v uhlovodíkových řetězcích lipidů. Vibracím na skupině CH_3 přísluší také pásy na vlnočtech ~ 2096 a 3040 cm^{-1} . Na Obr.4.1.3 můžeme vidět spektrální změny při přechodu z gelové fáze membrány na fázi kapalného krystalu. V Ramanově spektru vidíme hlavně snížení intenzity na $\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$ s charakteristickým posunem pásu o $10\text{-}12 \text{ cm}^{-1}$ směrem k vyšším vlnočtům. Při teplotách nad teplotou fázového přechodu se také výrazně zvýší intenzita pásu $\sim 2935 \text{ cm}^{-1}$. Z Obr.4.1.3 je evidentní, že relativní poměr intenzit na vlnočtech ~ 2845 a $\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$ je ve fázi kapalného krystalu

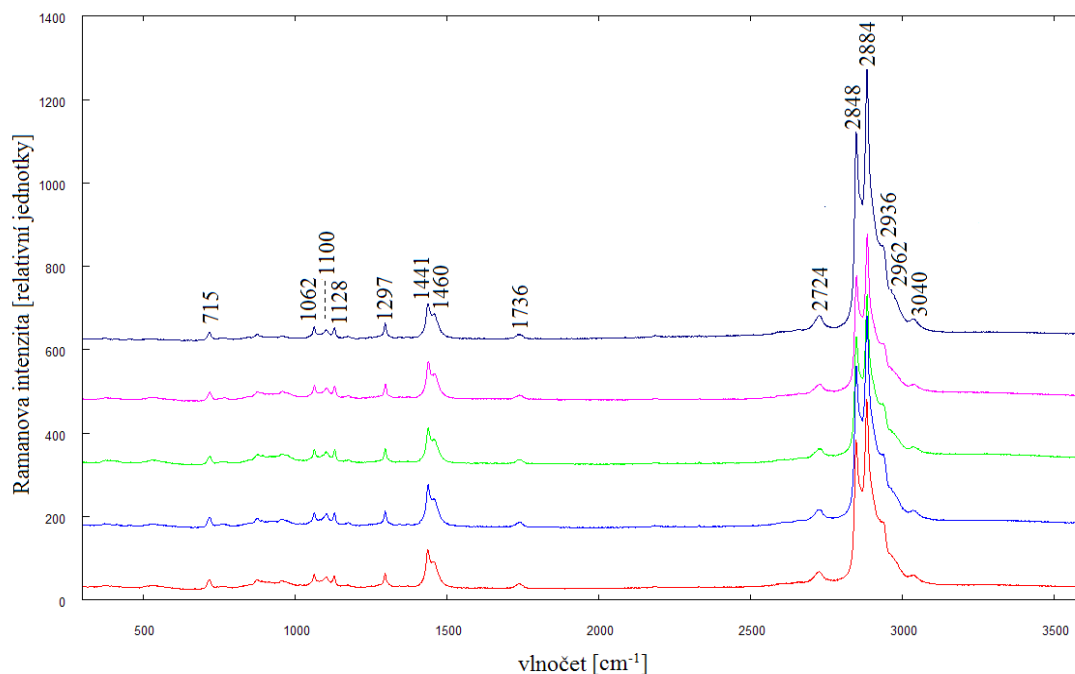
$I_{2845}/I_{2880} > 1$ a v gelové fázi $I_{2845}/I_{2880} < 1$. Tato skutečnost se používá jako kritérium k určení fáze lipidů. K této identifikaci lze ekvivalentně také použít poměr intenzit I_{2935}/I_{2880} . Zmiňované poměry jsou citlivými ukazateli vnitřní uspořádanosti molekul.

Oblast vlnočtů $1050-1150 \text{ cm}^{-1}$ je oblast s pásy pocházejícími od valenčních C-C vibrací skeletu. Spektrální změny v této oblasti přímo ukazují na intramolekulární *trans/gauche* konformační změny v uhlovodíkových řetězcích. Změny v konformacích molekul nastávají při fázovém přechodu dvojvrstvy. Tři pásy na vlnočtech ~ 1062 , ~ 1100 a $\sim 1130 \text{ cm}^{-1}$ odpovídají třem *all-trans* C-C valenčním vibracím v řetězcích mastných kyselin. Změny v intenzitách a hlavně v relativních poměrech intenzit jednotlivých pásů se stejně jako v oblasti vyšších vlnočtů projevují s rostoucí teplotou. V gelové fázi je intenzita pásu na $\sim 1062 \text{ cm}^{-1}$ nižší než na ~ 1100 a 1130 cm^{-1} . Tyto dva pásy jsou srovnatelné. Když se s teplotou blížíme k fázovému přechodu, postupně narůstá relativní intenzita pásů na ~ 1062 a $\sim 1130 \text{ cm}^{-1}$. Poměr hodnot I_{1100}/I_{1130} tedy může také dobře sloužit jako ukazatel fáze v membráně.

