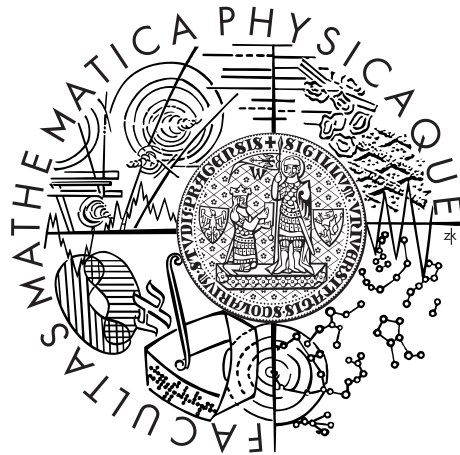


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁRSKA PRÁCA



Andrej Antalík

Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků liposomů s různým složením

Fyzikální ústav UK

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Eva Kočišová, PhD.

Študijný program: Fyzika

Študijný odbor: Obecná fyzika

Praha 2012

Rád by som sa poďakoval dr. Eve Kočišovej za oboznámenie s problematikou, vedenie tejto práce a tiež nemalú pomoc s jej prípravou. Ďalej by som chcel poďakovať doc. Markovi Procházkovi za asistenciu pri riešení menších, či väčších problémov na ktoré som natrafil pri práci v laboratóriu, mgr. Janu Palackému za poskytnutie softvéru na spracovanie spektier, ako aj ostatným pracovníkom Oddelenia fyziky biomolekúl. Nemalá vďaka patrí tiež Janu Ulrychovi a dr. Janu Proškovi za prípravu povrchov použitých pri meraní. V neposlednej rade ďakujem všetkým, ktorí ma podporovali a usmerňovali v mojom štúdiu, nakoľko bez nich by táto práca nevznikla.

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval samostatne a výhradne s použitím citovaných prameňov, literatúry a ďalších odborných zdrojov.

Beriem na vedomie, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platnom znení, obzvlášť skutočnosť, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa §60 odst. 1 autorského zákona.

V Prahe dňa 31.7.2012

Podpis autora

Název práce: *Ramanova spektroskopie kapkovo nanášených povlaků liposomů s různým složením*

Autor: Andrej Antalík

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Eva Kočišová, PhD., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Metóda kvapkovo nanášaných povlakov je špeciálna technika Ramanovej spektroskopie spočívajúca v nanosení malého množstva vzorky na hydrofóbny povrch s následným odparením rozpúšťadla. Po vyschnutí dochádza k sústredeniu materiálu v homogénnom krúžku na okraji kvapky. Použitie tejto techniky sa ukázalo ako vhodné na štúdium lipozómov pri nízkych koncentráciách. Jej využitím sme skúmali prejavy cholesterolu v spektrách prevažne fosfatidylcholínových lipozómov, a tiež jeho vplyv na tvorbu krúžkov. Vyššia koncentrácia cholesterolu nespôsobila výraznejšie zmeny štruktúry membrány, ako napríklad zmenu fázy, avšak nedochádzalo k vytvoreniu krúžkov. V druhej časti bakalárskej práce sme sa zaoberali hľadaním vhodnej alternatívy k doteraz používanému a už nedostupnému DCDR povrchu – doštičkám SpectRIMTM od firmy Tienta Sciences, Inc. Z testovaných povrchov sa ako najvhodnejší na ďalšie použitie javí sklíčko fluoridu vápenatého (CaF₂). Signál z ostatných povrchov bol príliš slabý, alebo boli v spektrách pozorované spektrálne pásy nepríslušiace lipidu.

Kľúčové slová: Ramanova spektroskopia kvapkovo nanášaných povlakov, lipozómy, cholesterol, faktorová analýza

Title: *Drop coating deposition Raman spectroscopy of liposomes with different compositions*

Author: Andrej Antalík

Department: Institute of Physics, Charles University

Supervisor: RNDr. Eva Kočišová, PhD., Institute of Physics, Charles University

Abstract: Method of drop-coating deposition Raman spectroscopy is a special technique that employs deposition of a small droplet of the sample on a hydrophobic surface with subsequent solvent removal by evaporation. As a result the concentrated material forms a ring at the edge of the droplet. This technique has proven to be efficient for liposome studies at low concentrations. We focused on a study of spectral changes and ring formation in phosphatidylcholine liposomes due to increasing amount of cholesterol. Higher concentration of cholesterol didn't cause significant changes in membrane structure, such as phase transition, however the ring wasn't formed. Second part of this bachelor thesis concerns with the search for some alternative surface to previously used SpectRIMTM DCDR plates made by Tienta Sciences, Inc. which are no longer available. The polished calcium fluoride glass (CaF₂) seems to be the most suitable for the further use from all tested surfaces. Raman signal at the other surfaces was either weak or spectral bands that don't belong to lipid were observed.

Keywords: drop-coating deposition Raman spectroscopy, liposomes, cholesterol, factor analysis

Obsah

Úvod	2
1 Teoretická časť	3
1.1 Lipozómy	3
1.1.1 Štruktúra membrán	3
1.1.2 Fázový prechod membrán	4
1.2 Ramanova spektroskopia	4
1.2.1 Klasický model Ramanovho rozptylu	5
1.2.2 Kvantovo mechanický popis Ramanovho rozptylu	6
1.2.3 Vibrácie molekúl	7
1.2.4 Popis spektra	8
1.3 Metóda kvapkovo nanášaných povlakov	8
1.3.1 Mechanizmus vzniku krúžkov	9
1.4 Metódy spracovania spektier	10
1.4.1 Metóda ortogonálnych diferencií	10
1.4.2 Faktorová analýza	10
2 Experimentálna časť	12
2.1 Príprava vzoriek	12
2.1.1 Príprava suspenzie	12
2.2 Experimentálne usporiadanie	14
2.2.1 Schématický popis systému HR800	14
2.2.2 Parametre používanej aparatúry a ovládací softvér	15
3 Výsledky merania	16
3.1 DPPC a cholesterol	16
3.2 Porovnanie rôznych povrchov	17
3.3 Lipozómy s cholesterolom	20
3.3.1 Lipozómy s 10% príspevkom cholesterolu	21
3.3.2 Lipozómy s 20% príspevkom cholesterolu	22
3.3.3 Ďalšie lipidy	24
Záver	26
Zoznam použitej literatúry	27
Zoznam použitých skratiek	29
A Chemické vzorce molekúl	30

Úvod

Biologické membrány nachádzajúce sa v bunkách oddeľujú prostredie bunky od vonkajšieho prostredia, ale taktiež vymedzujú jednotlivé bunkové organely. Pozostávajú prevažne z *fosfolipidov*, *cholesterolu* (u eukaryotickej bunky) alebo *ergosterolu* (u húb a kvasiniek) a tiež *proteínov*, ktoré sú v nej buď zabudované alebo sa nachádzajú na jej povrchu. Cholesterol je steroid predstavujúci významnú molekulu živočíšneho organizmu, avšak jeho zastúpenie v membráne sa v rôznych druhoch buniek líši. Dôležitou vlastnosťou membrán je tzv. *selektívna permeabilita*, teda polopriepustnosť, ktorá je výsledkom molekulárnej organizácie biomembrány. Spôsobuje, že vybrané látky prechádzajú do bunky alebo organely jednoduchšie ako iné. Cholesterol sa včleňuje medzi molekuly fosfolipidov čím ovplyvňuje permeabilitu membrány [1].

Štúdium štruktúry bunkových membrán ako aj ich interakcií s rôznymi látkami je z pohľadu možných aplikácií obzvlášť dôležité napríklad vo farmácii. Častokrát je kľúčové prepraviť účinnú látku – liek – do bunky, kde by ďalej putovala na aktívne miesta a reagovala s ďalšími molekulami. To môže byť problematické, obzvlášť pokiaľ táto látka nie je bunke vlastná a ako cudziu ju membrána neprepustí dovnútra.

Skúmanie membrán priamo v bunke však môže byť mimoriadne náročné, nakoľko sa už jedná o veľmi komplikovaný systém. Preto je vhodné používať jednoduchší model, ktorý však v kľúčových aspektoch zodpovedá prirodzeným membránam v bunke. Jednou z možností je práve využitie *lipozómov*. Jedná sa o veľmi flexibilný model, pretože lipozómy možno pripraviť s rôznym zložením a teda poskytujú možnosť napodobniť prirodzené bunkové membrány.

Jednou z metód vhodnou na skúmanie týchto, ale aj rôznych iných biologických štruktúr, je *Ramanova spektroskopia*. Jedná sa o optickú spektroskopickú metódu, využívajúcu nepružný rozptyl svetla k skúmaniu vibračných pohybov molekúl. Veľkou nevýhodou však môže byť nutnosť práce so vzorkami o vysokých koncentráciách, a preto sme zvolili pomerne novú techniku Ramanovej spektroskopie tzv. *metódu kvapkovo nanášaných povlakov*. Jedná sa o techniku, pri ktorej sa malé množstvo študovaného roztoku alebo suspenzie naniesie na špeciálny hydrofóbny povrch a následné odparenie rozpúšťadla s tzv. *efektom kávového krúžku*, vedie k výraznému zosilneniu Ramanovho signálu.

Hlavným cieľom tejto práce bolo pripraviť a preskúmať pomocou metódy kvapkovo nanášaných povlakov vlastnosti lipozómov, ako modelového systému živočíšnej bunkovej membrány, definovaných rozmerov s rôznym zložením a zastúpením cholesterolu. Zamerali sme sa na pozorovanie spektrálnych zmien v prítomnosti cholesterolu, ako aj jeho vplyv na tvorbu „kávových“ krúžkov. Vzhľadom k tomu, že sa doteraz používaný povrch (doštičky *SpectRIMTM* od spoločnosti *Tienta Sciences*) v nedávnej dobe prestal vyrábať, zamerali sme sa v druhej časti práce na testovanie iných potenciálnych povrchov s cieľom vyhodnotiť ich vhodnosť pri meraní metódou kvapkovo nanášaných povlakov.

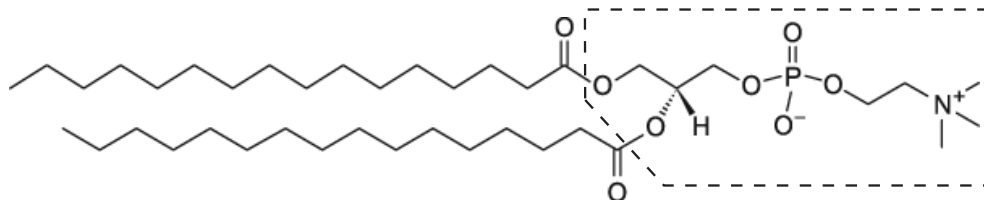
1. Teoretická časť

1.1 Lipozómy

Lipozómy, alebo tiež *vezikuly*, sú uzavreté membránové štruktúry tvorené lipidovou dvojvrstvou, ktorá oddeľuje vnútorné prostredie od vonkajšieho. Vo väčku lipozómu ostáva vodný roztok, v ktorom bol pripravovaný. Vhodnou prípravou je možné uzavrieť vo vnútri lipozómu rôzne živiny alebo liečivá určené k doprave do buniek. Lipozómy možno vytvoriť z prirodzených ako aj zo syntetických lipidov. Často sa využívajú ako modelový systém na štúdium bunecných membrán – primeraným zastúpením rozličných typov lipidov a ďalších látok, ako napríklad cholesterolu, je možné imitovať prirodzenú bunkovú membránu.

1.1.1 Štruktúra membrán

Základným prvkom biologických membrán sú *fosfolipidy*. Sú to amfipatické¹ molekuly pozostávajúce z hydrofilnej polárnej hlavičky a hydrofóbného chvostíka. Hlavička pozostáva z glycerolu, fosfátu a ďalších funkčných skupín. Chvostík je tvorený uhľovodíkovými reťazcami zvyškov mastných kyselín. Na obrázku 1.1 je znázornená molekula *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholínu* (DPPC), ktorej hlavičku (v rámečku) tvorí glycerol, fosfát a cholín². Chvostík je tvorený dvomi nasýtenými uhľovodíkovými reťazcami po 16 uhlíkov, ktoré sú zvyškom kyseliny palmitovej.



Obr. 1.1: Molekula DPPC

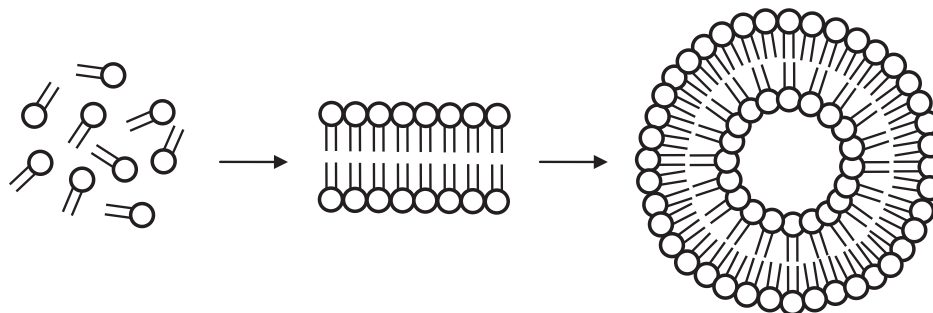
Keď sú fosfolipidy rozpustené vo vode, usporiadávajú sa do rovinatej dvojvrstvy, aby sa minimalizoval styk hydrofóbných chvostíkov s vodou. Následne sa tieto vrstvy uzatvoria, ako možno vidieť na obrázku 1.2, čím vytvoria vezikuly. Tie môžu byť *unilamelárne*, tvorené jednou dvojvrstvou, alebo *multilamelárne*, tvorené viacerými dvojvrstvami. [2].

