



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Alexandra Suchá

**Studium liposomů pomocí Ramanovy
spektroskopie kapkově nanášených
povlaků**

Fyzikální ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: FP

Praha 2024

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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 má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Za podporu a ochotu pri vedení bakalárskej práce ďakujem vedúcej práce RNDr. Eve Kočišovej, Ph.D., ktorá ma zoznámila s danou problematikou a s trpezlivosťou prijímala moje nové nápady. Ďakujem doc. RNDr. Ondřejovi Kyliánovi, Ph.D., za sprístupnenie aparatury na Katedre makromolekulárnej fyziky na meranie kontaktných uhlov a ochotu dozerat na mňa pri meraniach. Za pomoc pri kvapkaní prvých kvapiek, prvých spracovaniach spektier a cenné rady ďakujem Mgr. Alžbete Kuižovej. Tiež ďakujem Marekovi Talířovi, s ktorým som mohla preberat harmonický oscilátor pri hocijakej príležitosti a vždy mi bol ochotný poradiť, aký typ grafu je najlepší, keď som bola nerozhodná. Ďakujem Mgr. Jane Sušej za korektúry textu.

Název práce: Studium liposomů pomocí Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků

Autor: Alexandra Suchá

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D., Oddělení fyziky biomolekul, Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Metoda kapkově nanášených povlaků v Ramanově spektroskopii je založena na měření Ramanova spektra ze suchého depozitu zkoumaného vzorku, který se vytvoří vysušením kapky roztoku nebo suspenze kápnuté na pevný hydrofobní povrch. Vysušením kapky se látka zkoncentruje, což umožňuje dosáhnout vyšší detekční citlivosti oproti měření z roztoku. V této práci jsme zkoumali homogenní a nehomogenní suspenze liposomů v různých koncentracích z pěti typů jednosložkových lipidů a dvou přírodních lipidových extraktů. Kapku suspenze jsme kápli na komerčně dostupný hydrofobní substrát μ -RIMTM, změřili statický kontaktní úhel kapky a následně charakterizovali vytvořené depozity jejich plochou a šířkou obvodového prstence. Změřili jsme Ramanovo spektra z prstence a určili poměr intenzit spektrálních pásem odpovídajících natahovacím vibracím skupiny $-\text{CH}_2-$ (I_{2880}/I_{2850}), které charakterizují uspořádaní a fázi lipidů. Získané výsledky ukazují, že depozity z homogenních suspenzí se od depozitů z nehomogenních liší výskytem jasně definovaných okrajových prstenců, menší plochou depozitů a vyšší intenzitou spektrálních pásů v Ramanově spektru. Hodnoty statických kontaktních úhlů ukazují, s výjimkou lipidu DOPE, podobnou smáčivost vody a liposomových suspenzí s nízkou koncentrací zkoumaných v této práci. Mapy vytvořené z poměrů intenzit spektrálních pásů $\nu_s(\text{CH}_2)$ ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) a $\nu_a(\text{CH}_2)$ ($\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$) ukazují možné změny uspořádání lipidů a jejich fáze v suchých okrajových prstencích a větší rozsahy hodnot poměru I_{2880}/I_{2850} a parametru S_L dokazují, že okrajové kroužky nejsou uniformní.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků, depozit, fosfolipidy, liposomy.

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

Author: Alexandra Suchá

Institute: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Eva Kočiřová, Ph.D., Division of Biomolecular Physics, Institute of Physics of Charles University

Abstract: The method of drop coating deposition in Raman spectroscopy is based on the measurement of Raman spectra from a dried deposit of the studied sample, which is formed by drying a drop of a solution or suspension deposited on a solid hydrophobic surface. By drying the drop, the substance is pre-concentrated which achieves a higher detection sensitivity compared to the measurement of Raman spectra from a solution. In this work, we studied homogeneous and non-homogeneous suspensions of liposomes in different concentrations from five types of single-component lipids and two natural lipid extracts. We deposited a drop of the suspension onto a commercially available hydrophobic substrate μ -RIMTM, measured the droplet static contact angle and characterized the formed deposits by their area and the width of their edge rings. We measured the Raman spectra from the ring and determined the ratio of the intensities of the selected spectral bands corresponding to the stretching vibrations of the group -CH₂- (I_{2880}/I_{2850}), which characterize the order and phase of the lipid. The obtained results show that deposits from homogeneous suspensions differ from inhomogeneous suspensions by the presence of clearly defined edge rings, a smaller area of the deposit and by a higher intensity of spectral bands in the Raman spectra. The values of static contact angles indicate, except for the DOPE lipid, similar wettability of water and liposome suspensions in the range of low concentrations studied here. The maps created from the ratios of the intensities of the spectral bands $\nu_s(\text{CH}_2)$ ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) and $\nu_a(\text{CH}_2)$ ($\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$) indicate possible changes in the arrangement of lipids and the phase in the dried edge rings. Larger ranges of values of the I_{2880}/I_{2850} ratio and the S_L parameter prove that the edge rings are not uniform.

Keywords: Drop coating deposition Raman spectroscopy, deposit, phospholipids, liposomes.

Obsah

Úvod	3
1 Teória	4
1.1 Ramanova spektroskopia	4
1.1.1 Ramanov rozptyl	4
1.1.2 Vibrácie molekúl	5
1.1.3 Druhy a príklady vibrácií molekúl	7
1.2 Zasychanie kvapiek a metóda kvapkovo nanášaných povlakov	9
1.2.1 Zasychanie kvapky a efekt kávového krúžku	11
1.2.2 Cheerios efekt a elipsoidálny tvar častíc	13
1.2.3 Marangoniho efekt	14
1.2.4 Veľkosť a náboj častíc v kvapaline	14
1.3 Fosfolipidy a ich agregáty	15
1.3.1 Fosfatidylcholíny, fosfatidyletanolamíny a fosfatidylseríny	17
1.3.2 Polymorfizmus a fázy lipidov	19
1.3.3 Agregáty fosfolipidov: lamelárne agregáty, micely a lipozómy	21
1.3.4 Využitie lipozómov	23
2 Experimentálna časť	26
2.1 Použité vzorky a ich príprava	26
2.1.1 Príprava suspenzie lipozómov	30
2.1.2 Príprava depozitu pre Ramanovu spektroskopiu	31
2.2 Aparatúra na meranie Ramanových spektier	32
2.3 Aparatúra na meranie kontaktných uhlov	33
2.4 Metodika charakterizácie depozitu vzorky	35
2.4.1 Plocha depozitu	35
2.4.2 Šírka obvodového prstenca	36
2.4.3 Statické kontaktné uhly	36
2.4.4 Faktorová analýza	37
2.4.5 Metóda ortogonálnych diferencií	38
2.4.6 Ramanove spektrum lipidov	38
2.4.7 Pomer intenzít spektrálnych pásov z Ramanových spektier a parameter usporiadania pre laterálne interakcie	38

3	Výsledky	41
3.1	Šírka obvodového prstenca, plocha a vizuálna charakteristika depozitu	41
3.1.1	Obvodový prstenec	50
3.1.2	Plocha depozitu	52
3.1.3	Vizuálna charakteristika depozitov	52
3.2	Statické kontaktné uhly	55
3.3	Charakterizácia Ramanových spektier	57
3.3.1	Spektrálny interval 700 až 1800 cm^{-1}	58
3.3.2	Spektrálny interval 2500 až 3100 cm^{-1}	61
3.4	Mapy Ramanových spektier, pomer intenzít a parameter laterálneho usporiadania	64
3.4.1	Mapy Ramanových spektier	65
3.4.2	Pomer intenzít	65
3.4.3	Závislosť pomeru intenzít na teplote fázového prechodu lipidových suspenzií	75
3.4.4	Rozsah pomeru intenzít	76
3.4.5	Parameter laterálneho usporiadania	77
	Záver	81
	Literatúra	84
	Zoznam obrázkov	90
	Zoznam tabuliek	96
	Zoznam použitých skratiek	97

Úvod

Ramanova spektroskopia je spolu s infračervenou spektroskopiou vibračnou molekulovou spektroskopiou, ktoré nám umožňujú študovať prechody medzi vibračnými energetickými hladinami molekuly. Ramanova spektroskopia sa vyznačuje neinvazívnosťou a využíva sa na kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu organických a anorganických látok v rôznych odvetviach ako je potravinárstvo, geológia a fyzika pevných látok, v priemysle pri výrobe nanomateriálov a fotovoltaike, farmaceutikom priemysle, v chémii, medicíne, biológii a tiež na skúmanie pravosti umeleckých diel a historických predmetov.

Metóda kvapkovo nanášaných povlakov (DCDR, *Drop Coating Deposition Raman*) v Ramanovej spektroskopii prináša výhodu získania vyššieho signálu Ramanovho spektra v prípade, ak máme k dispozícii iba malé množstvo vzorky s nízkou koncentráciou. Princíp spočíva v kvapnutí suspenzie alebo roztoku vzorky na substrát, ktorý má vhodné vlastnosti. Po zaschnutí kvapky sa vytvorí depozit, v ktorom sa látka zo suspenzie alebo z roztoku skoncentruje do určitých oblastí ako je napr. obvodový prstenec. Z týchto koncentrovaných oblastí je potom možné získať Ramanove spektrá s vyššou intenzitou ako zo suspenzie alebo roztoku a zároveň v spektre nie sú viditeľné spektrálne pásy z rozpúšťadla, ktoré môžu byť u niektorých skúmaných látok nežiadúce.

Táto práca sa zaoberá charakteristikou depozitov suspenzií lipozómov vytvorených z fosfolipidov na komerčne dostupnom substráte μ -RIMTM. Skúmajú sa parametre ako je statický kontaktný uhol kvapky, plocha zaschnutého depozitu, šírka obvodového prstenca, porovnanie Ramanových spektier z obvodového prstenca a porovnanie pomeru intenzít vybraných spektrálnych pásov k charakterizácii fázy lipidu vo vyschnutom depozite. Tento výber sa sústredil predovšetkým na pásy 2850 cm^{-1} a 2880 cm^{-1} , ktoré prislúchajú metylénovým valenčným symetrickým (2850 cm^{-1}) a antisymetrickým (2880 cm^{-1}) vibráciám a ich pomer je vhodným parametrom na popis usporiadania lipidového agregátu a zároveň aj určenia fázy lipidu.

Sústredili sme sa na porovnanie parametrov depozitov z rôznych koncentrácií homogénnej unilamelárnej suspenzie lipozómov a ich porovnanie s nehomogénnou multilamelárnou lipozómovou suspenziou.

V tejto práci boli lipozómy pripravené z jednozložkových fosfolipidov zo skupiny fosfadylocholínov, fosfatidyletanolamínov a fosfatidylserínov a taktiež z prírodných zmesí fosfolipidov (výťažok z vaječného žĺtka a výťažok zo sójových bôbov). Študovali sme vyššie zmienené parametre a sledovali vplyv polárnej skupiny, dĺžky a saturácie reťazca, veľkosti a náboja lipidovej molekuly a prítomnosti jedného alebo viacerých druhov fosfolipidov.

1. Teória

1.1 Ramanova spektroskopia

1.1.1 Ramanov rozptyl

Atómy majú energetické elektrónové stavy diskkrétne kvantované. Ak sa molekula skladá z viacerých atómov, jej jednotlivé atómy sa môžu voči sebe pohybovať, čo ovplyvňuje rozloženie elektrónovej hustoty a z toho vyplývajúce energie elektrónových stavov. Na rozdiel od atómu má molekula viac stupňov voľnosti a ak prijme energiu, môže ju previesť do rotačného pohybu celej molekuly alebo do vibračného pohybu svojich atómov voči sebe navzájom. V Ramanovej a infračervenej spektroskopii sa sledujú vibračné pohyby, ktorých energetický rozdiel hladín je väčší ako pri rotačných pohyboch.

Prechod medzi vibračnými stavmi umožňujú pozorovať viaceré javy, nakoľko fotóny môžu byť molekulou buď absorbované alebo rozptýlené. Infračervená absorpcia je jav, pri ktorom sa absorbuje fotón a molekula sa dostane do vyššieho vibračného stavu. Rozptyl na časticách oveľa menších ako je vlnová dĺžka žiarenia môže nastať elasticky (Rayleighov rozptyl) alebo neelasticky (Ramanov rozptyl).

Pri **Rayleighovom rozptyle** nedochádza k výmene energie medzi dopadajúcim žiarením a molekulou, energia a frekvencia dopadajúceho (*incident*) fotónu ν_i a rozptýleného (*scattered*) fotónu ν_s sa nezmení $\nu_i = \nu_s$.

Pri **Ramanovom rozptyle** dochádza k výmene energie medzi dopadajúcim žiarením a molekulou. To znamená, že rozptýlený fotón mení svoju frekvenciu vzhľadom k frekvencii dopadajúceho fotónu $\nu_i \neq \nu_s$. Ramanov rozptyl sa delí na dve vetvy podľa toho, že či $h\nu_i < h\nu_s$ alebo $h\nu_i > h\nu_s$.

Ak je energia základného vibračného stavu E_1 ($v = 1$) a energia excitovaného vibračného stavu E_2 , rozptýlený fotón s frekvenciou ν_s spĺňa zákon zachovania energie [1]

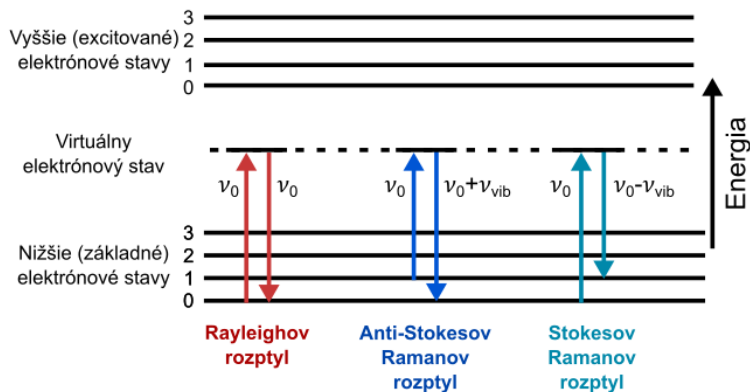
$$h\nu_s = h\nu_i \pm (E_2 - E_1). \quad (1.1)$$

Stokesov Ramanov, Anti-Stokesov Ramanov a Rayleighov rozptyl sa zobrazujú v Jablonského energetickom diagrame (Obr.1.1).

Ak dopadajúci fotón odovzdá energiu molekule, platí $h\nu_s = h\nu_i - h\nu_{vib}$. Rozptýlený fotón má väčšiu vlnovú dĺžku ako dopadajúci, dochádza k **Stokesovmu Ramanovmu rozptylu** (často označovaný len ako Ramanov rozptyl). Molekula sa dostane do vibračného stavu energeticky vyššieho ako bol jej pôvodný.

Ak dopadajúci fotón prijme energiu od molekuly, platí $h\nu_s = h\nu_i + h\nu_{vib}$. Rozptýlený fotón má menšiu vlnovú dĺžku ako dopadajúci a dochádza k **Anti-Stokesovmu Ramanovmu rozptylu**. Molekula sa dostáva do vibračného stavu

energeticky nižšieho ako bol jej pôvodný. Tento typ rozptylu je menej pravdepodobný než Stokesov.

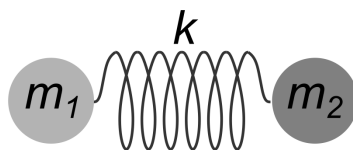


Obr. 1.1: Jablonského diagram pre Rayleighov, Ramanov Anti-Stokesov a Ramanov Stokesov rozptyl. Podľa práce Careyho [2].

V klasickej fyzike sú spektrálne pásy prislúchajúce Stokesovmu a Anti-Stokesovmu rozptylu rovnako intenzívne. V kvantovom prístupe z Boltzmanovho rozdelenia vieme, že pravdepodobnosť obsadenia hladiny je úmerná $e^{-k_B T}$ a teda vibračné hladiny sú rôzne populované, čiže aj intenzita pásov Stokesovho a Anti-Stokesovho rozptylu je rozdielna. Pri izbovej teplote je populácia základnej hladiny tisíckrát väčšia ako populácia prvej vibračnej hladiny, preto Stokesove spektrálne pásy sú intenzívnejšie a v Ramanovej spektroskopii sa používajú oveľa častejšie [1, 2].

1.1.2 Vibrácie molekúl

Model dvojatómovej molekuly ako lineárneho harmonického oscilátora, môžeme riešiť okrem kvantového prístupu aj klasicky ako dva atómy s hmotnosťami m_1 a m_2 spojené nehmotnou pružinou s tuhosťou (konštantou pružnosti) k (Obr.1.2).



Obr. 1.2: Lineárny harmonický oscilátor.

Harmonický oscilátor spĺňa Hookeov zákon

$$F = -k x, \tag{1.2}$$

pričom F je sila vynucujúca kmity a x je výchylka z rovnováhy. Harmonický oscilátor tiež spĺňa 2. Newtonov zákon (Zákon sily)

$$F = m \frac{d^2x}{dt^2}, \quad (1.3)$$

v ktorom je m redukovaná hmotnosť daná ako

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}, \quad (1.4)$$

kde m_1 a m_2 sú hmotnosti atómov. Z rovníc (1.2) a (1.3) získame diferenciálnu rovnicu pre výchylku

$$-k x = m \frac{d^2x}{dt^2}, \quad (1.5)$$

ktorej riešením je [1]

$$x = x_0 \cos(2\pi\nu t + \varphi). \quad (1.6)$$

V (1.6) je x_0 počiatočná výchylka, ν frekvencia a φ fázový uhol. Ak dosadíme toto riešenie do (1.5), získame vzťah pre frekvenciu

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}. \quad (1.7)$$

Vidíme, že vibrácia závisí nepriamo úmerne na redukovanej hmotnosti, takže ťažšie funkčné skupiny v molekule vibrujú na nižších frekvenciách ako ľahšie molekuly. V Ramanovej spektroskopii sa vibrácie nemerajú v hertzoch (Hz) alebo s^{-1} , používajú sa vlnočty označované ako $\tilde{\nu}$ alebo $\Delta\tilde{\nu}_R$ dané ako [1]

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}, \quad (1.8)$$

kde c je rýchlosť svetla a λ vlnová dĺžka. Vlnočet, nazývaný aj Ramanov posun (*Raman shift*) alebo vlnové číslo, sa udáva v cm^{-1} . V Ramanovom spektre, kde je vynešená závislosť intenzity signálu Ramanovho rozptylu v relatívnych jednotkách na vlnočte, má vlnočet význam absolútnej hodnoty rozdielu energií dopadajúceho a rozptýleného žiarenia ($E = h\nu = hc/\lambda$).

Ak klasické riešenie pre dvojatómovú molekulu chceme zovšeobecniť pre N atómovú molekulu, zavedieme systém N hmotných bodov navzájom pospájaný nehmotnými pružinami - sústavu harmonických oscilátorov. Keďže túto sústavu riešime v kartézskych súradniciach, dostaneme $3N$ diferenciálnych rovníc podobných (1.5) a $3N$ partikulárnych riešení (tzv. normálnych kmitov) charakterizovaných ν_i , kde $i = 1 \cdots 3N$. Súradnice odpovedajúce normálnym kmitom sa nazývajú normálne súradnice.

Medzi $3N$ riešeniami je 6 (pri lineárnych molekulách 5) riešení, ktoré odpovedajú trom translačným pohybom celej molekuly v smere osi x , y a z a trom (resp. dvom) rotačným pohybom celej molekuly v priestore. Tieto riešenia majú $\nu_i = 0$ a pri štúdiu vibrácií molekúl sa k nim neprihliada [3]. Pre vibrácie teda ostáva $3N - 6$ (pri lineárnych molekulách $3N - 5$) vibračných stupňov voľnosti, čo je aj počet normálnych módov molekuly [1].

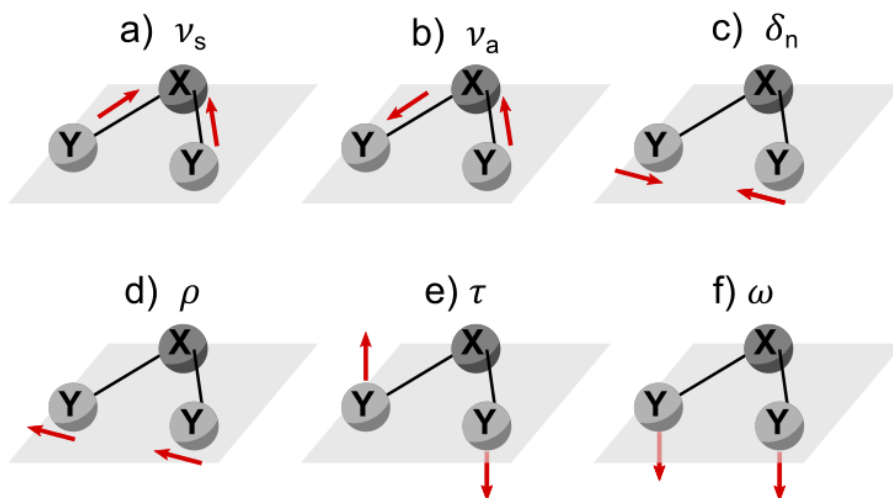
1.1.3 Druhy a príklady vibrácií molekúl

Vibrácie molekúl delíme na deformačné (*bending*, δ) a valenčné (*stretching*, ν). Pri deformačných vibráciách sa mení uhol medzi atómami v molekule a pri valenčných sa mení dĺžka väzby medzi atómami.

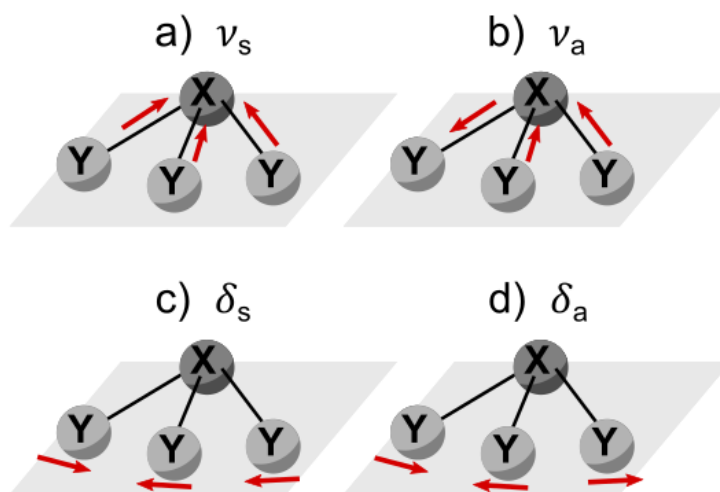
Valenčné vibrácie delíme na symetrické valenčné (ν_s , Obr.1.3a) a antisymetrické valenčné (ν_a , Obr.1.3b).

Deformačné vibrácie sa delia na rovinné (δ) a nerovinné (π). Pri trojatómových molekulách sa rovinné vibrácie ešte delia na **nožnicové** (*scissoring*, δ , Obr.1.3c) a **kyvadlové** (*rocking*, ρ , Obr.1.3d). Pri nožnicových vibráciách atómy kmitajú proti sebe v protifáze a pri kyvadlových vo fáze jedným smerom. V tejto práci budeme nožnicové vibrácie označovať ako δ_n , aby sme ich odlišili od všeobecnejších deformačných δ . Pri štvoratómových molekulách je delenie deformačných rovinných vibrácií len na **symetrické deformačné** δ_s a **antisymetrické deformačné** δ_a (Obr.1.4). Nerovinné deformačné pri trojatómových molekulách poznáme **vejárové** (*wagging*, ω , Obr.1.3e) a **krútiace alebo torzné** (*twisting*, τ , Obr.1.3f). Pri torzných a vejárových sa mení dihedrálny uhol v molekule. Pri torzných vibráciách atómy kmitajú rôznymi smermi kolmo na rovinu molekuly a pri vejárových, podobne ako vejár v ruke, rovnakým smerom kolmo na rovinu molekuly. V aromatických jadrách sa deformačné vejárové vibrácie nazývajú **dáždnikové**, pretože pripomínajú otváranie a zatváranie dáždnika [4].

V Ramanovom spektre sú aktívne len vibrácie, pri ktorých sa mení polarizácia molekuly. V infračervenej spektroskopii, komplementárnej technike k Ramanovej spektroskopii, sú naopak aktívne tie vibrácie, kde sa polarizácia molekuly nemení.



Obr. 1.3: Vibrácie trojatómovej lomenej molekuly XY_2 alebo funkčnej skupiny $-XY_2$, ktoré delíme na: a) valenčné symetrické ν_s , b) valenčné antisymetrické ν_a , c) nožnicové δ_n , d) kyvadlové ρ , e) krútiace (torzné) τ , f) vejárové ω . Prevzaté a upravené podľa práce Milatu a kol. [4].



Obr. 1.4: Vibrácie štvoratómovej molekuly XY_3 alebo funkčnej skupiny $-XY_3$, ktoré delíme na: a) valenčné symetrické ν_s , b) valenčné antisymetrické ν_a , c) deformačné rovinné symetrické δ_s , d) deformačné rovinné antisymetrické δ_a . Prevzaté a upravené podľa práce Milatu a kol. [4].

1.2 Zasychanie kvapiek a metóda kvapkovo nanášaných povlakov

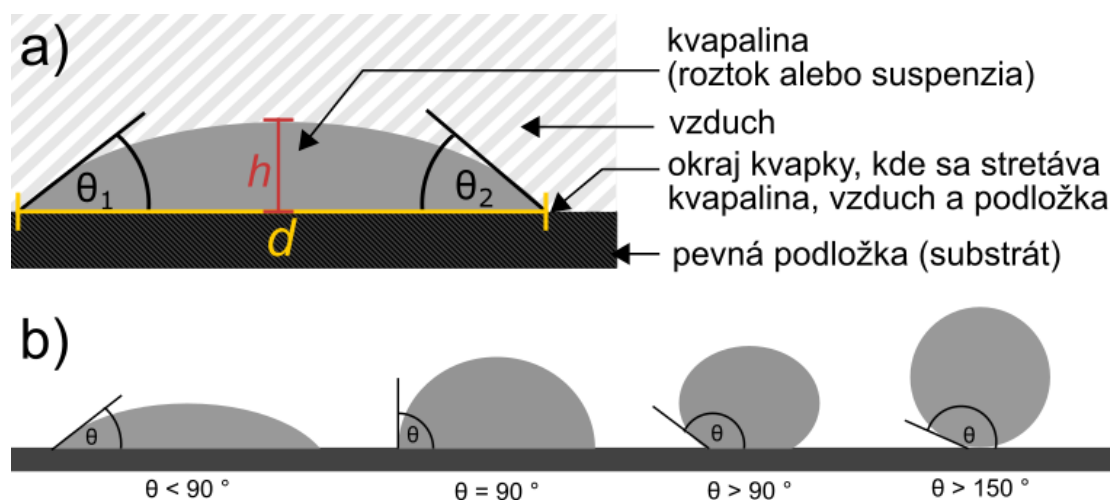
K Ramanovmu neelastickému rozptylu fotónu na molekulách dochádza zriedkavo oproti početnosti Rayleighovho elastického rozptylu: Ramanovsky rozptýlený je jeden fotón z $10^6 - 10^8$ [5], a preto získaný Ramanov signál z roztokov a suspenzií býva veľmi nízky. Zvýšenie intenzity tohoto signálu sa dá dosiahnuť pomocou uschnutia kvapky na hydrofóbnom a super-hydrofóbnom povrchu (Obr. 1.5b). Ak kvapka s objemom $2 \mu\text{l}$ a polomerom $1,56 \text{ mm}$ zmenší svoj polomer na $10 \mu\text{m}$, jej koncentrácia a aj intenzita získaného signálu sa zvýši 3×10^6 -krát [5]. Toto meranie Ramanových spektier zo zaschnutých depozitov, v ktorých sa skoncentruje rozpustená látka, sa nazýva metóda kvapkovo nanášaných povlakov (*Drop-Coating Deposition Raman*, DCDR).

Metóda kvapkovo nanášaných povlakov spočíva v kvapnutí kvapky s objemom 1 až $10 \mu\text{l}$ na pevný povrch (substrát), na ktorom kvapka vysychá a vytvorí depozit. Pri tomto zasychaní dochádza ku koncentrovaniu látky do určitých oblastí, z ktorých potom meriame Ramanovo spektrum.

Je to metóda vhodná pre roztoky a suspenzie s nízkou koncentráciou rozpustenej (rozptýlenej) látky: optimálna koncentrácia napr. pre suspenzie lipidov je okolo $0,3 \text{ mg/ml}$ [6], ale Ramanove spektrá sa dajú získať aj z mikromolárnych koncentrácií napr. proteínových suspenzií uvedených v práci Zhanga a kol. [7]. Použitie takéhoto malého objemu a nízkej koncentrácie je výhodou pri skúmaní látok, ktoré sa vyskytujú v malých množstvách ako sú napríklad kontaminanty v potravinách alebo životnom prostredí [8], biomolekuly a biologicky významné molekuly ako aminokyseliny, peptidy, proteíny, nukleové kyseliny, lipidy a ďalšie [9, 10]. Veľkou výhodou je, že viaceré biomolekuly, ako napríklad proteíny [7] alebo lipidy [6], si aj po zaschnutí uchováajú svoju štruktúru a fázu, akú ju mali v suspenzii či roztoku.

Vzhľad a formu depozitu ovplyvňuje viacero faktorov: chemické zloženie, koncentrácia, veľkosť a náboj molekúl alebo častíc [9] a tiež tvar častíc.

Niektoré rozpustené látky vďaka tomu vytvárajú v depozite typické vzory ako obvodový prstenec, praskliny, oblúkovité útvary, periodické pruhy alebo sústredné prstence, vzory pripomínajúce futbalovú loptu, dendrické vzory podobajúce sa konárom stromov, materiál sa môže hromadiť v zhlukoch alebo kryštáloch [12]. Zasychanie kvapky a tvorbu depozitu ovplyvňujú viaceré fyzikálne javy ako Marangoniho efekt a Cheerios efekt. Okrem vlastností roztoku alebo suspenzie ovplyvňujú výsledný depozit aj vlastnosti substrátu, na ktorom kvapka zasychá a fyzikálne podmienky okolitého prostredia.



Obr. 1.5: a) Kontaktné uhly θ_1 a θ_2 pri pohľade z boku na kvapku s výškou h a kontaktnou líniou (priemerom kvapky) d . b) Delenie pevných povrchov (substrátov) podľa kontaktného uhla: super-hydrofilné ($\theta \approx 0^\circ$), hydrofilné ($\theta < 90^\circ$), hydrofóbne ($\theta > 90^\circ$), super-hydrofóbne ($\theta > 150^\circ$). Prevzaté a upravené podľa práce Larmoura a kol. [5] a Adamsona a Gasta [11].

Vlastnosti substrátu majú veľký vplyv na formovanie zasychajúceho depozitu. Substrát vhodný na DCDR spektroskopiu by mal spĺňať nasledujúce vlastnosti [7]:

1. Substrát má nízku optickú absorpciu.
2. Substrát má vysokú optickú odrazivosť.
3. Substrát má slabý Ramanov signál v oblasti vlnočtov skúmanej vzorky.
4. Substrát je solvofóbny, má malú zmáčavosť voči rozpúšťadlu.

Vysoká optická odrazivosť a nízka optická absorpcia substrátu napomáhajú k zvýšeniu intenzity signálu.