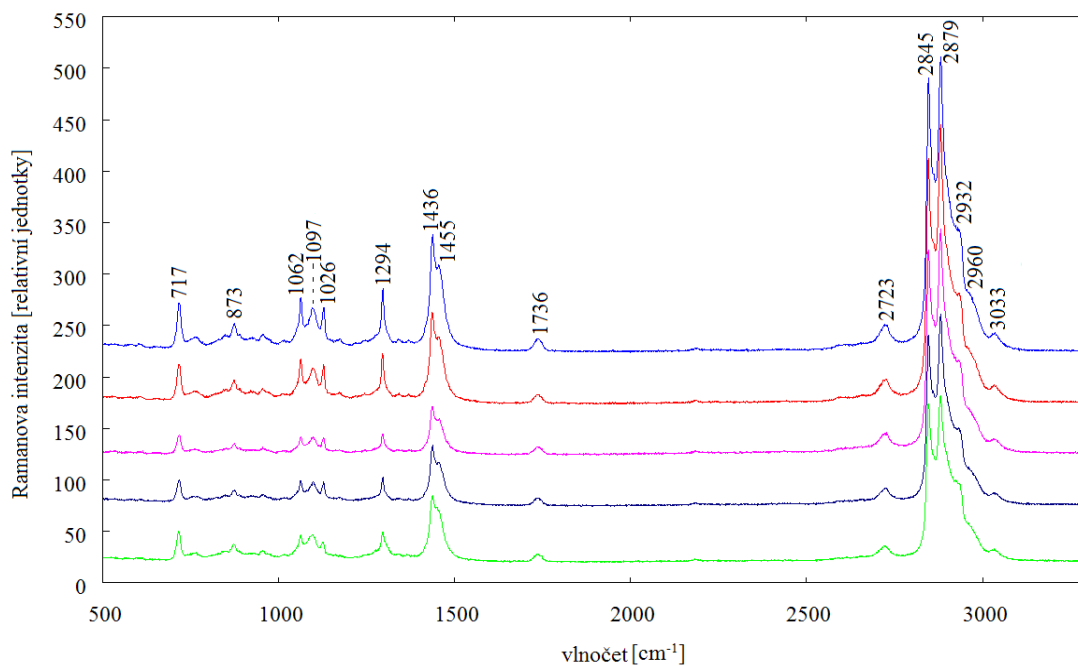
Vibrační pásy v Ramanově spektru pocházející od polární fosfátové hlavičky se nacházejí v oblasti nízkých vlnočtů. Pro cholin je charakteristický intenzivní pás na hodnotě Ramanova posunu $\sim 717 \text{ cm}^{-1}$, který přísluší symetrické C-N valenční vibraci. Druhý pás C-N valenčních vibrací se nachází na vlnočtu $\sim 870 \text{ cm}^{-1}$. Tyto dva pásy reflektují *gauche* konformaci segmentu O-C-C-N⁺. Ukazuje se, že intenzita pásu na 717 cm^{-1} se snižuje asi o 15% při přechodu z gelové fáze do fáze kapalného krystalu.

V oblasti $1435-1460 \text{ cm}^{-1}$ se objevuje dublet pocházející z ohybových deformačních módů metylenových skupin CH₂ v uhlovodíkových řetězcích a cholinové CH₂ skupiny. Během fázové přeměny membránové dvojvrstvy se pás dubletu na 1460 cm^{-1} sníží a stane se jen raménkem pásu na 1435 cm^{-1} . Tuto skutečnost lze pozorovat i na námi naměřených spektrech. Na Obr.4.1.4 a 4.1.5 jsou zobrazena spektra vzorků DSPC a DPPC, které jsou za pokojové teploty v gelovém uspořádání. Na těchto spektrech je zřetelný deformační dublet metylenové skupiny na Ramanových posunech $\sim 1435 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$. Oproti tomu na Obr.4.2.2, kde vidíme DCDR spektrum z kapky asolektinu ve fázi kapalného krystalu, je pás na vyšším vlnočtu vidět pouze jako přidružené raménko k pásu na 1438 cm^{-1} . Od CH₂ pochází také pás na frekvenci 1297 cm^{-1} . Tento pás odpovídá točivé (twist) deformaci [Kočišová, Procházka, 2011].

Pás na hodnotě Ramanova posunu $\sim 1736 \text{ cm}^{-1}$ lze přiřadit karboxylovým valenčním vibracím u vazby $\text{C}=\text{O}$ v části molekuly, kde se napojují uhlovodíkové řetězce mastných kyselin na fosfátovou hlavičku.



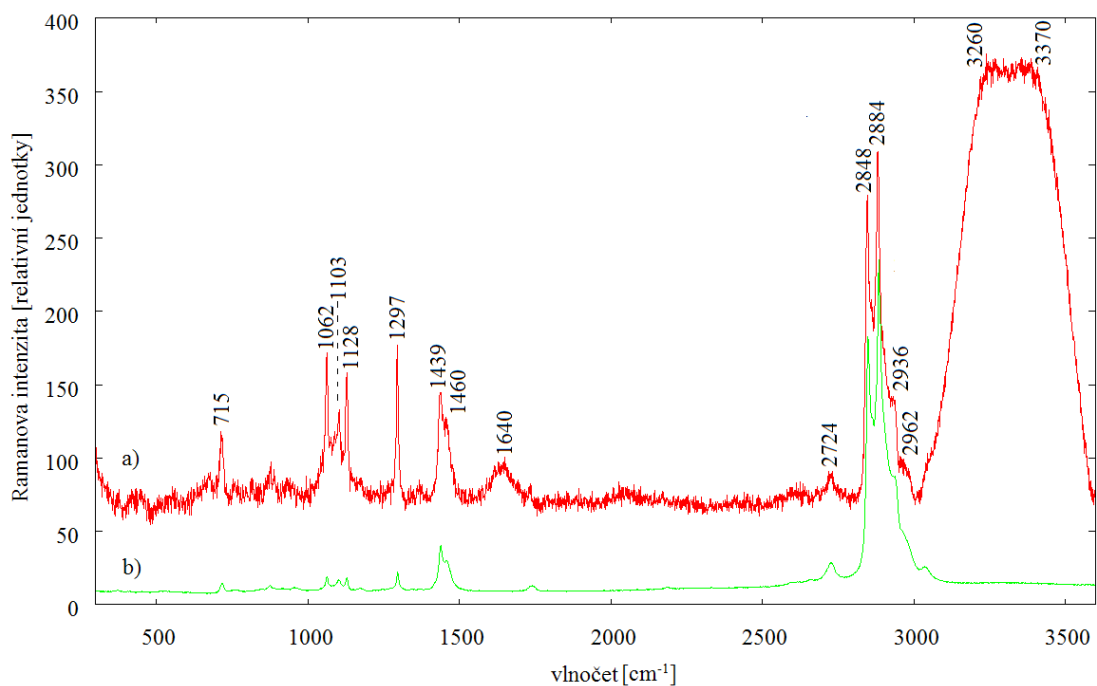
Obr.4.1.4 – Srovnání Ramanových spekter pořízených z různých míst kroužku kapky DSPC připravené v pufru za teploty 60°C a poté dialyzované.