V závislosti od spôsobu prípravy a zloženia možno vytvoriť lipozómy s veľkosťou pohybujúcou sa od niekoľko desiatok nanometrov až po niekoľko desiatok mikrometrov. Podľa prímeru sa delia na:

- *malé* (small vesicles) – do 100 nm
- *veľké* (large vesicles) – približne do 1000 nm
- *obrovské* (giant vesicles) – od niekoľkých mikrometrov vyššie

¹Obsahujú hydrofilnú aj hydrofóbnú časť.

²Fosfolipidy s takouto hlavičkou bývajú tiež označované ako *fosfatidylcholíny*.



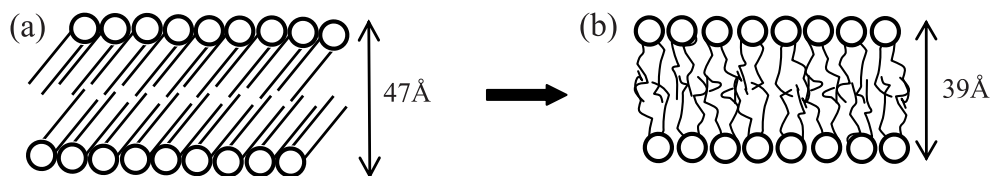
Obr. 1.2: Proces usporiadavania fosfolipidov do vezikúl

1.1.2 Fázový prechod membrán

Vlastnosti membrány sú značne závislé na teplote. Pri prekročení *teploty prechodu* prechádza membrána z usporiadanej *gelovej fázy* do voľnejšej neusporiadanej *tekuto-kryštalickej fázy*. Hodnota teploty prechodu je daná zložením membrány. Čím sú uhľovodíkové reťazce fosfolipidov dlhšie a nasýtenejšie, tým je táto teplota vyššia. Jej výška je ovplyvnená tiež prítomnosťou rôznych funkčných skupín v hlavičke molekuly.

Prechod medzi fázami sa deje v dvoch krokoch. Najprv dôjde k zvlneniu membrány. Potom nastáva zmena konformácie fosfolipidov – z formácie s rovnými reťazcami (*trans*) sa dostávajú do formácie, v ktorej dochádza k zakriveniu C–C väzby (*gauche*). To spôsobí zväčšenie plochy, ktorú reťazce zaberajú, a stenčenie membrány, viď obrázok 1.3 [2].

Pri zmene fázy dochádza k zmenám vlastností membrány akou je napríklad zmena permeability. Cholesterol, ktorý býva súčasťou živočíšnych bunkových membrán, má na vlastnosti membrány rôzne účinky. Pri miernych teplotách znižuje tekutosť membrány, pri nízkych spomaľuje jej tuhnutie [1].



Obr. 1.3: Fázový prechod membrány z gelovej (a) do tekuto-kryštalickej fázy (b)

1.2 Ramanova spektroskopia

V roku 1928 realizoval indický vedec *Chandrasekhara Venkata Raman* so svojím spolupracovníkom *Kariamanickam Srinivasa Krishnanom* sériu experimentov s desiatkami rozličných kvapalín, pri ktorých pozorovali, že pri osvetlení dochádza pri časti rozptýleného svetla k posunu vlnovej dĺžky. O dva roky neskôr bol za svoj objav ocenený Nobelovou cenou a tento jav získal jeho meno – *Ramanov rozptyl*.

Jedná sa o nepružný rozptyl svetla na molekulách. Pri interakcii fotónov s molekulou dochádza k vzájomnej výmene energie, dôsledkom čoho je zmena vlnovej

dĺžky svetla, ako je zrejmé zo vzťahu $E = h\nu$, kde E je energia svetla, h Planckova konštanta a ν frekvencia svetla. Energia, ktorú molekula získa spôsobí jej prechod na vyššiu energetickú hladinu, pričom v prípade Ramanovej spektroskopie sa jedná o prechody medzi vibračnými hladinami.

Medzi hlavné výhody v biochemických aplikáciách sa radí možnosť práce so vzorkami vo vodnom roztoku, ktorý predstavuje prirodzené biologické prostredie. Vibračné pásy vody minimálne zasahujú do pásov zlúčenín v nej rozpustených. Nevýhodou môže byť potreba práce s vyššími koncentraciami prípadne vyšším svetelným tokom (môže spôsobiť chemické zmeny vo vzorke) nakoľko je Ramanov rozptyl značne nepravdepodobný proces [3].

V nasledujúcom texte vysvetlíme princíp vzniku Ramanovho rozptylu na príklade dvojatómovej molekuly.

1.2.1 Klasický model Ramanovho rozptylu

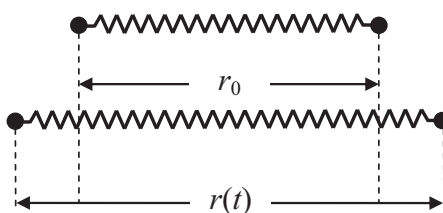
Ako modelový systém nám poslúžia dva hmotné body o hmotnostiach m_1 a m_2 spojené väzbou, ktorá je reprezentovaná pružinou tuhosti k , pričom predpokladáme, že ich pohyb je lineárny. Táto sústava je schématicky znázornená na obrázku 1.4. Zavedieme súradnicu

$$q(t) = \Delta r(t) = r(t) - r_0, \quad (1.1)$$

kde $r(t)$ predstavuje aktuálnu vzdialenosť hmotných bodov v čase t a r_0 ich vzdialenosť v rovnovážnej polohe. Potom je možné nájsť pohybovú rovnicu sústavy, ktorej riešenie má tvar

$$q(t) = \Delta r_{max} \cos(2\pi\nu_{vib}t + \varphi) \quad (1.2)$$

pričom ν_{vib} je frekvencia, Δr_{max} amplitúda kmitov a φ fázový posun.



Obr. 1.4: Dva hmotné body spojené pružinkou

Svetelná vlna pôsobí na všetky elektróny molekuly rovnakou silou, pretože veľkosť molekuly je o dva rády menšia ako vlnová dĺžka dopadajúceho svetla. Táto sila spôsobuje vychýlenie elektrónov v molekule, čo pre uskutočnenie Ramanovho javu musí viesť k indukovanému dipólovému momentu molekuly, ktorý môžeme vyjadriť ako

$$\pi_i = \alpha_{ij} E_j \quad (1.3)$$

kde E_j je vektor elektrického poľa a α_{ij} je tenzor druhého rádu, nazývaný elektrická polarizovateľnosť.

Ak molekulu ožiarime monochromatickým žiarením o frekvencii ν_0 , ktoré je lineárne polarizované v smere E_z , tak

$$\pi_z(t) = \alpha_{zz}(t)E_z(t) \quad (1.4)$$

pričom časová závislosť α_{zz} je dôsledkom vibrácií molekuly (1.2). Úpravami dostávame

$$\begin{aligned} \pi_z(t) = & \alpha_{zz}^0 E_{max} \cos 2\pi\nu_0 t \\ & + \frac{1}{2} \frac{d\alpha_{zz}}{dr} \Delta r_{max} E_{max} \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t \\ & + \frac{1}{2} \frac{d\alpha_{zz}}{dr} \Delta r_{max} E_{max} \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t \end{aligned} \quad (1.5)$$

kde α_{zz}^0 predstavuje polarizovateľnosť nevibrujúcej molekuly, $\frac{d\alpha_{zz}}{dr}$ vyjadruje zmenu polarizovateľnosti v závislosti na výchylke r a E_{max} je amplitúda dopadajúcej vlny. Prvý člen rovnice (1.5) reprezentuje *Rayleighov rozptyl* - rozptýlené žiarenie má rovnakú frekvenciu ako dopadajúce. V druhom resp. treťom člene však dochádza k zmene frekvencie o ν_{vib} oproti frekvencii dopadajúceho žiarenia a tieto členy predstavujú *Stokesovu* resp. *anti-Stokesovu vetvu Ramanovho rozptylu* [3].

1.2.2 Kvantovo mechanický popis Ramanovho rozptylu

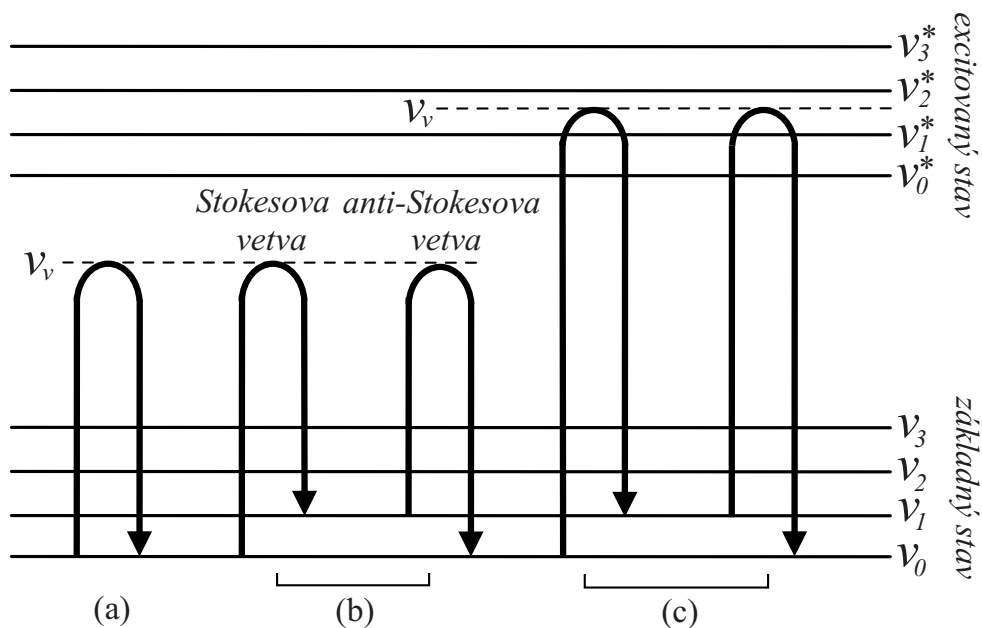
V tejto časti budeme k nášmu modelu pristupovať z hľadiska kvantovej mechaniky. Uvážime, že molekulárne energetické hladiny sú kvantované. Energiu dvojatómovej molekuly plynu je možné v rozumnom priblížení vyjadriť ako súčet energie daných energetických hladín elektrónov E_e a vibračných energií E_{vib} . Ako môžeme vidieť zo zjednodušeného Jablonského diagramu na obrázku 1.5, rozdiel energií pri prechode medzi elektrónovými stavmi je omnoho väčší, ako pri prechode medzi stavmi vibračnými. Pretože náš modelový systém možno považovať za harmonický oscilátor, kvantovanie vibračných hladín v rozumnej miere zodpovedá kvantovaniu energie harmonického oscilátora v kvantovej teórii

$$E_{vib} = (n + \frac{1}{2})\nu_{vib} \quad \text{pre } n = 0, 1, 2, \dots \quad (1.6)$$

a teda tieto hladiny sú ekvidistantné.

Dopadajúci fotón spôsobí excitáciu molekuly na vyššiu energetickú hladinu ν_v . Následne dôjde k deexcitácii, pričom v závislosti na tom, aká bude výsledná hladina voči východzej, vieme určiť k akému druhu rozptylu došlo. Ak bude energetický rozdiel nulový, jedná sa o elastický Rayleighov rozptyl. V prípade kladného resp. záporného rozdielu ide o Stokesovu resp. anti-Stokesovu vetvu Ramanovho rozptylu. Ak je energia svetla dostatočne veľká na to, aby sa priblížila k prvému excitovanému elektrónovému stavu, dochádza k výraznému zosilneniu Ramanovho signálu. V prípade, že je dostatočná na to aby spôsobila prechod do vyššieho elektrónového stavu, dochádza k rezonančnému Ramanovmu rozptylu.

Kvantový popis nám na rozdiel od klasického umožňuje nahliadnuť, že signál anti-Stokesovej vetvy je výrazne slabší než signál Stokesovej vetvy. Obsadenie vyšších vibračných hladín je totiž popísané Boltzmannovým rozdelením čoho dôsledkom je nižšia pravdepodobnosť obsadenia vyššieho stavu a teda aj nižšia pravdepodobnosť anti-Stokesovho deja [3].