Veľmi dôležitým parametrom je zmáčavosť, ktorú definujeme pomocou statického kontaktného uhla. Statický kontaktný uhol θ je priemerom pravého θ_1 a ľavého θ_2 uhla medzi rozhraním substrát-rozpúšťadlo a rozhraním rozpúšťadlo-vzduch (Obr.1.5a):

$$\theta = \frac{\theta_1 + \theta_2}{2}. \quad (1.9)$$

Najčastejšie používaným rozpúšťadlom je voda [9], a preto povrchy podľa zmáčavosti voči nej delíme na super-hydrofilné, hydrofilné, hydrofóbne a super-hydrofóbne,

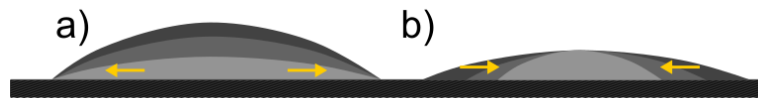
pričom kontaktný uhol $\theta = 90^\circ$ je medzná hodnota medzi hydrofilným a hydrofóbnym povrchom (Obr.1.5b). Super-hydrofóbne povrchy majú kontaktný uhol väčší ako $\theta > 150^\circ$ [5] a super-hydrofilné majú $\theta \approx 0^\circ$.

Väčší kontaktný uhol, menšia zmáčavosť a teda väčšia hydrofóbnosť povrchu umožňujú koncentrovanie vzorky do depozitu menších rozmerov, z ktorého môžeme získať intenzívnejšie Ramanove spektrum.

Substráty používané na DCDR spektroskopiu sú najčastejšie z leštenej nehrzdavejúcej ocele s hydrofóbnou flourokarbonátovou vrstvou na povrchu [9]. Okrem toho sa používajú substráty s povrchom tvoreným nanočasticami medi alebo striebra, leštené pláty fluoridu vápenatého, skla, kremeňa, zlata, hliníka a ďalších odrazivých materiálov, pokrytých tenkou hydrofóbnou vrstvou [9].

1.2.1 Zasychanie kvapky a efekt kávového krúžku

Zasychanie kvapky na rovnom pevnom povrchu je zložitý a komplexný proces ovplyvnený mnohými parametrami. Všeobecne je popísaný modelom, ktorý vychádza z popisu zasychania kvapky s počiatočným kontaktným uhlom $\theta < 90^\circ$, a vďaka prúdom v jej vnútri sa delí do dvoch fáz. Prvá fáza, ktorá tvorí 90 - 95 % času schnutia [13], spočíva v znižujúcom sa kontaktnom uhle a výške kvapky h , pričom kontaktná línia rozpúšťadlo-substrát d je zafixovaná (Obr.1.6a). Až výška h a kontaktný uhol θ dosiahnu kritické hodnoty, tak sa začne druhá fáza: znižuje sa priemer kvapky pri nemennom malom kontaktnom uhle θ_C (Obr.1.6b) [13]. Pre vodu na sklenenom povrchu je kritická hodnota kontaktného uhla priemerne $\theta_C = 2 - 4^\circ$ [13].



Obr. 1.6: *a)* Schnutie kvapky po kvapnutí pri zafixovanej kontaktnej línii rozpúšťadlo-substrát. *b)* Schnutie kvapky na konci procesu vysychania pri konštantnom kontaktnom uhle.

Jedným z častých foriem vzniknutých depozitov je vytváranie obvodového prstenca, v ktorom sa zhromaždí väčšina materiálu kvapky. Označuje sa ako depozit s tzv. efektom kávového krúžku, ktorý nesie svoje meno po zaschnutej rozliatej káve, kde je dobre pozorovateľný vyformovaný obvodový prstenec. Podmienky vyformovania prstenca sú:

1. Rozpúšťadlo má s povrchom nenulový kontaktný uhol θ . Častice sa prichycujú na povrchu [14].

2. Kontaktná línia medzi povrchom a rozpúšťadlom nezmení svoju pozíciu počas celého procesu zasychania kvapky. Kvapka počas zasychania a po zaschnutí nezmení svoj polomer [14].
3. Rozpúšťadlo sa vyparuje z okraja kvapky, z rozhrania rozpúšťadlo-vzduch [14].
4. Je potrebné, aby bol potlačený Marangoniho efekt, ktorý je výsledkom latentného tepla z vyparovania [15].
5. na konci vyparovania nemôže byť kontaktná línia posunutá dovnútra [12].
6. Koloid nemôže formovať zaseknutý stav (*jammed state*) v strede kvapky, ktorý zabraňuje jeho presunutiu na okraj [12].

Ak sa obvodový prstenec vyformuje, tak jeho šírku ovplyvňuje viacero faktorov [12, 14]:

- (a) koncentrácia látky v suspenzii,
- (b) typ rozpúšťadla,
- (c) viskozita,
- (d) chemické zloženie látky alebo častíc, ktorá je v suspenzii,
- (e) hydrofóbnosť substrátu,
- (f) teplota substrátu a okolia pri zasychaní kvapiek,
- (g) časový vývoj schnutia kvapky.

Tieto faktory nie sú na sebe nezávislé, navzájom sa ovplyvňujú a vytvárajú jedinečné podmienky na schnutie kvapky.

Všeobecne platí, že vyššia koncentrácia látky alebo častíc v rozpúšťadle spôsobí širší prstenec [14]. Taktiež závisí na type rozpúšťadla: pri niektorých kvapkách sú prúdy vnútri kvapky silnejšie ako pri iných a veľká viskozita kvapky môže zabrániť dosiahnutiu rovnovážneho stavu kvapky [14]. Zvýšenie viskozity, napr. pridaním polymérov do suspenzie, ovplyvní prúdenie v kvapke a teda aj tvar vyschnutého depozitu [16].

Tvorbu prstenca ovplyvňujú aj vlastnosti častíc ako ich tvar, veľkosť a náboj. Pri lipidoch je známe, že niektoré druhy alebo zmesi lipidov vytvárajú pri rovnakej koncentrácii rôzne široké prstence [9]. Oproti pevným polystyrénovým guľôčkam použitých v práci Deegana a kol. [14] a polymetylmetakrylátovým (PMMA) fluorescenčným časticiam v práci Hua a kol. [15], lipozómy vytvorené z lipidov môžu pri zasychaní meniť svoj tvar.

So zvyšujúcou sa hydrofóbnosťou substrátu majú zaschnuté depozity menší priemer a širší prstenec. Pre super-hydrofóbne povrchy (Obr.1.5b) môže efekt kávového krúžku úplne vymiznúť a látka sa skoncentruje skôr do stredu depozitu [5]. Vyššia hydrofóbnosť substrátu sa dá dosiahnuť napríklad naprášením nanočastíc na jeho povrch [17].

Pre hladké substráty so zvyšujúcou sa teplotou rastie priemer depozitu lipidov a klesá šírka prstenca. Pre nanodrsné substráty (napr. substrát so striebornými nanočasticami) sa vplyv teploty na depozit neprejaví [17]. Pri vyšších teplotách substrátu vznikajú vnútri kvapky plynové bubliny, ktoré ovplyvňujú prúdy v kvapke [16].

Kontaktná línia kvapky so substrátom počas vysychania môže byť narušená rôznymi faktormi: koncentráciou kvapaliny, veľkosťou častíc, iónovou väzbou, pridaním povrchovo aktívnych látok, chemickou a/alebo drsnou heterogenitou substrátu [16]. Vysoká koncentrácia častíc na konci schnutia pôsobí proti efektu kávového krúžku, kedy sa preruší kontaktná línia, suspenzia sa rozprestrie po celom dostupnom povrchu a častice sa neusadzujú len po obvode [15].

1.2.2 Cheerios efekt a elipsoidálny tvar častíc

Cheerios efekt (*Cheerios effect*) je pomenovaný po cereáliách, ktoré v miske s mliekom majú tendenciu spájať sa dokopy a zhromažďovať sa po obvode a v strede misky. Spočíva v tom, že pre malé častice vztlaková sila prevláda nad kapilárnym nasávaním [18].

Pri malých elipsoidálnych časticách (rádovo jednotky μm v práci Yunkera a kol. [19]) sa cheerios efekt prejavuje tým, že vztlakové sily dvíhajú častice na povrch kvapky. Elipsoidálne častice sa môžu dostať na okraj kvapky len vtedy, ak sú na hladine [19]. Ale ak sa tam dostanú, začnú na nich pôsobiť silné priečne kapilárne sily dlhého dosahu. Elipsoidálna častica deformuje rozhranie rozpušťačov vzduch tak, že na koncoch dlhších polosí sa hladina dvíha a na koncoch kratších polosí hladina klesá.

Kapilárne sily medzi elipsoidálnymi časticami vytvoria zhluky voľnejšie usporiadaných štruktúr na rozhraní vzduch-rozpušťač, ktoré bránia časticám dostať sa k okraju kvapky [19]. Týmto sa vytvorí depozit so zhlukmi materiálu po celej svojej ploche. Materiál sa nekonzcentruje ani po obvode, ako v prípade efektu kávového krúžku, ani v strede, kam ho obyčajne unášajú Marangoniho prúdy.

Už 0,015 % objemového zlomku elipsoidálnych častíc v suspenzii obsahujúcej guľovité častice dokáže potlačiť efekt kávového krúžku [19]. Pre suspenziu pozostávajúcu len z elipsoidálnych častíc sa efekt kávového krúžku nepotláča, lebo guľovitá častica nedeformuje hladinu tak ako elipsoidálna, a preto môže byť unášaná prúdmi v kvapke k okraju. Suspenzia pozostávajúca zo zmesi elipsoidálnych častíc (s priemerom $d = 1,3 \mu\text{m}$) a malých guľovitých častíc ($d = 0,7 \mu\text{m}$) tiež



Obr. 1.7: Počas vysychania sa v kvapke vytvoria Marangoniho prúdy (naznačené žltými prúdnicami). Podľa práce Hua a kol. [15].

vytvorí obvodový prstenec, ale suspenzia obsahujúca zmes elipsoidálnych častíc ($d = 1,3 \mu\text{m}$) a veľkých guľovitých častíc ($d = 5,0 \mu\text{m}$) potlačí efekt kávového krúžku [19].

1.2.3 Marangoniho efekt

Marangoniho efekt je prúdenie medzi rozhraním dvoch kvapalín vplyvom gradientu ich povrchových napätí. Kvapalina prúdi z oblasti s nižším povrchovým napätím do oblasti s vyšším povrchovým napätím. Pri zasychajúcich kvapkách sú Marangoniho prúdy spôsobené tým, že vyparovanie rozpúšťadla nerovnomerne ochladzuje kvapku: najnižšia teplota a najvyššie povrchové napätie je na povrchu vrchola kvapky. Tiež rozhranie rozpúšťadlo-vzduch (tj. povrch kvapky) má nižšiu teplotu ako vnútro kvapky. Tieto prúdy unášajú častice z okraja kvapky do jej stredu (Obr.1.7) a pôsobia proti efektu kávového krúžku.

Marangoniho efekt je pre vodu celkom slabý, pre organické rozpúšťadlá ako sú alkány je naopak tak silný, že úplne potlačí efekt kávového krúžku a vytvorí sa depozit s materiálom deponovaným v strede [15].

1.2.4 Veľkosť a náboj častíc v kvapaline

na efekt kávového krúžku má vplyv aj veľkosť častíc v suspenzii. Väčšie častice sa zo začiatku hýbu smerom k okraju kvapky, ale na konci schnutia je ich pohyb skôr do stredu depozitu. Čím je väčšia častica ďalej od stredu, tým rýchlejšie sa k stredu blíži na konci schnutia. Malé častice sa hýbu v kvapke jednoduchšie a počas celej doby vysychania smerujú k vonkajšiemu okraju [20].

Za tento jav sú zodpovedné kapilárne sily a pri zmesi rôznych veľkých častíc v suspenzii sa malé častice oddelia od veľkých: malé (jednotky μm) sa zhromaždia po obvode depozitu, veľké (desiatky μm) sa zhromaždia v strede depozitu. Pri zmesi častíc v desatinách μm a jednotkách μm sa dokonca vytvárajú niekoľkonásobné obvodové prstence: ak sa väčšie častice zhromaždia po obvode a ich spätný pohyb sa

zastaví prasklinou, tak sa vytvorí vnútri depozitu ďalší prstenec. Niekoľkonásobné prstence sa vytvárajú pri koloidných roztokoch a DNA kvapkách [20].

Rovnako ako veľkosť častíc, tak aj ich náboj ovplyvňuje tvorbu obvodového prstena na depozite. Avšak tento vplyv je vzhľadom ku Coulombickým silám menší a prejavuje sa len pri malej výške kvapky h , malom kontaktnom uhle a veľkých časticiach.

Záporne nabitú guľatú polystyrénovú časticu (s priemerom 860 nm) na záporne nabitom sklenenom substráte vytvorili prstenec s presne definovaným vnútorným aj vonkajším okrajom. Pri kladne nabitých guľatých polystyrénových časticiach (s priemerom 738 nm) na záporne nabitom sklenenom povrchu sa častice zhromaždili pri okraji depozitu, ale vnútorný okraj prstena nie je jasne definovaný [21]. Silné Coulombické sily medzi kladne nabitými guľôčkami a záporne nabitým substrátom spôsobujú silnú príľnavosť a malú mobilitu častíc. Ak sú častice a substrát nabité kladným nábojom a kvapka je na konci schnutia taká nízka, že jej výška je porovnateľná s veľkosťou častíc, tak príťažlivé kapilárne sily z častíc vytvoria usporiadanejšiu štruktúru [21].

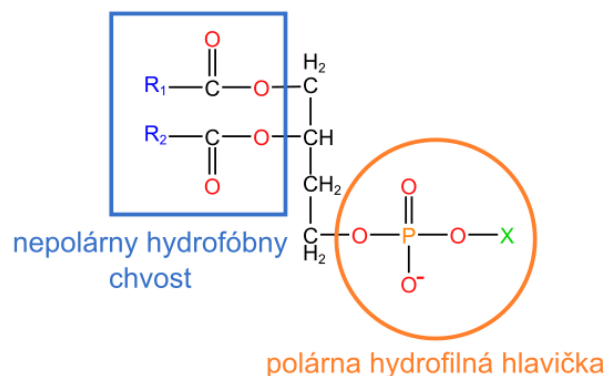
Ak je substrát záporne nabitý a častice v kvapke majú kladný náboj, tak častice sa prichytávajú Coulombickými silami o substrát po obvode kvapky, na rozhraní kvapka-substrát-vzduch. Ak sú častice veľké (napr. 250 - 390 nm v priemere v práci Raya a kol. [22]), tak pri malom kontaktnom uhle sa usadzujú v jednočasticovej vrstve a po usadení niekoľkých radov častíc za sebou spôsobia nárast kontaktného uhla a uvoľnenie kontaktného línie. Kontaktná línia sa potom prichytí, až keď sa o substrát prichytia ďalšie častice po jej obvode. Depozit potom nemá jeden obvodový prstenec, ale sériu sústredných prstencov, ktorých vzájomná vzdialenosť sa znižuje, ak kontaktný uhol rastie [22].

1.3 Fosfolipidy a ich agregáty

Fosfolipidy sú organické molekuly, ktoré tvoria membránu buniek a organel vo forme fosfolipidovej dvojvrstvy. Nazývajú sa aj zložené, membránové alebo polárne lipidy, pretože obsahujú polárnu hlavičku a nepolárny chvost pozostávajúci z dvoch zvyškov mastných kyselín (Obr.1.8). Tieto dve časti sú spojené glycerolovým mostom. Molekula fosfolipidu je amfipatická (amfifilná): polárna hlavička je hydrofilná a chvost je hydrofóbny. Amfifilita lipidov spôsobuje, že vo vodnom roztoku lipidy vytvárajú agregáty ako micely, lipozómy alebo dvojvrstvy.

Fosfolipidy vznikajú dehydratáciou glycerolu, dvoch mastných kyselín, alkoholu a fosfátu [23]. V tele živočíchov majú buď nulový celkový náboj alebo sú pri fyziologickom pH aniónmi. Úlohou väčšiny fosfolipidov je prinášať negatívnu nábojovú hustotu do membrány [23].

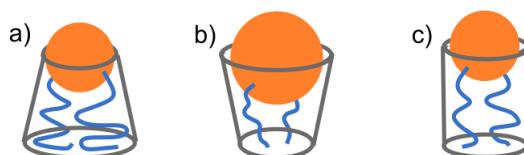
Nepolárny chvost tvoria všeobecne dva rôzne acylové reťazce mastných kyselín



Obr. 1.8: Všeobecná štruktúra molekuly fosfolipidu: nepolárny chvost s dvomi zvyškami mastných kyselín R_1 a R_2 , glycerolový most a polárna hlavička. na mieste X v hlavičke môže byť alkohol alebo iná organická skupina.

lín, alebo v prípade sfingomyelínu jeden. Saturované acylové reťazce sa v lipidoch viažu v *sn-1* pozícii, to znamená, že acylový reťazec je pripojený na C_1 uhlík v glycerolovom moste. Polynesaturované acylové reťazce sú obyčajne naviazané v *sn-2* pozícii [24]. Dĺžka, saturácia a štruktúra zvyškov mastných kyselín ovplyvňuje tvar celej molekuly, ktorý môže byť kónický, cylindrický alebo invertovaný kónický (Obr.1.9). Tvar molekuly fosfolipidu následne určuje, aké agregáty daný lipid vytvára jednoduchšie a častejšie.

Tvorbu agregátov ovplyvňujú aj teploty fázových prechodov, ktoré sa môžu meniť pri zmene počtu uhlíkov v acylových reťazcoch, prítomnosťou a polohou dvojitej väzby v reťazcoch, rovnako aj pri jej počte [25, 26].



Obr. 1.9: Tvary molekúl lipidu: a) kónický tvar, b) invertovaný kónický tvar, c) cylindrický tvar.

Polárnu hlavičku tvorí fosfátová skupina a poväčšine aspoň jedna ďalšia organická skupina (napr. cholín, etanolamín, serín, glycerol, hydroxylová skupina a ďalšie [27]). na rozdiel od chvosta lipidu, hlavička je pri kontakte s vodou hydrofilná.

Nielen vlastnosti acylových reťazcov ovplyvňujú celú molekulu lipidu, ale aj vlastnosti polárnej hlavičky, ktoré sa menia hlavne naviazaním organických skupín na fosfátovú skupinu. Niektoré organické skupiny sú tak veľké, že môžu zmeniť celý

tvár molekuly lipidu (napr. cyklický alkohol inositol), iné prinášajú do molekuly elektrický náboj alebo znižujú či zvyšujú teplotu fázového prechodu [26]. Podľa práce Stillwella [23] delíme fosfolipidy vyskytujúce sa v živočíšnych membránach na sedem druhov podľa alkoholu, ktorý obsahujú v hlavičke:

- (a) fosfatidové kyseliny (PA) - bez alkoholu,
- (b) fosfatidyletanolamíny (PE) - alkohol je etanolamín,
- (c) fosfatidylcholíny (PC) - alkohol je cholín,
- (d) fosfatidylseríny (PS) - alkohol je serín,
- (e) fosfatidylinositoly (PI) - alkohol je inositol,
- (f) fosfatidylglyceroly (PG) - alkohol je glycerol,
- (g) difosfatidylglyceroly (CL) - alkohol je fosfatidylglycerol.

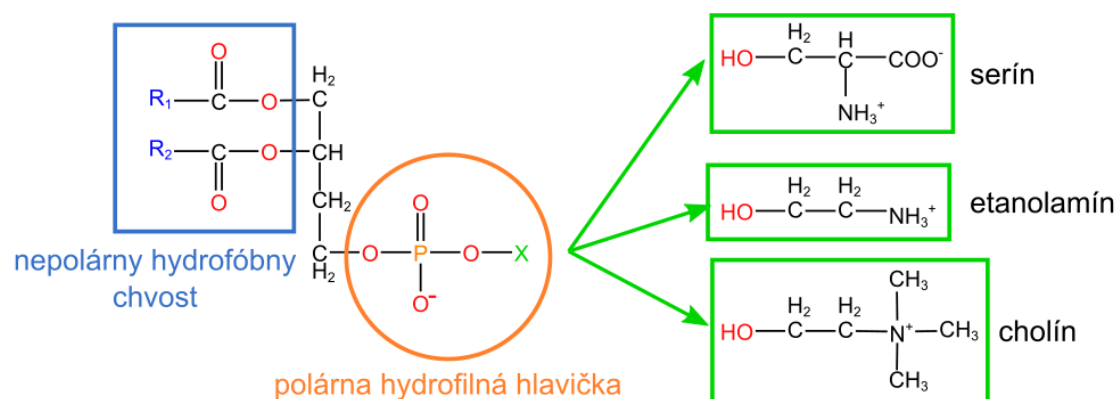
Iné delenie fosfolipidov podľa práce Dobroty a kol. [28] je na glycerofosfolipidy obsahujúce glycerol ako alkohol a sfingofosfolipidy obsahujúce aminoalkohol sfingozín. Glycerofosfolipidy, ktorých základnou zložkou je kyselina fosfatidová, sa potom delia na PA, PE, PC, PS, PI, PG.

1.3.1 Fosfatidylcholíny, fosfatidyletanolamíny a fosfatidylseríny

V tejto práci sme sa zamerali na tri druhy fosfolipidov: fosfatidylcholíny (PC), fosfatidyletanolamíny (PE) a fosfatidylseríny (PS). Tieto tri skupiny majú veľmi podobnú štruktúru alkoholov (Obr.1.10) a môžu sa premeniť jedna na druhú: fosfatidyletanolamín cez trojnásobnú metyláciu etanolamínu dusíkom sa môže zmeniť na fosfatidylcholín a fosfatidylserín sa môže cez dekarbonizáciu premeniť na fosfatidyletanolamín [23].

Fosfatidylcholíny (PC), zvané aj lecitíny, obsahujú aminoalkohol cholín viazaný esterovou väzbou. Molekula PC je cylindrického tvaru, hlavička je rovnako široká ako chvost, a je amfión: hoci obsahuje kladný aj záporný náboj, tak celkový náboj molekuly je nulový.

Najviac zastúpené lipidy v živočíšnych a ľudských bunkových membránach sú PC, nachádzajú sa najmä na ich vonkajšej strane. Cholín v PC je dôležitý pri prenose nervového vzruchu a vďaka metylovým skupinám je súčasťou pľúcneho surfaktantu vo forme dipalmitollecitínu [28]. Spolu s PE a cholesterom sa PC vyskytujú najmä vo vaječnom žĺtku.



Obr. 1.10: Všeobecná štruktúra molekuly fosfatidylserínu (PS), fosfatidyletanolamínu (PE) a fosfatidylcholínu (PC) sa líši len aminoalkoholom na mieste X . V prípade PS je namiesto X serín, pri PE etanolamín a pri PC cholín. Prevzaté a upravené podľa práce Dobroty a kol. [28].

Fosfatidyletanolamíny (PE) obsahujú dusíkatú bázu etanolamín, vyskytujú sa vo všetkých tkanivách orientované na vnútornú stranu membrány [28]. Hlavička PE je malá a ak chvost tvoria nenasýtené zvyšky mastných kyselín, tak molekula PE má kónický tvar. Na rozdiel od PC, PE môžu formovať vodíkové mostíky s okolitými polárnymi skupinami. Ak sa PE nenachádza medzi inými fosfolipidmi, uprednostňuje tvorbu nelamelárnych agregátov vrátane invertovanej hexagonálnej fázy (H_{II}).

PE je v živočíšnych bunkách druhý najviac zastúpený membránový lipid, napríklad v bunke obličky je 15-25 % lipidov PE a 45-55 % lipidov je PC [23]. V prípade baktérií je najčastejším membránovým lipidom PE. V ľudskom tele sa nachádza v nervových tkanivách: v bielej hmote v mozgu, nervoch a mieche.

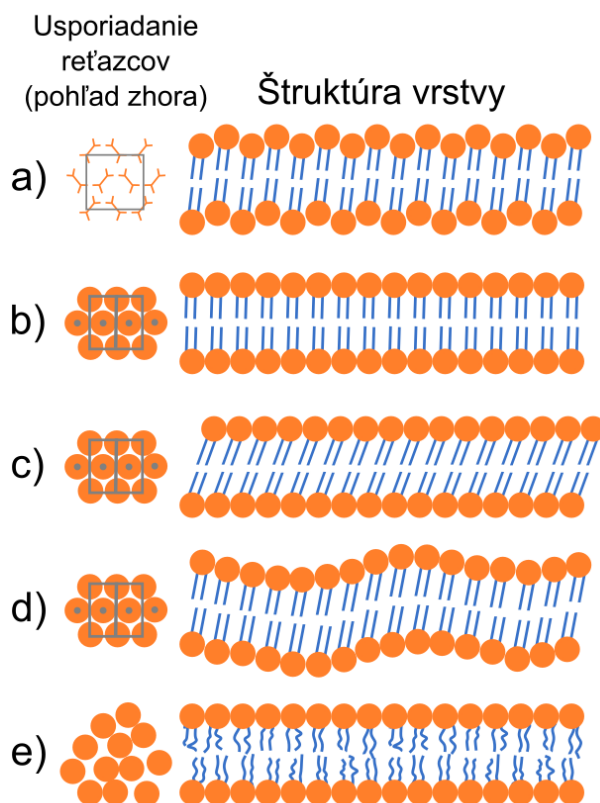
Fosfatidylseríny (PS) podobne ako PE obsahujú dusíkatú bázu, ale v tomto prípade sa jedná o serín. Za fyziologických podmienok je PS anión a silno interaguje s dvojmocnými kovovými kationmi ako Ca^{2+} . PS sa vyskytujú vo všetkých tkanivách na vnútornej strane membrány podobne ako PE, avšak takmer exkluzívne, čo je u fosfolipidov nezvyčajné. Ak sa PS časom zhromaždí na vonkajšej strane membrány, tak to je signál pre organizmus, že bunka má byť zrecyklovaná [23].

Spolu s PE a PC má PS v organizme v prvom rade stavebnú funkciu. Okrem nej PS aktivujú a ukotvujú rôzne proteíny k membráne, vrátane ATPáz, kináz, receptorov a sú kľúčové pre adaptorové proteíny pri prenose signálov v bunke, sú potrebné pre správnu funkciu proteínkinázy C, ktorá vyžaduje negatívne nabité fosfolipidy, a adenylátcyklázy [23].

1.3.2 Polymorfizmus a fázy lipidov

S tvorbou agregátov je spojená aj fáza lipidu. Fázové premeny vyvolané zmenou teploty nazývame **termotropným polymorfizmom**, zmeny štruktúrneho usporiadania vyvolané hydratáciou **lyotropným polymorfizmom** (zmena koncentrácie lipidu v rozpúšťadle). Lipid v určitej fáze vytvára len niektoré typy agregátov a zároveň nie každý agregát sa vytvára v každej fáze.

Fázu definuje rozdielna konformácia uhľovodíkových reťazcov a vzdialenosť monomérnych jednotiek lipidov jednej od druhej. Fázový prechod medzi jednotlivými fázami je daný teplotou systému, ale aj hydratáciou, tlakom, pH, iónovou silou a typom príslušného iónu. Stabilita fázy je daná Gibbsovou energiou pri danej teplote, tlaku a objeme vody. Pre daný lipid sa určité fázy vytvárajú často pri laboratórnych podmienkach vo vhodnom roztoku a iné sa nemusia vytvoriť vôbec.



Obr. 1.11: Lamelárne fázy lipidov: a) kryštalická alebo pseudokryštalická fáza L_c , b) gélová fáza L_β , c) gélová fáza s naklonenými reťazcami $L_{\beta'}$, d) zvltnená gélová fáza P_β , e) tekutokryštalická fáza L_α . Prevzaté a upravené podľa práce Jaina a kol.[29].

Z topologického hľadiska delíme fázy lipidov na lamelárne a nelamelárne. Uvážame niekoľko príkladov fáz:

1. Lamelárne fázy:

- (a) **(Pseudo)kryštalická lamelárna fáza** (L_c) - acylové reťazce tvoriace chvost sú tuhé, tesne usporiadané, v *trans* konformácii a dosahujú najväčšiu dĺžku (Obr.1.11a). Pri niektorých lipidoch sú acylové reťazce naklonené. Túto fázu tvoria fosfolipidy pri nízkej teplote a/alebo nízkej hydratácii [30].
- (b) **Gélová lamelárna fáza** (L_β , $L_{\beta'}$) - gélové fázy L_β a $L_{\beta'}$, ktoré sú viac expandované ako L_c , sa vytvárajú pri zvyšovaní teploty, kedy sa tesné kryštalické usporiadanie stáva energeticky nevýhodným kvôli termálnej a rotačnej excitácii acylových reťazcov [30]. V oboch gélových fázach sú avšak acylové reťazce lipidov ešte v *all-trans* konformácii. Gélová fáza L_β (Obr.1.11b) alebo gélová fáza s naklonenými reťazcami $L_{\beta'}$ (Obr.1.11c) sa vytvára po prekročení sub-prechodovej teploty T_s .
- (c) **Zvlnená gélová fáza** (P_β) - v tejto fáze sú lamely zvlnené s periódou približne 12 až 15 nm a amplitúdou približne 1,5 nm, ktorá sa s hydrataciou nemení [30]. Acylové reťazce sú tesne usporiadané, ale hlavičky sú viac mobilné, preto sú lamely zvlnené (Obr.1.11d). Táto fáza vzniká po predprechodovej teplote T_p .
- (d) **Tekutokryštalická lamelárna fáza** (L_α) - táto fáza vzniká po hlavnom fázovom prechode pri teplote T_m . S rastúcou teplotou sú molekuly lipidu viac pohyblivé: celé molekuly rotujú okolo pozdĺžnej osi a samostatne rotujú aj polárne skupiny a acylové reťazce. Rastúca pohyblivosť vedie k *trans-gauche* izomerizácii, ktorú umožňuje rotácia okolo jednoduchých C-C väzieb. Za *gauche* konformáciou väzby C-C nasleduje *trans* konformácia väzby C-C a potom *gauche* konformácia s opačnou polaritou, ktorá vráti reťazec do pôvodného smeru. Vďaka tomu sú reťazce kratšie ako v *all-trans* konformácii v predchádzajúcich fázach (Obr.1.11e). Molekuly lipidu v L_α fáze zaberajú väčší objem, dvojvrstva sa zväčší laterálne a jej hrúbka sa zmenší.

2. Nelamelárne fázy:

- (a) **Hexagonálna fáza** (H_I) - lipidy sú usporiadané do tubulov.
- (b) **Invertovaná hexagonálna fáza** (H_{II}) - lipidy sú usporiadané do inverzných tubulov.

- (c) **Bikontinuálne kubické fázy** - typy Q^{230} , Q^{234} , Q^{229} . Sférické normálne alebo invertované micely sú usporiadané v kubickej kryštálovej mriežke a vnútorne sú navzájom pospájané [31].
- (d) **Ďalšie kubické fázy** - typ Q^{212} tvoria pospájané tubuly a micely, typ Q^{227} kvázisferické uzavreté micely a typ Q^{223} dva druhy uzavretých micel [31].

Fázový prechod z pseudokryštalickej lamelárnej fázy do gélovej lamelárnej fázy ($L_c \rightarrow L_\beta$) sa nazýva sub-prechod pri kritickkej teplote T_s a fázový prechod z gélovej lamelárnej fázy do zvlnenej lamelárnej fázy ($L_{\beta l} \rightarrow P_\beta$) sa označuje ako pred-prechod pri kritickkej teplote T_p [30].