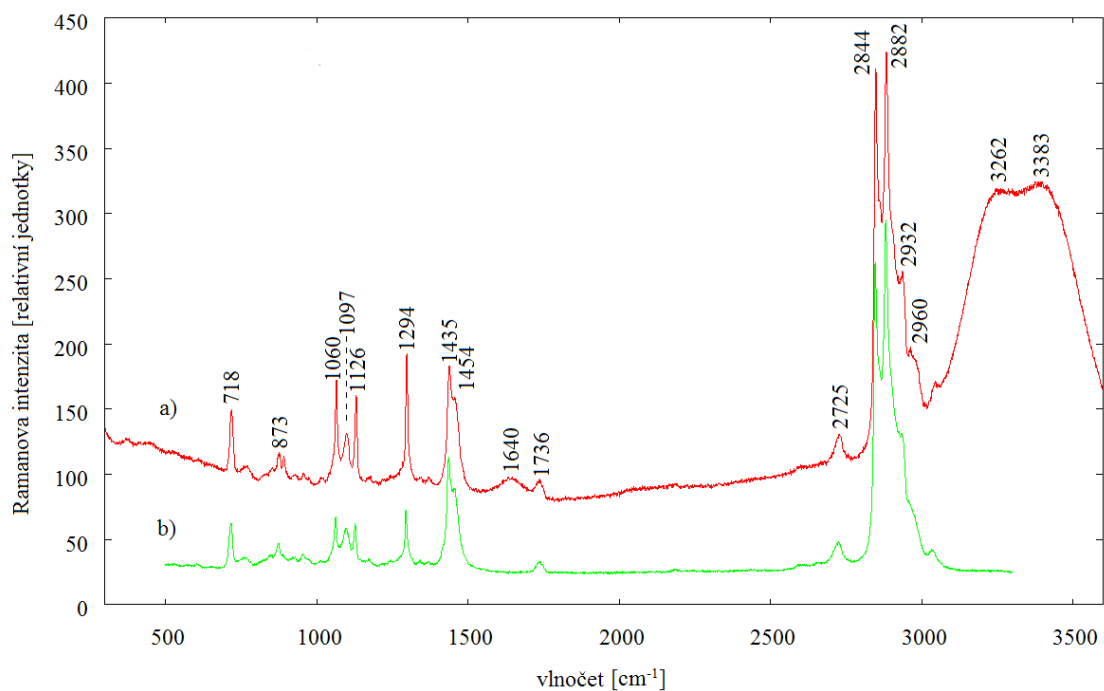
Obr.4.1.5 – Srovnání naměřených spekter z různých částí kroužku vyschlé kapky DPPC. Vzorek byl připraven v pufru za teploty 50°C a následně dialyzován.

Na Obr.4.1.4 a Obr.4.1.5 jsou ukázána porovnání naměřených spekter z kapek DSPC a DPPC. Jak je vidět, spektra z různých míst kroužku kapky se ve svém profilu neliší. Jsou tedy dobře reprodukovatelná. Na tomto srovnání se také ukazuje dobrá využitelnost metody DCDR v Ramanově mikrospektroskopii. Podle výše uvedených kritérií lze snadno určit fázi liposomální membrány z jejich Ramanových spekter. U obou vzorků lze podle poměru intenzit v oblasti $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ a taktéž v oblasti $1050-1150\text{ cm}^{-1}$ určit fázi lipidů jako gelovou. Gelovou fázi jsme očekávali, neboť spektra byla měřena za pokojové teploty, která je pod teplotou fázového přechodu obou vzorků.