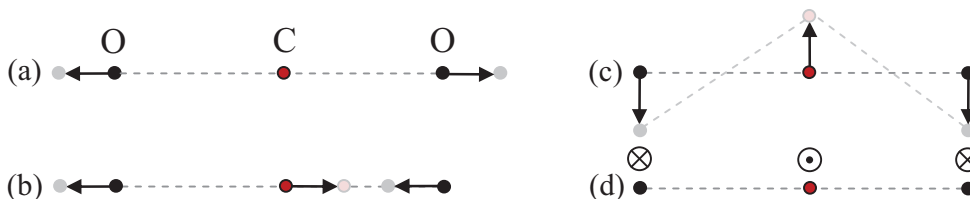
Obr. 1.5: Vibračné prechody pre Rayleighov (a), Ramanov (b) a rezonančný Ramanov rozptyl (c)

1.2.3 Vibrácie molekúl

Energia, ktorú molekula získa, spôsobí zmenu jej vibračného stavu. Vibrácie zložitých molekúl je možné pre jednoduchší popis rozložiť na zložky nazývané *normálne módy*. Ich počet zodpovedá počtu stupňov voľnosti molekuly, pričom v každom z nich všetky atómy molekuly vibrujú s rovnakou frekvenciou.

Niekoľko základných módov si ukážeme na príklade lineárnej molekuly CO_2 . Tá má $3 \times 3 - (3 + 2) = 4$ stupne voľnosti, kde 3×3 predstavuje celkový počet stupňov voľnosti trojatómovej molekuly od ktorých odčítame tri translačné a dva rotačné (pretože je lineárna - teda otáčanie okolo dvoch rôznych osí predstavuje z energetického hľadiska rovnaký pohyb). Tieto sú znázornené na obrázku 1.6. Prvý (a) predstavuje symetrické a druhý (b) asymetrické *valenčné vibrácie* (stretching), pri ktorých dochádza k zmene dĺžky väzby. Tretí (c) a štvrtý (d) predstavujú *deformačné vibrácie* (bending), pri ktorých sa mení väzbový uhol. Tieto majú rovnakú frekvenciu, ale smery pohybu sú navzájom kolmé.

Polohy spektrálnych pásov je možné spočítať z pohybových rovníc molekuly, čo však pre zložitejšie molekuly môže byť zdĺhavé. Rôzne funkčné skupiny molekuly však môžu vytvárať pre ne charakteristické pásy, ktorých znalosť možno využiť pri interpretácii spektier [3].

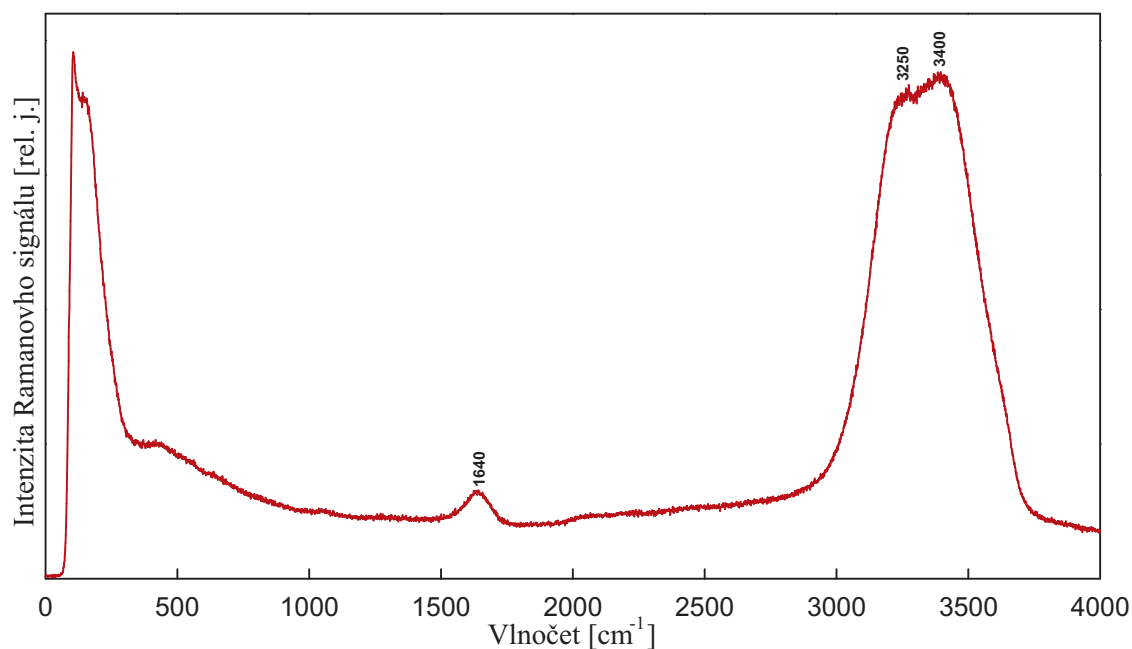


Obr. 1.6: Normálne módy molekuly CO_2

1.2.4 Popis spektra

Príklad Ramanovho spektra je uvedený na obrázku 1.7. Jedná sa o spektrum vody. V grafe je vynesena závislosť intenzity signálu (intenzity rozptýleného svetla), ktorá je vyjadrená v relatívnych jednotkách, na *vlnočte*, teda na rozdiel frekvencií dopadajúceho a rozptýleného svetla, ktorý býva označovaný ako *Ramanov posun*. Pre prehľadnosť sa na vodorovnej osi uvádza iba táto relatívna vzdialenosť od frekvencie excitujúceho svetla. Je uvádzaná ako prevrátená hodnota vlnovej dĺžky, obvykle v recipročných centimetroch.

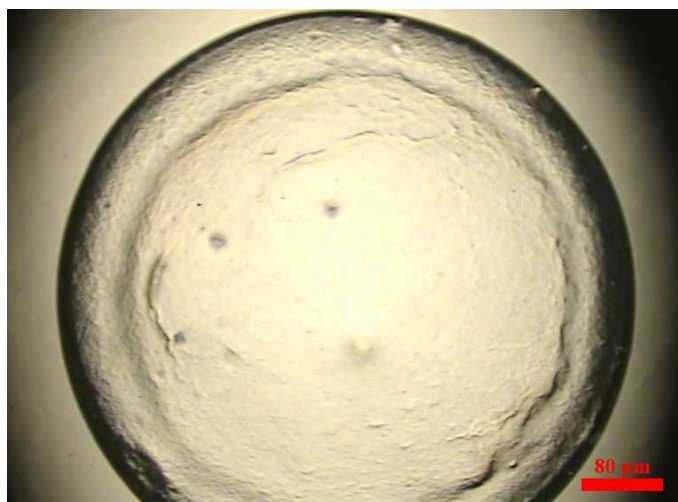
Pre spektrum vody sú charakteristické dva pásy. Slabší pás nachádzajúci sa na 1640 cm^{-1} , ktorý je dôsledkom deformačnej vibrácie H–O–H. Výrazné, široké pásy na 3250 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} sú spôsobené valenčnými vibráciami O–H a odrážajú vzájomnú interakciu molekúl vody prostredníctvom vodíkových väzieb. V oblasti 0 cm^{-1} sa prirodzene nachádza pás zodpovedajúci pružnému Rayleighov rozptylu s vlnovou dĺžkou rovnou vlnovej dĺžke excitujúceho lasera, v našom prípade $632,82\text{ nm}$. Tento pás však nevidno, pretože je potlačený filtrom.



Obr. 1.7: Ramanove spektrum vody

1.3 Metóda kvapkovo nanášaných povlakov

Homogénna suspenzia lipozómov nakvapnutá na vhodný povrch vytvorí rovnomerný, symetrický krúžok na okraji kvapky, ako možno vidieť na obrázku 1.8. V tomto prípade bola nakvapnutá suspenzia lipozómov pripravená z 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholínu (DSPC) na hydrofóbny povrch tvorený leštenou nerezou pokrytou tenkou vrstvou teflónu. Podstatná časť lipozómov sa pri vysychaní skoncentrovala do okrajového krúžku a vo vnútri kvapky už neostáva takmer žiadny materiál. Jedná sa o vysychanie s tzv. *efektom kávového krúžku*.



Obr. 1.8: Krúžok vytvorený kvapkou DSPC

Extrémnym prípadom je odparovanie na superhydrofóbnom povrchu, kedy sa materiál pri odparovaní rozpúšťadla postupne koncentruje, až sa nakoniec sústreďí na malej plôške uprostred kvapky [4].

Spektroskopická metóda využívajúca tento jav sa nazýva *Ramanova spektroskopia kvapkovo nanášaných povlakov* (ďalej označovaná ako DCDR z angl. drop-coating deposition Raman). Zakoncentrovaním vzorky spojeným s úplným odparením rozpúšťadla, vieme dosiahnuť výrazné zosilnenie Ramanovho signálu [4]. Hlavnou výhodou tejto metódy je možnosť práce s malým objemom materiálu a rádovo nižšími koncentraciami, než v prípade klasickej Ramanovej spektroskopie. Po odparení rozpúšťadla si lipozómy zachovávajú rovnaké vlastnosti ako v roztoku, a preto je táto metóda vhodná na štúdium modelov biologických membrán [5].

1.3.1 Mechanizmus vzniku krúžkov

Kvapka, ktorá má vytvoriť krúžok, musí s povrchom zvierat nenulový uhol, mať pevný, neposúvajúci sa okraj a rozpúšťadlo sa musí odparovať [6]. Dostatočne veľký kontaktný uhol kvapky je možné dosiahnuť použitím hydrofóbného povrchu. Pripevnenie okraja je spôsobené nerovnosťou povrchu a v prípade roztoku je silnejšie než pri nakvapnutí samotného rozpúšťadla, pretože usadeniny zväčšia pôvodné nerovnosti.

Ako možno vidieť na obrázku 1.9a najväčší tok odparovaných častíc je na okraji. V prípade, že by okrajová línia nebola pevná, dochádzalo by so zmenšujúcim sa objemom kvapky tiež k posúvaniu okraja ako vidno na obrázku 1.9b. V sku-



Obr. 1.9: Odparovanie kvapky s (a) pevným okrajom, (b) voľným okrajom

točnosti sa však postupne znižuje výška kvapky, pričom okraj drží svoj tvar. Aby k posúvaniu neprišlo, musia byť straty spôsobené odparovaním kompenzované, čo je dosiahnuté práve prúdením kvapaliny zo stredu smerom k okraju vid' obrázok 1.9a. Tento prúd so sebou nesie častice, ktoré sa tu usádzajú, čo vedie ku vzniku krúžku [6].

Ukazuje sa tiež, že vytvoreniu krúžku môže zabrániť prítomnosť tzv. Marangoniho prúdenia. Jedná sa o druh prúdenia vznikajúci pozdĺž rozhrania medzi dvomi tekutinami v dôsledku gradientu povrchového napätia. Tento jav je však pri použití vody ako rozpúšťadla slabý a teda zanedbateľný [7].

1.4 Metódy spracovania spektier

1.4.1 Metóda ortogonálnych diferencií

S nameraným spektrom \mathbf{A} , ktoré pozostáva z m spektrálnych bodov, možno pracovať ako s m rozmerným vektorom. Ten je možné rozložiť na súčet

$$\mathbf{A} = \mathbf{S} + \mathbf{N} \quad (1.7)$$

kde \mathbf{S} predstavuje zložku spektra, ktorá nás zaujíma, a \mathbf{N} nežiaduci príspevok k tomuto spektru.

Definujeme ortogonálnu diferenciu spektra $(\mathbf{A})_{\text{OD}}$ voči ortonormálnej báze

$$(\mathbf{A})_{\text{OD}} = \mathbf{A} - \sum_{k=1}^s \langle \mathbf{A}, \mathbf{O}_k \rangle \mathbf{O}_k \quad (1.8)$$

kde \mathbf{O}_k sú prvky tejto bázy. Ortogonálnu diferenciu spektra $(\mathbf{A})_{\text{OD}}$ môžeme vyjadriť ako súčet spektier $(\mathbf{S})_{\text{OD}}$ a $(\mathbf{N})_{\text{OD}}$ podobne ako (1.7). Nežiaduca zložka spektra vymizne, ak je \mathbf{N} lineárnou kombináciou spektier ortonormálnej bázy \mathbf{O}_k . Preto treba predpokladať určitý tvar nežiaduceho spektra a nájdením vhodnej ortonormálnej bázy vieme toto spektrum eliminovať.

Táto metóda sa využíva na elimináciu nežiaducich zložiek v spektrách akými sú napríklad luminiscenčné pásy alebo nežiaduce pozadie [8].

1.4.2 Faktorová analýza

Jedná sa štatistickú metódu, ktorá umožňuje charakterizovať väčšie množstvo dát pomocou niekoľkých spoločných faktorov. Existujú rôzne spôsoby ako ju možno vykonať, pričom všetky metódy dávajú ekvivalentné výsledky.

Majme maticu \mathbf{A} typu $m \times n$, pričom $m \geq n$. Často využívaný algoritmus *singular value decomposition* (SVD) spočíva v rozklade tejto matice na súčin matíc

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{W}\mathbf{V}^T \quad (1.9)$$

kde \mathbf{U} je ortogonálna matica typu $m \times m$, \mathbf{V} ortogonálna matica typu $n \times n$ a \mathbf{W} diagonálna matica typu $n \times n$ s nezápornými prvkami. Prvky matice \mathbf{W} sa nazývajú singulárne hodnoty.