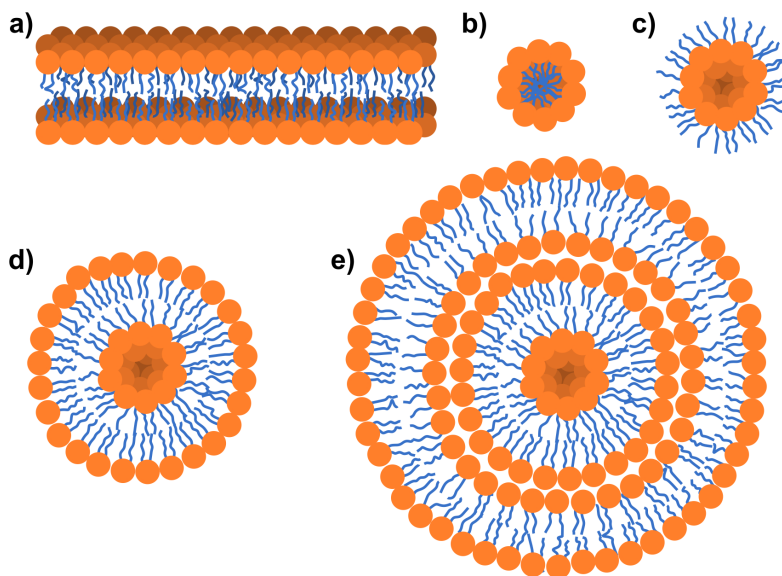
Fázový prechod z gélovej fázy ($L_\beta, L_{\beta l}, P_\beta$) do tekutokryštalickej (L_α) sa označuje ako **hlavný fázový prechod lipidu pri kritickkej teplote T_m** . Z termodynamického hľadiska sa jedná o fázový prechod prvého druhu. Vo vodných suspenziách lipidov sa počas tohto fázového prechodu pozoruje kritické správanie: opalescencia a rozptyl svetla, maximum permeability pre ióny a organické molekuly, zníženie rýchlosti šírenia ultrazvuku a pod. [30].

1.3.3 Agregáty fosfolipidov: lamelárne agregáty, micely a lipozómy

Ak fosfolipid vložíme do vody (nepolárneho rozpúšťadla), jeho molekuly sa natočia tak, aby ich hydrofilná hlavička bola v kontakte s molekulami vody a hydrofóbny chvost nebol. To pri dostatočnej koncentrácii fosfolipidu (tzv. *kritickej micelárnej koncentrácii X_{CMC}*) vedie k vzniku agregátov.

Lamelárne agregáty sú vrstvy lipidov, ktoré sú orientované chvostami od vodného roztoku a hlavičkami k nemu. Môžu sa sformovať ako **monovrstvy** na hladine vodného roztoku, kde hydrofilné hlavičky smerujú k vode a hydrofóbne chvosty dohora. Membránu buniek tvoria **dvojvrstvy**, pri ktorých sú hlavičky orientované von do roztoku a chvosty smerujú dovnútra (Obr.1.12a). Dvojvrstvy vytvorené umelo vo vodnom roztoku sa ľahko rozpadnú, keďže chvosty lipidov na jej koncoch sú v kontakte s vodou. Taktiež sa môžu vytvárať **multilamelárne vrstvy**, ktoré pozostávajú z dvojvrstiev naskladaných na seba. Lamelárne agregáty sa samovolne vytvárajú v suspenziách jednozložkových lipidov, ktorých molekuly sú cylindrického tvaru: polárna skupina je rovnako široká ako chvost (Obr.1.9c).

Micela je sférický jednovrstvový agregát, kde hydrofilné hlavičky lipidov smerujú vonku k vodnému roztoku a chvosty dovnútra (Obr.1.12b). Niekedy sa môžu formovať aj invertované micely (Obr.1.12c), v ktorých chvosty smerujú do roztoku a hlavičky do vnútra. Invertované micely sa vytvárajú pri lipidoch so záporným nábojom a ak sú vo vodnom roztoku prítomné vápenaté ióny, pri cho-



Obr. 1.12: Agregáty fosfolipidov: *a*) planárna dvojvrstva, *b*) normálna micela, *c*) invertovaná micela, *d*) unilamelárny lipozóm, *e*) multilamelárny lipozóm.

lesterole, pri monogalaktosyl-diacylglycerole (MGDG), taktiež pri lipidoch s malým objemom hlavičky (menším ako $0,42 \text{ nm}^2$) alebo v prípade lipidov s dlhým nenasaturovaným chvostom [26]. Molekuly lipidov, ktoré majú invertovaný kónický tvar (Obr.1.9b), vytvárajú normálne micely a molekuly lipidov s kónickým tvarom (Obr.1.9a) samovoľne formujú invertované micely.

Lipozóm vzniká spontánne z planárnej dvojvrstvy zabalením sa do sférickej vezikuly pri rastúcej hydratácii. Lipozómy na rozdiel od micel obsahujú vo svojom vnútri rozpúšťadlo (roztok) z okolia. Môžeme ich klasifikovať na základe počtu vrstiev a veľkosti [23]:

1. Unilamelárne lipozómy (ULV, *unilamellar vesicle*) - obsahujú len jednu dvojvrstvu (Obr.1.12d), delíme ich podľa veľkosti:
 - (a) Malé (SUV, *small unilamellar vesicle*) - priemer 20 až 50 nm.
 - (b) Veľké (LUV, *large unilamellar vesicle*) - priemer 50 až 500 nm.
 - (c) Gigantické (GUV, *giant unilamellar vesicle*) - priemer viac ako 500 nm.
2. Multilamelárne lipozómy (MLV, *multilamellar vesicle*) - obsahujú viacero dvojvrstiev, hlavičky vždy smerujú k sebe. Vyskytujú sa v suspenzii s rôzne veľkými priermi od 0,1 po 5 μm (Obr.1.12e).

Okrem lamelárnych a sférických agregátov, lipidy formujú tyčinkovité a invertované tyčinkovité útvary, polymorfné agregáty v kubických a hexagonálnych usporiadaniach. Tie sa vyskytujú hlavne v nelamelárnych fázach.

Jednotlivé druhy agregátov môžu do seba plynulo prechádzať a vytvárať zložitejšie štruktúry, ktoré môžu byť vnútorne pospájané. Prechod jednej štruktúry do druhej môže spôsobiť elektrolyt, koncentrácia lipidu v roztoku, pH alebo teplota [26]. Závisí na medzimolekulových silách či sa lipidy v roztoku sformujú do jednoduchších štruktúr ako sférické, elipsoidálne a cylindrické micely, alebo do zložitejších štruktúr ako lipozómy a invertované agregáty.

1.3.4 Využitie lipozómov

Lipozómy sa často používajú ako modelové systémy vo výskume v rôznych vedných odboroch ako je matematika, teoretická fyzika, biofyzika, chémia, biochémia, biológia a vo vedách skúmajúcich koloidy [32].

Vďaka amfifílnym vlastnostiam je možné do lipozómov enkapsulovať lipofilné aj hydrofilné látky. Chemické zloženie lipozómov zaručuje biokompatibilitu a biodegradabilitu, lipozómy sú netoxické, vhodné na systémové aj lokálne podanie [33, 34, 35, 36]. Lipidový povrch lipozómu neprepúšťa ióny a veľké dipólové molekuly ako sú sacharidy a proteíny, preto sú enkapsulované látky chránené pred degradáciou enzýmami.

Látky sa do lipozómov zavádzajú buď pasívne počas tvorby lipozómu alebo aktívne po vytvorení lipozómu. **Pasívna enkapsulácia** hydrofilných látok závisí od kapacity vnútorného priestoru lipozómu a rozpustnosti látky v roztoku, v ktorom sa vytvárajú lipozómy. Účinnosť pasívnej enkapsulácie je nižšia ako 30 % [34]. **Aktívna enkapsulácia** spočíva v enkapsulácii látky až po vytvorení lipozómov s transmembránovým gradientom pH alebo iónov. Na základe gradientu preniká látka rozpustená vo vonkajšom vodnom prostredí cez fosfolipidovú dvojvrstvu do lipozómu. Vo vnútri lipozómu látka interaguje s už prítomným vnútorným prostredím za vzniku nerozpustných zrazenín. Pri aktívnej enkapsulácii sa dá účinnosť zvýšiť použitím amfifílnych slabo kyslých alebo slabo zásaditých molekúl. Účinnosť aktívnej enkapsulácie dosahuje až 100 % [37, 38].

Vzhľadom ku spôsobu prenosu látok delíme lipozómy na konvenčné a druhoгенераčné lipozómy. Pri **konvenčných lipozómoch** sa hydrofilné látky enkapsulujú vo vnútornom objeme lipozómu a lipofilné látky sú rozpustené priamo v lipidovej dvojvrstve. Organizmus konvenčné lipozómy nerozpoznáva ako cudzorodé látky, preto imunitný systém na nich reaguje až po opsonizácii (obalení) lipozómu plazmatickými proteínmi. Makrofágy vychytávajú opsonizované lipozómy z krvného obehu a prenášajú ich do pečene, sleziny a lymfatického tkaniva. Tento jav sa využíva na cielený transport liečiv do spomínaných tkanív pri ochoreniach ako je leishmanóza alebo systémová mykóza [39].

Druhogeneračné lipozómy sú modifikované lipozómy so špecifickými vlastnosťami [39]. Modifikácia spočíva v sterickej stabilizácii, tj. v naviazaní molekúl na vonkajší obal lipozómu, alebo spojením lipozómu a inej štruktúry, napr. vírusu (tzv. virozómy v práci Hernandéza a kol. [40]). Naviazaním molekúl syntetických polymérov polyetylénglykolu (PEG) na vonkajší obal lipozómu sa predlžuje doba cirkulácie lipozómov v krvi, pretože makrofágy ich nedokážu rozpoznať. Ďalšie ligandy sa môžu na lipozóm naviazať kovalentne priamo na polárnu časť fosfolipidu alebo sa konjugujú na molekuly PEG. Ligandy môžu pozostávať z protilátok, fragmentov protilátok, proteínov, peptidov, vitamínov, sacharidov a glykoproteínov [41]. Ochraňujú lipozóm pred likvidáciou retikuloendotelovým systémom a tak zabezpečujú transport lipozómov až do cieľového tkaniva [32, 40].

Výber vhodných fyzikálnych vlastností štruktúry lipozómu a lipidov vzhľadom k cieľovým bunkám umožňuje **pasívny cielený transport** lipozómu. Tieto vlastnosti zahŕňajú napríklad hydrofóbnosť alebo hydrofilnosť, nábojovú hustotu, fluiditu alebo veľkosť lipozómu [32]. **Aktívny cielený transport** je podmienený naviazaním molekúl na povrch lipozómu, ktoré potom interagujú s receptormi na cytoplazmatickej membráne cieľovej bunky [32]. Tieto špecifické interakcie využívajú lipozómy druhej generácie.

Uvoľňovanie látok z lipozómov prebieha pomocou pasívnej difúzie, riadeného uvoľňovania (zosieťovanie lipidových dvojrvtiev lipozómu, transformácia látky do nanokryštalickej formy vo vnútri lipozómu, a pod.) a rozpadu lipozómov. Snahou je príprava takých lipozómov, ktoré dodávajú a uvoľňujú látku kontrolovane na špecifický endogénny stimul (pH, redoxný potenciál, enzým) alebo na aplikovaný vonkajší podnet (teplo, svetlo, ultrazvuk). Lipozómy interagujú s bunkami prostredníctvom jednoduchej adsorpcie, endocytózy, fúzie s bunkovými membránami alebo výmenou zložiek lipidovej dvojrvtvy [41].

Výhodou používania lipozómov na transport látok do organizmu je zníženie toxicity látky v necieľových tkanivách, zvýšenie koncentrácie látky v cieľových bunkách, zvýšenie stability látky vďaka enkapsulácii a dosiahnutie vyššej terapeutickú účinnosti. Taktiež lipozómy môžu prenášať záporne a kladne nabitú molekuly, molekuly väčších veľkostí (napr. časti DNA veľkosti chromozómu, monoklonálne protilátky) [32, 42, 33, 34, 35, 36].

Obmedzením je malý vnútorný objem lipozómu a účinnosť pasívnej enkapsulácie. Je nevyhnutné, aby liečivo bolo transportované v terapeutických dávkach a v primeranom množstve lipidov [38]. Ďalšími nevýhodami sú vysoké výrobné náklady, enkapsulované molekuly môžu uniknúť z lipozómu, fosfolipidy niekedy prechádzajú oxidačnými reakciami a hydrolytickým štiepením, lipozómy majú krátky polčas rozpadu (*short half-life*) a malú rozpustnosť [32].

Využitie *in vivo* zahŕňa použitie lipozómov v chemoterapii, liečbe infekčných chorôb, liečbe vrodených metabolických ochorení, v imunoterapii, gémovej terapii,

v diagnostike ochorení [27, 41]. Lipozómy sa využívajú taktiež pri liečbe zápalov, restenózy (opätovnom zúžení dutých orgánov, obyčajne tepien) a vo vakcínach [27, 43, 35]. V rámci voľnopredajných liekov sú v súčasnosti vitamíny C, D3, K2, železo, zinok, lyzín, kolagén a kyselina hyaluronová bežne dostupné v lipozomálnej forme v lekárňach. Lipozómy sa využívajú ako nosiče biologicky aktívnych látok v kozmetike, najmä v krémoch a sérach s hydratačným alebo zvláčňujúcim účinkom a v prípravkoch zameraných na zamedzenie starnutia pleti.

2. Experimentálna časť

2.1 Použité vzorky a ich príprava

Na prípravu lipozómov boli použité vzorky lipidov:

- DMPS (14:0 PS, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serín), výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 840033,
- DMPC (14:0 PC, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín), výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 850345,
- DPPC (16:0 PC, 1,2 - dipalmityl-*sn*-glycero-3-fosfocholín), výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 850355,
- 16:1 PC (16:1 ($\Delta 9$ -*cis*) PC, 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín), výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 850358,
- DOPC (18:1 ($\Delta 9$ -*cis*) PC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín), výrobca Sigma Aldrich, objednávkové číslo P-6354,
- DOPE (18:1 ($\Delta 9$ -*cis*) PE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamín), výrobca Sigma Aldrich, objednávkové číslo P-0510,
- výťažok z vaječného žĺtka (L- α fosfatidylcholín), výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 840051,
- výťažok zo sójových bôbov, výrobca Avanti Polar Lipids, objednávkové číslo 541602.

Štruktúrne vzorce použitých lipidov sú zobrazené na Obr.2.1 okrem dvoch vzoriek. Výťažok z vaječného žĺtka a výťažok zo sójových bôbov boli vzorky obsahujúce zmesi lipidov, ktoré sú vhodné ako modelový systém, pretože v prírode membrány buniek a organel netvorí výhradne jeden druh lipidu. Ďalšie lipidy sme vyberali ako jednozložkové a tak, aby sme mali zastúpený rôznych typ saturácie a dĺžky reťazca a rôzne polárne hlavičky. Jednozložkové lipidy DMPS, DMPC, DPPC, 16:1 PC, DOPC, DOPE mali od výrobcu uvedenú teplotu hlavného fázového prechodu T_m a molekulovú hmotnosť M_r (Tab.2.2).

Zloženie výťažku zo sójových bôbov, ktorý pozostával z viacerých lipidov, je uvedený v tabuľke Tab.2.1a spolu s relatívnymi podielmi hmotností vzhľadom k hmotnosti celkovej vzorky m_{rel} . Najviac zastúpené sú PC a PE lipidy.

Výťažok z vaječného žĺtka pozostával z fosfocholínov, ktorých acylové reťazce tvorili zvyšky rôznych mastných kyselín so štrnástimi až dvadsiatimi dvoma uhlíkmi a žiadnou až šiestimi dvojitými väzbami (Tab.2.1b). Ako acylové reťazce sa najčastejšie vyskytovali zvyšky kyseliny palmitovej (16:0) a kyseliny olejovej (18:1).

Jednozložkové lipidy sme vybrali zo skupín PS, PC a PE. Lipid DMPS patrí medzi PS lipidy, DMPC, DPPC, 16:1PC, DOPC sú PC lipidy a DOPE je PE lipid.

Zo skupiny PS lipidov sme skúmali DMPS, ktorého nesaturovaný chvost tvoria dva acylové reťazce kyseliny myristovej, hlavičku tvorí serín.

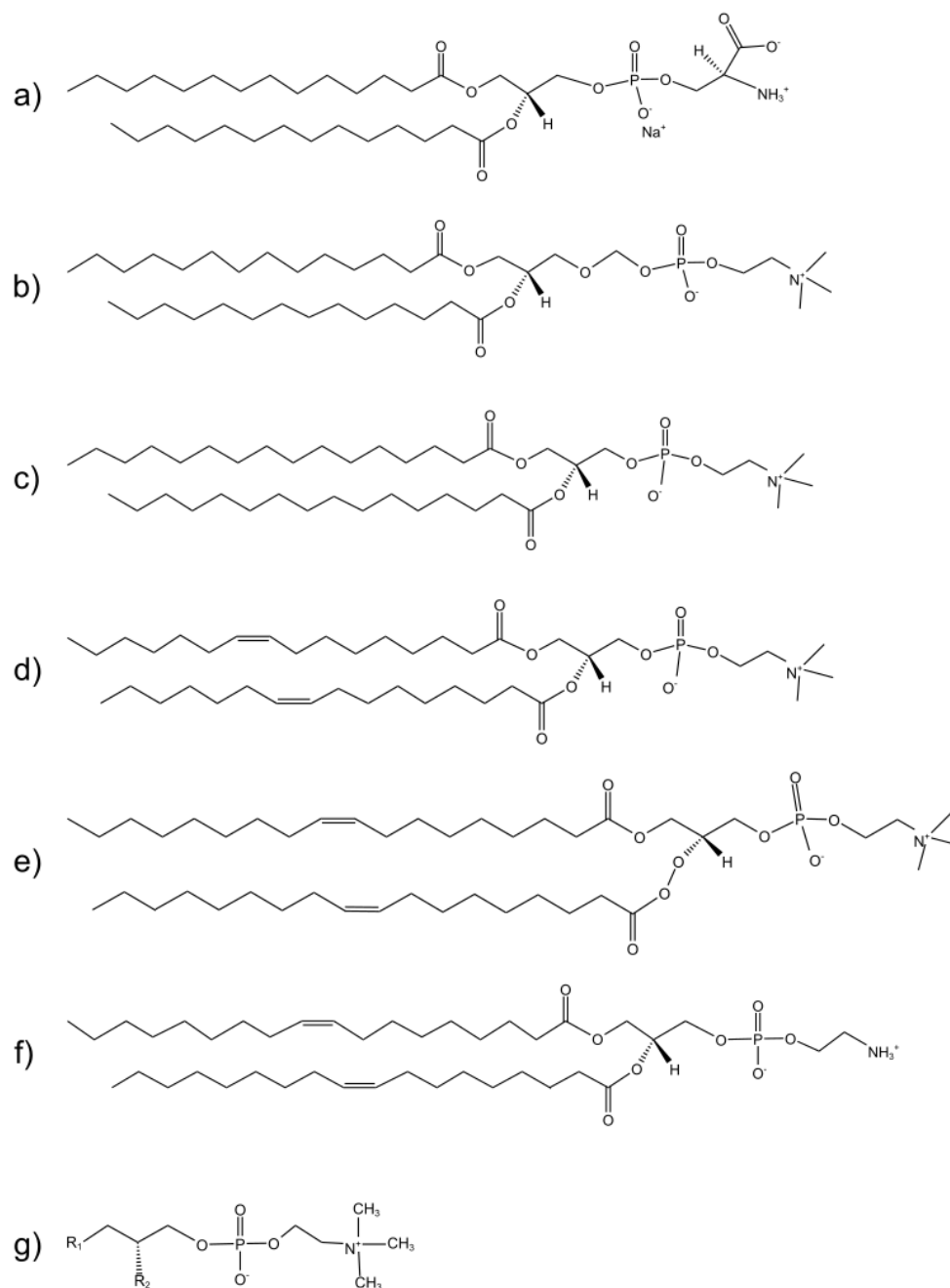
Lipid DMPC (14:0 PC) má chvost podobný DMPS: tiež je tvorený dvoma zvyškami kyseliny myristovej, ale hlavičku tvorí fosfatidylcholín. Spolu s cholesterolom je často používaný ako súčasť pripravovaných membránových modelov.

Lipid DPPC (16:0 PC) pozostáva z dvoch zvyškov kyseliny palmitovej, ktoré tvoria jeho chvost, a z fosfatidylcholínovej hlavičky. Je často používaný ako modelový lipid, pretože buď samostatne alebo v kombinácii s ostatnými lipidmi vytvára lipozomy vhodné na prenos liečiv.

Lipid 16:1 PC (16:1 (Δ^9 -*cis*) PC) má oproti DPPC jednu dvojitú väzbu v každom acylovom reťazci v *cis* usporiadaní (Obr.2.1d). Dajú sa z neho pripraviť GUV a MLV lipozomy.

Lipid DOPC (18:1 (Δ^9 -*cis*) PC) v kombinácii s DPPC vytvára stabilnú lipidovú dvojvrstvu, samostatne sa využíva na prípravu lipozomov alebo planárnych membrán. Chvost lipidu DOPE pozostáva z dvoch zvyškov kyseliny olejovej, takže celkovo obsahuje dve dvojité väzby.

Z PE lipidov sme vybrali jednozložkový lipid DOPE (18:1 (Δ^9 -*cis*) PE). Podobne ako DOPC, aj jeho chvost tvoria dva zvyšky kyseliny olejovej, ale hlavička obsahuje etanolamínovú skupinu. DOPE vytvára stabilnú lipidovú vrstvu a je možné z neho vytvoriť GUV lipozomy. DOPE sme mali v jednozložkovej vodnej suspenzii, a preto samovoľne vytváral aj invertované agregáty ako väčšina jednozložkových PE lipidov.



Obr. 2.1: Štruktúrne vzorce použitých lipidov:

a) DMPS (14:0 PS), b) DMPC (14:0 PC), c) DPPC (16:0 PC),
 d) 16:1 PC (16:1 ($\Delta 9$ -cis) PC), e) DOPC (18:1 ($\Delta 9$ -cis) PC), f) DOPE (18:1
 ($\Delta 9$ -cis) PE), g) výťažok z vaječného žĺtka s acylovými reťazcami R_1 a R_2 .

Tabuľka 2.1: Priemerné zastúpenie lipidov a mastných kyselín vo výťažku zo sójových bôbov a vo výťažku z vaječného žĺtka.

(a) Priemerné zastúpenie lipidov vo výťažku zo sójových bôbov.

PC - fosfatidylcholíny,

PE - fosfatidyletanolamíny,

PI - fosfatidylinozitoly,

PA - fosfatidové kyseliny.

Lipid	m_{rel} (%)
PC	45,7
PE	22,1
PI	18,4
PA	6,9
Neznáme	6,9

(b) Priemerné zastúpenie mastných kyselín v acylových reťazcoch R_1 a R_2 lipidov vo výťažku z vaječného žĺtka.

Značenie $x:y$ znamená x počet uhlíkov v reťazci mastnej kyseliny a y je počet dvojitých väzieb.

Mastná kyselina $x:y$	m_{rel} (%)
14:0	0,2
16:0	32,7
16:1	1,1
18:0	12,3
18:1	32,0
18:2	17,1
20:2	0,2
20:3	0,3
20:4	2,7
22:6	0,4
Neznáme	1,0

Tabuľka 2.2: Teplota fázového prechodu a molekulárna hmotnosť použitých lipidov.

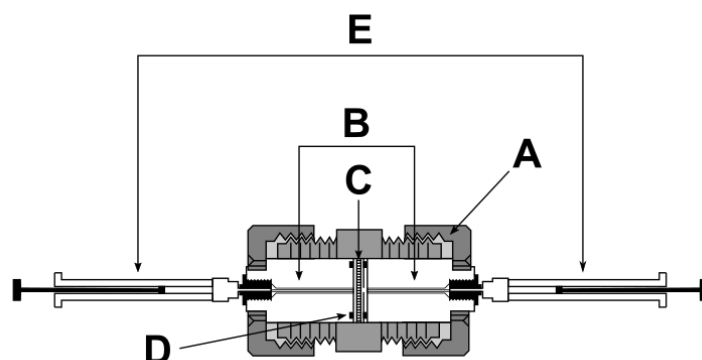
T_m je teplota hlavného fázového prechodu z gélovej fázy do tekutokryštalickej fázy, M_r je molekulárna hmotnosť. Údaje sú prevzaté z stránok firmy Avanti Polar Lipids (<https://avantilipids.com>).

vzorka	T_m (°C)	M_r
výťažok z sójových bôbov	-	odhad 930
výťažok z vaječného žĺtka	-	770
DOPE (18:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PE)	-16	744
DOPC (18:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PC)	-17	786
DMPC (14:0 PC)	24	678
DMPS (14:0 PS)	35	702
DPPC (16:0 PC)	41	734
16:1 PC (16:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PC)	-36	730

2.1.1 Príprava suspenzie lipozómov

Suspenzie lipozómov sme pripravovali nasledujúcim spôsobom podľa protokolu uvedeného v práci Nawa [27]:

1. **Vytvorenie suspenzie.** Lipid v práškovej forme navážime do sklenenej banky a pridáme chloroform (v prípade lipidu DMPS aj metanol). Lipid v chloroforme rozpustíme krúživými pohybmi banky pod digestorom.
2. **Vytvorenie lipidového filmu.** Pomocou plynného dusíka odparíme chloroform z banky tak, že do banky so suspenziou privádzame dusík a krúžime ňou, aby sa vytvoril rovnomerný lipidový film na dne a stenách banky.
3. **Hydratácia lipidu a jeho ohrev nad teplotu fázového prechodu.** Do banky pridáme destilovanú deionizovanú vodu a jej spodnú časť ponoríme do ultrazvukového kúpeľa na približne 5 min, aby sa lipidový film, vytvorený na povrchu banky, úplne uvoľnil od jej stien. V zakalenej suspenzii vzniknú spontánne multilamelárne lipozómy s rôznymi veľkosťami. Banku so suspenziou zahrievame minimálne 45 min v piecke nad teplotu fázového prechodu, pretože lipidové agregáty sa vytvárajú jednoduchšie v tekutokryštalickej fáze. Teploty fázových prechodov pre jednotlivé lipidy a zmesi lipidov sú uvedené v tabuľke Tab.2.2.
4. **Extrudácia a homogenizácia veľkosti lipozómov.** Suspenziu pretlačíme aspoň 30-krát cez polykarbonátovú membránu extrudera LiposoFast-Basic od firmy Avestin, Inc. (schéma extrudera na Obr.2.2). Použili sme polykarbonátovú membránu AVESTIN s veľkosťou pórov 100 nm, aby sme získali suspenziu s unilamelárnymi lipozómami homogénnej veľkosti, v ďalšom texte označovanej ako homogénna unilamelárna suspenzia alebo len homogénna suspenzia. Ak použitie extrudera vynecháme, tak pracujeme s nehomogénnou suspenziou, ktorá obsahuje lipidové agregáty rôznych veľkostí a tvarov: micely, unilamelárne a multilamelárne lipozómy.



Obr. 2.2: Schéma extrudera LiposoFast-Basic od firmy Avestin, Inc. [44]. *A* - kovový obal, *B* - teflonové valce s nylonovou sieťkou orientované smerom k membráne, *C* - polykarbonátová membrána, *D* - O-kružky po obvode valcov, ktoré zabraňujú pretekaniu suspenzie pri extrudácii a držia nylonovú sieťku, *E* - Hamiltonove striekačky, ktoré sú upevnené na nerezových kapilárach vedúcich z valcov.

2.1.2 Príprava depozitu pre Ramanovu spektroskopiu

Použili sme komerčne dostupný substrát μ -RIMTM od firmy BioTools [45], ktorý sa skladá z lešteného nerezového plátu pokrytého tenkou hydrofóbnou (uhľovodíkovou) vrstvou. Tento plát je zasadený do plastovej podložky (Obr.2.3). Povrch nerezového plátu je vhodný na Ramanovu spektroskopiu kvôli jeho odrazivosti a slabému Ramanovmu signálu.

Na substrát sme kvapli dve kvapky suspenzie vedľa seba, čiže jeden depozit sa vytváral z jednej kvapky. Kvapky sme nechali pred meraním vysychať pri laboratórnej teplote 20 °C približne jednu hodinu, čím sa vyformovali suché depozity. Na meranie sme vybrali depozit, ktorého proces schnutia nebol narušený vonkajšími vplyvmi, napríklad prúdom vzduchu, nárazom a pod.

Na substrát sme kvapli 2 μ l lipozómovej suspenzie, pričom sme pripravili koncentrácie 1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 0,1 mg/ml pre homogénne suspenzie a 1 mg/ml pre nehomogénnu suspenziu. Koncentrácie \sim 0,3 mg/ml sú pre metódu kvapkovo nanášaných povlakov optimálne [6].



Obr. 2.3: Substrát μ -RIMTM so zaschnutými depozitmi.

2.2 Aparatúra na meranie Ramanových spektier

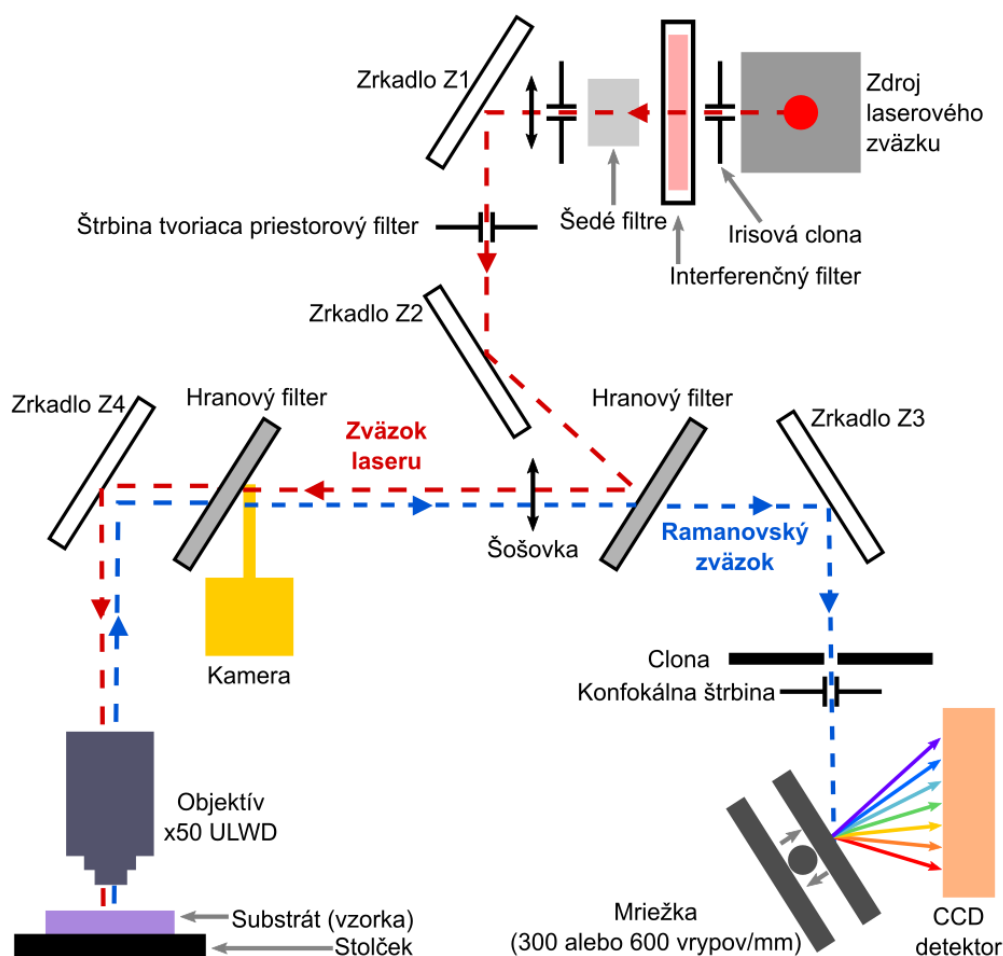
Ramanove spektrá sme merali na konfokálnom Ramanovom mikrospektrometri LabRam HR 800 vyrobenom spoločnosťou Horiba Jobin-Yvon. Jedná sa o integrovaný Ramanov systém, v ktorom je mikroskop konfokálne spojený so spektrografom. Pracuje v usporiadaní na meranie spätného rozptylu a jeho základná schéma sa nachádza na Obr.2.4.