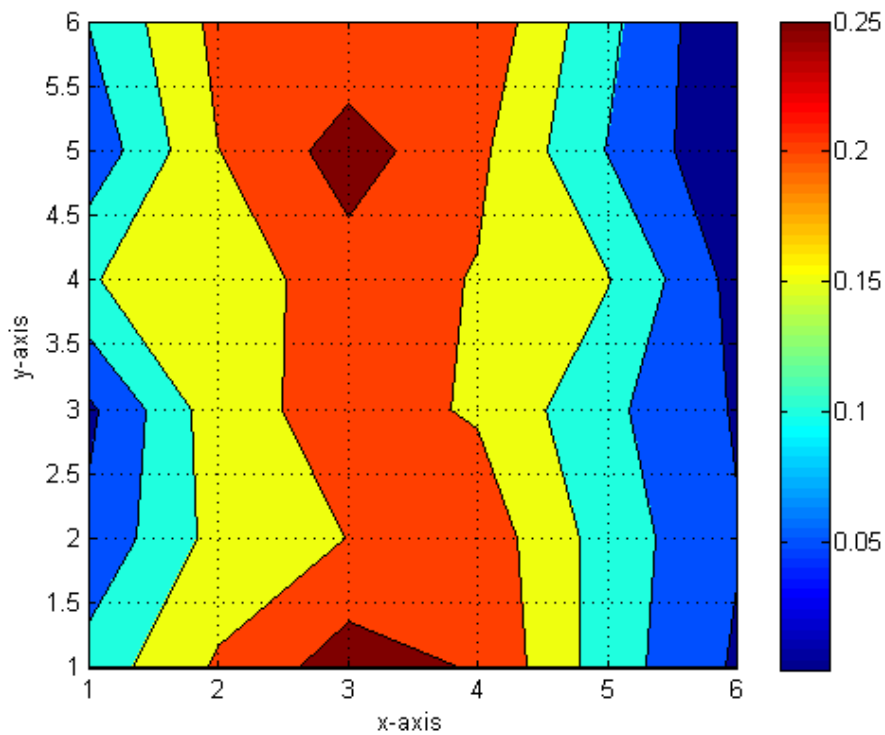
Na Obr.4.1.6 a Obr.4.1.7 jsou zobrazena srovnání spekter DSPC a DPPC naměřených v roztoku a v „kávovém“ kroužku kapky. Na spektrech měřených v suspenzi (Obr.4.1.6a, Obr.4.1.7a) jsou zřetelné dva intenzivní vzájemně se překrývající široké pásy vody se středem v ~ 3260 a $\sim 3370\text{ cm}^{-1}$. Tyto pásy odpovídají valenčním vibracím vody. Další pás příslušející vodě se objevuje na $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$. Pochází z deformačních vibrací vody. Na spektrech změřených z kapek (Obr.4.1.6b, Obr.4.1.7b) se tyto pásy vůbec nevyskytují. Kapky tedy vysychají kompletně v celém svém objemu. Je zřejmé, že při vysychání nedochází k žádným fázovým změnám lipidů. V oblasti vyšších vlnočtů je vidět, že pro poměr intenzit platí $I_{2845}/I_{2880} < 1$ pro spektra z roztoku i z kapky. To reflektuje gelové uspořádání. Této skutečnosti odpovídá také spektrální profil v oblasti $1050-1150\text{ cm}^{-1}$. Zachování fáze a nepřítomnost pásů vody ve spektrech kapek potvrzuje dobrou použitelnost metody DCDR při studiu membrán.



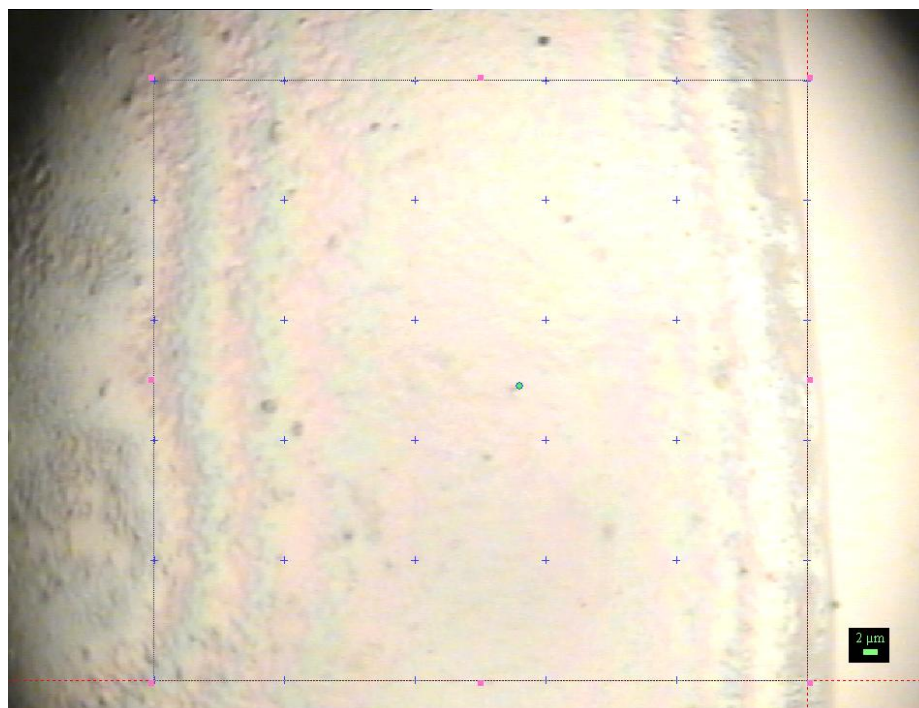
Obr.4.1.6 – Srovnání Ramanova spektra DSPC. Spektrum měřené a) ze suspenze, b) v „kávovém“ kroužku kapky.



Obr.4.1.7 – Srovnání Ramanových spekter DPPC naměřených a) ze suspenze, b) v kroužku vyschlé kapky.



Obr.4.1.8 – Spektrální DCDR mapa z kroužku kapky DSPC. Vzdálenost spektrálních bodů je 15 μm .