Nameraných n spektier o m spektrálnych bodoch možno usporiadať do matice \mathbf{A} typu $m \times n$. Keď túto maticu rozložíme podľa vzťahu (1.9) a rozpíšeme v zložkách

$$A_{ri} = \sum_{j=1}^n W_j V_{ij} U_{rj} \quad \text{pre } r = 1..m, \quad i = 1..n \quad (1.10)$$

môžeme tento rozklad interpretovať nasledovne: dané i -te spektrum možno vyjadriť ako lineárnu kombináciu n subspektier, pričom j -te subspektrum predstavuje j -tý stĺpec matice \mathbf{U} , V_{ij} sú koeficienty lineárnej kombinácie a W_j predstavuje váhový faktor.

V praxi je postačujúce pracovať iba s niekoľkými prvými subspektrami, ktoré popisujú najdôležitejšie charakteristiky spektier. Prvé subspektrum odpovedá váženému priemeru spektrálnej intenzity a ďalšie subspektrá sú diferenčné spektrá odrážajúce spektrálne zmeny. V nich ubúdajú tieto význačné vlastnosti, pričom od istého subspektra prispievajú k celkovému spektru už iba šumom [8].

Na spracovanie spektier sme požívali program *Cell Viewer* od mgr. Jana Palackého.

2. Experimentálna časť

2.1 Príprava vzoriek

Všetky študované vzorky pochádzali od firmy *Avanti® Polar Lipids, Inc.* Jednalo sa o nasledujúce produkty:

- *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholín* (DPPC), kat. č. 850355P
- *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholín* (DSPC), kat. č. 850365P
- *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholín* (DOPC), kat. č. 850375P
- *azolektín*, kat. č. 541602P
- *cholesterol*, kat. č. 700100P

Ako sme už spomínali v časti 1.1.1, DPPC sa skladá z dvoch 16 uhlíkových reťazcov kyseliny palmitovej a hlavičky tvorenej cholínom, fosfátom a glycerolom. Teplota prechodu DPPC je 41°C. DSPC má na rozdiel od DPPC reťazce pozostávajúce z 18 uhlíkov, ktoré sú zvyškom kyseliny stearovej. Teplota prechodu DSPC je 55°C. Reťazce DOPC sú zvyškom kyseliny olejovej, pozostávajú z 18 uhlíkov a majú jednu dvojnú väzbu. Teplota prechodu DOPC je -20°C. Vo všetkých prípadoch boli lipidy pripravované chemickou syntézou.

Azolektín je extrakt zo sójových bôbov tvorený zmesou lipidov. Pozostáva z približne 46% fosfatidylcholínov, 22% fosfatidyletanolamínov, 18% fosfatidylinositolov a 7% fosfatidových kyselín. Zvyšných 7% je tvorených inými nezaraďenými látkami.

Použitý cholesterol je podľa výrobcu pripravený polosyntetickou cestou z rastlinného prekurzora [9].

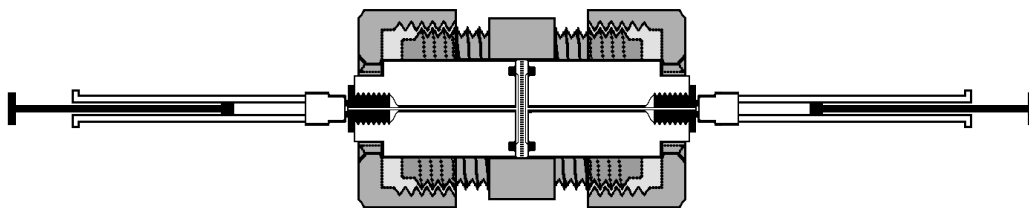
Chemické vzorce použitých látok možno nájsť v prílohe A.

2.1.1 Príprava suspenzie

Suspenzia lipozómov bola pripravovaná podľa štandardnej procedúry popísanej v [2, 9]. V sklenenej Erlenmeyerovej banke sme navázili potrebné množstvo lipidu a cholesterolu, ku ktorým sme pridali chloroform. Obsah nádoby bol premiešavaný, až kým nedošlo k úplnému rozpusteniu materiálu. Následne sa chloroform odparoval za stáleho prísunu plynného dusíka, aby nedošlo k oxidácii lipidu. Odparovanie prebiehalo za stáleho otáčania banky, čoho výsledkom bolo vytvorenie tenkej vrstvy na povrchu skla.

V ďalšom kroku bola pridaná deionizovaná voda. Banka bola uzatvorená a lipid sa nechal za stáleho miešania hydratovať. Postupne sa vrstva na dne uvoľnila za vzniku suspenzie multilamelárnych vezikúl rôznej veľkosti. Suspenzia bola ponorená do vodného kúpeľa a pomocou ultrazvuku boli oddelené zvyšky lipidu z povrchu banky.

Suspenzia bola následne ohriata nad teplotu fázového prechodu daného lipidu a pretláčaná cez polykarbonátovú membránu v zariadení *LiposoFast-Basic™* od firmy *Avestin®, Inc.*



Obr. 2.1: Schéma zariadenia LiposoFast-BasicTM od firmy Avestin[®], Inc. [10]

Na obrázku 2.1 vidíme schému zariadenia LiposoFast-BasicTM. Pozostáva z dvoch Hamiltonových striekačiek, vonkajšieho kovového tela (na schéme sivé časti) a dvoch teflónových valčekov s kanálikmi (biele vnútorné časti). Membrána sa umiestňuje medzi valčeky a je upevnená gumenými tesniacimi krúžkami. Pred ňou sa nachádza nylónová sieťka, ktorá umožní rovnomerné rozdelenie suspenzie na povrchu membrány [10]. Nami používané membrány mali póry o priemeru 100 nm, 200 nm a 400 nm.

Volili sme vždy nepárny počet pretlačaní, aby lipozómy resp. zbytkové agregáty lipidu väčšie ako póry membrány ostali v pôvodnej striekačke a výslednú homogenizovanú suspenziu sme odoberali na druhej strane. Pretláčali sme približne 30–40 krát, pričom v [10] je odporúčaný počet 19 krát cez dve membrány. Celý proces prebiehal v piecke, aby bola suspenzia udržiavaná nad teplotou fázového prechodu lipidu.

Koncentrácia pripravovenej zásobnej suspenzie lipozómov bola 1 mg/ml. V prípade merania Ramanovho spektra priamo z vodného prostredia, bola suspenzia zakoncentrovaná na približne 40 násobne vyššiu koncentráciu a nanosená na podložné sklíčko. V prípade metódy DCDR bola zásobná suspenzia zriedená na polovičnú koncentráciu a 2 μ l kvapka bola nakvapnutá na daný povrch, pričom vysychala pri izbovej teplote.

Primárne sme ako povrch na DCDR používali doštičky *SpectRIM*TM od spoločnosti *Tienta Sciences, Inc.*, vid' obrázok 2.2. Tie pozostávajú z plastového tela a hydrofóbného DCDR povrchu, ktorý tvorí leštená nerezová oceľ potiahnutá 50 nm vrstvou teflónu. Kvapka na ňom dokonale vyschla za približne polhodinu.

Medzi ďalšie skúmané povrchy patrili leštené sklíčka z fluoridu vápenatého (CaF_2) a kremeňa (pripravil Jan Ulrych z optických dielní FÚ UK) a tiež sklíčko pokryté roztokom *Sigmacote*[®] od firmy *Sigma-Aldrich*[®] Co. LLC. (pripravil dr. Jan Proška z FJFI ČVUT). Jedná sa o roztok chlorovaného organopolysiloxánu v heptáne, ktorý reaguje so silanolovými skupinami skla a vytvára tenký hydrofóbny film [11]. Na povrchu *Sigmacote*[®] bola doba schnutia porovnateľná s doštičkou *SpectRIM*TM, ale pri kremennom a CaF_2 sklíčku bola mierne dlhšia.



Obr. 2.2: Doštička *SpectRIM*TM od firmy *Tienta Sciences, Inc.* [11]

2.2 Experimentálne usporiadanie

Pri meraní sme používali integrovaný Ramanov systém *LabRam HR800* od spoločnosti *Horiba Jobin-Yvon, Ltd.* pozostávajúci z mikroskopu a spektrografu, ktoré su navzájom konfokálne¹ spojené. Obmedzíme sa iba na stručný popis tohto systému, podrobnejší popis možno nájsť v [12].

2.2.1 Schématický popis systému HR800

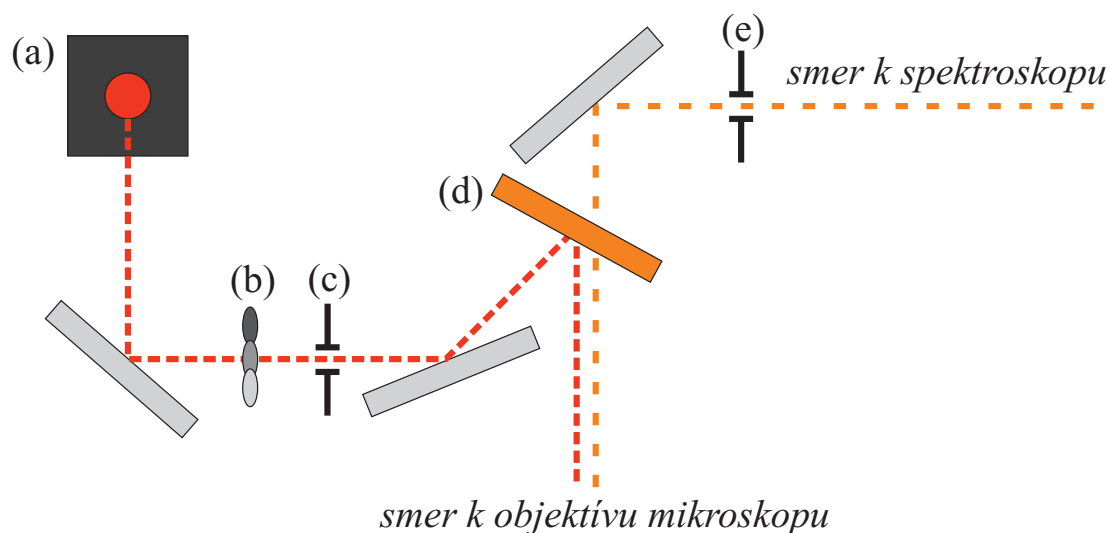
Ako možno vidieť na obrázku 2.3, laserový zväzok (a) vstupujúci do systému prechádza sústavou zrkadiel a filtrov. Šošovkou je zaostrény na štrbinu (c), ktorá určuje apertúru zväzku pred vstupom do mikroskopu. Pred štrbinou sú umiestnené *hustotné* alebo tiež *šedé filtre* (b), ktorými možno regulovať intenzitu zväzku dopadajúceho na vzorku.

Odtiaľto je odrazený na tzv. *notch filter* (d). Je to holografická mriežka, ktorá pod istým uhlom úplne odráža svetlo istej, pre ňu špecifickej vlnovej dĺžky. Svetlo ostatných vlnových dĺžok prepúšťa. V tomto prípade odráža vlnovú dĺžku použitého lasera.

Zväzok odrazený notch filtrom putuje ďalej do mikroskopu. Tam môžu byť umiestnené deliče zväzkov, pričom jeden posiela biele svetlo z lampy na vzorku a druhý posiela obraz na kameru.

Po rozptyle na vzorke prechádza Ramanov (resp. fluorescenčný) zväzok notch filtrom. Ďalej je zobrazený na *konfokálnu štrbinu* (e), odkiaľ vstupuje do spektrografu.

V spektrografe sa nachádzajú dve optické mriežky na ktorých dochádza k difrakcii zväzku a výsledné žiarenie dopadá na CCD detektor chladený tekutým dusíkom. Ohnisková vzdialenosť spektrografu je 800 mm [12].



Obr. 2.3: Schéma integrovaného Ramanovho systému HR800 [12]

¹Vstupná a výstupná štrbina sú zaostrény na rovnaký bod. Konfokálna štrbina teda vyberá len svetlo z ohniskovej roviny.

2.2.2 Parametre používanej aparatúry a ovládací softvér

Používali sme hélium-neónový laser o vlnovej dĺžke 632,82 nm s výkonom 20 mW. Pred každým meraním sme overovali kalibráciu spektrometru na pás kremíku s vlnčtom $520,7 \text{ cm}^{-1}$. Aparatúru sme ovládali pomocou softvéru NGSLabSpec verzie 5.25.15, v ktorom bolo možné nastaviť potrebné parametre experimentu. Šírka konfokálnej štrbiny, nastaviteľná v rozmedzí 0–1000 μm , bola pri DCDR meraní nastavená na 400 μm a pri meraní zo suspenzie na 1000 μm . Aparatúra bola vybavená súpravou šedých filtrov o optických hustotách v rozmedzí 0,3–4, pričom optická hustota nami využívaného filtra bola 0,3. Vstupná clona bola pri všetkých meraniach pevne nastavená na 100 μm . Nami používaná mriežka v spektrografe mala 600 vrypov na milimeter, pričom dostupná bola aj mriežka s 1800 vrypmi na milimeter. Používali sme súpravu objektívov so zväčšením 5 \times , 10 \times na zhotovenie snímok z kamery, 50 \times a 100 \times na meranie spektier metódou DCDR. Na meranie zo suspenzie sme používali *imerzný objektív* so 100 násobným zväčšením a vodnou imerziou.