Excitujúci laserový zväzok (v našom prípade hélium-neónový laser s vlnovou dĺžkou 632,8 nm) najprv prechádza cez irisovú clonu a potom cez interferenčný filter, ktorý odstraňuje vedľajšie plazmové línie. Ďalej prechádza cez šedé filtre, ktoré znižujú jeho intenzitu, aby nepoškodil skúmanú vzorku. Potom laserový zväzok vchádza do ďalšej irisovej clony a je zaostrený pomocou šošovky do štrbiny tvoriacej priestorový filter, ktorá určuje apertúru zväzku vstupujúceho do mikroskopu. Po odraze od zrkadla Z2 dopadá na hranový filter. Zväzok prechádza šošovkou a objektívom mikroskopu a dopadá na skúmanú vzorku umiestnenú na posuvnom stolčeku mikroskopu.

Odrazené a rozptýlené žiarenie je objektívom následne zbierané a vracia sa späť k hranovému filteru. Tento filter prepúšťa iba neelasticky rozptýlené žiarenie (odpovedajúce Ramanovmu rozptylu), teda žiarenie s posunutou vlnovou dĺžkou oproti vlnovej dĺžke excitujúceho zväzku. Ramanovský zväzok putuje k zrkadlu Z3 a ďalej ku konfokálnej štrbine a k spektrografu. Konfokálna štrbina je nastaviteľná v rozmedzí 0 až 1000 μm . Spektrograf má ohniskovú vzdialenosť 800 nm a obsahuje dve vymeniteľné mriežky (300 a 600 vrypov/mm). Žiarenie je detekované CCD detektorom (1024 \times 256 pixelov), ktorý je chladený tekutým dusíkom na teplotu -129 °C.

Experimentálne podmienky a nastavenia pri našich meraniach boli nasledovné: Výkon hélium-neónového lasera na vzorke bol 6,4 mW (bez použitia šedých filtrov). Priemer vstupnej clony bol nastavený na 100 μm , šírka konfokálnej clony na 400 μm . Použitá mriežka v spektrografe mala 300 vrypov/mm. Pri meraní Ramanových spektier sme používali objektív $\times 50$ ULWD (*ultra long working distance*, objektív s predĺženou pracovnou vzdialenosťou). Ramanove spektrá sme merali v spektrálnom rozsahu 250 až 3400 cm^{-1} so 60 priemerovaniami a expozičným časom 1 s (60 opakovaní po 1 sekunde). Toto nastavenie bolo rovnaké pre všetky merané vzorky lipidových depozitov okrem DOPE, pri ktorom bol Ramanov signál z obvodového prstenca veľmi nízky. V tomto prípade sme zvolili dlhší expozičný čas (3 s) a vyšší počet priemerovaní (120).

Depozity meraných vzoriek boli pozorované aj v bielom svetle pomocou kamery s použitím objektívov so zväčšením $\times 5$, $\times 10$, $\times 50$ ULWD a $\times 100$. Niektoré obrázky boli vytvorené aj pomocou dvoch skrížených polarizátorov.



Obr. 2.4: Schéma Ramanovho mikrospektrometru Horiba Jobin-Yvon LabRAM HR800.

2.3 Aparatúra na meranie kontaktných uhlov

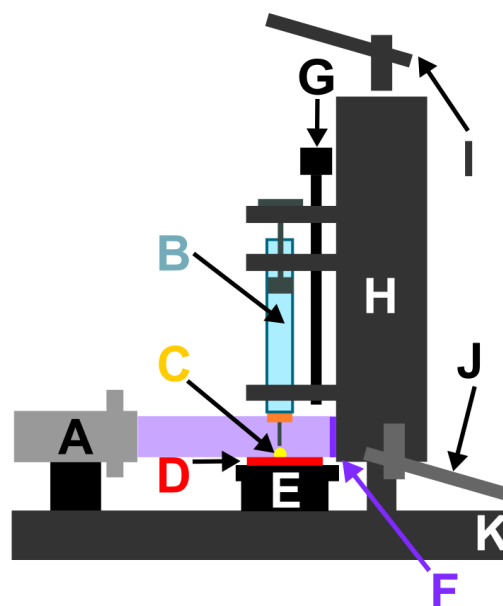
Kontaktné uhly sme merali na Oddelení fyziky vrstiev a povrchov na Katedre makromolekulárnej fyziky Matematicko-fyzikálnej fakulty Univerzity Karlovy v Prahe (MFF UK) pomocou aparatúry ich vlastnej výroby (Obr.2.5) a programu Solarius Wettability.

Aparatúra na meranie kontaktných uhlov pozostávala z kamery (Obr.2.5 A), stolčeka na substrát (Obr.2.5 E) a stojana na striekačky so suspenziami vzoriek (Obr.2.5 H). V aparatúre bola použitá kamera s vysokým rozlíšením Logitech Mic (QuickCam S5500), ktorá ukladá fotografie s veľkosťou 640×480 px a s rozlíšením 96 dpi. V stojane na striekačky boli zabudované biele LED diódy a zrkadlo z lešteného kovu. Svetlo z LED diód prechádzalo zdrsneným plexisklom, aby na vzorku

dopadlo rozptýlené svetlo (Obr.2.5 *F*). Striekačka Hamilton 250 μl 1725 TLL s ihlou s tupým hrotom bola naplnená suspenziou vzorky približne do objemu 50 μl a vložená do jedného zo štyroch držiakov na striekačky na stojane (Obr.2.5 *B*). Kvapka vzorky bola kvapnutá zo striekačky na substrát položený na stolčeku (Obr.2.5 *C*). Vyformovanie kvapky a výška striekačky nad substrátom sa dala regulovať pomocou skrutky na držiaku na striekačku (Obr.2.5 *G*), na dostatočné priblíženie ihly k substrátu po vyformovaní kvapky slúžila páka na okraji stojana (Obr.2.5 *J*).



(a) Fotografia aparatury.



(b) Schéma aparatury.

Obr. 2.5: Aparatúra na meranie kontaktných uhlov.

A - kamera s LED osvetlením, *B* - Hamiltonova striekačka s tupou ihlou, *C* - kvapka suspenzie na substráte, *D* - substrát, *E* - stolček so substrátom, *F* - zrkadlo z lešteného kovu so zdrsneným plexisklom, *G* - skrutka na polohovanie striekačky, *H* - stojan so štyrmi držiakmi na umiestnenie striekačiek, *I* - páka na výmenu držiaka so striekačkou, *J* - páka na kvapnutie kvapky na substrát, *K* - podstavec.

Najprv sme merali homogénne suspenzie lipidov postupne od najnižšej po najvyššiu koncentráciu a potom sme pracovali s nehomogénnou suspenziou. Medzi jednotlivými koncentraciami sme striekačku vypláchli etanolom a deionizovanou vodou, aby sme zamedzili kontaminácii. Ak to bolo možné, tak na každú vzorku a

každú koncentráciu sme použili novú sterilnú ihlu Miraject Endo Luer $0,5 \times 40$ mm s tupým koncom.

Kvapkali sme kvapky s objemom $(1,8 \pm 0,1)$ μl , ktorým zodpovedala kvapka s priemerom 2 cm na obrazovke monitora. Ihla pri aparátúre mala reálne rozmery $(0,53 \pm 0,01)$ mm [46], na fotografiách mala rozmery $(36,7 \pm 0,2)$ px. Vzorky DPPC, 16:1 PC, DMPS, DOPE a DOPC sme kvapkali s Miraject Endo Luer ihlami $0,5 \times 40$ mm. Priemer ihly výrobcu uvádza ako 0,5 mm, dĺžku 40 mm. Po premeraní sme zistili, že Miraject ihly mali priemer $(0,50 \pm 0,01)$ mm, na fotografiách to bolo $(36,5 \pm 0,2)$ px.

2.4 Metodika charakterizácie depozitu vzorky

Kvapky zo suspenzií vzoriek lipozómov s rôznymi koncentraciami po kvapnutí na substrát $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ vytvorili depozity, ktoré sme charakterizovali prostredníctvom plochy depozitu S , šírky prstenca l , pomeru intenzít vybraných spektrálnych pásov z Ramanovho spektra a pre koncentráciu 1 mg/ml danej vzorky aj pomocou súboru Ramanových spektier.

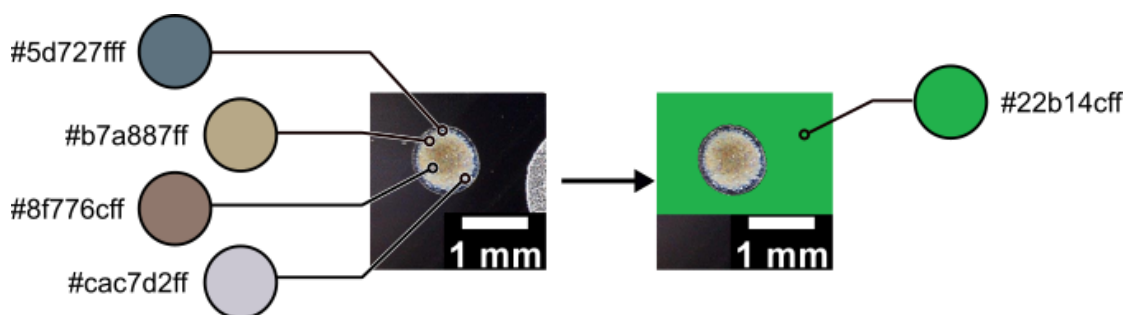
2.4.1 Plocha depozitu

Aproximovanie plochy depozitu kruhmi alebo elipsami vzhľadom k niektorým tvarom depozitov bolo nepresné, preto sme ju merali počítaním pixelov zo záberov vytvorených pomocou mikroskopu a softvéru Microcapture Pro. Pri dostatočne malých depozitoch (vzorka DPPC) bola plocha analyzovaná zo záberov z kamery mikrospektrometra LabRam HR 800.

Depozity nie sú dobre rozlíšiteľné od substrátu pomocou knižnice OpenCV v programovacom jazyku Python alebo pomocou detekcie hrán v programe ImageJ. Preto sme na každom zábere po pixeloch zafarbili pozadie zelenou farbou (`#22b1cff`), ktoré sme následne odfiltrovali a zmerali len povrch depozitu v programe ImageJ. Týmto sme zároveň do merania plochy nezahrnuli prachové častice, ktoré sa na odrazivom substráte $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ často vyskytovali.

Zelená farba sa ukázala ako najvhodnejšia na zafarbenie substrátu, pretože zábery depozitov obsahovali okrem odtieňov sivej aj odtiene červenej, žltej, modrej a hnedej (Obr.2.6). Modré a žlté odtiene sa vyskytovali v záberoch depozitu kvôli odrazom osvetlenia miestnosti a odrazom osvetlenia vzorky v mikroskope.

Hornú hranicu chyby určenia plochy depozitov s koncentráciou 1 mg/ml u_S sme odhadli na 5 % plochy S . Pre ne sa chyba u_S pohybovala v intervale 0,1 až 0,4 mm^2 . Pre depozity s koncentráciou 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml sme chybu odhadli zmeraním viacerých obrázkov a pohybovala sa v intervale 0,1 až 0,5 mm^2 .



Obr. 2.6: Farebnosť záberov homogénneho depozitu DOPE s koncentráciou 0,1 mg/ml (vľavo) a fotografia pripravená na meranie plochy s pozadím zafarbeným zelenou farbou (vpravo).

2.4.2 Šírka obvodového prstenca

Šírku prstenca l sme stanovili z obrázkov vytvorených pomocou záznamu z kamery z mikrospektrometra LabRam HR 800 a obrázky sme spracovali pomocou programu ImageJ. Na každom obrázku sme zmerali 30 až 50 úsečiek od vonkajšieho okraja prstenca po jeho vnútorný okraj. Pre každú koncentráciu vzorky sme merali aspoň dva obrázky. Hornú hranicu chyby určenia úsečky charakterizujúcej šírku prstenca u_l sme odhadli na základe toho, ako sme pre danú koncentráciu dokázali stanoviť začiatok a koniec úsečky na obrázkoch. Chyba u_l sa pohybovala v intervale 5 až 12 μm .

Okrem priemernej šírky prstenca l , sme sledovali aj štandardnú odchýlku σ_l , ktorá ukazuje ako veľmi sa šírka prstenca mení: niektoré vzorky majú prstenec po obvodu depozitu približne rovnako široký, u iných sa táto šírka po obvodu mení a niektoré koncentrácie vytvárali prstence s veľmi nejasne definovaným vnútorným okrajom.

2.4.3 Statické kontaktné uhly

V programe Sollarius Wettability sme zaznamenali obrázky kvapiek suspenzií lipozómov na substráte $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ kvapnutých pomocou aparatury z Katedry makromolekulárnej fyziky MFF UK. Na každom obrázku sme pomocou určenia kontaktnej línie a aproximácie elipsami rozhrania suspenzia-vzduch stanovili pre kvapku 5 až 10 priemerných statických kontaktných uhlov θ , ktoré boli priemerom ľavého a pravého statického kontaktného uhla (Obr.1.5). Následne sme vypočítali priemerný statický kontaktný uhol pre každú koncentráciu. Chyba nameraného priemerného uhla θ bola $\pm 3^\circ$.

2.4.4 Faktorová analýza

Ak máme nameraných n spektier v m spektrálnych bodoch, tak ich môžeme zapísať ako maticu s n stĺpcami a m riadkami ($m \times n$), označme ju \mathbb{A} . Pomocou faktorovej analýzy zredukujeme maticu \mathbb{A} na najnižšiu možnú dimenziu. Dimenzia takto zredukovanej matice udáva počet faktorov popisujúcich riešený problém.

Na zredukovanie matice \mathbb{A} sa používa viacero techník, veľmi častou je metóda singulárneho rozkladu (*Singular Value Decomposition*, SVD), ktorá spočíva v rozklade matice A ($m \times n$, bez újmy na všeobecnosti predpokladáme $m \leq n$) na súčin

$$\mathbb{A} = \mathbf{U}\mathbf{W}\mathbf{V}^T, \quad (2.1)$$

pričom \mathbf{U} je ortogonálna $m \times m$ matica a \mathbf{V} je ortogonálna $n \times n$ matica. Matica \mathbf{W} je diagonálna, jej nezáporné prvky na diagonále sa nazývajú singulárne hodnoty matice \mathbb{A} .

Pre prvky matice \mathbb{A} (prvok v i -tom riadku a j -tom stĺpci označujeme a_{ij}) pri SVD rozklade platí

$$a_{kl} = \sum_{i=1}^n u_{ki} w_{ii} v_{li}, \quad k = 1, \dots, m, \quad l = 1, \dots, n. \quad (2.2)$$

Znamená to, že l -té spektrum je lineárnou kombináciou n subspektier, i -té subspektrum je i -tý stĺpec ortogonálnej matice \mathbf{U} . Koefficienty lineárnej kombinácie sú určené prvkami matice \mathbf{V} , prvky matice \mathbf{W} vyjadrujú váhový faktor.

Pri faktorovej analýze sady Ramanovych spektier získame ortonormálne spektrálne komponenty (subspektrá), ich štatistické váhy (singulárne čísla) a normalizované koeficienty, ktoré určujú relatívne zastúpenie subspektier v jednotlivých spektrách (stĺpce matice \mathbf{V}). Prvé subspektrum aproximuje v zmysle metódy najmenších štvorcov sadu spektier v matici \mathbb{A} a popisuje ich najdôležitejšie charakteristiky. Ďalšie subspektrá popisujú rôzne spektrálne zmeny, každé vďaka vzájomnej ortogonalite obsahuje nezávislé informácie. Rovnako nezávislé informácie obsahuje aj každý člen zo sumy vo vzťahu s inou váhou a od určitého subspektra ide len o šum.

Ak sa obmedzíme na zopár prvých členov a súčet sa líši s pôvodnou sumou o malú chybu, tak získame žiadanú redukciu dát a vylúčime spektrálne zmeny spôsobené šumom. Počet prvých členov, ktoré berieme do úvahy pri redukcii dát, sa nazýva faktorová dimenzia analyzovaných dát. Určujeme ju na základe veľkosti singulárnych hodnôt jednotlivých subspektier. Jednotlivé subspektrá so svojou singulárnou hodnotou majú v nameraných spektrách zastúpenie s váhou danou koeficientom rozkladu (prvky matice \mathbf{V}). Z nich vieme určiť intenzitné zmeny v spektrách.

2.4.5 Metóda ortogonálnych diferencií

Metóda ortogonálnych diferencií sa používa na odčítanie pozadia Ramanových spektier, ktoré je spôsobené šumom alebo signálom zo substrátu. Spočíva v tom, že si definujeme ortogonálnu diferenciu spektra \vec{A}_{OD} voči ortonormálnej báze $\{\vec{O}_r\}_{r=1}^s$:

$$\vec{A}_{OD} = \vec{A} - \sum_{r=1}^s \langle \vec{A}, \vec{O}_r \rangle \vec{O}_r. \quad (2.3)$$

Vektor \vec{A} je neupravené spektrum s m spektrálnymi bodmi. Každý z vektorov \vec{A} a \vec{A}_{OD} môžeme rozložiť na súčet dvoch vektorov, kde jeden z nich predstavuje pozadie (\vec{p}_i) a druhý upravené spektrum (\vec{s}_i):

$$\vec{A}_{OD} = \vec{p}_1 + \vec{s}_1, \quad \vec{A} = \vec{p}_2 + \vec{s}_2. \quad (2.4)$$

Ak spektrum pozadia vieme vyjadriť lineárnou kombináciou ortonormálnej bázy, tak dokážeme toto pozadie odčítať [47]. Na nájdenie vhodnej ortonormálnej bázy je potrebné predpokladať určitý spektrálny tvar pozadia. V našom prípade sme použili k aproximácii tvaru pozadia polynómy druhého alebo tretieho rádu, pri vyšších subspektrách sme rád polynómu zvyšovali.

2.4.6 Ramanove spektrum lipidov

Ramanove spektrum lipidov z depozitu z lipozomálnej suspenzie sme akumulovali v spektrálnom rozsahu 250 až 3400 cm^{-1} , v ktorom sa nachádzajú spektrálne pásy odpovedajúce vibráciám v lipidoch. Túto spektrálnu oblasť je možné rozdeliť na podoblasti 700 - 1800 cm^{-1} a 2500 - 3100 cm^{-1} , ktorých detailná analýza je súčasťou výsledkovej časti.

2.4.7 Pomer intenzít spektrálnych pásov z Ramanových spektier a parameter usporiadania pre laterálne interakcie

Pri teplotne závislých meraniach lipidov a lipidových suspenzií sa v spektrálnej oblasti 2500 - 3100 cm^{-1} výraznejšie mení intenzita spektrálnych pásov a aj dochádza k posunom vo vlnočtoch. Na určenie fázy pri fázovom prechode z gélovej do tekutokryštalickéj fázy sa používajú zmeny pomerov intenzít spektrálnych pásov $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_s(\text{CH}_2)$), $\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_a(\text{CH}_2)$) a $\sim 2935 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_s(\text{CH}_3)$).

V literatúre sa používajú pomery:

- (a) I_{2935}/I_{2850} v práci Levina [48], Wonga a kol. [49], Liddla a Tua [50], Bunowa [51] a Okamuru a kol. [52]. Jamieson a kol. použili tento pomer obrátene ako I_{2950}/I_{2835} pri skúmaní štruktúr mastných kyselín [53].

- (b) I_{2935}/I_{2880} označované $I_{disorder}/I_{order} = I_{neusporiadane}/I_{usporiadane}$ v práci Levina [48], ďalej tento pomer používa O’Leary [54] a Bunow [51] v spolupráci s Levinom, ďalej Yova a kol. [55] a Huang a kol [56].
- (c) I_{2850}/I_{2880} sa používa v prácach O’Learyho a Levina [54] a Bunowa a Levina [51], tiež ho využíva Yova a kol. [55], Lee a Bain [57], Larsson a Rand [58]. V prevrátenej hodnote ako I_{2880}/I_{2850} ho nájdeme v práci Liddla a Tua [50], Okamuru a kol. [52], Gabera a Peticolasa [59].
- (d) I_{3005}/I_{2850} používa Jamieson a kol. u mastných kyselín [53].

Pre mastné kyseliny niektoré pomery závisia lineárne na stupni saturácie (počte C=C väzieb) alebo počte uhlíkov v reťazci [53]. Pri lipidoch sa skúmala závislosť pomeru intenzít na dĺžke acylových reťazcov v práci Huang a kol. [56].

Gaber a Peticolas zavádzajú parametre usporiadania $S_{trans} = S_T$ a $S_{lateral} = S_L$ pre nehomogénne a homogénne suspenzie s priemerom agregátov 25 nm a 40-100 nm lipidu DPPC, DMPC a výťažku z vaječného žĺtka. Parametre sú normalizované tak, že $S = 1$ označuje najvyššie možné usporiadanie a $S = 0$ žiadne usporiadanie, ale nie nutne najnižšie možné.

Trans parameter S_T využíva pomer z oblasti nižších vlnočtov I_{1133}/I_{ref} , kde $I_{ref} = I_{1090}$ alebo $I_{ref} = I_{772}$. Tento parameter udáva kvantitatívny popis priemerného počtu väzieb v *trans* konformácii [59].

Parameter usporiadania pre laterálne interakcie S_L definovaný pomocou pomeru I_{CH_2} [59], využíva spektrálne pásy z oblasti 2500 až 3100 cm^{-1} :

$$S_L = \frac{I_{CH_2} - 0,7}{1,5}, \quad I_{CH_2} = I_{2880}/I_{2850}, \quad (2.5)$$

kde intenzity spektrálnych pásov odpovedajú valenčným vibráciám $\nu_s(\text{CH}_2)$ ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) a $\nu_a(\text{CH}_2)$ ($\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$). Ak je parameter S_L aplikovaný na oblasť, v ktorej je intenzita spektrálneho pásu $\nu_a(\text{CH}_2)$ konštantná, tak získame kvantitatívny odhad pre stupeň laterálnej interakcie [59]. Parameter S_L bol použitý pre suspenziu s multilamelárnymi lipozómami z výťažku z vaječného žĺtka v práci Noothalapatiho a kol. [60].

V tejto práci sme použili pomer I_{2880}/I_{2850} získaný z intenzít pásov zo spektier akumulovaných zo zaschnutých depozitov, pretože spektrálne pásy $\nu_s(\text{CH}_2)$ a $\nu_a(\text{CH}_2)$ boli dobre pozorovateľné vo všetkých vzorkách lipidov. Zároveň sme získané dáta spracovali postupom uvedeným v práci Gabera a Peticolasa [59] pomocou ktorého sme určili parameter laterálneho usporiadania S_L .

Pri depozitoch lipidov sme merali spektrá z obvodového prstenca alebo ak sa prstenec nevytvoril, zo zhlukov po obvode depozitu. Pre depozity z homogénnych

suspenzií s koncentráciou 1 mg/ml sme merali súbor Ramanovych spektier (Ramanova mapa), ktoré pozostávali z akumulácie Ramanovych spektier z vopred vybraných bodov tvoriacich mriežku v obdĺžnikovej oblasti. Túto oblasť sme sa snažili vybrať na každom depozite tak, aby sme do súboru spektier zahrnuli spektrá z celej šírky obvodového prstenca. Pre niektoré depozity sme medzi body zahrnuli aj oblasti zvnútra depozitu (za prstencom smerom do stredu) a zvonku depozitu.

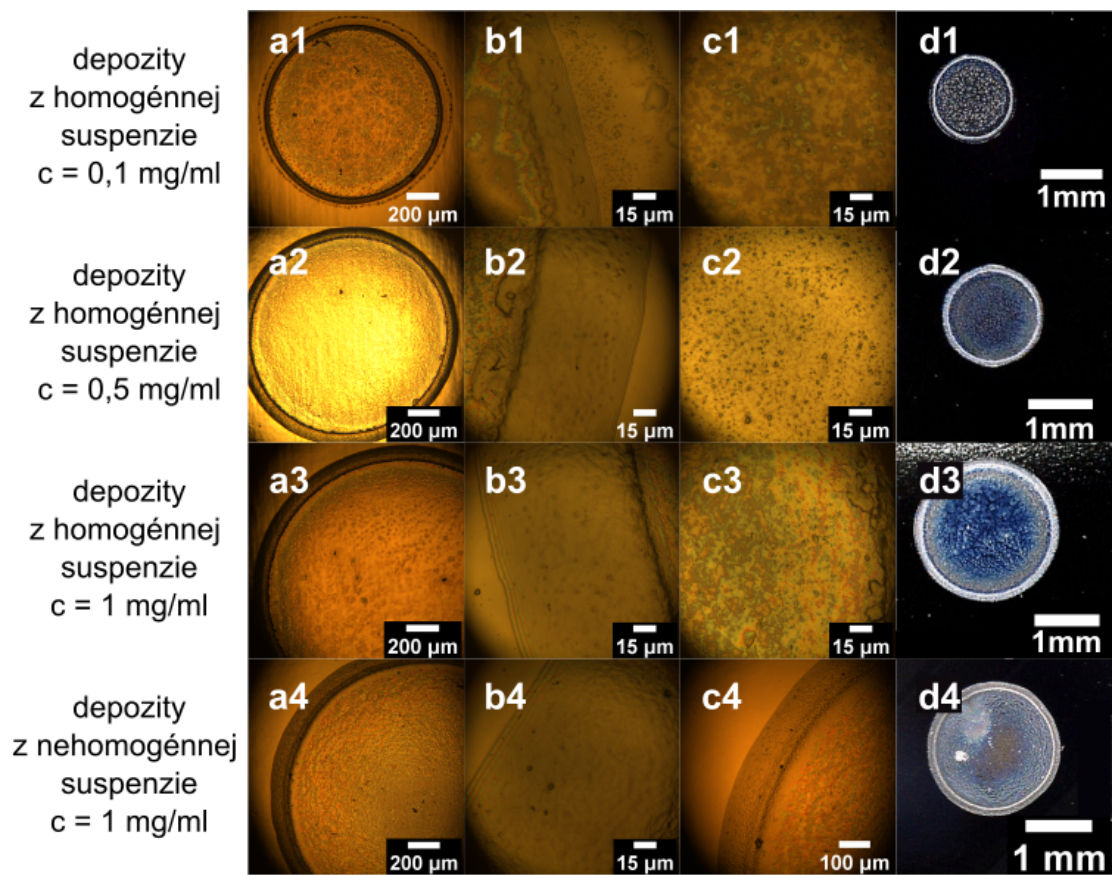
3. Výsledky

3.1 Šírka obvodového prstenca, plocha a vizuálna charakteristika depozitu

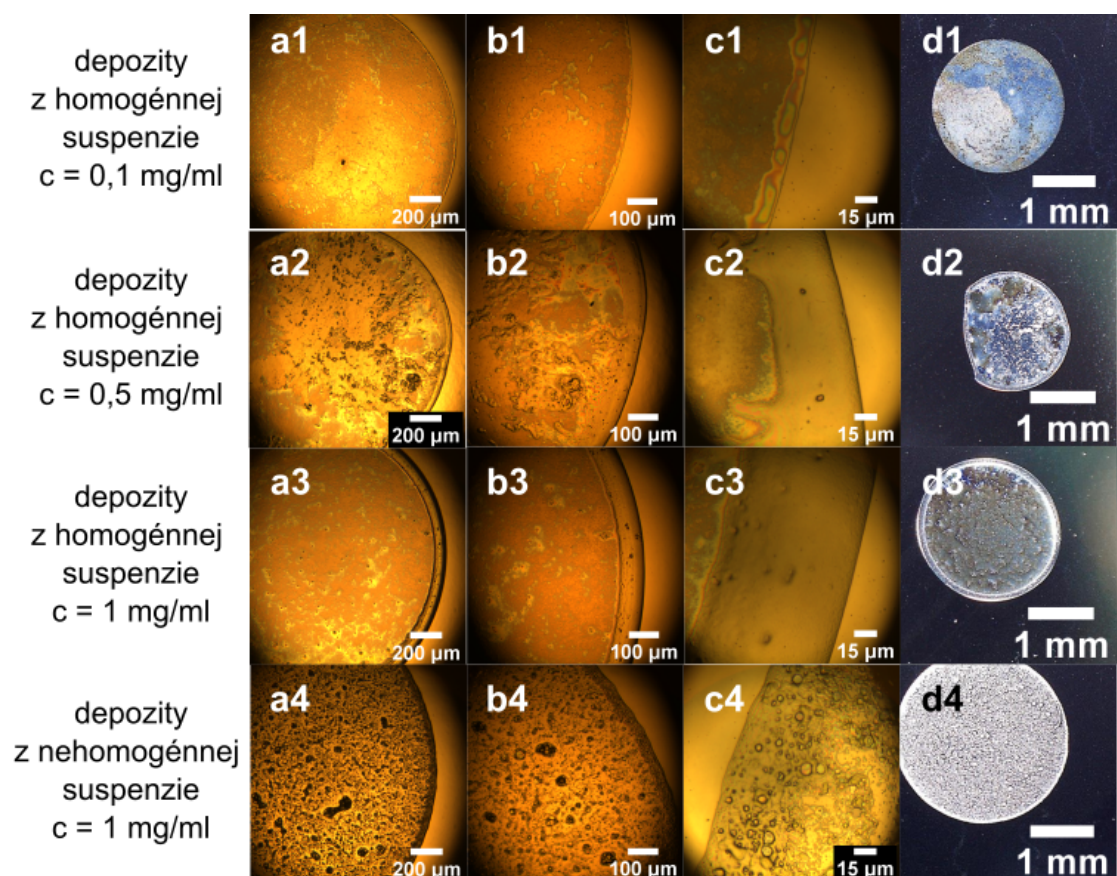
Vo vzorkách pripravených suspenzií lipozómov z výťažku z vaječného žĺtka, výťažku zo sójových bôbov a jednozložkových lipidov DMPS, DMPC, DPPC, 16:1 PC, DOPC a DOPE sme po kvapnutí kvapky a jej následnom vyschnutí pozorovali vzory na depozitoch. Vytvorili sa depozity s efektom kávového krúžku alebo sa lipidy koncentrovali do zhlukov po celej ploche depozitu (Obr.3.2a4, Obr.3.3a4, Obr.3.5a4, Obr.3.6a4). Výnimočne mali zhluky dendrické tvary (Obr.3.4a1) alebo sa časť lipidového materiálu nachádzala okrem obvodového prstenca aj v strede depozitu (Obr.3.3a1, a3). Iné vzory ako sústredné prstence, praskliny, kryštály a pod. sme na depozitoch nepozorovali.

Pri niektorých depozitoch sa počas schnutia skokovo zmenšila kontaktná plocha kvapky so substrátom, preto sme po obvode depozitu pozorovali malé zhluky lipidu (Obr.3.1a1, b1; Obr.3.3d1; Obr.3.4d2; Obr.3.5b1, b2, b3).