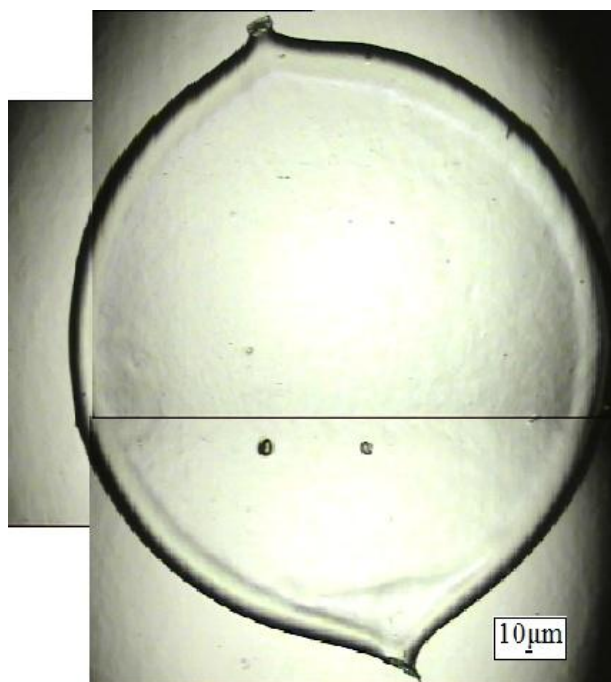
Obr.4.1.9 – Detail kroužku kapky DSPC (Obr.4.1.1) v bílém světle mikroskopu. Mřížka bodů, ze kterých byla sbírána data pro spektrální mapu.

Pro názorné zobrazení rozložení intenzity Ramanova signálu v kroužku kapky slouží spektrální mapy. Změřili jsme spektra z několika míst v konstantní vzdálenosti od sebe. Poté jsme použili metodu ortogonálních diferencí, abychom odečetli nežádoucí pozadí ve spektrech. Metodou faktorové analýzy jsme pak získali rozklad do odpovídajících subspekter. Mapa na Obr.4.1.8 je vytvořena jako mapa koeficientů V prvního subspektra, které reprezentují spektrální intenzitu v daném bodě. Místa křížení čar od souřadnicových bodů odpovídají jednotlivým místům, odkud byla měřena spektra. Vzdálenost těchto spektrálních bodů činila v tomto případě 15 μm . Na Obr.4.1.9 je v bílém světle mikroskopu zobrazena část kapky DSPC, ze které byla mapa měřena. Je zřejmé, že největší Ramanova intenzita je uprostřed „kávového“ kroužku kapky a směrem dovnitř i k okraji rychle klesá. Avšak profil naměřených spekter je stejný těsně u okraje kapky i blíže ke středu, jak jsme ukázali na spektrech na Obr.4.1.4 a 4.1.5.

4.2 Přírodní lipid – Asolektin

Asolektin jsme vybrali jako zástupce přírodních lipidů. Jeho teplota fázového přechodu není ostře vymezená, ale přechod probíhá spojitě na širším teplotním intervalu. Za pokojové teploty si zachovává fázi kapalného krystalu.

Stejně jako v případě předešlých liposomů jsme na podložku nakápli vždy 2 μl zásobního roztoku. Tvar kapek a viditelnost „kávového“ kroužku je už na pohled mnohem lepší než u liposomů ze syntetických lipidů. Tato skutečnost je dobře vidět na Obr.4.2.1. Průměr této kapky je přibližně 700 μm . Avšak zjistili jsme, že při nižších koncentracích lipidů v zásobním roztoku kapka nevyschne do kruhového tvaru, ale potrhá se. Tato kritická koncentrace byla pozorována jako 0,5 mg/ml. Na rozdíl od předešlých vzorků, jsme asolektin připravovali v deionizované vodě.

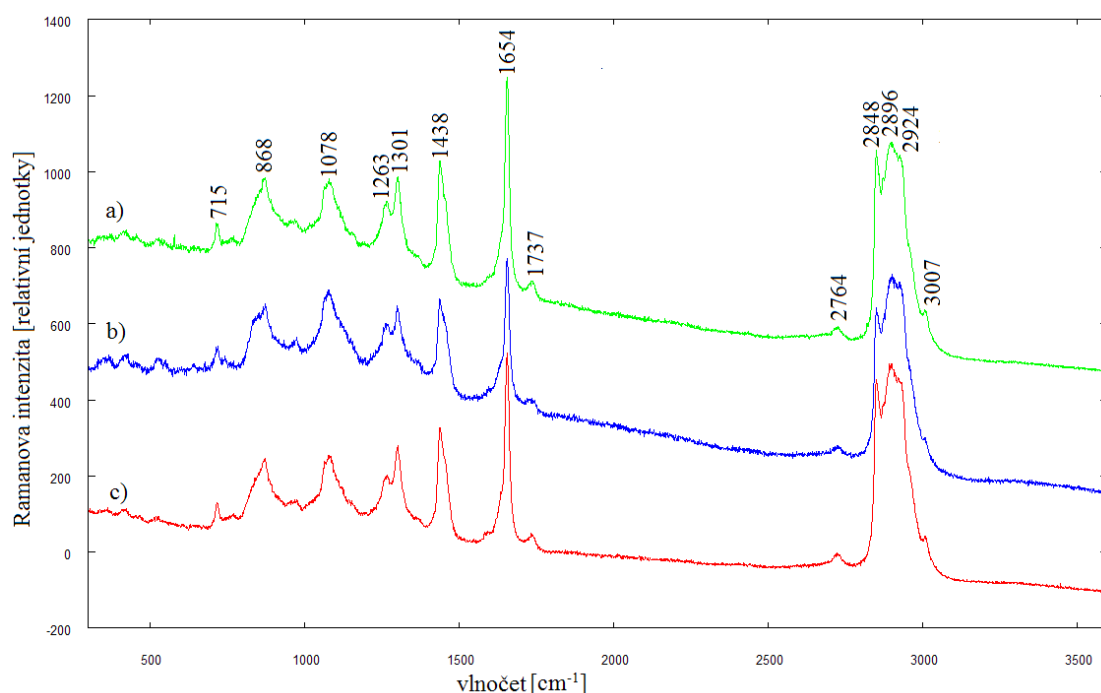


Obr.4.2.1 – Vyschnutá kapka vzorku asolektinu s koncentrací 1mg/ml. Lipid je rozpuštěn v deionizované vodě. Na kapce je pozorovatelný efekt kávového kroužku po obvodu. Obrázek je složen z fotografií pořízených spektrometrem HR800.