V programe sa ďalej nastavovala spektrálna oblasť zberu dát (obvykle 500–3600 cm^{-1}) a tiež doba načítania signálu zo vzorky. Program automaticky stredoval cez zadaný počet opakovaných meraní, čo viedlo k potlačeniu šumu. Doba akumulácie v prípade merania samostatných spektier bola 5 \times 60 s (60 opakovaní po 5 sekundách), pri mapovaní 2 \times 60 s. Pri premeriavaní širokej spektrálnej oblasti, označovanej ako *extended range*, si program rozložil spektrum na niekoľko menších celkov. Tie namerá samostatne a výsledné spektrum vytvoril ich spojením. Pri tzv. *mapovaní*, bola vytvorená sieť bodov s presným nastavením počtu bodov a ich vzájomnou vzdialenosťou. Sieť sa umiestňovala priamo na snímke z kamery. Výsledok, tzv. *mapa*, predstavuje súbor spektier nameraných vo vyznačených bodoch.

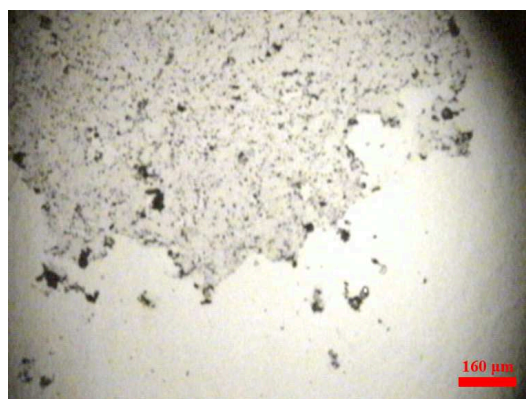
3. Výsledky merania

3.1 DPPC a cholesterol

Suspensia DPPC s koncentráciou 1 mg/ml (molárna koncentrácia 1,36 mM) bola nakvapnutá na sklíčko fluoridu vápenatého. Suspensia cholesterolu s koncentráciou 0,2 mg/ml (0,26 mM) bola nakvapnutá na doštičku *SpectRIMTM*. Ako môžeme vidieť na obrázku 3.1, DPPC po vyschnutí vytvorilo symetrický homogénny krúžok na okraji kvapky. Čistý cholesterol však krúžok nevytvoril a bol rovnomerne rozprestretý po povrchu, vid' obrázok 3.2. Cholesterol má pri vysychaní tendenciu vytvárať akési kryštalické platničky, čo odpovedá výsledkom experimentov pozorovaných v [13] pre bezvodý cholesterol a cholesterol v monohydrátovanej forme.



Obr. 3.1: Kvapka DPPC

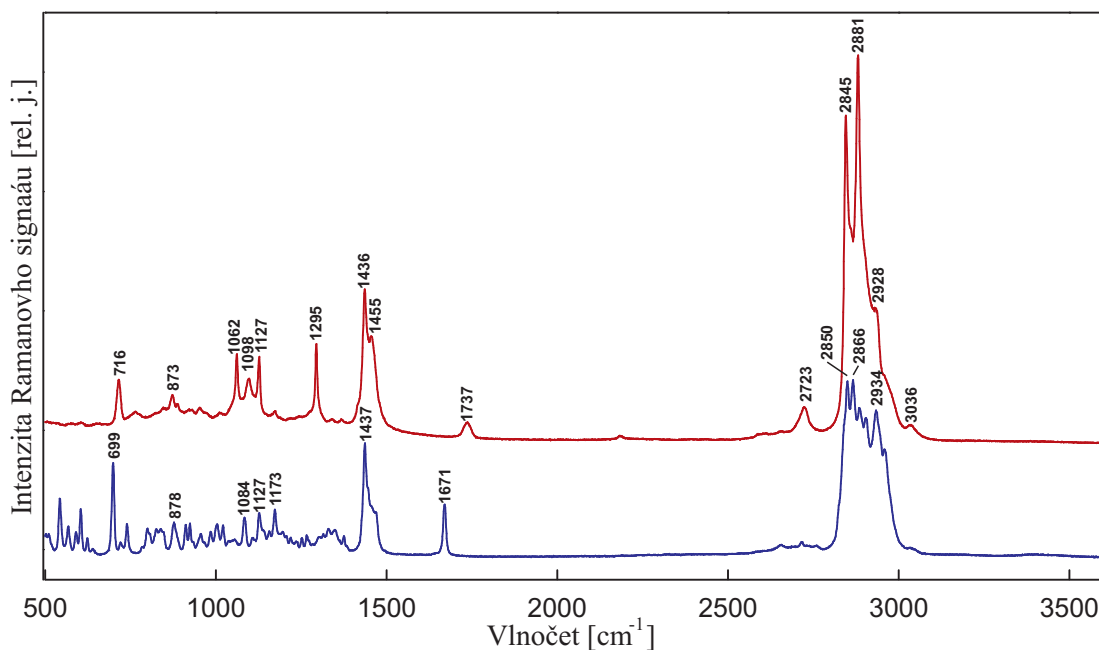


Obr. 3.2: Kvapka cholesterolu

Na obrázku 3.3 sa nachádzajú spektrá DPPC (červené) a cholesterolu (modré), ktoré sme namerali metódou DCDR. V spektre DPPC prislúchajú najvýraznejšie pásy v oblasti $2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$ valenčným vibráciám väzieb C–H v uhľovodíkových reťazcoch – pás na 2845 cm^{-1} symetrickým a pás na 2881 cm^{-1} asymetrickým vibráciám metylénu CH_2 . Pás nachádzajúci sa na 2928 cm^{-1} , ktorý má oproti nim približne polovičnú intenzitu, zodpovedá symetrickým vibráciám metylu CH_3 . Pomer týchto pásov je závislý na fáze, v ktorej sa membrána nachádza. Pomery na obrázku 3.3 sú charakteristické pre gelovú fázu. S rastúcou medzimolekulárnou neusporiadanosťou však dochádza k poklesu intenzity pásu prislúchajúceho asymetrickým metylénovým vibráciám a rastu intenzity pásu metylových vibrácií.

Pásy na 1436 cm^{-1} a 1455 cm^{-1} predstavujú dublet metylénových nožničkových (zmena veľkosti uhla medzi väzbami) deformačných vibrácií. Pás na 1295 cm^{-1} prislúcha krúživým (zmena uhla roviny CH_2 voči uhlíkovému reťazcu) metylénovým deformačným vibráciám.

Tri pásy v oblasti $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ zodpovedajú valenčným vibráciám C–C uhľovodíkových reťazcov. Pásy na 1127 cm^{-1} a 1098 cm^{-1} sú dôsledkom vibrácií, ktoré sú vzájomne vo fáze, na rozdiel od pásu na 1062 cm^{-1} , ktorý možno priradiť vibráciám mimo fázy. Intenzita týchto pásov odráža vnútramolekulové usporiadanie fosfolipidových reťazcov (*trans/gauche*). Pomer intenzít v nameranom spektre vypovedá o *trans* konformácii molekuly. Pri prechode do *gauche* konformácie by



Obr. 3.3: Ramanove spektrá DPPC (červené) a cholesterolu (modré)

došlo k zvýšeniu intenzity pásov na 1062 cm^{-1} a 1127 cm^{-1} a výraznému posunu pásu na 1098 cm^{-1} .

Na 716 cm^{-1} a 873 cm^{-1} sa nachádzajú pásy symetrických valenčných vibrácií C–N. Z ich polohy v týchto vlnôčtoch vyplýva, že časť molekuly O–C–C–N⁺ je v *gauche* usporiadaní. Slabý pás na 1737 cm^{-1} zodpovedá valenčným vibráciám karbonylových skupín C=O. Pás na 3036 cm^{-1} prislúcha asymetrickým metylovým valenčným vibráciám cholínu [5, 14].

Namerané spektrum cholesterolu je veľmi blízke spektrám v [13] pre bezvodý cholesterol a cholesterol v monohydrátovanej forme, so zastúpením pásov v oblastiach $500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ a $2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$. V prvej oblasti sú to predovšetkým vlnôčty 699 cm^{-1} , 1437 cm^{-1} a 1671 cm^{-1} . V druhej oblasti sa jedná o vlnôčty C–H valenčných vibrácií na 2850 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} a 2934 cm^{-1} .

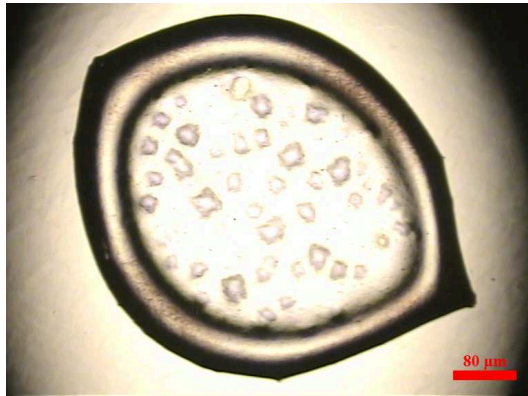
3.2 Porovnanie rôznych povrchov

Cieľom tejto podkapitoly bolo nájsť povrchy, ktoré by boli vhodné na meranie metódou DCDR, nakoľko doteraz používané doštičky SpectRIMTM už nie sú dostupné. Vhodný povrch by mal vytvárať kvapku s homogénnym krúžkom, ako to možno vidieť na obrázku 3.4.

Skúmali sme nasledujúce povrchy:

- sklíčko *fluoridu vápenatého*
- sklíčko pokryté filmom *Sigmacote*[®]
- *kremenné* sklíčko

Na tieto tri povrchy sme naniesli kvapku suspenzie DPPC o koncentrácii 1 mg/ml ($1,36\text{ mM}$). Môžeme vidieť, že na sklíčku z kremeňa (obrázok 3.7) je



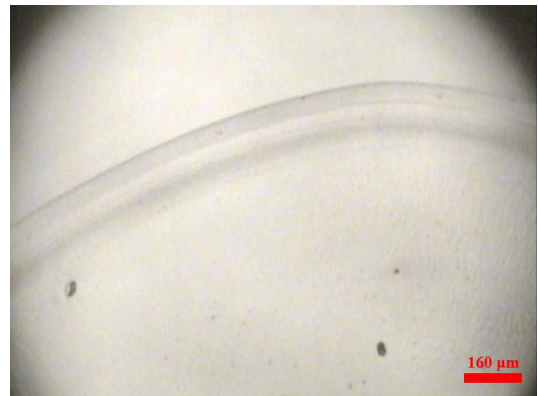
Obr. 3.4: Kvapka DPPC nakvapnutá na doštičke SpectRIM™



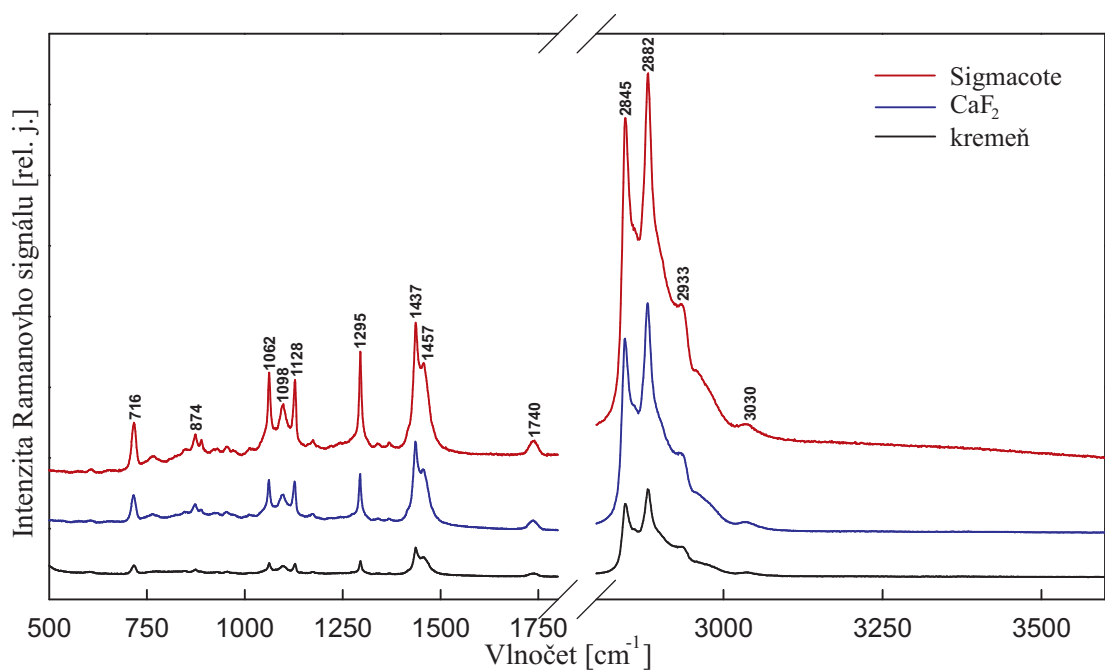
Obr. 3.5: Kvapka DPPC nakvapnutá na sklíčku CaF₂



Obr. 3.6: Kvapka DPPC nakvapnutá na sklíčku s povlakom Sigmacote®



Obr. 3.7: Kvapka DPPC nakvapnutá na kremennom sklíčku



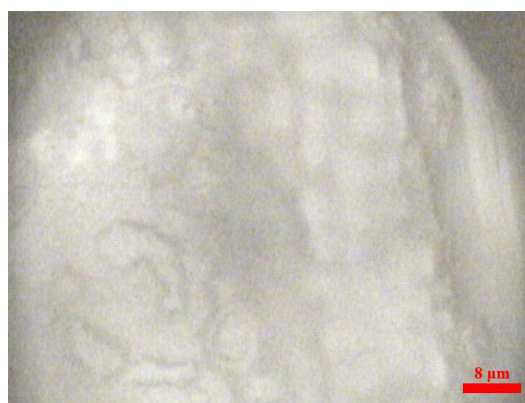
Obr. 3.8: Ramanove spektrá DPPC nakvapnutého na rôzne povrchy

vytvorený krúžok veľmi nevýrazný. Na sklíčku s filmom, ktorý vytvoril Sigmacote (obrázok 3.6), sa vytvoril malý, relatívne homogénny krúžok v ktorom je však možné pozorovať nečistoty vo vnútri. Na sklíčku fluoridu vápenatého (obrázok 3.5) sa vytvoril symetrický a celkom homogénny krúžok. Môžeme pozorovať, že kvapky z CaF_2 a kremenného sklíčka sú niekoľkonásobne väčšie ako kvapky z povrchov SpectRIMTM a Sigmacote[®].