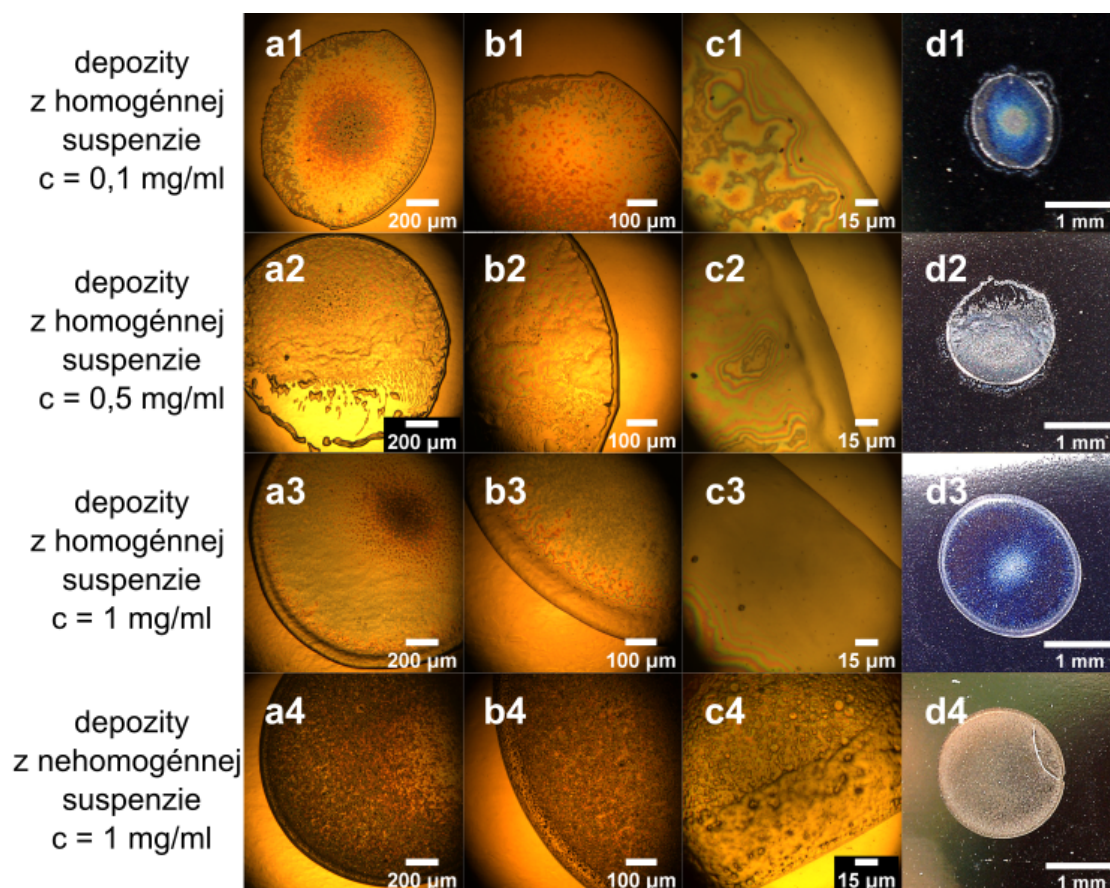
Na vzhľade depozitu sa výraznejšie prejavovala zmena homogenity pri rovnakej koncentrácii ako zmena koncentrácie pri depozitoch z homogénnych suspenzií. Pri zmene koncentrácie homogénnej suspenzie sa menila šírka obvodového prstenca a plocha depozitu, ale celkový vzor ostával podobný. Depozity z homogénnych suspenzií boli s efektom kávového krúžku až na DOPE, kde sme pozorovali rovnomernejšie rozloženie lipidového materiálu po celej ploche depozitu (Obr.3.6). Pri depozitoch z nehomogénnych suspenzií bolo časté rozloženie lipidového materiálu vo forme zhlukov po celej ploche depozitu, hoci sa z homogénnej suspenzie toho istého lipidu vytvoril depozit s efektom kávového krúžku (Obr.3.2, Obr.3.3, Obr.3.5, Obr.3.6, Obr.3.7).



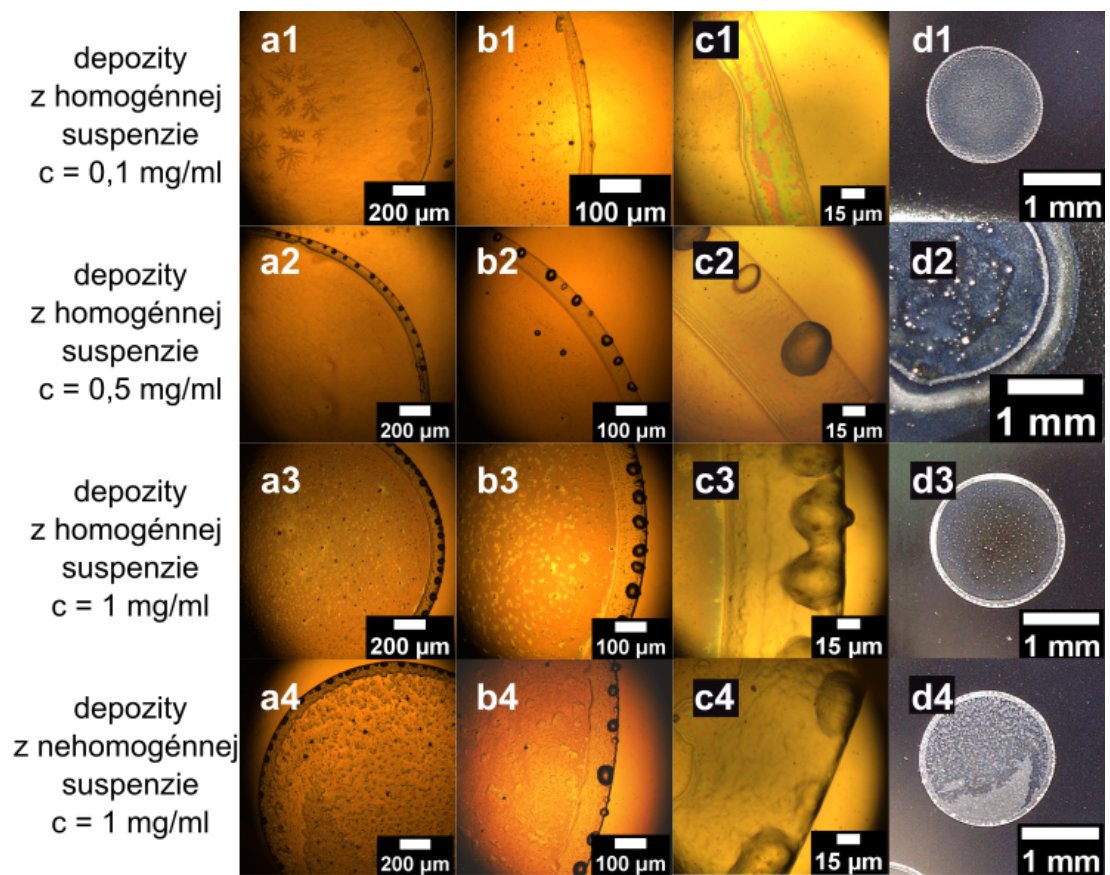
Obr. 3.1: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DMPS z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



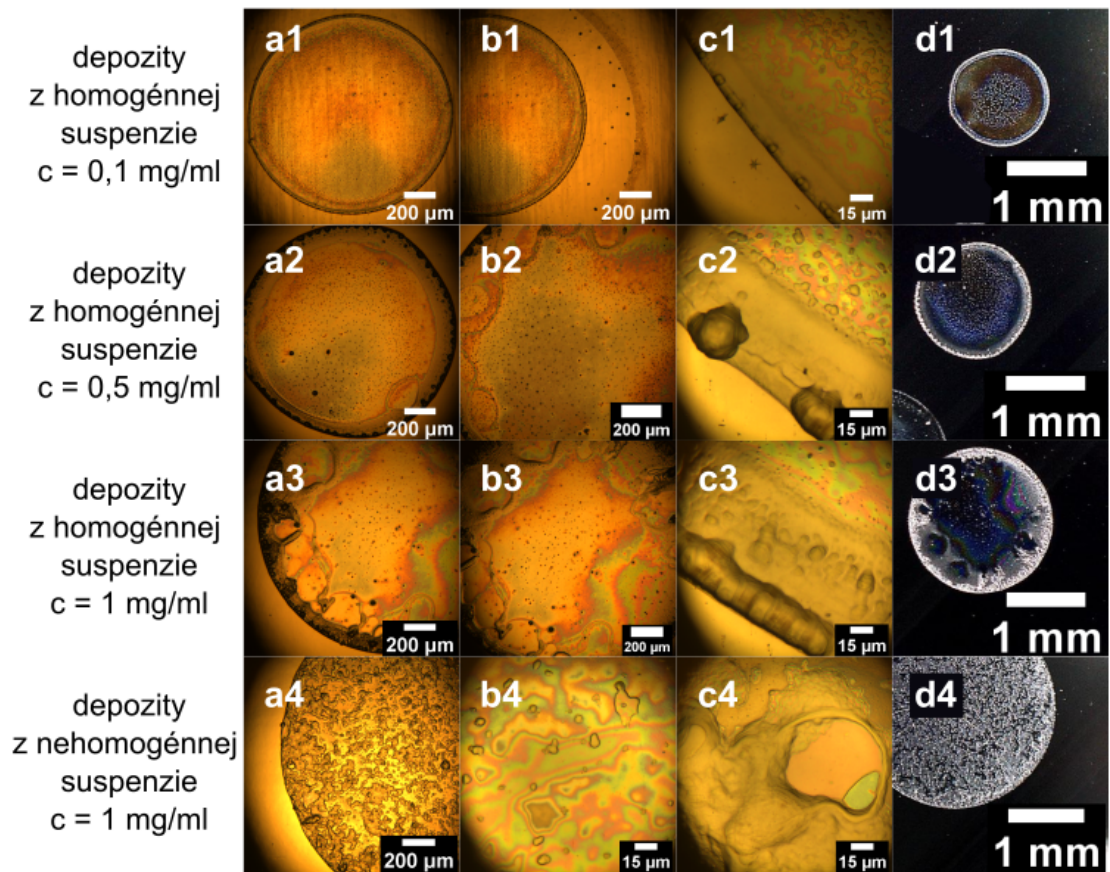
Obr. 3.2: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DMPC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



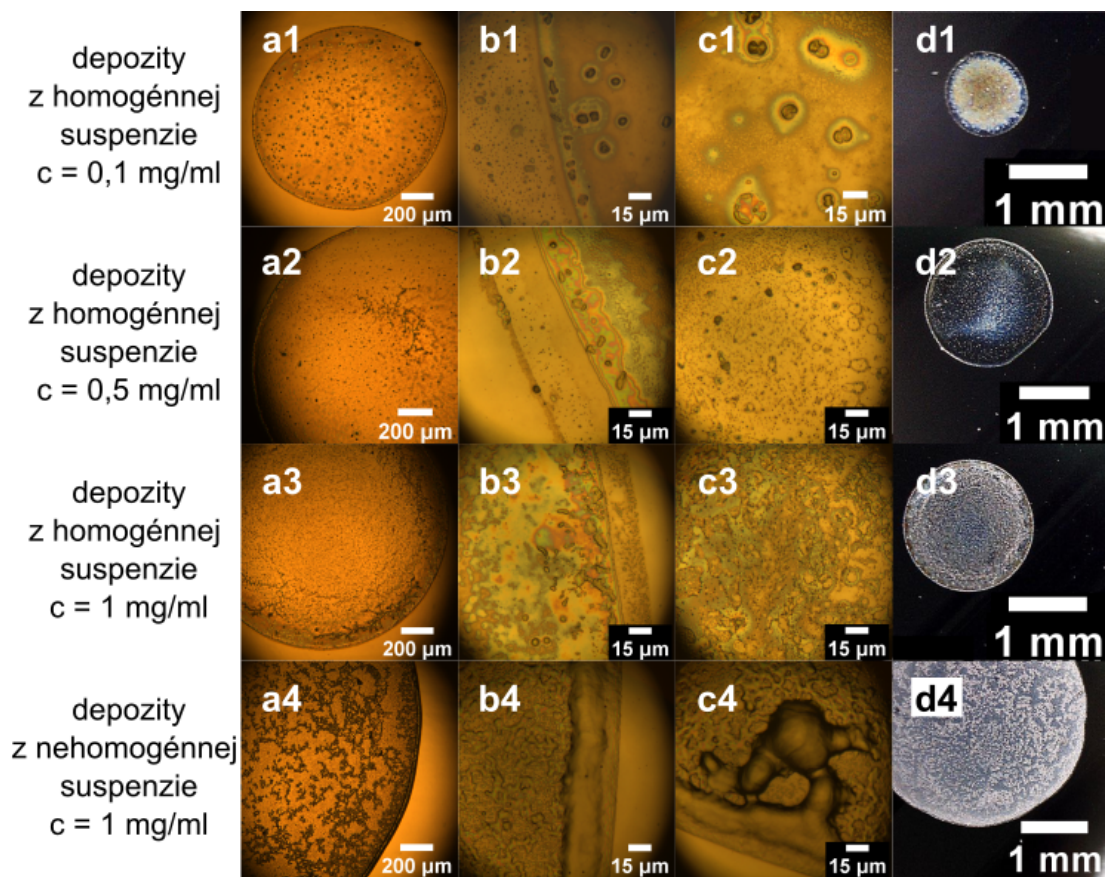
Obr. 3.3: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DPPC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



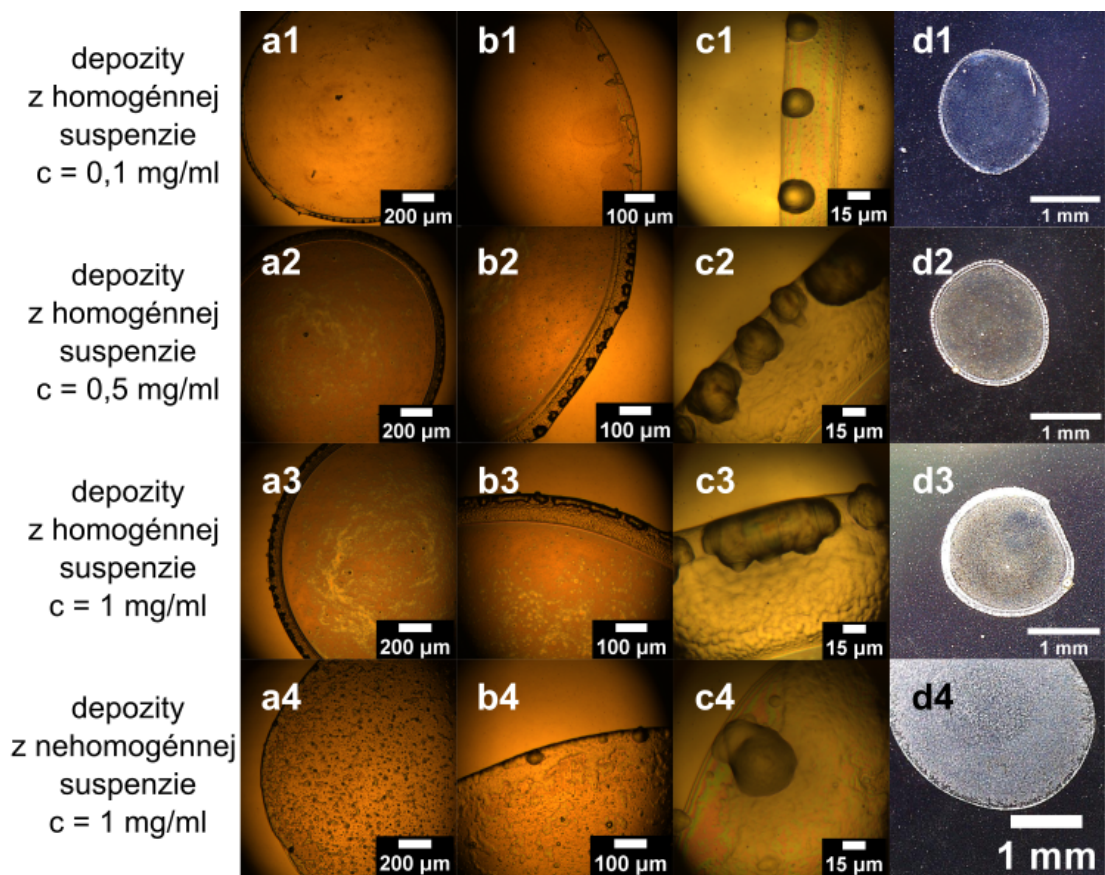
Obr. 3.4: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z 16:1 PC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



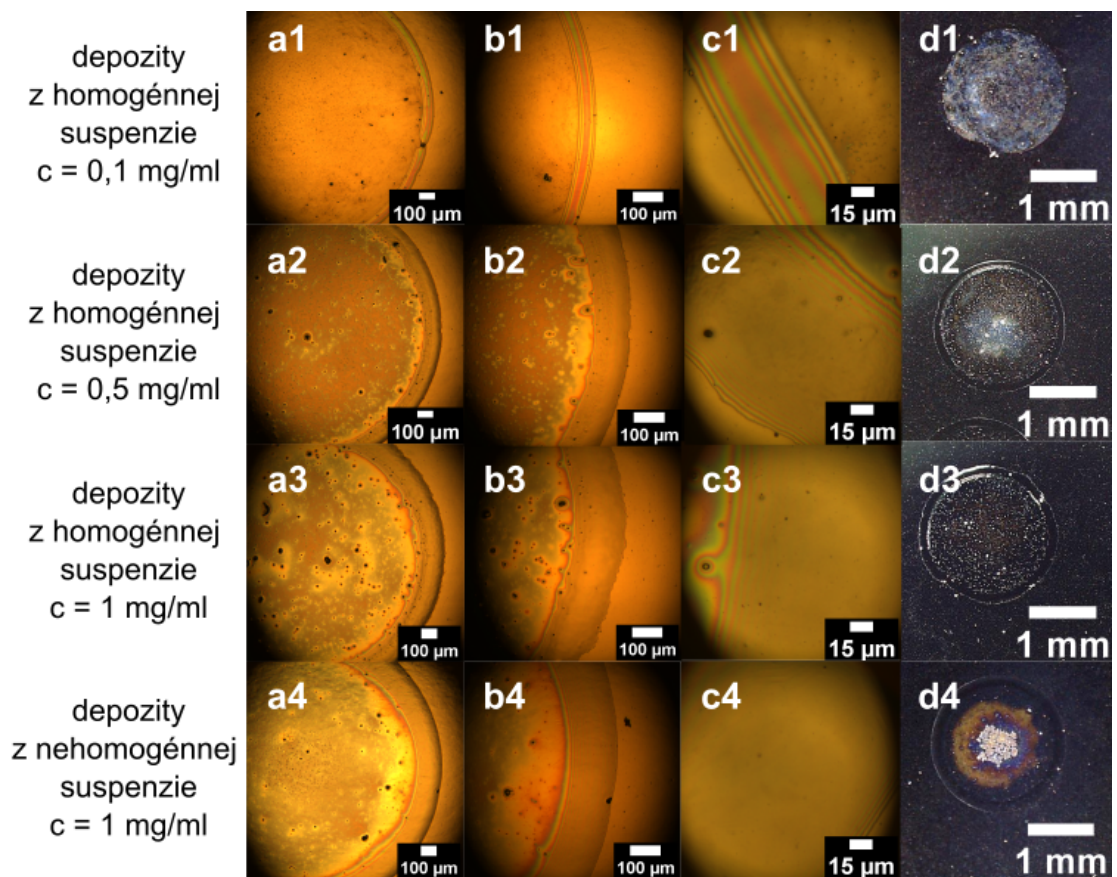
Obr. 3.5: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DOPC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



Obr. 3.6: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DOPE z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



Obr. 3.7: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z výťažku z vaječného žltka z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).



Obr. 3.8: Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z výťažku zo sójových bôbov z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).

3.1.1 Obvodový prstenec

Efekt kávového krúžku je dobre pozorovateľný pri depozitoch z homogénnych suspenzií DMPS, všetkých jednozložkových PC lipidov (DMPC, DPPC, 16:1 PC, DOPC) a oboch výťažkov. Depozity lipidu DOPE sa odlišujú od depozitov PS a PC lipidov: pri depozitoch z homogénnych suspenzií sa nevytvárali súvislé prstence, skôr išlo o zhluky lipidov po obvode depozitu (Obr.3.6b1, b2, b3).

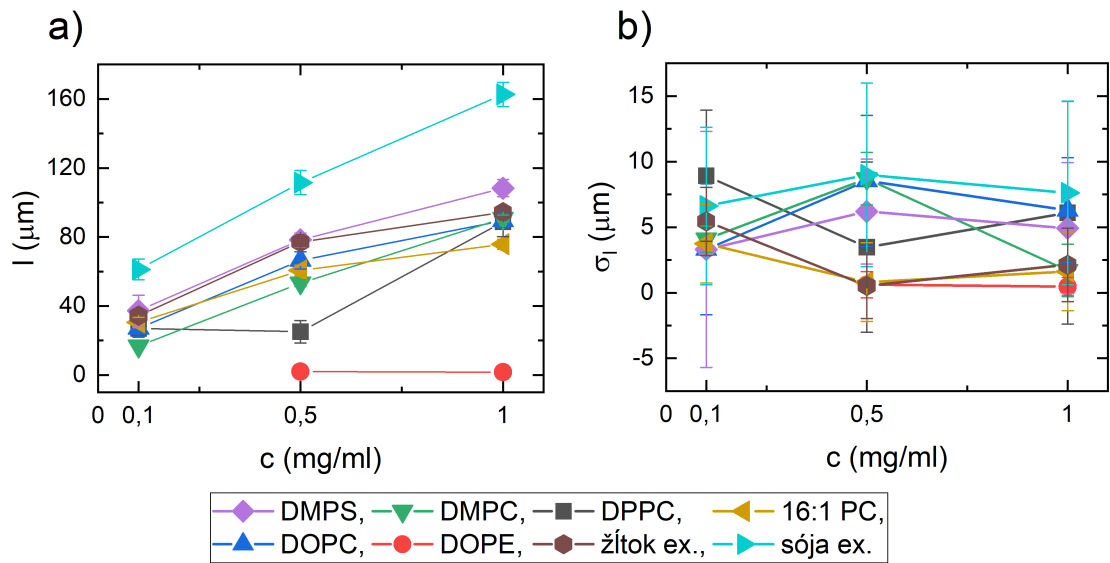
Depozity z nehomogénnych suspenzií majú obvodový prstenec najmenej vizuálne odlišný od obvodového prstenca depozitov z homogénnych suspenzií pri DMPS (Obr.3.1) a pri výťažku zo sójových bôbov (Obr.3.8). Pri PC lipidoch majú depozity z nehomogénnych suspenzií prstence s nejasne definovaným vnútorným okrajom (DMPC, Obr.3.2b4, c4) alebo je prstenec tvorený lipidovými zhlukmi na okraji depozitu (DPPC, Obr.3.3; DOPC, Obr.3.5; výťažok z vaječného žltka, Obr.3.7). Ak je prstenec depozitu z nehomogénnej suspenzie podobný tomu z homogénnej, tak je širší a vnútorný okraj je nepravidelnejší (16:1 PC, Obr.3.4c3, c4). Depozit z nehomogénnej suspenzie lipidu DOPE bol s efektom kávového krúžku, ale po jeho obvode sa nepravidelne vyskytovali zhluky lipidov (Obr.3.6b4, c4).

Pri depozitoch z homogénnych suspenzií sme merali šírku prstenca pre tri koncentrácie lipidov v suspenzii (0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml, presné hodnoty v prílohe, Tab.??) a s rastúcou koncentráciou šírka prstenca l rástla alebo bola v rámci chyby merania konštantná pri DPPC a DOPE (Obr.3.9a, Tab.??). Pri depozitoch DOPE z homogénnej suspenzie s $c = 0,1$ mg/ml sa žiaden prstenec nevytvoril, pri depozitoch z homogénnych koncentrácií s $c = 0,5$ mg/ml a 1 mg/ml bola šírka prstenca do $2 \mu\text{m}$, čo je o rád menej ako u ostatných lipidov. Najväčšiu priemernú šírku prstenca pre depozity z homogénnej suspenzie mal sójový výťažok (Obr.3.9a) s hodnotami $l_{0,1-H}(\text{sója}) = (61 \pm 6) \mu\text{m}$; $l_{0,5-H}(\text{sója}) = (112 \pm 7) \mu\text{m}$; $l_{1-H}(\text{sója}) = (163 \pm 7) \mu\text{m}$ (Tab.??). Depozit z homogénnej suspenzie sójového výťažku s koncentráciou 1 mg/ml mal širší prstenec ako depozit z nehomogénnej suspenzie (Obr.3.9a).

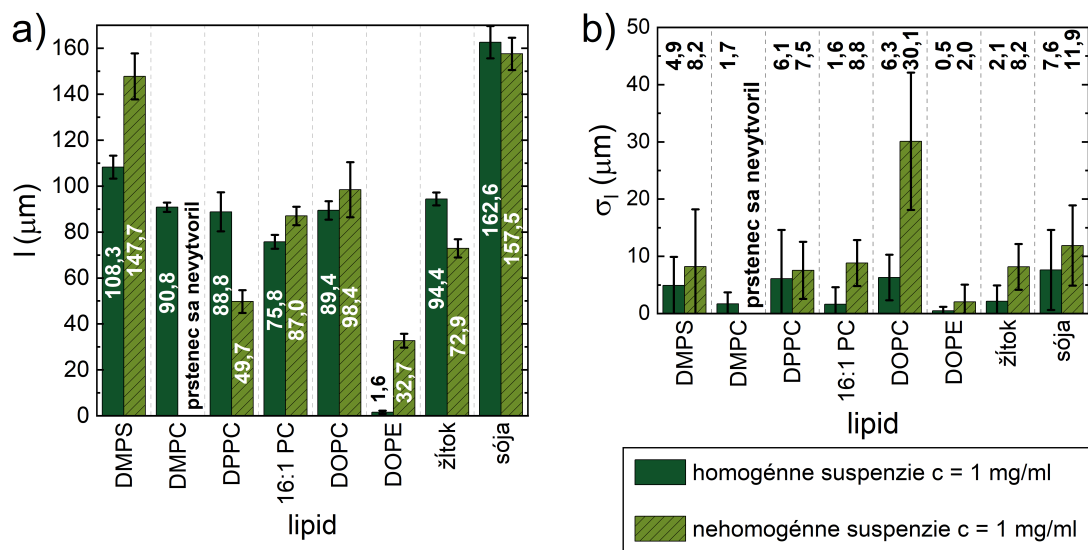
Pri porovnaní šírky prstenca depozitov z nehomogénnej a homogénnej suspenzie s rovnakou koncentráciou 1 mg/ml sme zistili, že väčšina jednozložkových lipidov (DMPS, 16:1 PC, DOPC, DOPE) vytvorila širšie prstence pri depozite z nehomogénnej suspenzie (Obr.3.10a). V prípade zmesí lipidov (výťažok zo sójových bôbov a výťažok z vaječného žltka) a DPPC boli prstence širšie v depozitoch z homogénnych suspenzií.

V rámci porovnania štandardných odchýlok šírky prstenca σ_l homogénnych suspenzií s rôznymi koncentraciami (Obr.3.9b), hodnoty σ_l sa pohybujú medzi hodnotou $(0,54 \pm 2,5) \mu\text{m}$ (výťažok z vaječného žltka pre $c = 0,5$ mg/ml) a hodnotou $(9,0 \pm 7,0) \mu\text{m}$ (výťažok zo sójových bôbov pre $c = 0,5$ mg/ml). V rámci chyby určenia σ_l sa odchýlky pre rôzne koncentrácie daného lipidu nelíšia.

Pri porovnaní štandardnej odchýlky šírky prstenca depozitov z nehomogénnej



Obr. 3.9: a) Závislosť priemernej šírky prstenca l na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie. b) Štandardná odchýlka šírky prstenca σ_l v závislosti na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie.



Obr. 3.10: a) Porovnanie priemernej šírky prstenca l . b) Porovnanie štandardnej odchýlky σ pre depozity z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml.

a homogénnej suspenzie s rovnakou koncentráciou 1 mg/ml je vidieť, že najväčšiu štandardnú odchýlku (30 ± 12) μm mal depozit z nehomogénnej suspenzie DOPC s $c = 1$ mg/ml. Depozity z nehomogénnych suspenzií mali šírku obvodového prstenca viac variabilnú a štandardná odchýlka je väčšia (Obr.3.10). Pri niektorých depozitoch sa šírka prstenca natolko mení, že depozit nepovažujeme za depozit s efektom kávového krúžku.

Depozity lipidov, ktoré mali aspoň jednu dvojitú väzbu v acylových reťazcoch a cholínovú (PC) alebo etanolamínovú (PE) hlavičku, mali na obvodových prstencoch pozorovateľné iné formy lipidových zhlukov, okom odlišiteľné od zvyšku prstenca (16:1 PC, Obr.3.4; DOPC, Obr.3.5; DOPE, Obr.3.6; výťažok z vaječného žĺtka). Pri PC lipidoch so saturevanými acylovými reťazcami (DMPC a DPPC), DMPS a pri výťažku zo sójových bôbov, ktorý obsahoval 45,7 % podiel PC lipidov a zvyšné lipidy mali iné hlavičky (Tab.2.1a), tieto iné formy lipidových zhlukov na prstencoch nepozorujeme.

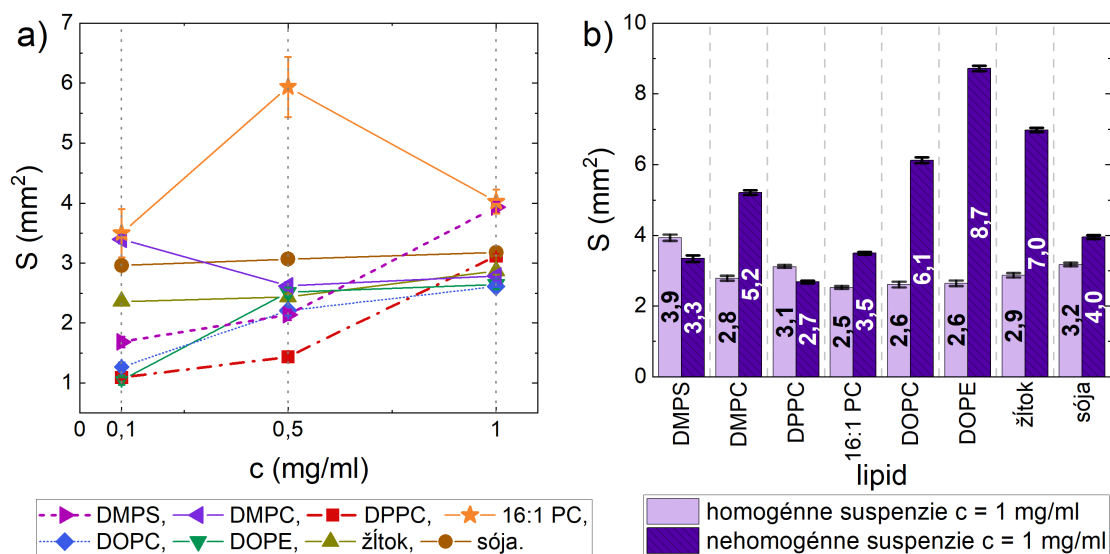
3.1.2 Plocha depozitu

S rastúcou koncentráciou pôvodnej homogénnej suspenzie c výrazne rastie plocha depozitu S pre jednozložkové lipidy DMPS, DPPC, DOPC, DOPE (presné hodnoty v prílohe, Tab.??). Pre zmesi lipidov (výťažok z vaječného žĺtka, výťažok zo sójových bôbov) rastie S v závislosti na c pomalšie, ich depozity z homogénnych suspenzií si boli veľkosťou podobné (Obr.3.11a). V prípade lipidu 16:1 PC bola plocha depozitu z homogénnej suspenzie s $c = 0,5$ mg/ml výrazne väčšia ($5,94 \pm 0,02$ mm²) ako plochy ostatných depozitov lipidu 16:1 PC a depozitov z homogénnych suspenzií ostatných vzoriek.

V prípade DOPE, väčšiny jednozložkových PC lipidov a pri lipidových zmesiach bola plocha depozitu z nehomogénnej suspenzie väčšia (Obr.3.11b). Zároveň najvýraznejší rozdiel medzi plochou depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie sme pozorovali pri depozitoch DOPE (Obr. 3.6d3, d4), pri ktorých sa plocha zmenila o ($6,08 \pm 0,08$) mm², a pri depozitoch z vaječného výťažku (Obr. 3.7d3, d4), pri ktorých rozdiel dosiahol ($4,11 \pm 0,06$) mm². Pre depozity lipidov DPPC a DMPS bola plocha depozitu z nehomogénnej suspenzie menšia ako plocha depozitu z homogénnej (Obr.3.11b). Pri DPPC sme pozorovali najmenší rozdiel ($(0,44 \pm 0,03)$ mm²) vo veľkosti plochy medzi depozitmi z homogénnej a nehomogénnej suspenzie.