Na Obr.4.2.2 jsou zobrazena DCDR spektra z kapky asolektinu. Přiřazení většiny pásů je většinou stejné jako v případě syntetických lipidů DSPC a DPPC. Nevyskytuje se zde triplet mezi 1050 a 1150 cm^{-1} . V této oblasti je relativně široký pás se středem kolem 1078 cm^{-1} , který pochází od *gauche* C-C valenčních vibrací skeletu.

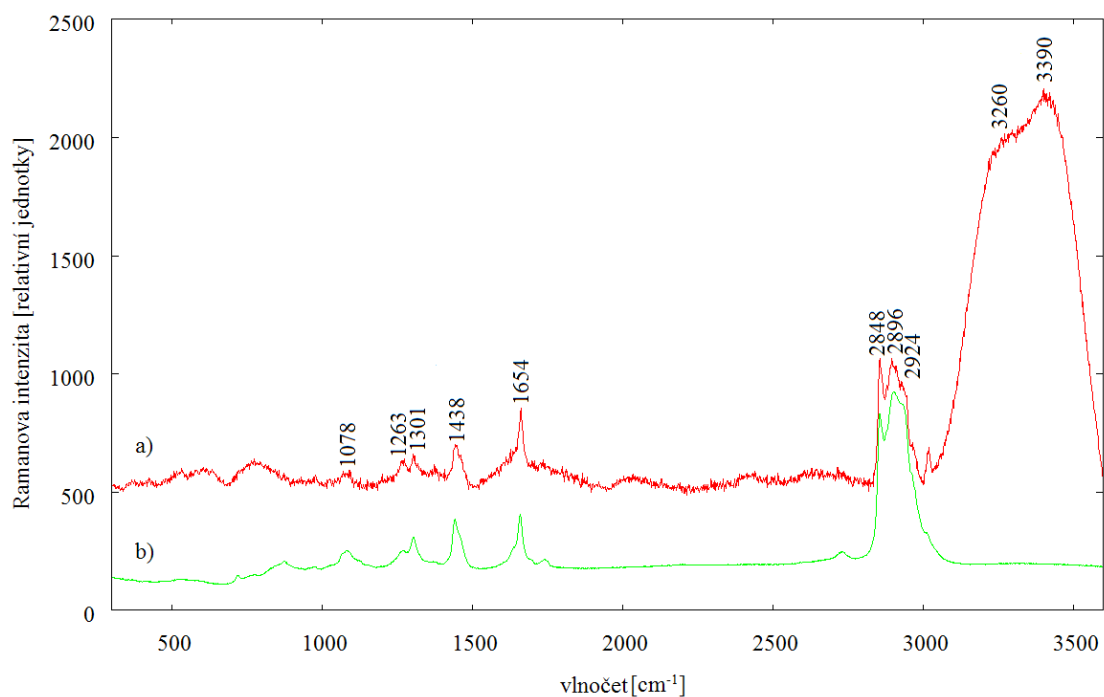
Další výrazný pás C-C vibrací se nachází na 1654 cm^{-1} . Dále vidíme dva pásy na vlnočtech 1263 cm^{-1} a 1301 cm^{-1} . První pochází z ohybových deformačních vibrací na uhlících, druhý reflektuje krouivé deformace na metylenových skupinách [Kočišová, Procházka, 2011].

Na Obr.4.2.2 je z poměru intenzit pásů v oblasti $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ zřejmé, že liposomy jsou ve fázi kapalného krystalu, což opět odpovídá našim předpokladům ze znalosti teploty fázového přechodu.