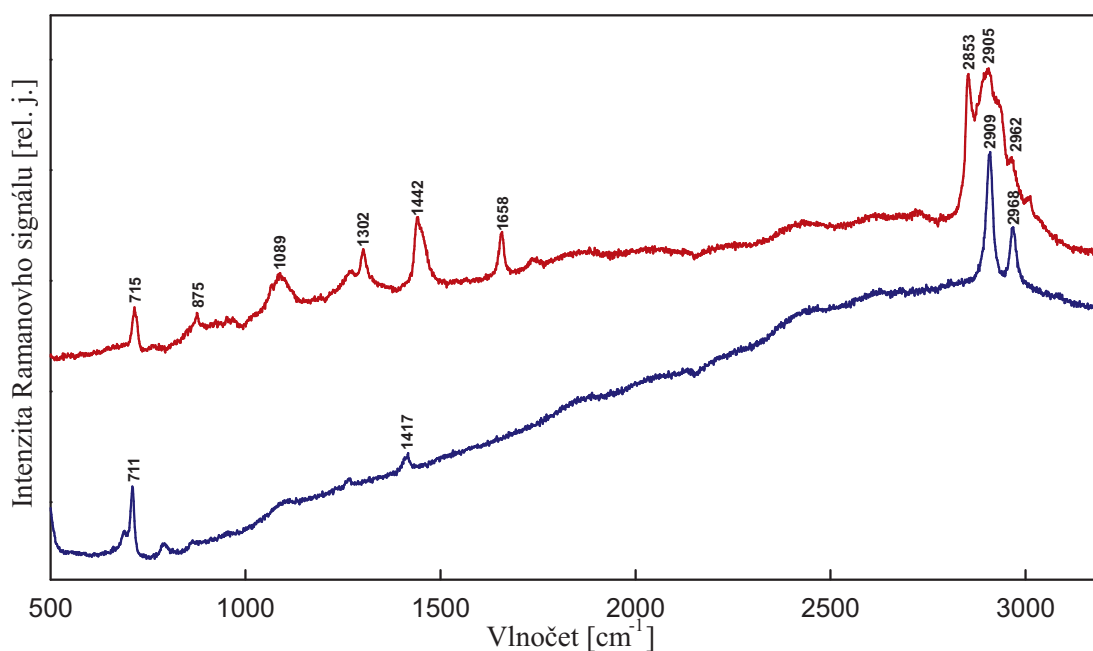
Po nameraní spektier v niekoľkých bodoch sme potvrdili, že krúžky sú homogénne. Na obrázku 3.8 vidíme spektrá namerané z krúžku na každom povrchu. Signál z krúžku na kremennom sklíčku je výrazne slabší v porovnaní s ostatnými povrchmi. Najsilnejší sa javí signál z kvapky na povrchu Sigmacote[®]. Vo všetkých prípadoch možno pozorovať dokonalé vysušenie kvapiek, čo potvrdzuje neprítomnosť širokého pásu valenčných vibrácií vody v oblasti $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$.



Obr. 3.9: Kvapka DOPC nakvapnutá na sklíčku s povlakom Sigmacote[®]



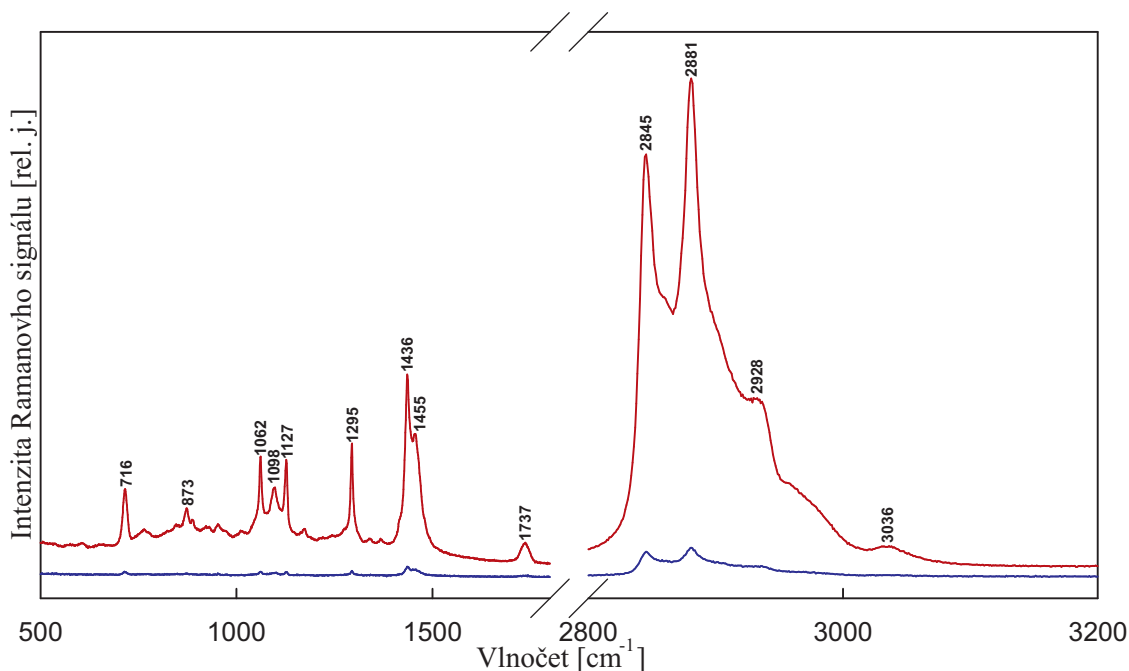
Obr. 3.10: Detail krúžku kvapky z obrázku 3.9



Obr. 3.11: Ramanove spektrá DOPC z dvoch rôznych miest krúžku kvapky nakvapnutej na sklíčku s povlakom Sigmacote[®]

Z ďalších meraní, ktoré sme na tomto povrchu vykonali, sa však ukázalo, že nie je vhodný na ďalšie použitie. Kvapka DOPC s koncentráciou 1 mg/ml (1,27 mM) nakvapnutá na povrchu Sigmacote® vytvorila iba nevýrazný krúžok, viď obrázky 3.9 a 3.10. Povrch kvapky je po vyschnutí nerovný, čo môže byť spôsobené rozpúšťaním alebo odlupovaním hydrofóbneho filmu z povrchu skla. Spektrá na obrázku 3.11 boli získané z rôznych miest tohoto krúžku. V červenom spektre pozorujeme miernu zmenu pomeru pásov v oblasti 2800–3000 cm^{-1} v porovnaní so spektrom DOPC meraného z napríklad z doštičky SpectRIM™. V modrom spektre dokonca vidieť iba cudzie pásy, ktoré by mohli patriť odlúpnutému povrchu Sigmacote®.

Ako najvhodnejší povrch pre ďalšie experimenty sa javí sklíčko CaF_2 . Na obrázku 3.12 sa nachádzajú dve spektrá za účelom porovnania intenzity Ramanovho signálu z okraja, ako aj zo stredu krúžku na tomto povrchu. Vidíme, že signál z vnútra krúžku je veľmi slabý a teda vo vnútri neostáva takmer žiadny materiál, nakoľko sa skoro všetok sústreď v krúžku. Porovnaním so spektrami nameranými na povrchu SpectRIM™ v [15] vidíme, že sa na tomto povrchu zachováva gelová fáza.



Obr. 3.12: Ramanove spektrá DPPC z krúžku (červené) a stredu (modré) kvapky nakvapnutej na sklíčko CaF_2

3.3 Lipozómy s cholesterolom

Cieľom tejto sekcie je pozorovať vplyv cholesterolu v lipozómoch na tvorbu krúžkov a prípadné zmeny fázy lipidov. Pozornosť budeme venovať predovšetkým DPPC, ktoré sme si už podrobne popísali v sekcii 3.1.

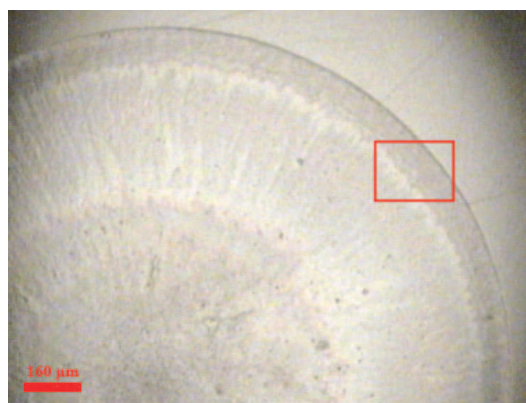
3.3.1 Lipozómy s 10% príspevkom cholesterolu

Na obrázku 3.13 vidíme kvapku DPPC na doštičke SpectRIM™ o koncentrácii lipidu 0,5 mg/ml (0,68 mM) s príspevkom cholesterolu predstavujúcim 10% hmotnosti lipidu. Môžeme pozorovať, že krúžok je len veľmi málo viditeľný a materiál je takmer rovnomerne rozprestretý po celej ploche kvapky.

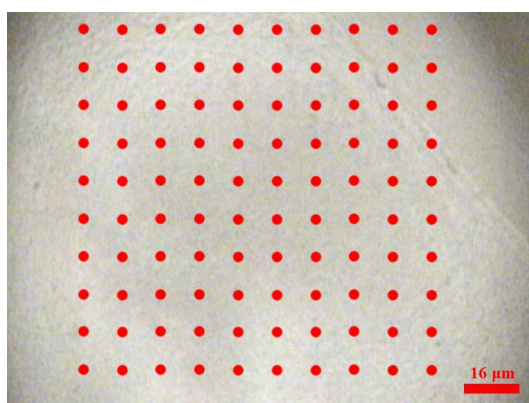
Na obrázku 3.14 je krúžok, ktorý vznikol vysušením suspenzie s koncentráciou DPPC 0,5 mg/ml (0,68 mM) na sklíčku CaF₂. Krúžok bol jasne viditeľný, avšak značne široký. Premerali sme mapu na okraji kvapky tvorenú pravouhlou sieťou 10 × 10 bodov so vzájomnou vzdialenosťou 10 μm. Jednotlivé body mapy sú zobrazené na obrázku 3.15a. Od nameraných spektier sme metódou ortogonálnych diferencií odčítali pozadie v podobe polynómu piateho stupňa a následne celú mapu spracovali faktorovou analýzou. Na obrázku 3.15b vidíme výslednú spektrálnu mapu, ktorá predstavuje veľkosti koeficientov lineárnej kombinácie pre prvé subspektrum v danom mieste. Odtiaľ pozorujeme, že krúžok je homogénny, pričom viac materiálu sa nachádza na jeho vonkajšej strane.