3.1.3 Vizuálna charakteristika depozitov

Pri výťažku z vaječného žĺtka sa v depozite z homogénnej suspenzie s koncentráciou 0,1 mg/ml vytvorili po obvode malé zhluky lipidu (Obr.3.7c1), ktoré sa s rastúcou koncentráciou homogénnej suspenzie zväčšovali a vytvárali sa viac po



Obr. 3.11: a) Závislosť priemernej plochy depozitu S na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie. b) Porovnanie priemernej plochy depozitu S pre depozity z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml.

vonkajšom obvode prstenca (Obr.3.7c2, c3). Depozit z nehomogénnej suspenzie mal lipidové zhluky najviac sústredené po obvode, ale vyskytovali sa po celej ploche depozitu (Obr.3.7a4, b4). Depozity z homogénnych suspenzií mali vnútorný okraj prstenca dobre definovaný. Pri depozitoch z nehomogénnych suspenzií bola šírka prstenca variabilná a celkovo bol prstenec užší ako pri depozite z homogénnej suspenzie s koncentráciou 1 mg/ml.

Homogénne aj nehomogénne suspenzie sójového výťažku zasychali do približne rovnako veľkých depozitov, vnútri ktorých sa vyskytovali zhluky lipidového materiálu. Depozity z homogénnych suspenzií mali vnútri prstenca lipidový materiál rovnomerne rozdelený po celej ploche, prípadne sa vyskytli v oblasti okolo stredu (napr. pri $c = 0,5$ mg/ml Obr.3.8d2). Pri depozite z nehomogénnej suspenzie sójového výťažku sa lipidový materiál okrem prstenca skoncentroval aj do stredu (Obr.3.8d4). Pri depozitoch z homogénnych suspenzií pozorujeme, že s rastúcou koncentráciou homogénnej suspenzie rastie šírka prstenca l a pre všetky koncentrácie bola najväčšia zo všetkých vzoriek (Obr.3.9a).

Všetky suspenzie lipidu DPPC vytvárali prstence, ktoré boli súvislé po celom obvode kvapiek. Pre $c = 0,1$ mg/ml bola šírka obvodového prstenca viac variabilná ako pre $c = 0,5$ mg/ml a 1 mg/ml pri depozitoch z homogénnych suspenzií. Pri porovnaní depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml (Obr.3.3, Obr.3.10) vidíme, že depozit z homogénnej suspenzie vytvoril širší obvodový prstenec ako depozit z nehomogénnej. Štruktúra prstenca z nehomogénnej

suspenzie je na pohľad pórovitá, homogénne suspenzie vytvorili depozity s hladkým prstencom. Šírka prstenca z nehomogénnej suspenzie sa nedala dobre zmerať, vnútorný okraj nebol jednoznačne určený.

Homogénna suspenzia DOPE s $c = 0,1$ mg/ml vytvorila nesúvislý prstenec s roztrúsenými čiastočkami lipidu na vonkajšej strane prstenca (Obr.3.6b1). Podobný vzhľad okraja prstenca sme nachádzali pri depozitoch z homogénnych suspenzií s $c = 0,5$ mg/ml a 1 mg/ml (Obr.3.6b2, b3), avšak bol viditeľný len pri zväčšení objektívu mikroskopu $\times 50$. Pri depozite z nehomogénnej suspenzie DOPE vonkajšie zhluky lipidu nepozorujeme (Obr.3.6b4). Vnútro depozitov z homogénnych suspenzií pokrývali zhluky lipidu, ktoré sa s rastúcou koncentráciou zmenšovali a vytvárali kruhové útvary, ktoré sa napokon spájali do povrazcovitých lipidových zhlukov. Tie boli najvýraznejšie pri depozite získanom z nehomogénnej suspenzie DOPE (Obr.3.6a4). Depozity DOPE z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml sa okrem prítomnosti vonkajších čiastočiek lipidu líšili aj v obvodovom prstenci: pri depozite z homogénnej suspenzie bol prstenec veľmi tenký ($1,6 \pm 0,7$) μm a pri depozite z nehomogénnej suspenzie dvadsaťkrát širší. Tento rozdiel pri DOPE je v porovnaní s inými vzorkami (Obr.3.10a) tretí najvýraznejší. Rozdiel v ploche depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie je najväčší spomedzi všetkých vzoriek.

Pre depozity z homogénnych suspenzií DOPC s rastúcou koncentráciou homogénnej suspenzie rástla aj šírka prstenca a plocha depozitu. Po vonkajšom obvode prstenca sa vytvárali zhluky lipidu, ktoré sa s rastúcou koncentráciou zväčšovali a pri $c = 1$ mg/ml sa spájali dohromady (Obr.3.6c1, c2, c3.). Depozit z homogénnej suspenzie s $c = 0,1$ mg/ml mal vo vzdialenosti 230 až 330 μm od vonkajšieho okraja depozitu čiastočky lipidu (Obr.3.6b1). Pre depozity z homogénnych suspenzií s $c = 0,5$ mg/ml a $c = 1$ mg/ml sme vonkajšie čiastočky okolo depozitov nepozorovali. Pri depozite z nehomogénnej suspenzie sa vytvoril obvodový prstenec s veľmi variabilnou šírkou (Obr.3.10b), depozit bol výrazne väčší ako depozit z homogénnej suspenzie (Obr.3.11b).

Depozit lipidu DMPC pre koncentráciu 0,1 mg/ml z homogénnej suspenzie mal veľmi nesúvislý prstenec a takmer dokonalý sférický tvar (Obr.3.2a1, b1, c1, d1). Pre vyššie koncentrácie pôvodnej homogénnej suspenzie boli depozity menej súmerné a obvodové prstence už mali výraznejšie (Obr.3.2). Pre nehomogénnu suspenziu DMPC s koncentráciou 1 mg/ml sa obvodový prstenec na depozite nedal určiť. Depozit mal sférický tvar, jasne ohraničený vonkajší okraj, ale vnútorný okraj sa už nedal pri väčšom priblížení stanoviť jednoznačne (Obr.3.2b4, c4).

Podobne ako pri depozite DOPE z homogénnej suspenzie s $c = 0,1$ mg/ml, tak aj pri depozite z homogénnej suspenzie DMPS s $c = 0,1$ mg/ml sa za okrajom depozitu vytvorili zhluky lipidov (Obr.3.1). Pri depozitoch z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,5 a 1 mg/ml sme tieto vonkajšie čiastočky nepozorovali.

Depozit z homogénnej suspenzie mal oproti depozitu z nehomogénnej prstenec užší o $(40 \pm 10) \mu\text{m}$, čo je druhý najväčší rozdiel v šírke prstenca depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie spomedzi všetkých vzoriek. Spolu s DPPC je lipid DMPS výnimkou v rozmere plôch depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s $c = 1 \text{ mg/ml}$, pretože depozit z homogénnej suspenzie má väčšiu plochu.

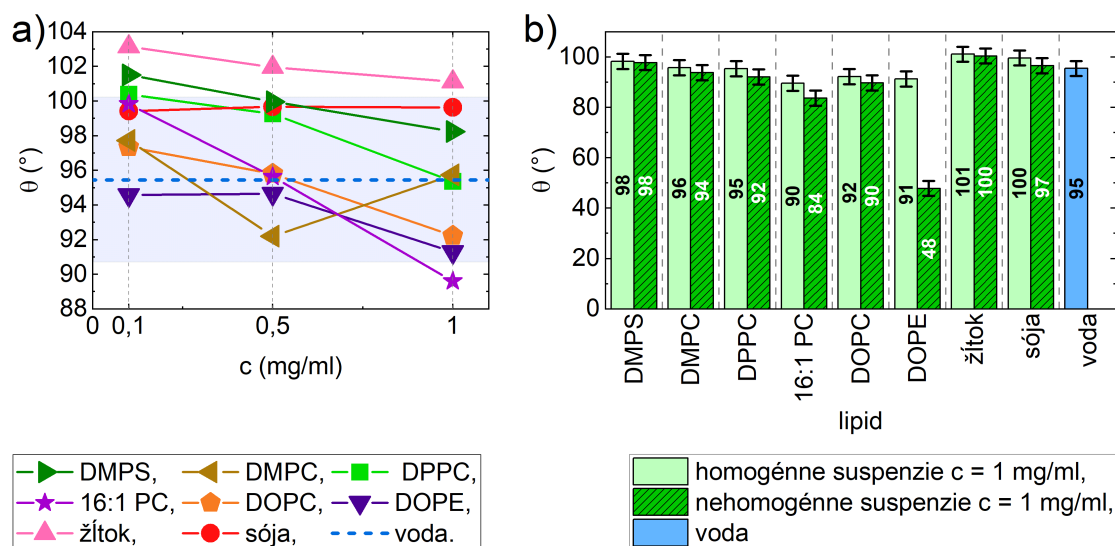
3.2 Statické kontaktné uhly

Pomocou programu Solarius Wettability sme podľa (1.9) určili priemerný statický kontaktný uhol θ substrátu $\mu\text{RIM}^{\text{TM}}$ a kvapky z homogénnych suspenzií s $c = 0,1 \text{ mg/ml}$, $0,5 \text{ mg/ml}$ a 1 mg/ml a z nehomogénnych suspenzií s $c = 1 \text{ mg/ml}$. Okrem vzoriek suspenzií lipozómov sme merali aj statický kontaktný uhol denaturovanej deionizovanej vody na substráte μRIM , ktorý bol $\theta = (95 \pm 3)^\circ$.

V rámci chyby merania $\pm 3^\circ$ sa hodnoty kontaktných uhlov homogénnych suspenzií pre tri koncentrácie nelíšia od kontaktného uhla vody (Obr.3.12a). Najvyššie hodnoty kontaktného uhla dosahujú kvapky homogénnej suspenzie výťažku z vaječného žĺtka, avšak rozdiel oproti ostatným lipidom je len v jednotkách stupňov (Tab.3.1).

Kvapky homogénnej a nehomogénnej suspenzie s koncentraciami 1 mg/ml všetkých vzoriek okrem DOPE nevykazovali veľké rozdiely v kontaktných uhloch. V prípade suspenzií DOPE bol rozdiel v kontaktnom uhle kvapiek homogénnej a nehomogénnej suspenzie až $43 \pm 3^\circ$ (Obr.3.12b, Tab.3.1b). Zo všetkých vzoriek depozit z nehomogénnej suspenzie DOPE mal najväčšiu plochu $(8,72 \pm 0,08) \text{ mm}^2$, takže najviac zmáčal substrát $\mu\text{RIM}^{\text{TM}}$. Môže to byť spôsobené tým, že DOPE má etanolamínovú hlavičku a tak ako veľa PE lipidov, vo vodnom roztoku samovoľne vytvára invertovanú hexagonálnu fázu. Pri invertovaných fázach vznikajú agregáty, ktoré majú hydrofóbne acylové reťazce smerom von k rozpúšťadlu a teda aj viac zmáčajú hydrofóbny substrát.

Ak porovnáme kontaktné uhly homogénnych a nehomogénnych suspenzií s plochami depozitov, tak zistíme, že len v prípade DOPE je takáto veľká súvislosť. Napr. depozit z nehomogénnej suspenzie výťažku z vaječného žĺtka vytvoril väčší depozit ako z homogénnej suspenzie pri $c = 1 \text{ mg/ml}$ (Obr.3.11b), ale kontaktné uhly oboch druhov jeho suspenzií sa v rámci chyby merania zhodujú ($101 \pm 3^\circ$, $100 \pm 3^\circ$, Obr.3.12b). V tejto práci sme mali len jeden PE lipid, takže porovnanie zmáčavosti $\mu\text{RIM}^{\text{TM}}$ substrátu PE lipidmi s ostatnými druhmi lipidov si vyžaduje ďalšie štúdium.



Obr. 3.12: a) Závislosť priemerného statického kontaktného uhla θ od koncentrácie homogénnej suspenzie lipozómov c . Chyba určenia statického kontaktného uhla bola 3° , vyznačená len pre vodu modrým pásom. b) Porovnanie priemerného statického kontaktného uhla θ vody, homogénnych a nehomogénnych suspenzií lipozómov s koncentráciou $c = 1$ mg/ml.

Tabuľka 3.1: Priemerné statické kontaktné uhly θ pre homogénne (H) a nehomogénne (N) suspenzie lipozómov s koncentraciami c .

(a) Zmesi lipidov a jednozložkové lipidy DPPC a 16:1 PC.

c (mg/ml)	$\theta_{\text{soja}} (^\circ)$	$\theta_{\text{žltok}} (^\circ)$	$\theta_{\text{DPPC}} (^\circ)$	$\theta_{\text{16:1 PC}} (^\circ)$
0,1 (H)	99 ± 3	103 ± 3	100 ± 3	100 ± 3
0,5 (H)	100 ± 3	102 ± 3	99 ± 3	96 ± 3
1 (H)	100 ± 3	101 ± 3	95 ± 3	90 ± 3
1 (N)	100 ± 3	100 ± 3	92 ± 3	84 ± 3

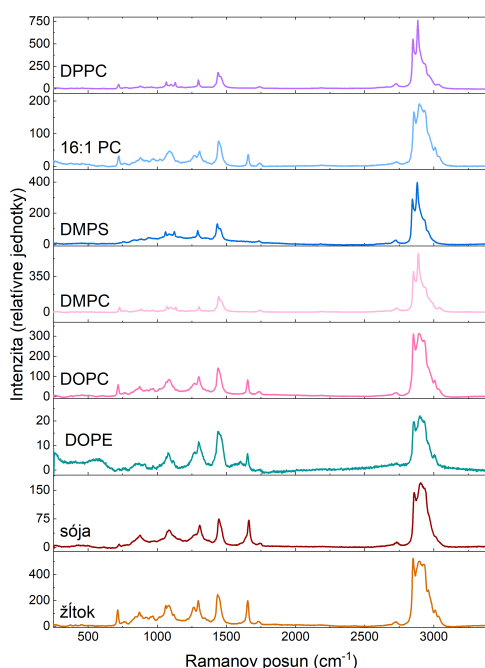
(b) Jednozložkové lipidy DOPE, DOPC, DMPC, DMPS.

c (mg/ml)	$\theta_{\text{DOPE}} (^\circ)$	$\theta_{\text{DOPC}} (^\circ)$	$\theta_{\text{DMPC}} (^\circ)$	$\theta_{\text{DMPS}} (^\circ)$
0,1 (H)	95 ± 3	97 ± 3	98 ± 3	102 ± 3
0,5 (H)	95 ± 3	96 ± 3	92 ± 3	100 ± 3
1 (H)	91 ± 3	90 ± 3	96 ± 3	98 ± 3
1 (N)	48 ± 3	90 ± 3	94 ± 3	98 ± 3

3.3 Charakterizácia Ramanových spektier

Ramanove spektrá lipidov majú výrazné pásy v oblasti od 700 do 1800 cm^{-1} a v oblasti 2700 až 3100 cm^{-1} (Obr.3.13). Vo vyschnutých depozitoch sa neobjavujú spektrálne pásy prislúchajúce vode.

Spektrá z depozitov z homogénnych suspenzií s koncentráciou 1 mg/ml mali vyššiu intenzitu ako spektrá z depozitov z homogénnych suspenzií s nižšími koncentraciami, vlnočty jednotlivých pásov sa nelíšia (Obr.3.13). Rovnako je to v prípade spektier získaných z depozitov z homogénnej a z nehomogénnej suspenzie, líšia sa len intenzitou, ktorá je v prípade depozitov z nehomogénnych suspenzií vyššia, a nelíšia sa vlnočtami jednotlivých pásov.



Obr. 3.13: Porovnanie spektrálneho intervalu 250 až 3400 cm^{-1} Ramanových spektier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentráciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií.

V ďalšom texte podrobne interpretujeme spektrá len z depozitov z homogénnej suspenzie s koncentráciou 1 mg/ml. Spektrá zo všetkých koncentrácií a oboch typov suspenzie pre každú vzorku sú v prílohe. Priradenie vibrácií k jednotlivým spektrálnym pásom rozoberieme najprv v spektrálnom intervale 700 až 1800 cm^{-1} a potom v spektrálnom intervale 2700 až 3100 cm^{-1} .

3.3.1 Spektrálny interval 700 až 1800 cm^{-1}

Spektrálny interval 700 až 1800 cm^{-1} pozostáva z oblastí, ktoré odpovedajú rôznym vibráciám v lipidoch:

I) 700 - 1000 cm^{-1} :

- 711 - 719 cm^{-1} : oblasť symetrických C-N valenčných vibrácií v skupine $-\text{N}^+(\text{CH}_3)$ v cholínovej hlavičke (PC lipidy) - $\nu_s(\text{C-N})$ [24, 48, 61, 62],
- $\sim 760 \text{ cm}^{-1}$: valenčné vibrácie etanolamínovej skupiny v hlavičke (PE lipidy) - $\nu(\text{H-N})$ [24].
- $\sim 875 \text{ cm}^{-1}$: oblasť antisymetrických valenčných vibrácií skupiny $-\text{N}^+(\text{CH}_3)$ v cholínovej hlavičke (PC lipidy) - $\nu_a(\text{C-N})$ [24, 48, 62],
- 887- 892 cm^{-1} : kyvadlové vibrácie CH_3 skupiny v acylovom reťazci ($\rho(\text{CH}_3)$) a valenčné vibrácie C-C ($\nu(\text{C-C})$) [61, 62],
- 960 - 973 cm^{-1} : oblasť symetrických a antisymetrických valenčných vibrácií C-N v skupine $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ v cholínovej hlavičke (PC lipidy) - $\nu_s(\text{C-N})$, $\nu_a(\text{C-N})$ [63].

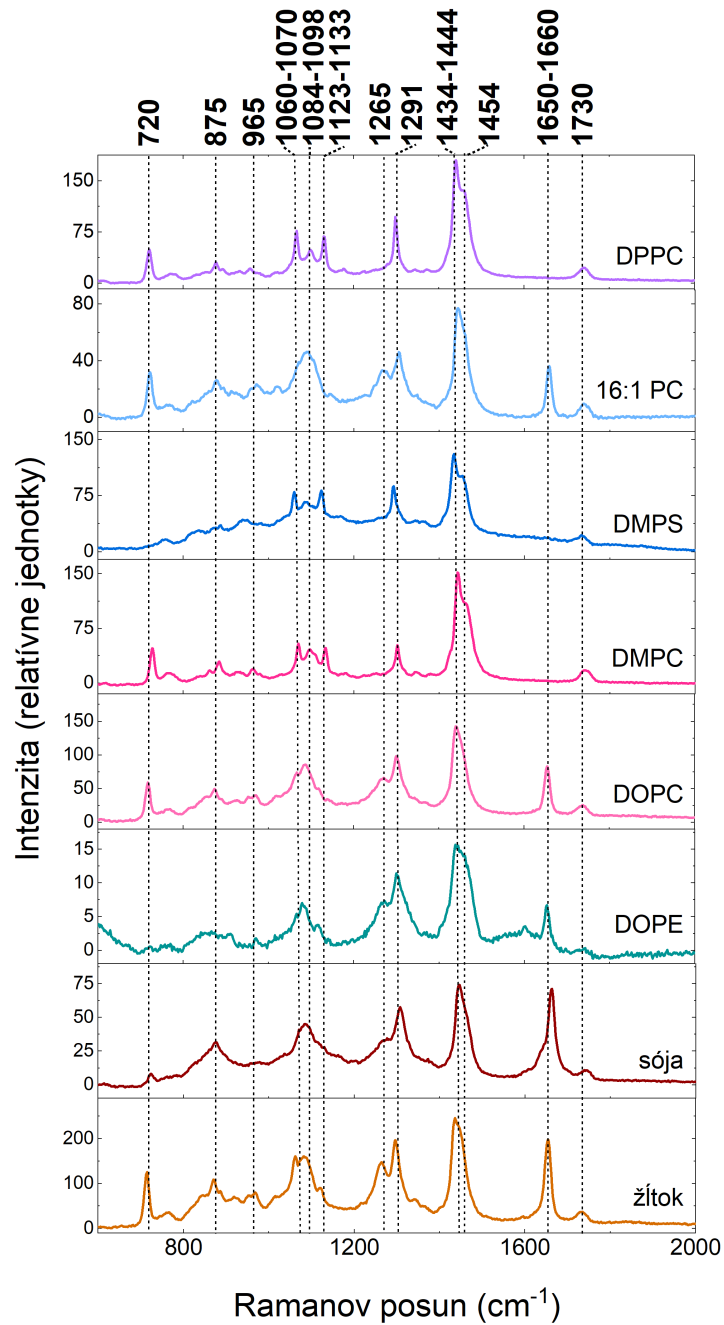
Symetrické vibrácie cholínovej hlavičky $\nu_s(\text{N}^+(\text{CH}_3))$ pozorujeme pri DPPC, 16:1 PC, DMPC, DOPC a výťažku z vaječného žĺtka, pretože tieto vzorky sú buď jednozložkové PC lipidy alebo zmes rôznych PC lipidov. Slabý spektrálny pás okolo 711 cm^{-1} pozorujeme aj pri výťažku zo sójových bôbov preto, lebo výťažok obsahuje až 45,7 % PC lipidov. (Tab.2.1a, Obr.3.14).

Spektrálny pás okolo 875 cm^{-1} pozorujeme pri výťažku zo sójových bôbov a pri PC lipidoch (DPPC, 16:1 PC, DMPC, DOPC, výťažok z vaječného žĺtka), ktorý prislúcha antisymetrickým valenčným vibráciám $\nu_a(\text{N}^+(\text{CH}_3))$ v cholínovej hlavičke, ktoré sú menej výrazné ako valenčné symetrické na 720 cm^{-1} .

Spektrálny pás $\sim 760 \text{ cm}^{-1}$, ktorý odpovedá vibráciám etanolamínovej skupiny v hlavičke pri PE lipidoch pozorujeme ako pás z nízkou intenzitou pri DOPE a pri výťažku zo sójových bôbov, ktorý tiež obsahuje PE lipidy (Tab.2.1a).

II) 1000 - 1200 cm^{-1} :

- 1050 - 1150 cm^{-1} : oblasť valenčných módov C-C kostry acylových reťazcov [48, 63],
 - 1055 -1066 cm^{-1} : *trans* vibrácie reťazca *sn-1* - $\nu(\text{trans C-C})$ [61, 62],
 - 1084 -1098 cm^{-1} : *trans* vibrácie reťazca *sn-2* - $\nu(\text{trans C-C})$ [61, 62],



Obr. 3.14: Porovnanie spektrálneho intervalu 700 - 1000 cm^{-1} Ramanových spektrier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentráciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií.

- $\sim 1127 \text{ cm}^{-1}$: *trans* vibrácie acylových reťazcov - $\nu(\text{trans C-C})$ [61, 62].

Pri jednozložkových lipidoch (DPPC, DMPS, DMPC) sa v tejto oblasti nachádza dobre rozlíšiteľná trojica spektrálnych pásov ($1060\text{-}1070 \text{ cm}^{-1}$, $1084\text{-}1098 \text{ cm}^{-1}$, $1123\text{-}1133 \text{ cm}^{-1}$), ktoré prislúchajú valenčným vibráciám uhlíkov v acylových reťazcoch $\nu(\text{C-C})$. Pri DOPC, DOPE a v prípade výťažku z vaječného žltka prevažuje stredný spektrálny pás na $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$ a sú viditeľné aj bočné pásy. Pri 16:1 PC a výťažku zo sójových bôbov táto trojica pásov splyva do jedného širokého spektrálneho pásu.

III) $1200 - 1400 \text{ cm}^{-1}$:

- $1226 - 1250 \text{ cm}^{-1}$: oblasť valenčných antisymetrických vibrácií PO_2^- skupiny - $\nu_a(\text{PO}_2^-)$ [48, 63],
- $1267 - 1284 \text{ cm}^{-1}$: rovinné deformačné vibrácie =C-H skupiny - $\delta(\text{=C-H})$ [61, 24],
- $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$: krúživé vibrácie CH_2 skupiny - $\tau(\text{CH}_2)$ [24, 61],
- $\sim 1370 \text{ cm}^{-1}$: CH_3 symetrické deformačné vibrácie - $\nu_s(\text{CH}_3)$ [62],

Pri lipidoch, ktoré majú v reťazci dvojitú väzbu (16:1 PC, DOPC, DOPE, výťažok zo sójových bôbov, výťažok z vaječného žltka) sa spektrálny pás prislúchajúci rovinným deformačným vibráciám $\delta(\text{=C-H})$ vyskytuje okolo $\sim 1265 \text{ cm}^{-1}$.

Spektrálny pás spôsobený krúživými vibráciami $\tau(\text{CH}_2)$ okolo 1291 cm^{-1} pozorujeme pri všetkých jednozložkových lipidoch a zmesiach lipidov.

IV) $1400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$:

- $1300 - 1470 \text{ cm}^{-1}$: oblasť deformačných vibrácií CH_2 a CH_3 skupín [48].
- 1410 cm^{-1} : C-O vibrácie [63],
- $1437 - 1460 \text{ cm}^{-1}$: nožnicové vibrácie CH_2 skupiny - $\delta_n(\text{CH}_2)$ [61, 24, 62],
- $1463 - 1473 \text{ cm}^{-1}$: CH_2 deformačné vibrácie - $\delta(\text{CH}_2)$ [61, 62].

V oblasti deformačných vibrácií CH_2 a CH_3 skupín sa pri všetkých lipidoch vyskytuje široký spektrálny pás s maximom v rozmedzí $1434 - 1444 \text{ cm}^{-1}$, ktorý odpovedá nožnicovým vibráciám $\delta_n(\text{CH}_2)$. V prípade DPPC, DMPS a DMPC pozorujeme rameno spektrálneho pásu okolo 1454 cm^{-1} . Tento spektrálny pás je výraznejší pri PC lipidoch, ktorých acylové reťazce sú saturované (neobsahujú dvojitú väzbu) a obsahujú maximálny možný počet atómov vodíka: DPPC, DMPC, výťažok zo sójových bôbov a výťažok z vaječného žltka.

V) 1600 - 1800 cm^{-1} :

- $\sim 1645 - 1660 \text{ cm}^{-1}$: C=C *cis* valenčné vibrácie - $\nu(\text{cis C=C})$ [24, 61],
- 1720 - 1750 cm^{-1} : C=O esterové vibrácie [61, 48],
- 1735 - 1745 cm^{-1} : oblasť valenčných vibrácií C=O skupiny - $\nu(\text{C=O})$ [48, 63].

Pri lipidoch obsahujúcich dvojitú väzbu v acylových reťazcoch (16: PC, DOPC, DOPE, výťažok zo sójových bôbov, výťažok z vaječného žĺtka) sa v rozmedzí 1650 až 1660 cm^{-1} nachádza spektrálny pás prislúchajúci valenčným vibráciám nenasaturovaných mastných kyselín $\nu(\text{C=C})$ (Obr.3.14). Oba výťažky majú tento spektrálny pás výraznejší ako jednozložkové lipidy (16:1 PC, DOPC, DOPE), pretože obsahujú zmes rôzne nasýtených fosfolipidov a teda aj väčší počet dvojitých väzieb (Tab.2.1a, Tab.2.1b). Pri saturovaných lipidoch (DPPC, DMPS, DMPC) tento spektrálny pás nepozorujeme, keďže v acylových reťazcoch sa žiadna dvojitá väzba nevyskytuje.

Okolo 1730 cm^{-1} je vidieť slabý spektrálny pás (Obr.3.14) spôsobený valenčnými vibráciami -C=O skupiny, ktorá sa vo fosfolipidoch nachádza na začiatku acylových reťazcov, blízko napojenia na glycerolový most a teda aj na polárnu hlavičku (Obr.1.8).

3.3.2 Spektrálny interval 2500 až 3100 cm^{-1}

Vlnočty v intervale 2500 až 3100 cm^{-1} odpovedajú valenčným vibračným módom CH_2 a CH_3 skupín v acylových reťazcoch [48]. Konkrétne tam nájdeme spektrálne pásy prislúchajúce týmto vibráciám:

- 2845 - 2850 cm^{-1} : valenčné symetrické vibrácie CH_2 skupiny - $\nu_s(\text{CH}_2)$ [6, 24, 61, 63, 62],
- 2880 - 2890 cm^{-1} : valenčné antisymetrické vibrácie CH_2 skupiny - $\nu_a(\text{CH}_2)$ [6, 61, 63, 62],
- $\sim 2930 \text{ cm}^{-1}$: valenčné symetrické vibrácie CH_3 skupiny - $\nu_s(\text{CH}_3)$ [6, 61, 62],
- $\sim 2950 \text{ cm}^{-1}$: valenčné antisymetrické vibrácie CH_3 skupiny - $\nu_s(\text{CH}_3)$ [6, 24, 63, 62],
- 3005 -3010 cm^{-1} : nenasaturované =CH valenčné vibrácie ($\nu(=\text{CH})$) [6, 24, 61],
- $\sim 3040 \text{ cm}^{-1}$: valenčné vibrácie cholínu - $\nu_a(\text{CH}_3)$ [6].

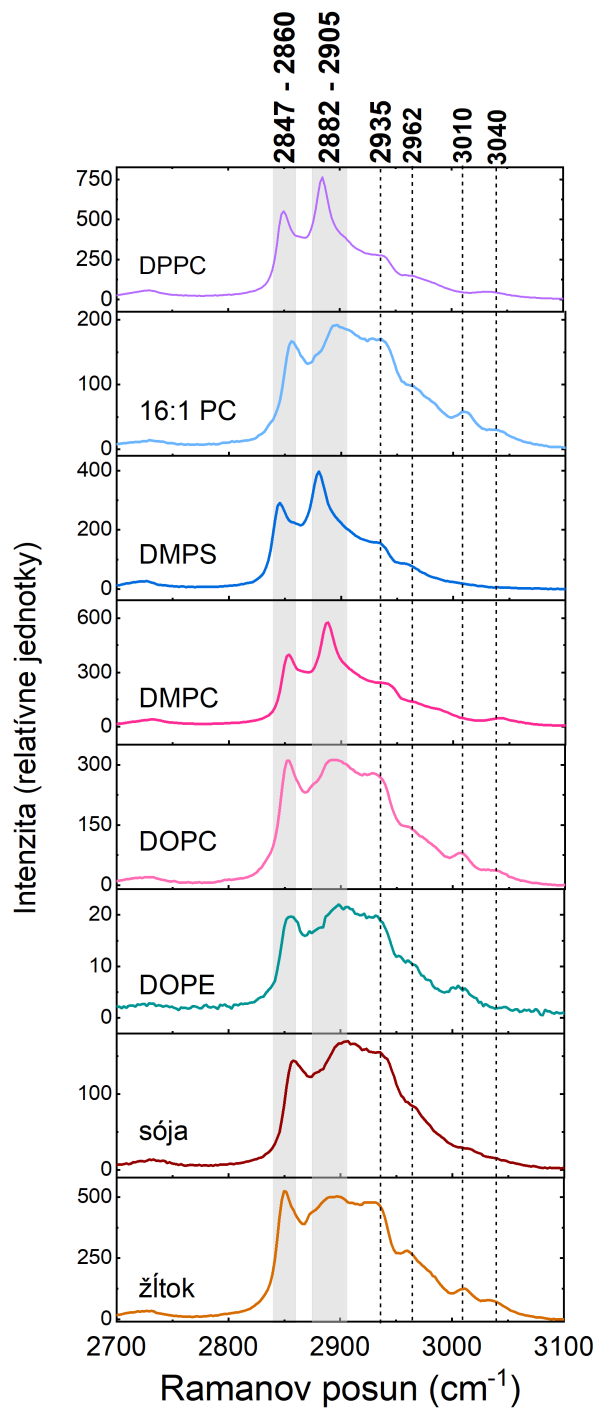
V oblasti vyšších vlnočtov pozorujeme spektrálny pás s maximom v rozmedzí 2847 až 2860 cm^{-1} odpovedajúci valenčným symetrickým vibráciám CH_2 skupiny ($\nu_s(\text{CH}_2)$) a následne spektrálny pás s maximom v intervale 2882 - 2905 cm^{-1} , ktorý prislúcha antisymetrickým vibráciám CH_2 skupiny ($\nu_a(\text{CH}_2)$), vid Obr.3.15. Oba tieto spektrálne pásy sú dobre viditeľné pri všetkých jednozložkových lipidoch a aj zmesiach lipidov, ale pomer ich intenzít sa mení: pri DPPC, 16:1 PC, DMPS, DMPC a pri sójovom výťažku je viac intenzívny spektrálny pás $\nu_a(\text{CH}_2)$. V prípade DOPE je tiež intenzívnejší spektrálny pás $\nu_a(\text{CH}_2)$, ale ten rozdiel nie je až taký zreteľný ako pri predchádzajúcich vzorkách. Naopak pri DOPC a výťažku z vaječného žĺtka je intenzívnejší spektrálny pás $\nu_s(\text{CH}_2)$. Vzájomná intenzita týchto dvoch spektrálnych pásov závisí od konkrétneho miesta na prstenci depozitu, z ktorého sme spektrálny pás získali, a špecifickú konformáciu lipidu a jeho fázu.