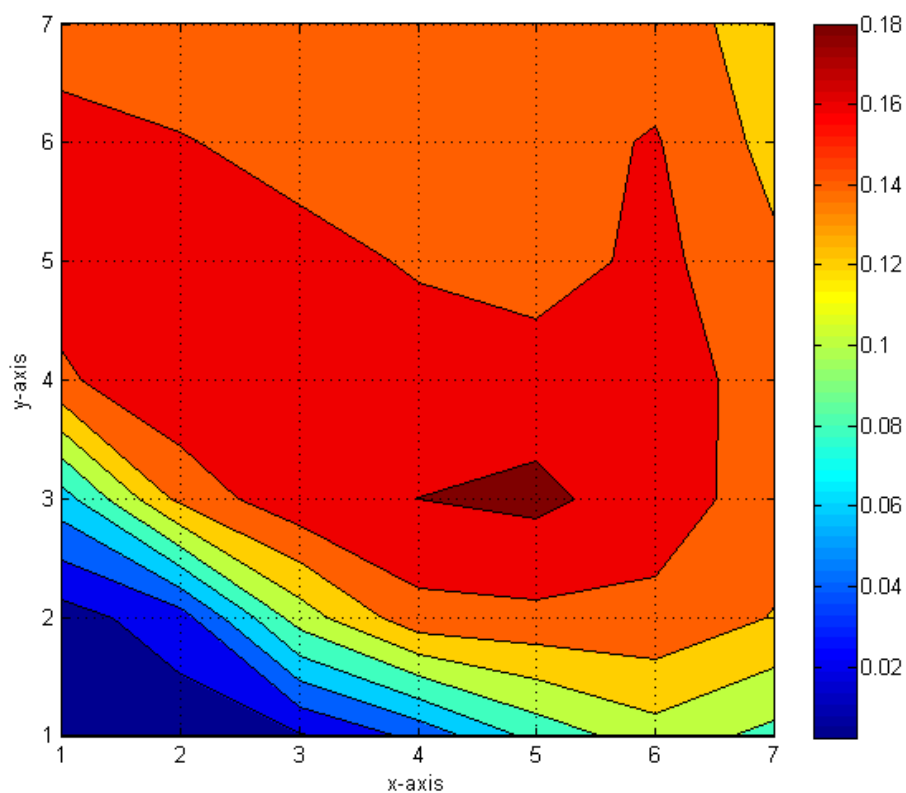


Obr.4.2.2 – Srovnání naměřených Ramanových spekter z různých částí kapky. Spektra a), c) jsou z různých míst v kávovém kroužku kapky, spektrum b) je sbíráno z místa mimo něj. Lipid byl rozpuštěn v deionizované vodě za pokojové teploty. Koncentrace vzorku je 1 mg/ml .

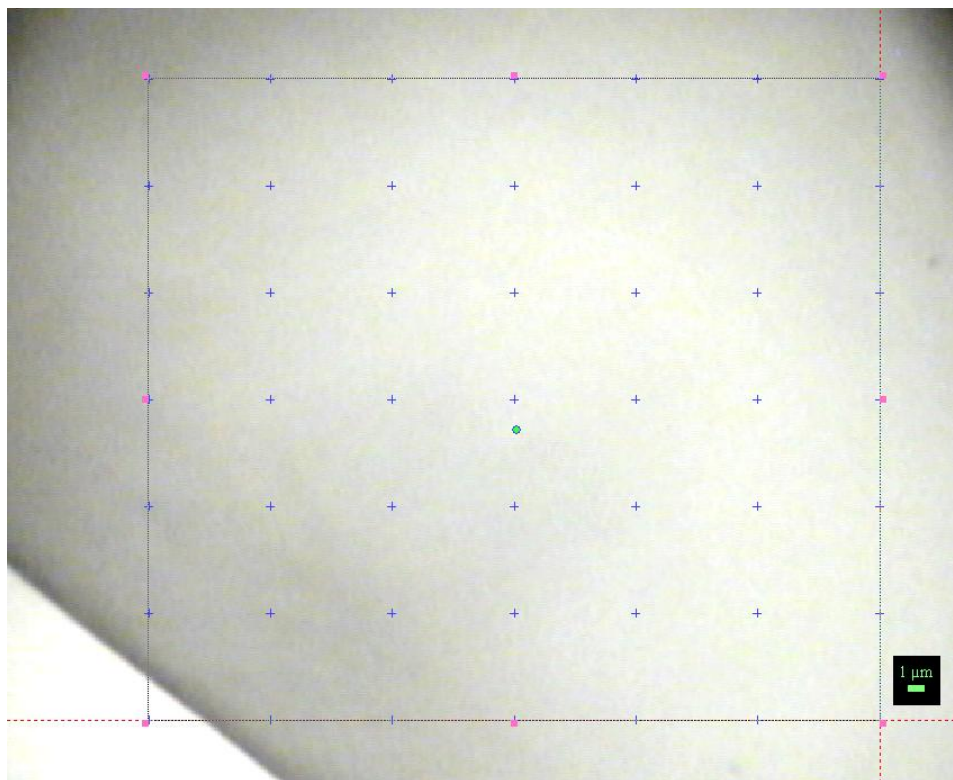
Pokud porovnáme Ramanova spektra pořízená ze suspenze a z vyschlé kapky (Obr.4.2.3), opět zjistíme, že fáze se při vysychání nezměnila. Poměry intenzit jednotlivých pásů jsou zachovány. Ve spektru ze suspenze (Obr.4.2.3a) je patrný široký pás vody nad vlnočty 3000 cm^{-1} , který se však již ve spektrech z vyschlé kapky (Obr.4.2.3b) nevyskytuje. Rovněž slabý pás na vlnočtu $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, který je ve spektru pořízeném ze suspenze přítomen, se ve spektru kapky ztrácí. Toto potvrzuje dokonalé vysušení kapky.



Obr.4.2.3 – Srovnání Ramanových spekter asolektinu a) spektrum měřené z vodní suspenze, b) spektrum z kroužku kapky.



Obr.4.2.4 – Spektrální mapa z okraje kapky asolektinu. Vzdálenost spektrálních bodů je 6 μm .



Obr.4.2.5 – Část kapky asolektinu (Obr.4.2.1) v bílém světle mikroskopu. Body označují místa, ze kterých jsme měřili spektrální DCDR mapu.

Také ze vzorku asolektinu jsme naměřili spektrální DCDR mapu. Na Obr.4.2.4 jsou opět vidět koeficienty příslušející prvnímu subspektru (spektrální intenzita) v rozkladu faktorové analýzy. Jak je vidět na Obr.4.2.5 v levém dolním rohu je již zobrazena oblast mimo kapku, kde není žádný signál. Na okraji kapky je nízký a směrem ke středu kávového kroužku se zvětšuje. Dále uvnitř kapky je již opět nižší.