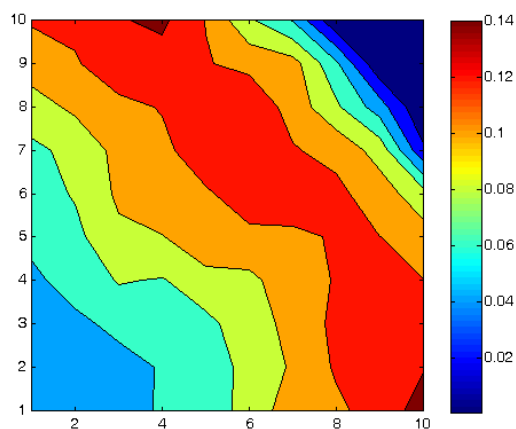
Obr. 3.13: Kvapka DPPC s 10% príspevkom cholesterolu na SpectRIM™



Obr. 3.14: Kvapka DPPC s 10% príspevkom cholesterolu na sklíčku CaF₂



(a) Polohy bodov mapy



(b) Spektrálna mapa

Obr. 3.15: Mapa kvapky DPPC s 10% príspevkom cholesterolu z obrázku 3.14

3.3.2 Lipozómy s 20% príspevkom cholesterolu

Pridaním ďalšieho cholesterolu (koncentrácia DPPC 0,5 mg/ml (0,68 mM)) dochádza k výraznej zmene formy vyschnutej kvapky. Na obrázku 3.16 nie je okrajový krúžok jasne viditeľný, ale dochádza k vytvoreniu množstva malých útvarov na ploche vo vnútri, vid' 3.17. V týchto miestach boli spektrá lipidu výrazne intenzívnejšie než inde, napríklad na okraji. Taktiež pásy cholesterolu tu boli veľmi výrazné a niekedy bola ich intenzita vyššia ako intenzita pásov lipidu.

Na snímke 3.18a pozorujeme okrajový pás, ktorý sa javí byť krúžkom. Z tejto oblasti sme premerali mapu 8×8 bodov, medzi ktorými bola vzdialenosť $4 \mu\text{m}$. Mapu sme opäť spracovali pomocou metódy ortogonálnych diferencií a faktorovou analýzou dostali spektrálnu mapu na obrázku 3.18b. Môžeme vidieť, že materiál sa na okraji nesústreďuje a je pomerne rovnomerne rozprestretý vo vnútri kvapky. Pozorovaný pás je tenká vrstva materiálu, ktorá je však pod úrovňou vnútornej časti vyschnutej kvapky.

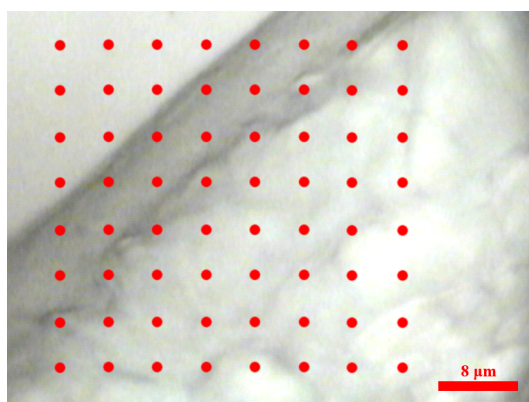
Ako vidíme z porovnania spektier na obrázku 3.19a, v oblasti $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ sa zachovávajú pomery intenzít spektrálnych pásov I_{2847}/I_{2880} a I_{2932}/I_{2880} , ktoré sú charakteristické pre gelovú fázu. Na obrázku 3.19b máme zväčšenú oblasť



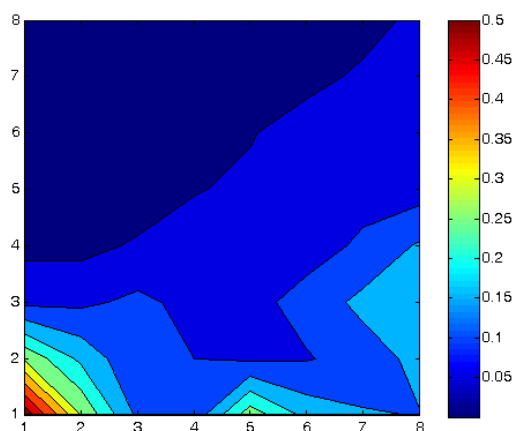
Obr. 3.16: Kvapka DPPC s 20% príspevkom cholesterolu



Obr. 3.17: Detail kvapky z obrázku 3.16



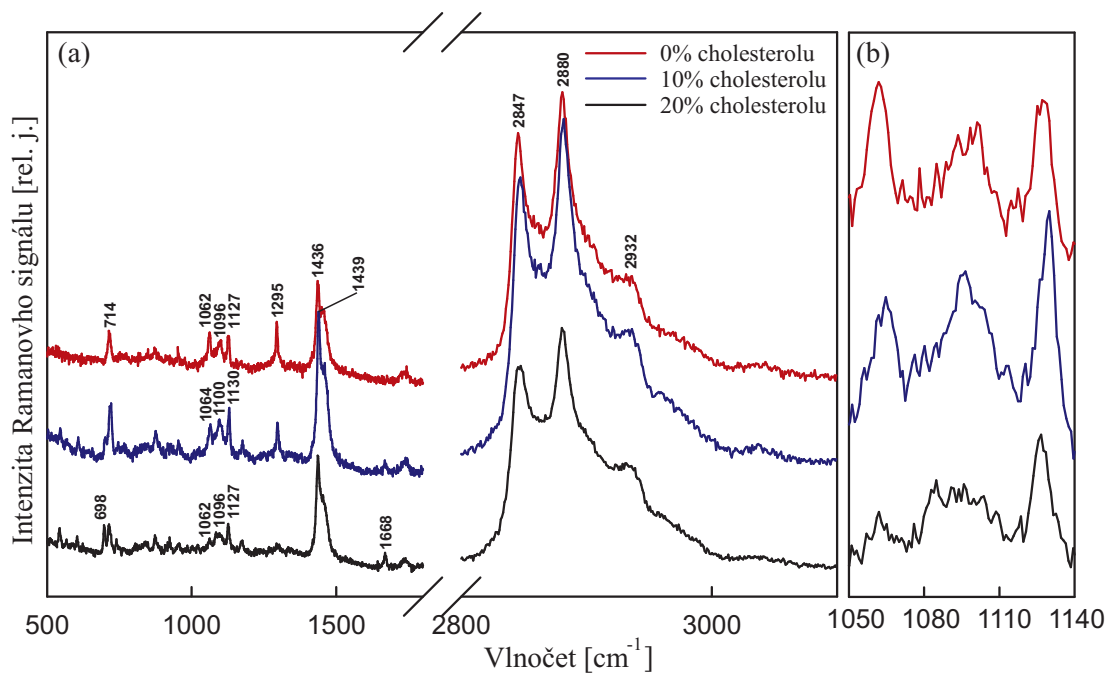
(a) Polohy bodov mapy



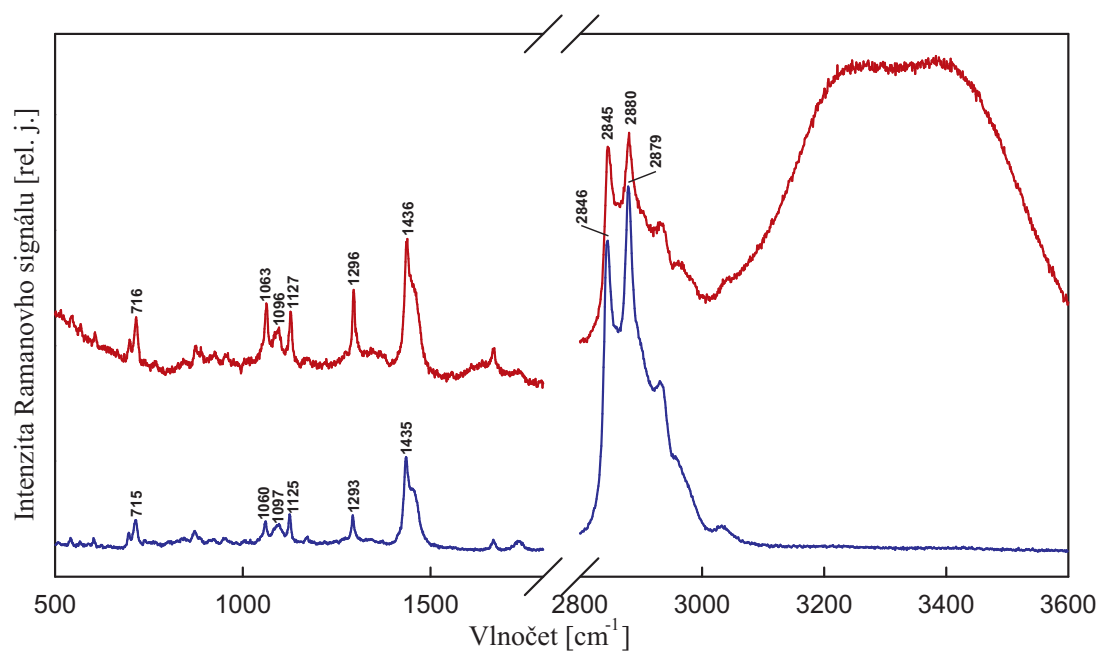
(b) Spektrálna mapa

Obr. 3.18: Mapa kvapky DPPC s 20% príspevkom cholesterolu

1050–1140 cm^{-1} a vidíme, že dochádza k miernej zmene pomerov intenzít pásov valenčných vibrácií C–C 1064 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} a 1130 cm^{-1} . S rastúcim podielom cholesterolu zároveň dochádza k výraznému poklesu intenzity pásu na 1295 cm^{-1} , ktorý prislúcha krútvým deformačným vibráciám CH_2 . Zdá sa, že prítomnosť cholesterolu spôsobuje drobné spektrálne zmeny odpovedajúce zmenám na reťazci uhľovodíkového chvostíka bez toho, aby došlo ku zmene fázy.



Obr. 3.19: Ramanove spektrá DPPC s rôznym príspevkom cholesterolu; (a) spektrálna oblasť 500–3100 cm^{-1} , (b) detail oblasti 1050–1140 cm^{-1}

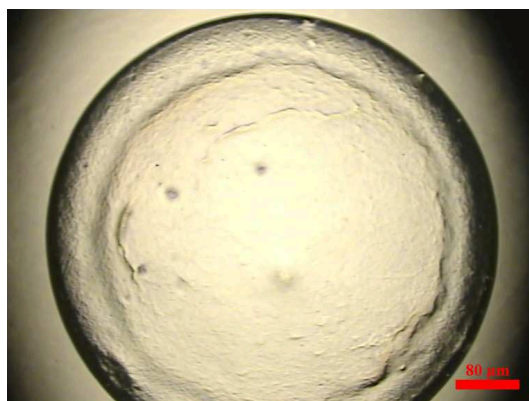


Obr. 3.20: Ramanove spektrá DPPC s 20% príspevkom cholesterolu merané metódou DCDR (modré) a zo suspenzie (červené)

Pri porovnaní spektra meraného zo suspenzie so spektrom rovnakej suspenzie nakvapnutým na doštičku SpectRIMTM (viď obrázok 3.20) vidíme, že dochádza k miernej zmene pomeru I_{2845}/I_{2880} , avšak systém zotrúva v gelovej fáze. K výraznejšej zmene pomerov dochádza v oblasti $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$. V oboch prípadoch je prítomný pás na 1295 cm^{-1} , ktorý pri predchádzajúcich meraniach s týmto množstvom cholesterolu vymizol. Z absentujúcich pásov v oblasti $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ v DCDR spektre je vidieť, že kvapka úplne vyschla.

3.3.3 Ďalšie lipidy

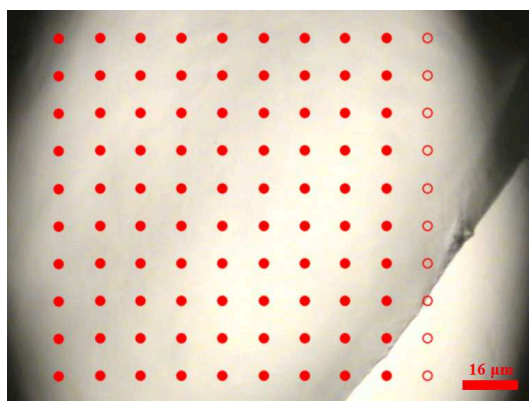
V prípade DSPC a azolektínu (koncentrácia 1 mg/ml) s príspevkom 10% cholesterolu sa pri vysychaní na doštičke SpectRIMTM v oboch prípadoch vytvoril symetrický homogénny krúžok, ako možno vidieť na obrázkoch 3.21 a 3.22. Ďalej sme namerali mapu krúžku azolektínu (obrázok 3.23a). Zadaný počet bodov bol 10×10 a ich vzdialenosť $10\text{ }\mu\text{m}$, avšak kvôli predčasnému ukončeniu merania má mapa iba 9×10 bodov. Nenamerané body sú v obrázku zaznačené prázdny krúžkami. Mapu sme spracovávali štandardným postupom ako v predchádzajúcich prípadoch a výstup je na obrázku 3.23b. Spektrálna mapa potvrdzuje vytvorenie okrajového



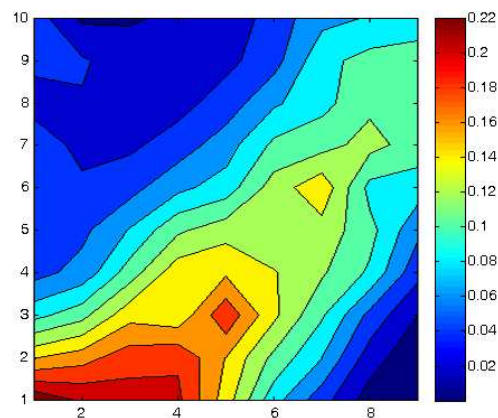
Obr. 3.21: Kvapka DSPC s 10% cholesterolu