Okolo 2935 cm^{-1} pozorujeme pri všetkých lipidoch spektrálny pás valenčných symetrických vibrácií CH_3 skupiny ($\nu_s(\text{CH}_3)$), ktorá sa nachádza na koncoch acylového reťazca. V prípade lipidov a zmesí lipidov, ktoré obsahujú aspoň jednu dvojitú väzbu (16:1 PC, DOPC, DOPE, výťažok zo sójových bôbov, výťažok z vaječného žĺtka), je tento spektrálny pás intenzívnejší ako pri lipidoch bez dvojitej väzby: DPPC, DMPS, DMPC (Obr.3.15).

Valenčné antisymetrické vibrácie CH_3 skupiny ($\nu_a(\text{CH}_3)$) sa objavujú poväčšine len ako rameno spektrálneho pásu pri všetkých vzorkách okolo 2960 cm^{-1} . Najlepšie sú rozlíšiteľné v prípade výťažku z vaječného žĺtka (Obr.3.15).

Pri lipidoch s dvojitou väzbou pozorujeme spektrálny pás od valenčných vibrácií $=\text{CH}$ skupiny ($\nu(=\text{CH})$) okolo 3010 cm^{-1} . Avšak ako vidíme pri 16:1 PC, DOPC, DOPE a výťažku z vaječného žĺtka (Obr.3.15), tento spektrálny pás je v porovnaní so spektrálnymi pásmi z valenčných vibrácií CH_2 skupiny slabý.

Pri PC lipidoch (DPPC, 16:1 PC, DMPC, DOPC, výťažok z vaječného žĺtka) je pozorovateľné rameno na $\sim 3040 \text{ cm}^{-1}$ prislúchajúce valenčným vibráciám cholínu v ich hlavičke (Obr.3.15). Pri DMPS a DOPE tento spektrálny pás nepozorujeme, pretože ich polárna skupina je tvorená buď serínom (PS) alebo etanolamínom (PE), vid Obr.1.10. Sójový výťažok je tvorený zo 45,7 % PC lipidmi (Tab.2.1a), ale zvyšné fosfolipidy, ktoré ho tvoria neobsahujú cholínovú skupinu, preto spektrálny pás na $\sim 3040 \text{ cm}^{-1}$ nie je viditeľný (Obr.3.15).



Obr. 3.15: Porovnanie spektrálneho intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} Ramanových spektier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentráciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií.

3.4 Mapy Ramanových spektier, pomer intenzít a parameter laterálneho usporiadania

Okrem samostatných Ramanových spektier získaných z rôznych miest na obvodovom prstenci depozitu sme merali aj súbor Ramanových spektier z bodov v obdĺžnikovej oblasti, ktoré tvoria mriežku so súradnicami x a y . Tento súbor Ramanových spektier sa nazýva Ramanova mapa. Merali sme ju z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s koncentráciou 1 mg/ml a snažili sme sa do mapy zahrnúť celú šírku prstenca. Keďže sa šírka prstenca pre jednotlivé depozity menila (Obr.3.10a), tak aj Ramanove mapy nemajú rovnaké rozmery.

Pri DMPS, DMPC, DPPC, 16:1 PC, DOPC a DOPE je vzdialenosť medzi bodmi na osi x a na osi y rovnaká, 10 μm . V prípade sójového výťažku je tiež vzdialenosť medzi bodmi v oboch smeroch rovnaká, ale je až 15 μm , pretože prsteneček bol širší (Obr.3.9a, Obr.3.10a). Pri výťažku z vaječného žltka v smere osi x sú body od seba vzdialené o 11,5 μm a v smere osi y sú vzdialené o 10,5 μm .

Sadám Ramanových spektier zmeraných v mapách sme odčítali pozadie v podprograme *backoround* metódou ortogonálnych diferencií a následne ich spracovali v podprograme *cellviewer* pomocou faktorovej analýzy od J. Palackého [47]. Mapa odpovedajúca 1. koeficientu faktorovej analýzy, kde sa pomocou Ramanových spektrálnych pásov od 250 do 3400⁻¹ zobrazuje intenzita, je doplnená o 1. subspektrum z faktorovej analýzy, ktoré má význam priemernej intenzity z danej oblasti (Obr.3.16 až Obr.3.23). Ďalšie subspektrá (2. a 3. subspektrum) ukazujú, v ktorých vlnôčtoch sa spektrum v danej oblasti menilo najviac a ďalšie koeficienty (2. a 3. koeficient) zobrazujú tieto zmeny. V tejto práci sme zahrnuli pri každej vzorke len 1. subspektrum a 1. koeficient, vyššie subspektrá a vyššie koeficienty sú v prílohe (Obr.?? až Obr.??).

Rovnako sme pozorovali, nakoľko sa od Ramanových máp z rozsahu vlnôčtov 250 až 3400 cm^{-1} líšia Ramanove mapy z rozsahu 250 až 2500 cm^{-1} a rozsahu 2500 až 3400 cm^{-1} . V prípade Ramanových máp z 2500-3400 cm^{-1} oproti mapám z celého spektrálneho rozsahu nebol až taký výrazný rozdiel (Obr.3.16 až Obr.3.23). Spektrálne pásy z oblasti 2500-3400 cm^{-1} sú niekoľkonásobne intenzívnejšie ako spektrálne pásy z oblasti 250-2500 cm^{-1} a teda dominujú aj celému spektrálnemu rozsahu 250-3400 cm^{-1} . Ramanove mapy z oblasti 250-2500 cm^{-1} sa líšili trochu viac od máp z celého spektrálneho rozsahu, ale veľké zmeny sme nepozorovali. Vyššie subspektrá a vyššie koeficienty z faktorovej analýzy zo spektrálneho intervalu 250-2500 cm^{-1} a 2500-3400 cm^{-1} sú uvedené v prílohe (Obr.?? až Obr.??). V ďalšom texte sa budeme venovať len z koeficientov 1. subspektra

3.4.1 Mapy Ramanových spektier

Mapy Ramanových spektier z koeficientov 1.subspektra z obvodového prstenca depozitov z homogénnych suspenzií lipozómov s $c = 1$ mg/ml odrážajú usporiadanie lipidu v prstenci. Ramanova mapa z koeficientov 1.subspektra mala vyšší signál pri vonkajšom okraji obvodového prstenca pri lipidoch 16:1 PC (Obr.3.19a), DOPC (Obr.3.20a) a DOPE (Obr.3.21a)), pretože sa v tejto oblasti nachádzalo viac lipidového materiálu. Najintenzívnejší signál v strede prstenca mali depozity DMPC (Obr.3.17a), výtazku z vajčného žĺtka (Obr.3.22a) a výtazku zo sójových bôbov (Obr.3.23a). Depozit DPPC mal maximum Ramanovho signálu skôr na vnútornej strane obvodového prstenca (Obr.3.18a). Najsilnejší signál na vnútornej strane prstenca mal depozit DMPS (Obr.3.16a). Ramanove mapy z oblasti 2500 až 3400 cm^{-1} poskytovali takmer identickú informáciu o tvare prstenca ako Ramanove mapy z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (Obr.3.16b až Obr.3.23b).

3.4.2 Pomer intenzít

Pre jednotlivé Ramanove mapy z koeficientov 1.subspektra sme odčítali hodnoty intenzity spektrálnych pásov 2850 cm^{-1} a 2880 cm^{-1} pomocou vlastného programu napísaného v programovacom jazyku Python. Následne sme z týchto intenzít určili pomer I_{2880}/I_{2850} . Spektrálny pás na ~ 2850 cm^{-1} prislúcha $\nu_s(\text{CH}_2)$ vibráciám a spektrálny pás ~ 2880 cm^{-1} prislúcha $\nu_a(\text{CH}_2)$ vibráciám [48].

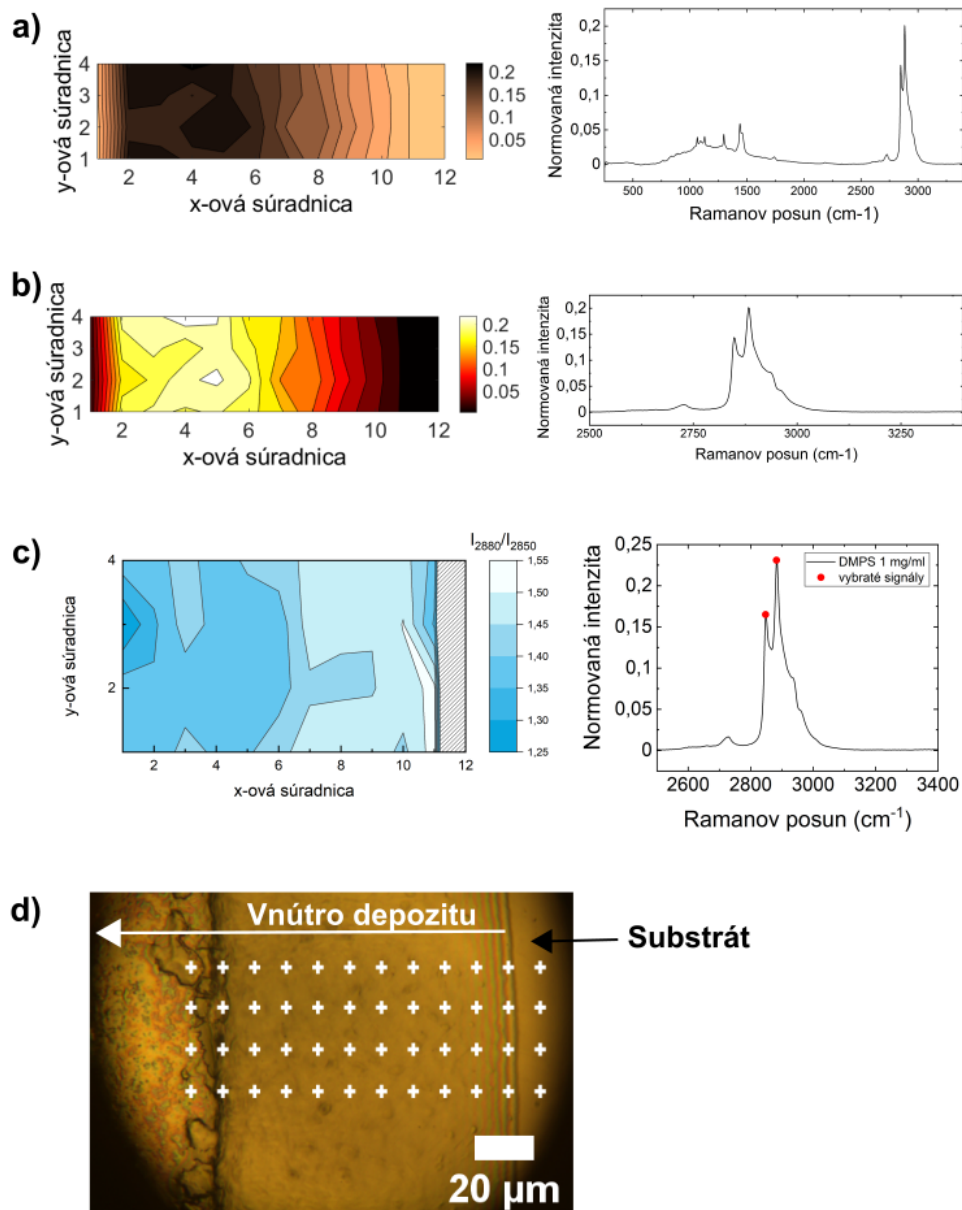
Pomer I_{2880}/I_{2850} je parametrom odzrkadľujúcim usporiadanie acylových reťazcov a fázu lipidu lipidu: čím je tento pomer vyšší, tým sú acylové reťazce lipidu usporiadanejšie. V literatúre sa tento pomer používa pri suspenziách a roztokoch, v tejto práci sme ho na aplikovali na suché depozity a pokúsili sa ho použiť ako parameter, ktorý by charakterizoval usporiadanosť vysušených lipidových molekúl.

Spektrálne pásy $\nu_a(\text{CH}_2)$ a $\nu_s(\text{CH}_2)$ majú najvyššie intenzity z celého spektrálneho rozsahu 250 až 3400 cm^{-1} , vplyv šumu je nižší ako v prípade pomerov intenzít iných spektrálnych pásov. Dajú sa nájsť aj v tých častiach vzorky, kde je menej lipidu a intenzita všetkých spektrálnych pásov je nižšia. Pri depozitoch vzniknutých zo suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml použitých v tejto práci sa lepšie pracovalo s pomerom $I_{2880}/I_{2850} = I_{\text{CH}_2}$ ako napríklad s pásmi v oblasti 1060 až 1130 cm^{-1} , ktoré odzrkadľujú *gauche* a *trans* konformácie a ich pomer intenzít je tiež používaný na vyhodnotenie fázy lipidu [48]. Pre štúdium menej intenzívnych spektrálnych pásov a ich pomerov z oblasti vlnočtov 750 až 2500 cm^{-1} je potrebné pracovať so suspenziami vyšších koncentrácií alebo akumulovať Ramanove spektrá s väčším množstvom opakovaní a dlhším expozičným časom, čím sa veľmi predĺži doba merania Ramanovej mapy.

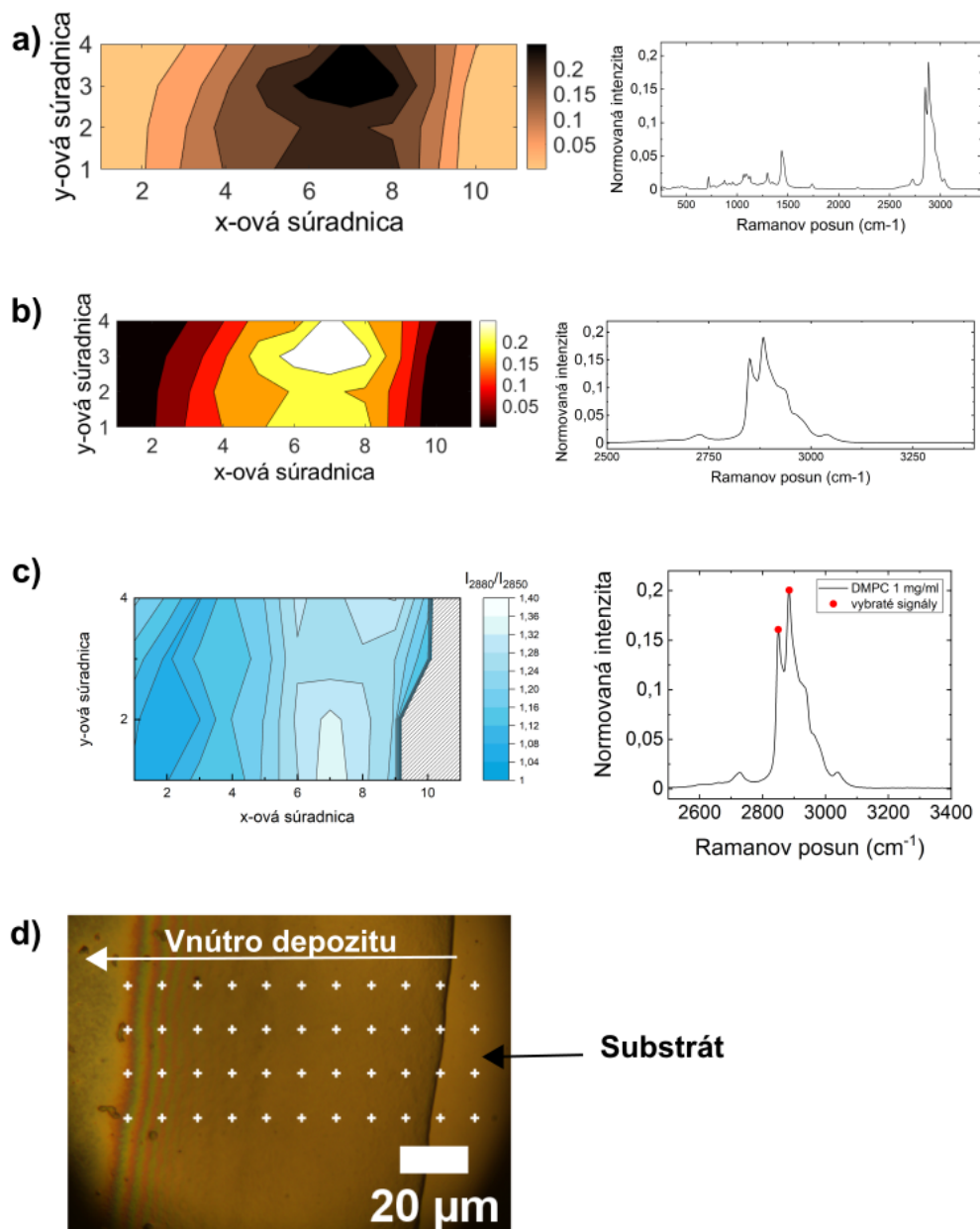
Pri porovnaní Ramanovej mapy z koeficientov 1.subspektra a mapy pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} nie je rozloženie lipidového materiálu a fázy rovnaké. Hod-

noty I_{2880}/I_{2850} sú najvyššie pri vonkajšom okraji obvodového prstenca pri depozite DMPS (Obr.3.16c), v strede prstenca pri DOPC (Obr.3.20c) a DMPC (Obr.3.17c) a na vnútornom okraji prstenca v prípade výťažku z vaječného žĺtka (Obr.3.22c) a výťažku zo sójových bôbov (Obr.3.23c). Pri depozitoch DPPC, 16:1 PC a DOPE má I_{2880}/I_{2850} maximálne a minimálne hodnoty po celom prstenci (DPPC Obr.3.18c, 16:1 PC Obr.3.19c, DOPE Obr.3.21c).

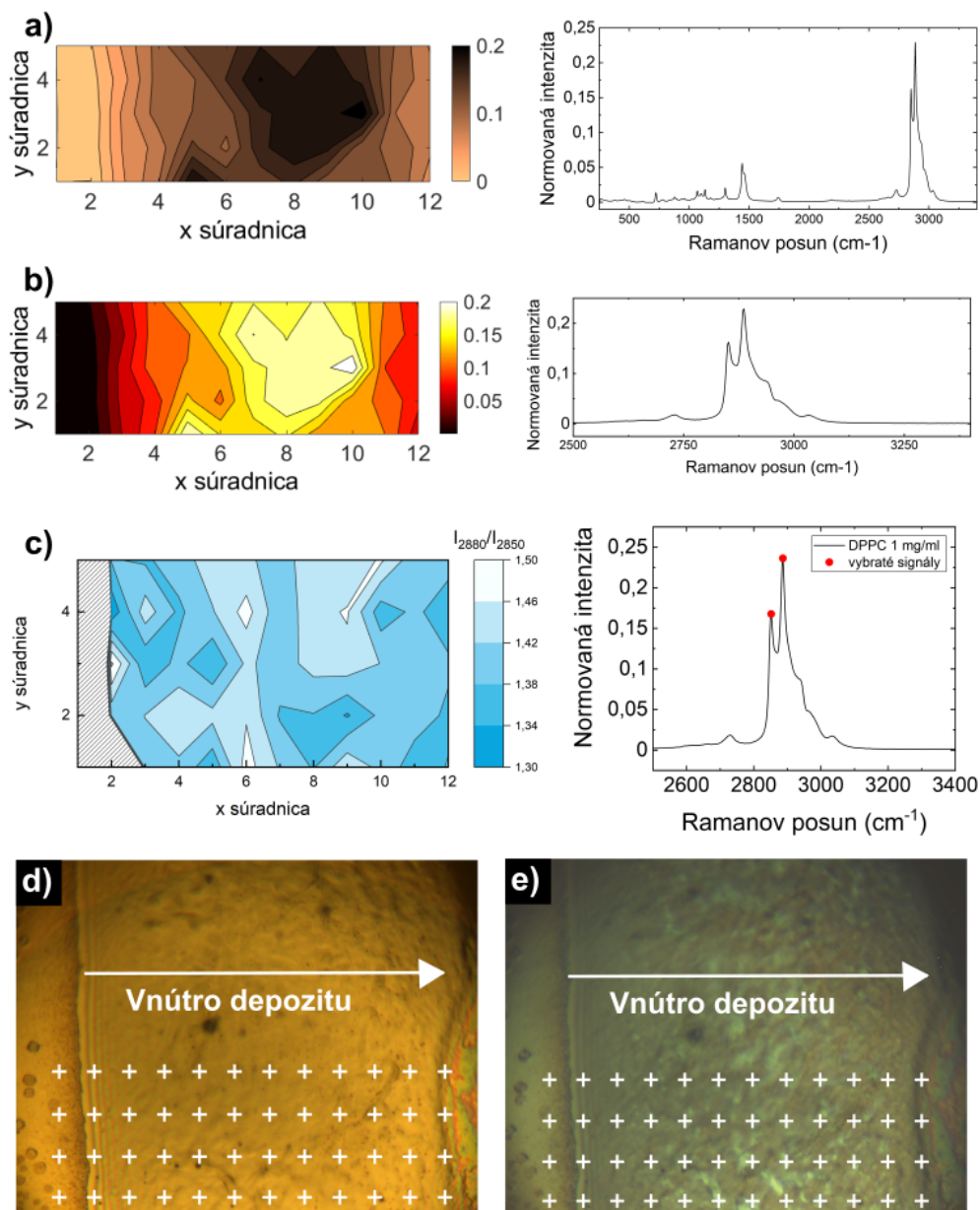
Celkovo môžeme obvodové prstence depozitov rozdeliť do dvoch skupín: na prstence, ktoré majú polohu maximálnej hodnoty pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} približne zhodnú s polohou maximálnej hodnoty signálu v Ramanovej mape (DMPS, DOPC, výťažok z vaječného žĺtka) a na prstence, ktorých poloha maximálnej hodnoty pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} sa približuje k polohe minimálnej hodnoty signálu v Ramanovej mape (DMPC a v niektorých častiach prstenca aj DOPE). V prípade DOPE je zaradenie nejednoznačné, pretože prstenec depozitu z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml bol úzky a obsahoval málo lipidového materiálu, takže aj jeho Ramanove spektrá sú menej intenzívne v porovnaní s obvodovými prstencami ostatných vzoriek z homogénnych suspenzií s $c = 1$ mg/ml. Pre DPPC a 16:1 PC je rozdelenie I_{2880}/I_{2850} v rámci prstenca nepravidelné a nie je možné tento pomer presne porovnať s Ramanovou mapu.



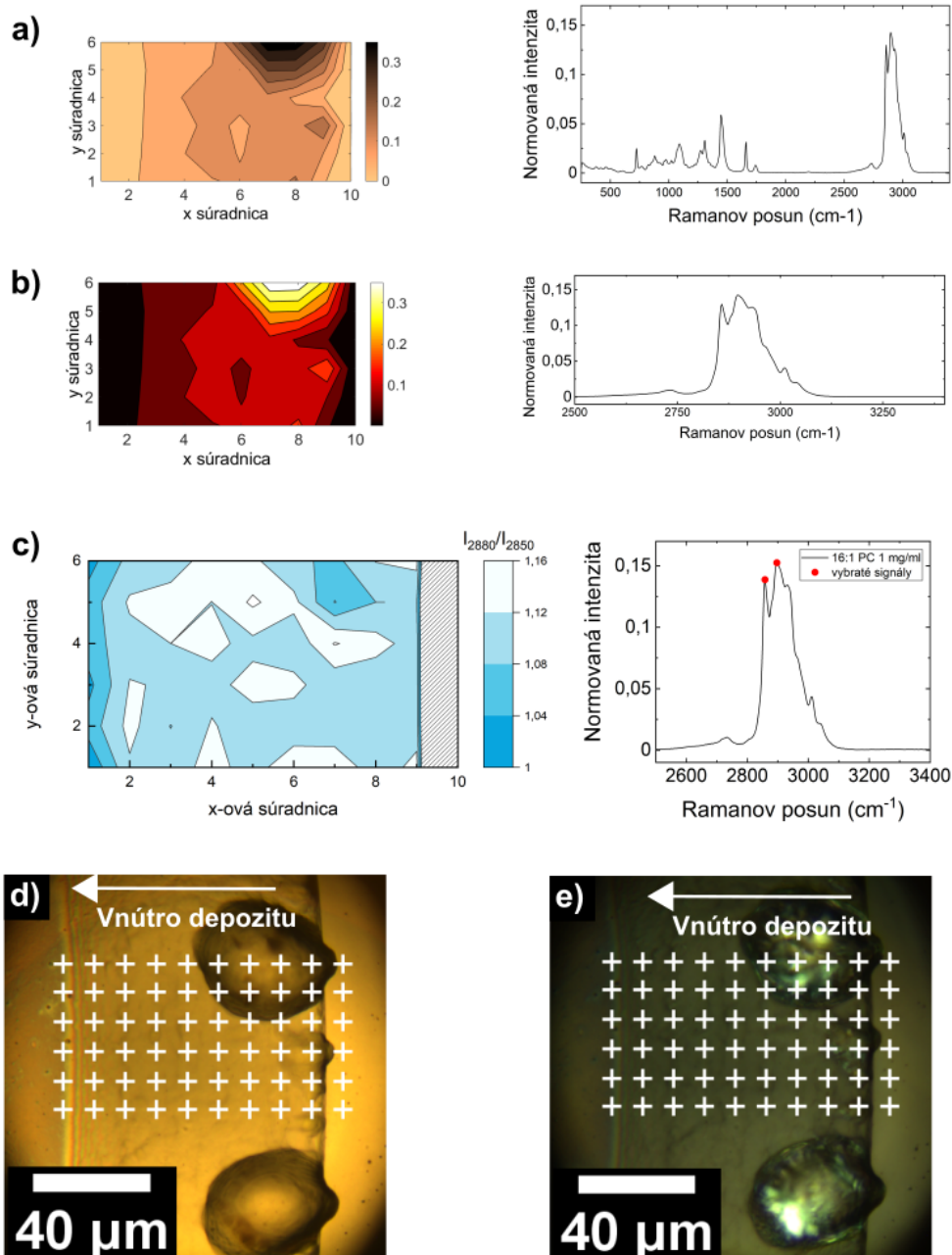
Obr. 3.16: Depozit DMPS z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.



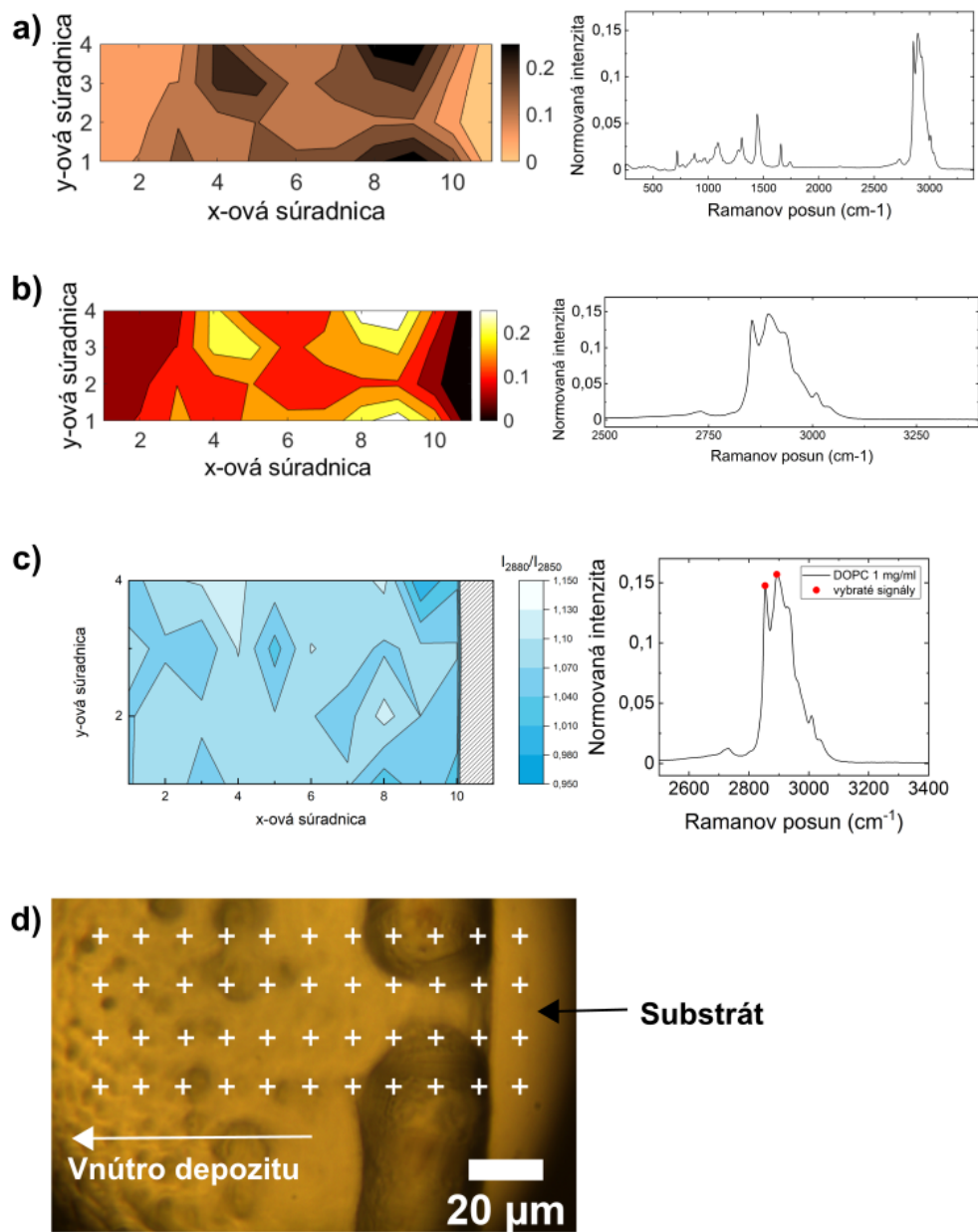
Obr. 3.17: Depozit DMPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: *a)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.