5. ZÁVĚR

Mezi hlavní cíle bakalářské práce patřilo zvládnutí a optimalizace přípravy vzorků liposomů s různým složením membrány pro Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků (DCDR). Byly vybrány dva syntetické lipidy – DSPC a DPPC a jeden přírodní – asolektin extrahovaný ze sójové fazolky. Optimalizace přípravy spočívá ve vypořádání správné koncentrace lipidu, teploty a dalších laboratorních podmínek, za kterých je nejlepší liposomy připravovat. Důležitou roli hraje rozpouštědlo. Používali jsme fosfátový pufr (5 mM KH_2PO_4 pH 7.4) a deionizovanou vodu. Optimalizace těchto faktorů se u každého vzorku liší. Zjistili jsme, že u syntetických lipidů je nejvýhodnější připravovat liposomy v pufru nad teplotou fázového přechodu s následnou dialýzou. U přírodního asolektinu byl naopak vzorek nejkvalitnější, pokud byla jako rozpouštědlo použita deionizovaná voda a příprava probíhala za pokojové teploty.

Dalším krokem byla interpretace spekter získaných z kapek. Ve spektrech jsou patrné pásy, které odpovídají konkrétní fázi liposomální membrány. Fázi jsme ve spektrech syntetických lipidů identifikovali jako gelovou. Ze spekter asolektinu jsme pak určili, že lipidy jsou ve fázi kapalného krystalu. Z různých míst kapek jsme získali množství spekter, která jsme vzájemně porovnali a zjistili jsme, že se od sebe neliší. Ukázali jsme tím, že fáze a složení liposomů jsou stejné v celém objemu vyschlé kapky. Ověřili jsme tím také, že jsme dobře zvládli optimalizaci přípravy, neboť ve spektrech se neobjevují žádné pásy pocházející od pufru nebo molekul vody. Tedy dialýza vzorků byla dostačující a kapky dobře vyschly v celém svém objemu.

Dále jsme provedli srovnání naměřených DCDR spekter s Ramanovými spektry změřenými přímo ze zásobní suspenze. Tímto přímým porovnáním jsme ověřili, že při vysychání kapky nedochází v liposomech k fázovým přechodům. Ve spektrech měřených ze suspenze se oproti DCDR spektrům vyskytují pouze pásy příslušející vodě.

Nakonec jsme ověřovali reprodukovatelnost spekter získaných metodou kapkově nanášených povlaků měřením spektrálních DCDR map z oblasti kroužku vyschlých kapek. Použitím rozkladu faktorové analýzy na naměřené mapy jsme získali spektrální profil těchto kroužků. Na něm je jasně zřetelné, že největší intenzita Ramanova signálu je uprostřed kroužku a směrem k jeho okrajům se plynule snižuje.

Jedním z hlavních důvodů studie metody kapkově nanášených povlaků je možnost měření Ramanových spekter i ze suspenzí o řádově nižších koncentracích (pro syntetické lipidy více než 0,3 mg/ml, pro asolektin nad 0,5 mg/ml) než je možné u klasické metodiky (kolem 40-50 mg/ml). Spektra měřená přímo ze suspenze se navíc získávají obtížněji. Ověřili jsme, že daná metodika je vhodná pro studium lipidů a dalším cílem bude prostudování její použitelnosti pro interakce lipidů s dalšími biomolekulami, například peptidy či nukleovými kyselinami.

Seznam použité literatury

- Avanti Polar Lipids, Inc.: Lipid products [online]. [cit. duben 2011]. Dostupný z: <http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=7>
- Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., Witten, T. A. (1997): Capillary flow as the cause of ring from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827 – 829.
- Hu, H., Larson, R. G. (2006): Marangoni effect reverses coffee-ring repositions. *The journal of physical chemistry B* **110**, 7090 – 7094.
- Kočišová, E., Procházka, M. (2011): Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes. *Journal of Raman spectroscopy* – přijato v lednu 2011.
- Kopecký, V. Jr., Baumruk, V. (2006): Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules. *Vibrational spectroscopy* **42**, 184 – 187.
- Levin, I. W. (1984): Advances in infrared and Raman spectroscopy. Volume 11. Edited by Clark, R. J. H., Hester, R. E. Wiley Heyden. 1 – 48.
- Lewis, I. R., Edwards, H. G. M. (2001): Handbook of Raman spectroscopy. Marcel Dekker, Inc., New York – Basel.
- O'Neill, S. D., Leopold, A.C. (1982): An assessment of phase transition in soybean membranes. *Plant Physiology* **70**, 1405 – 1409.
- Palacký, J. (2006): Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů – potenciálních chemoterapeutik. Diplomová práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí diplomové práce Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
- Plášek, J. (1995): Konfokální mikroskop. *Vesmír* **74**, 508.
- Prosser, V. a kol. (1989): Experimentální metody biofyziky. Academia, Praha.
- Rickwood, D., Hames, B.D. (1990): Liposomes, a practical approach. Oxford university press, Oxford – New York – Tokyo.
- Rothhaar, K., Zhang, D., Xie, Y., Ben-Amotz, D. (2005): New substrate for Raman, infrared, and mass spectroscopic chemical analysis. *Current separations* **21**, 49 – 52.

Šířová, H. (2006): Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech. Bakalářská práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Marek Procházka, Ph.D.

Zhang, D., Mrozek, M. F., Xie, Y., Ben-Amotz, D. (2004): Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition. *Applied spectroscopy* **58**, 929 – 933.