Obr. 3.22: Kvapka azolektínu s 10% cholesterolu



(a) Polohy bodov mapy



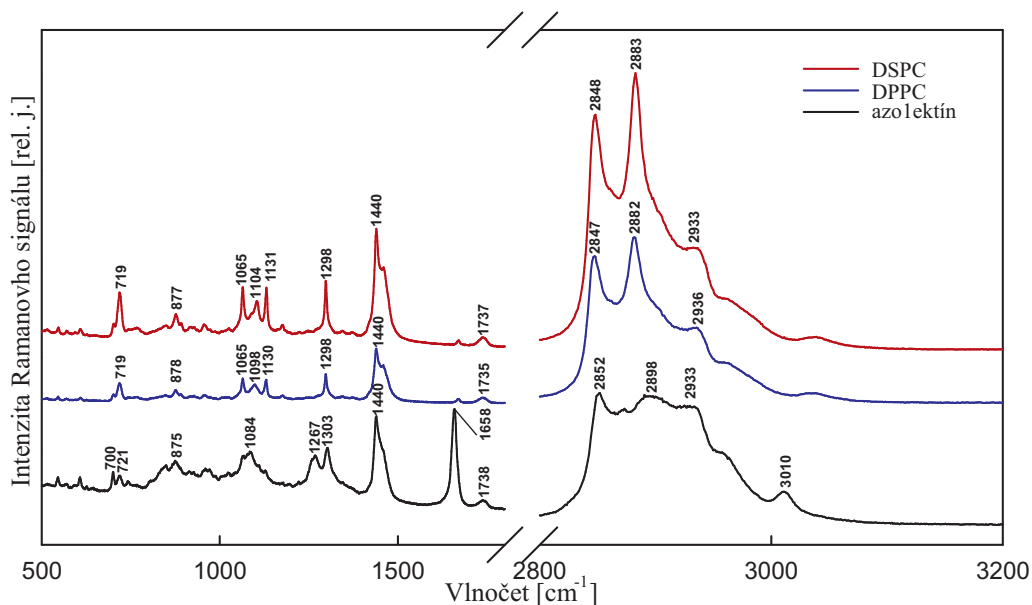
(b) Spektrálna mapa

Obr. 3.23: Mapa kvapky azolektínu s 10% cholesterolu

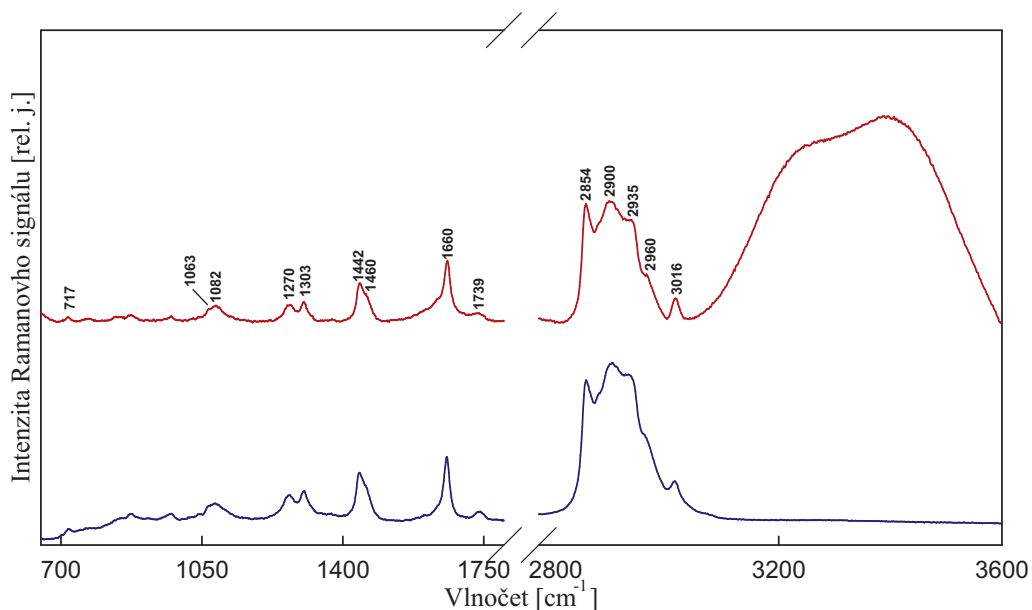
krúžku, i keď s miernymi nerovnosťami.

Prejavy v spektre DSPC boli rovnaké ako v prípade DPPC. V oboch prípadoch sa zachovával pomer intenzít pásov v oblasti 2800–3000 cm^{-1} a nedochádzalo k žiadnym výrazným zmenám v ich spektrách, viď obrázok 3.24.

V prípade azolektínu sa pomery pásov tiež zachovávajú, ale v spektrách nie sú pozorovateľné zmeny, ktoré by boli dôsledkom prítomnosti cholesterolu viď obrázok 3.25 (výsledky prevzaté z [5]). Azolektín je pri izbovej teplote v tekuto-kryštalickej fáze na rozdiel od DPPC a DSPC, ktoré sú v gelovej fáze a preto sa pravdepodobne prítomnosť cholesterolu neprejaví zmenami na reťazci lipidov u azolektínu.



Obr. 3.24: Ramanove spektrá rôznych lipidov s 10% cholesterolu



Obr. 3.25: Ramanove spektrá azolektínu merané metódou DCDR (modré) a zo suspenzie (červené) [5]

Záver

Pomocou metódy DCDR sme skúmali prejavy cholesterolu v prevažne fosfolipidových lipozómoch. V druhej časti tejto práce sme testovali rôzne hydrofóbne povrchy, ktoré by boli vhodné na využitie pri meraní touto metódou.

Ukázalo sa, že prítomnosť cholesterolu v membránach nespôsobuje výraznú zmenu štruktúry, akou by bola napríklad zmena fázy membrány. Tá sa zachovávala, hoci boli pozorované mierne zmeny pomerných intenzít spektrálnych pásov charakterizujúcich zmeny na uhľovodíkovom reťazci lipidového chvostíku. Prejavy cholesterolu boli rovnaké v suspenzii ako aj v nanosenej kvapke po vyschnutí. Vyššia koncentrácia cholesterolu však spôsobovala zmeny v tvorbe krúžkov. V prípade 20% príspevku cholesterolu už nedochádzalo k presunu väčšiny materiálu od centra ku okraju. Opakovane sme pozorovali, že dochádzalo k vytváraniu malých lokálnych zhlukov lipidu a cholesterolu o vysokej koncentrácii, ktoré boli rovnomerne rozmiestnené po povrchu vyschnutej kvapky.

Zo skúmaných povrchov sa ako vhodné na meranie metódou DCDR ukázalo leštené sklíčko fluoridu vápenatého a kremeňa. V oboch prípadoch dochádzalo k vytvoreniu symetrických homogénnych krúžkov, pričom sme nepozorovali žiadne spektrálne pásy, ktoré by neprislúchali použitému lipidu. Kremenné sklo však vykazovalo nízku hydrofóbnosť, čo malo za následok príliš široký krúžok s nízkym profilom. Ako najvhodnejšie z hľadiska intenzity signálu je sklíčko CaF_2 .

Výsledky tejto práce bude možné využiť pri ďalšom štúdiu, ktoré by spočívalo v pozorovaní interakcií lipozómov s inými látkami ako napríklad porfyrínmi, nukleovými kyselinami alebo proteínmi.

Zoznam použitej literatúry

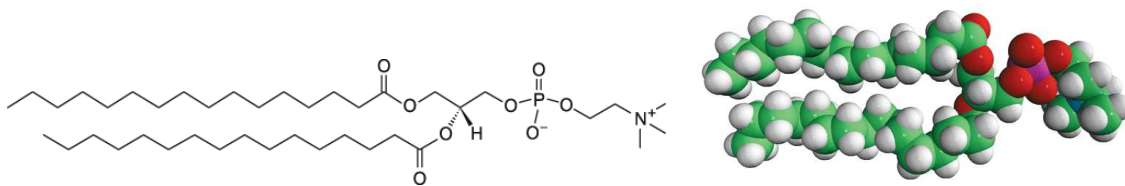
- [1] CAMPBELL, N.A., REECE, J.B. *Biologie*. Preložila Hana Moravcová et al. Brno: Computer Press, 2006. Kapitola 8, strany 141–142. ISBN 80-251-1178-4.
- [2] NEW, R.R.C. *Liposomes: A Pratical Approach*. New York: Oxford University Press, 1990. ISBN 0-19-963077-1.
- [3] CAREY, P.R. *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. New York: Academic Press, 1982. Kapitola 2. ISBN 0-12-159650-8.
- [4] LARMOUR, I.A., GRAY, J.P.E.D., BELL, S.E.J. Universal Raman enhancement by solvent removal. *Spectrosc. Eur.*, 2009, **21**, 6–9.
- [5] KOČIŠOVÁ, E., PROCHÁZKA, M. Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes. *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **42**, 1606–1610.
- [6] DEEGAN, R.D., BAKAJIN, O., DUPOND, T.F., HUBER, G., NAGEL, S.R., WITTEN, T.A. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 1997, **389**, 827–829.
- [7] HU, H., LARSON, R.G. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 7090–7094.
- [8] PALACKÝ, J. *Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů - potenciálních chemoterapeutik*. Praha: Univerzita Karlova. Matematicko-Fyzikální fakulta. Fyzikální ústav Univerzity Karlovy, 2005. 95s. Vedúci diplomovej práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
- [9] *Katalóg produktov firmy Avanti® Polar Lipids, Inc.* [databáza online]. Dostupné z URL <http://www.avantilipids.com> [cit. 2.7.2012].
- [10] MACDONALD, R.C., MACDONALD, R.I., Menco, B.Ph.M., TAKESHITA, K., SUBBARAO, N.K., HU, L. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1991, **1061**, 297–303.
- [11] *Katalóg produktov firmy Sigma-Aldrich® Co. LLC.* [databáza online]. Dostupné z URL <http://www.sigmaaldrich.com/catalog> [cit. 14.7.2012].
- [12] ŠÍPOVÁ, H. *Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanostrukturách*. Praha: Univerzita Karlova. Matematicko-Fyzikální fakulta. Fyzikální ústav Univerzity Karlovy, 2006. 34s. Vedúci diplomovej práce: RNDr. Marek Procházka, PhD.
- [13] HAWI, S.R., NITHIPATIKOM, K., WOHLFEIL, E.R., ADAR, F., CAMPBELL, W.B. Raman microspectroscopy of intracellular cholesterol crystals in cultured bovine coronary artery endothelial cells. *J. Lipid Res.*, 1997, **38**, 1591–1597.

- [14] LEVIN, I.W. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, Vol. 11*. Ed. Clark, R.J.H. and Hester, R.E. John Wiley & Sons Ltd, 1984. Kapitola 1. ISBN 0-47-126267-6.
- [15] VODÁKOVÁ, A. *Studium liposomů pomocí Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků*. Praha: Univerzita Karlova. Matematicko-Fyzikální fakulta. Fyzikální ústav Univerzity Karlovy, 2011. 38s. Vedúci diplomovej práce: RNDr. Eva Kočíšová, PhD.

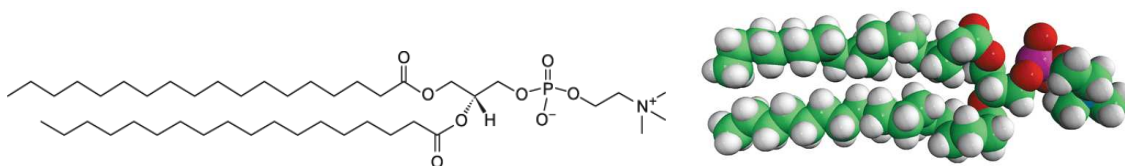
Zoznam použitých skratiek

DCDR	Ramanova spektroskopia kvapkovo nanášaných povlakov
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholín
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholín
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholín

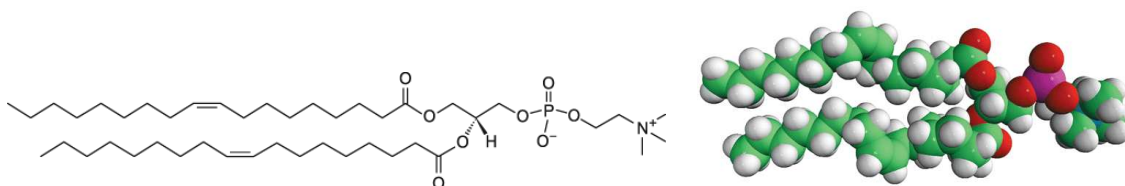
A. Chemické vzorce molekúl



Obr. A.1: Chemický vzorec (vľavo) a geometrické usporiadanie (vpravo) molekuly DPPC [9]



Obr. A.2: Chemický vzorec (vľavo) a geometrické usporiadanie (vpravo) molekuly DSPC [9]



Obr. A.3: Chemický vzorec (vľavo) a geometrické usporiadanie (vpravo) molekuly DOPC [9]



Obr. A.4: Chemický vzorec (vľavo) a geometrické usporiadanie (vpravo) molekuly cholesterolu [9]