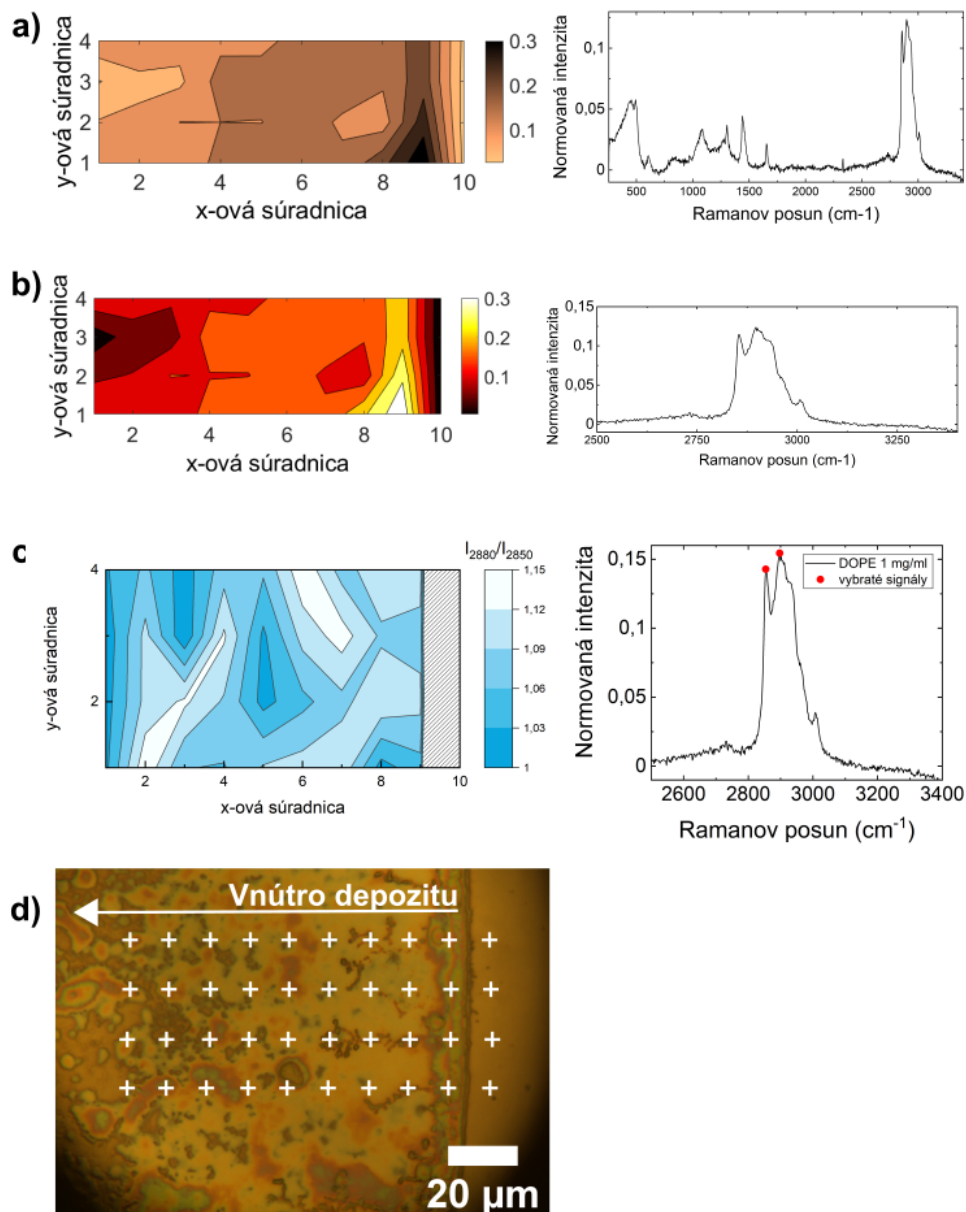
Obr. 3.18: Depozit DPPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. *e)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov.



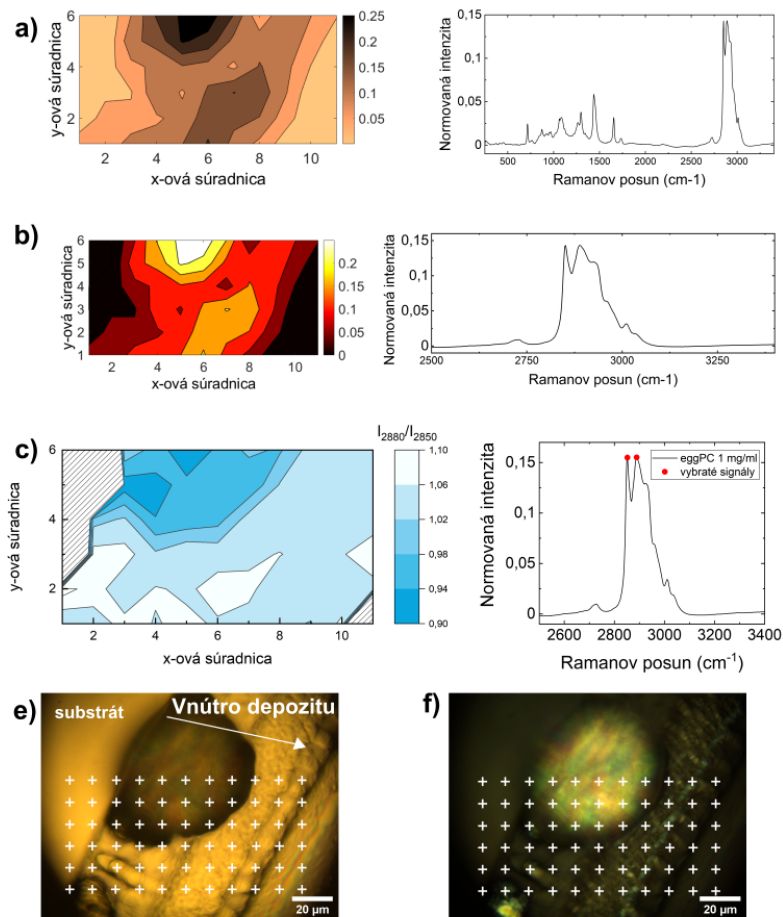
Obr. 3.19: Depozit 16:1 PC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$:
a) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. *e)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov



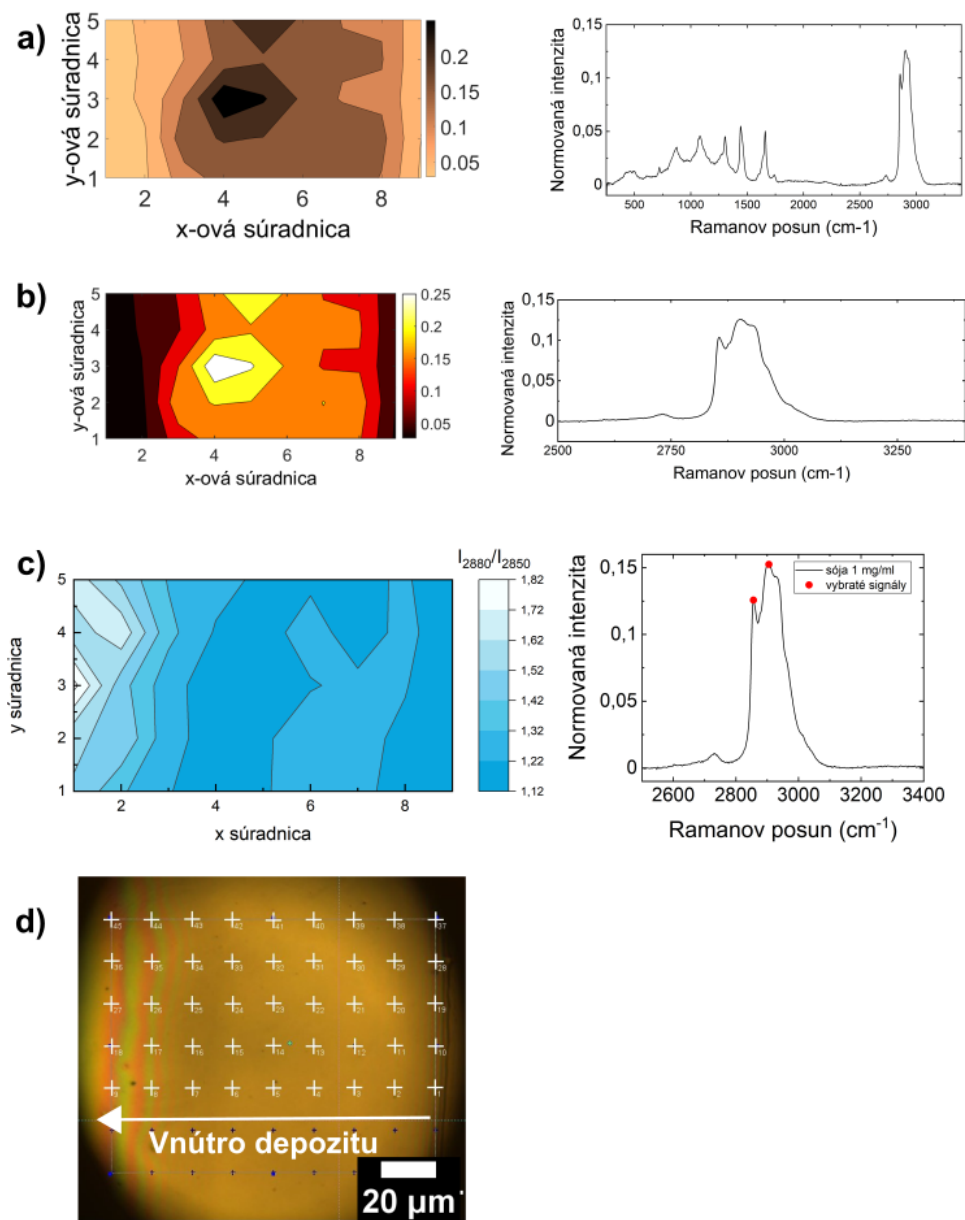
Obr. 3.20: Depozit DOPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.



Obr. 3.21: Depozit DOPE z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu $250 \text{ až } 3400 \text{ cm}^{-1}$ (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b)* Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu $2500 \text{ až } 3400 \text{ cm}^{-1}$ (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c)* Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d)* Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.



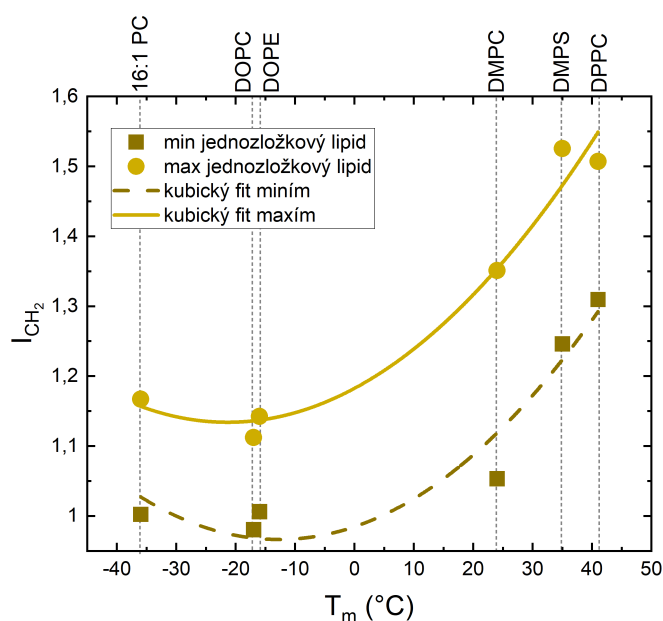
Obr. 3.22: Depozit výťažku z vaječného žĺtka z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. *e*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov.



Obr. 3.23: Depozit výťažku zo sójových bôbov z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.

3.4.3 Závislosť pomeru intenzít na teplote fázového prechodu lipidových suspenzií

Maximá a minimá pomeru $I_{2880}/I_{2850} = I_{\text{CH}_2}$ jednozložkových lipidov sme vy-niesli do grafu ako závislosť $I_{\text{CH}_2}(\text{max})$ a $I_{\text{CH}_2}(\text{min})$ na teplote hlavného fázového prechodu T_m lipidových suspenzií (Tab.2.2), ale v prípade suchých lipidov sa T_m posúvajú v vyšších hodnotám, ktoré nie sú určené jednoznačne. Táto závislosť má preto len orientačný charakter (Obr.3.24) a vyžaduje ďalšie štúdium. Závislosť sme fitovali vzťahom $I_{\text{CH}_2} = a + bT_m + cT_m^2$ s koeficientami a , b , c (ich hodnoty sú v Tab.3.2).



Obr. 3.24: Závislosť maximá a minimá z pomeru $I_{\text{CH}_2} = I_{2880}/I_{2850}$ na teplote fázového prechodu T_m . Závislosť je fitovaná kubickým fitom $I_{\text{CH}_2} = a + bT_m + cT_m^2$. Pomer I_{CH_2} je určený zo sady Ramanových spektier z obvodových prstencov de-pozitov homogénnych suspenzií jednozložkových lipidov s $c = 1$ mg/ml.

Tabulka 3.2: Koeficienty kubických fitov $I_{\text{CH}_2} = a + bT_m + cT_m^2$ z grafu na Obr.3.24.

Koeficienty	Minimá pomeru I_{CH_2}	Maximá pomeru I_{CH_2}
a	$0,98 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,03$
b	$2,88 \cdot 10^{-3} \pm 7,69 \cdot 10^{-4}$	$4,56 \cdot 10^{-3} \pm 6,50 \cdot 10^{-4}$
c	$1,13 \cdot 10^{-3} \pm 4,16 \cdot 10^{-4}$	$1,07 \cdot 10^{-3} \pm 3,52 \cdot 10^{-4}$

3.4.4 Rozsah pomeru intenzít

Okrem toho, že pri depozitoch rôznych lipidov a zmesí lipidov sa líšili miesta, kde sa nachádzali maximálne a minimálne hodnoty pomeru I_{2880}/I_{2850} , líšil sa aj rozsah hodnôt pomeru I_{2880}/I_{2850} . Vzhľadom na to, že súvisí s usporiadaním molekúl lipidu a teplotou fázového prechodu T_m , odhadujeme vyššiu variabilitu konformácií a usporiadanosti lipidových molekúl. Očakávali sme, že sa bude líšiť maximálna a minimálna hodnota pomeru a tiež rozsah pomeru (jeho interval hodnôt), označme

$$\Delta I_{\text{CH}_2} = \Delta(I_{2880}/I_{2850}),$$

ktorý sme si definovali ako

$$\Delta I_{\text{CH}_2} = I_{\text{CH}_2}(\text{max}) - I_{\text{CH}_2}(\text{min}), \quad (3.1)$$

kde $I_{\text{CH}_2}(\text{max})$ je maximálna hodnota pomeru a $I_{\text{CH}_2}(\text{min})$ je minimálna hodnota pomeru z celej sady pomerov z obvodového prstenca depozitu. Pre jednozložkové lipidy sme predpokladali, že hodnota ΔI_{CH_2} bude menšia a pre výťažky väčšia. Rovnako sme očakávali, že pre jednozložkové lipidy, u ktorých je výrobcom uvedená teplota fázového prechodu T_m (Tab.2.2), sa bude $I_{\text{CH}_2}(\text{min})$ a $I_{\text{CH}_2}(\text{max})$ posúvať k vyšším hodnotám, ak je pre daný lipid T_m pod laboratórnou teplotou a lipid sa nachádza v gélovej fáze. Podobne ak je pre daný lipid T_m vysoko nad laboratórnou teplotou, tak hodnoty $I_{\text{CH}_2}(\text{min})$ a $I_{\text{CH}_2}(\text{max})$ sa budú posúvať k nižším číslam, pretože lipid je v tekutokryštalickej fáze. Avšak uvádzané teploty T_m odpovedajú fázovému prechodu vo vodných suspenziách a nami merané depozity sú suché. Podľa literatúry sú teploty fázových prechodov pri bezvodých lipidov podstatne vyššie než pri hydratovaných. Prítomnosť vody spôsobuje výrazný pokles teploty fázového prechodu. Literatúra nie je v presných hodnotách teplôt T_m jednotná, ale v práci O'Learyho a Levina sa uvádza T_m pre bezvodý lipid DPPC 108 °C [62].

Zistili sme, že najmenší rozsah hodnôt bol pre DOPC, DOPE a 16:1 PC (Tab.3.3). Tieto vzorky majú teplotu hlavného fázového prechodu T_m v prípade suspenzií pod 0 °C. Pre výťažok zo sójových bôbov je rozsah hodnôt ΔI_{CH_2} najväčší (Obr.3.25b).

Ak sú spektrálne pásy $\nu_s(\text{CH}_2)$ a $\nu_a(\text{CH}_2)$ rovnako intenzívne, tak platí $I_{2880}/I_{2850} = 1$. Pozorovali sme minimum pomeru intenzít $I_{\text{CH}_2}(\text{min}) \approx 1$ pri lipidoch DOPE, DOPC a 16:1 PC, ktoré obsahujú jednu dvojitú väzbu v acylových

Tabuľka 3.3: Maximálne a minimálne hodnoty parametra laterálneho usporiadania S_L , rozsah hodnôt parametra usporiadania ΔS_L , maximálne a minimálne hodnoty pomeru intenzít $I_{CH_2} = I_{2880}/I_{2850}$, rozsah hodnôt pomeru intenzít ΔI_{CH_2} .

lipid	$S_L(\text{min})$	$S_L(\text{max})$	ΔS_L	$I_{CH_2}(\text{min})$	$I_{CH_2}(\text{max})$	ΔI_{CH_2}
DMPS	0,36	0,55	0,19	1,25	1,53	0,28
DMPC	0,24	0,43	0,20	1,05	1,35	0,30
DPPC	0,41	0,54	0,13	1,31	1,51	0,20
16:1 PC	0,20	0,31	0,11	1,00	1,17	0,16
DOPC	0,19	0,27	0,09	0,98	1,11	0,13
DOPE	0,20	0,30	0,09	1,01	1,14	0,14
žltok	0,14	0,28	0,14	0,91	1,12	0,21
sója	0,28	0,77	0,49	1,12	1,85	0,73

reťazcoch a majú teplotu fázového prechodu pod 0 °C (Tab.2.2). Jednozložkové lipidy DPPC, DMPC a DMPS, ktoré neobsahujú dvojité väzby v acylových reťazcoch a teplotu fázového prechodu majú vyššiu ako je laboratórna teplota, mali $I_{CH_2}(\text{min})$ a $I_{CH_2}(\text{max})$ posunuté k vyšším hodnotám (Obr.3.25a). Výťažok z vajecného žltka, ktorý obsahoval PC lipidy so žiadnou až šiestimi dvojitými väzbami, mal $I_{CH_2}(\text{min}) = 0,91$, čo je najnižšia hodnota $I_{CH_2}(\text{min})$ zo všetkých vzoriek (Tab.3.3). Je možné, že dôvodom tak nízkej hodnoty $I_{CH_2}(\text{min})$ sú PC lipidy s viacerými dvojitými väzbami v acylových reťazcoch a teda aj nízkou teplotou fázového prechodu: napr. PC 22:6 má $T_m = -68$ °C¹. Výťažok so sójových bôbov pravdepodobne neobsahuje lipidy s takým veľkým počtom dvojitých väzieb, pretože hodnoty I_{CH_2} boli v rozmedzí 1,12 až 1,85 (Tab.3.3)

3.4.5 Parameter laterálneho usporiadania

Pre vzorky lipidov sme vypočítali parameter laterálneho usporiadania S_L podľa vzťahu (2.5). Hodnoty parametra S_L boli len predstavovali len preškáľovanie hodnoty pomeru I_{CH_2} (Obr.3.25, Obr.3.26, Tab.3.3). Rovnako ako v prípade pomeru I_{CH_2} sme si definovali aj rozsah parametra S_L (interval jeho hodnôt, označme ho ΔS_L) ako

$$\Delta S_L = S_L(\text{max}) - S_L(\text{min}). \quad (3.2)$$

Rozsah parametra ΔS_L neobsahoval akúkoľvek ďalšiu informáciu o fáze lipidu vzhľadom k pomeru I_{CH_2} , len jeho hodnoty boli v intervale 0 až 0,8 (Obr.3.26,

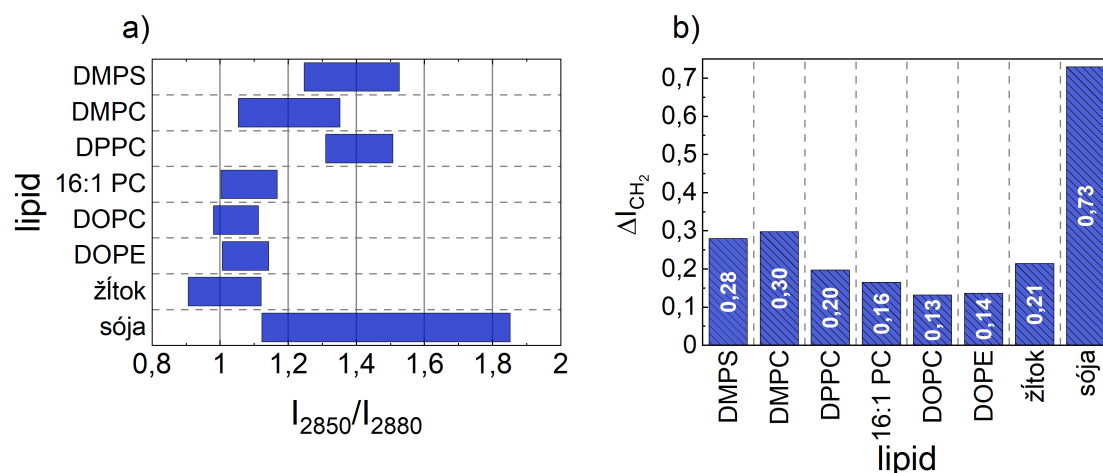
¹Údaj je zo stránok Avanti Polar Lipids pre 22:6 (Cis) PC, <https://avantilipids.com/product/850400>, cit. 3. 5. 2024. Ďalšie hodnoty T_m pre PC, PS a PE lipidy sú dostupné na stránkach Avanti Polar Lipids: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps>

Tab.3.3). Parameter S_L má pre hodnotu $S_L = 1$ význam najvyššieho možného usporiadania a pre $S_L = 0$ žiadne usporiadanie, ale nie nutne najnižšie možné [59]. V našom prípade sme parameter S_L a pomer I_{CH_2} určovali zo suchých depozitov, nie zo suspenzií ako sa uvádza v literatúre [59, 60], takže naše hodnoty sa môžu líšiť.

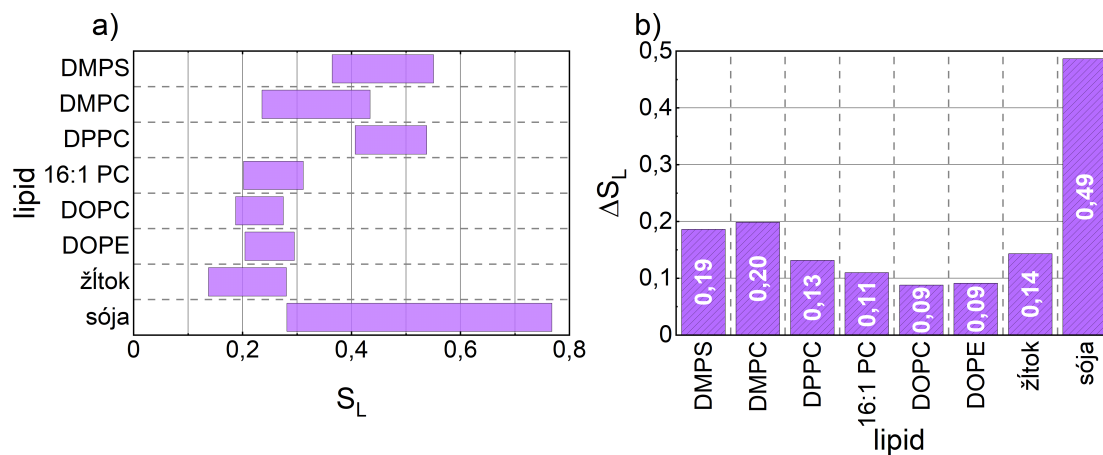
Keďže parameter S_L je normovaný, mapy obvodového prstenca s využitím parametra S_L sa dajú lepšie porovnať medzi sebou ako mapy obvodového prstenca s využitím pomeru I_{CH_2} . Mapy parametra S_L (obr.3.27) môžeme rozdeliť na základe hodnôt na:

1. mapy s najnižšími hodnotami S_L ($S_L = 0,14$ až $0,31$): 16:1 PC, DOPC, DOPE a výťažok z vaječného žĺtka,
2. mapy s najvyššími hodnotami S_L ($S_L = 0,24$ až $0,53$): DMPS, DMPC a DPPC,
3. mapy s veľkým rozsahom hodnôt S_L : výťažok zo sójových bôbov.

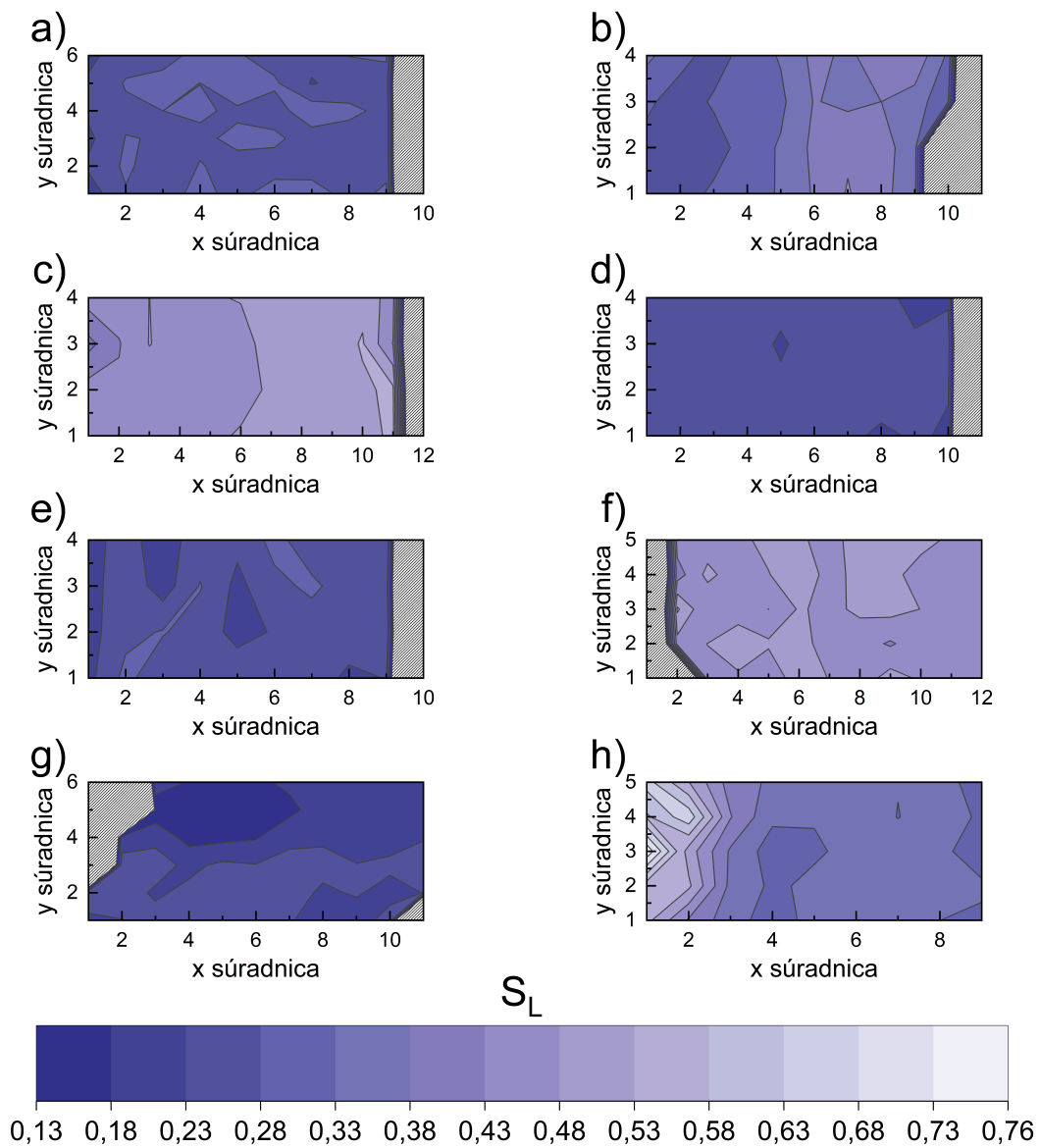
Ako je vidieť z obrázkov máp parametra S_L (obr.3.27) usporiadanie lipidov v suchých depozitoch nie je uniformné.



Obr. 3.25: a) Hodnoty pomeru I_{2850}/I_{2880} v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml. b) Rozsah hodnôt pomeru I_{2850}/I_{2880} označený ako ΔI_{CH_2} v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml.



Obr. 3.26: a) Hodnoty parametra S_L v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml. b) Rozsah hodnôt parametra ΔS_L v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml.



Obr. 3.27: Porovnanie máp parametra S_L z obvodového prstenca depozitov z homogénnych suspenzií s koncentráciou 1 mg/ml. Depozity lipidov: *a)* 16:1 PC, *b)* DMPS, *c)* DMPC, *d)* DOPC, *e)* DOPE, *f)* DPPC, *g)* výťažok z vaječného žĺtka, *h)* výťažok zo sójových bôbov.

Záver

V tejto práci sme sa zaoberali prípravou suspenzií lipozómov (homogénnych i nehomogénnych) z rôznych druhov lipidov a lipidových výťažkov, ich kvapnutím na hydrofóbny komerčne dostupný substrát μ -RIMTM od firmy BioTools a následne po vysušení charakterizáciou vytvorených depozitov pomocou viacerých parametrov. Sledovali sme statický kontaktný uhol kvapky θ , ktorý charakterizuje zmáčavosť substrátu študovanou suspenziou, plochu zaschnutého depozitu S , šírku jeho obvodového prstenca l , porovnávali sme Ramanove spektrá akumulované z obvodového prstenca, ako aj pomer intenzít vybraných spektrálnych pásov odpovedajúcich valenčným vibráciám skupiny CH₂.

Takto sme charakterizovali kvapky a suché depozity zo suspenzií lipozómov vytvorených z piatich rôznych jednozložkových fosfolipidov a dvoch prírodných zmesí (výťažkov) fosfolipidov v troch koncentráciách (1, 0,5 a 0,1 mg/ml). Pri koncentrácii $c = 1$ mg/ml sme pracovali s homogénnou (priemer unilamelárnych lipozómov bol 100 nm) i nehomogénnou (veľkosť a lamelarita lipidových agregátov boli rôzne) suspenziou.

Pri väčšine depozitov vytvorených z homogénnych suspenzií PC a PS lipidov platilo, že s rastúcou koncentráciou suspenzií c rastie šírka obvodového prstenca l . V prípade DPPC a DOPE l v rámci chyby určenia šírky prstenca bola konštantná s rastúcou c .

Depozity z homogénnych suspenzií sa vyznačovali prítomnosťou obvodových prstencov, ale depozity z nehomogénnych suspenzií mali častejšie lipid rozprestretý po celej ploche depozitu. Šírka prstenca depozitu z nehomogénnej suspenzie bola väčšia pri väčšine jednozložkových lipidov, ale v prípade DPPC a prírodných výťažkov lipidov boli širšie prstence depozitov z homogénnych suspenzií.

Pri etanolámínovej hlavičke lipidu (lipid DOPE) sa vytvoril veľmi úzky obvodový prstenec pri všetkých depozitoch, pri depozite z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 0,1$ mg/ml sa ani nevytvoril, lipidový materiál sa rozprestrel po celom depozite. Depozit lipidu DMPC z nehomogénnej suspenzie prstenec nevytvoril vôbec. Najširšie prstence zo všetkých homogénnych a nehomogénnych suspenzií sa vytvorili na depozitoch z výťažku zo sójových bôbov: depozity z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml mali prstence široké $l_{0,1} = 61 \pm 6 \mu\text{m}$, $l_{0,5} = 111 \pm 7 \mu\text{m}$, $l_1 = 162 \pm 7 \mu\text{m}$, depozit z nehomogénnej suspenzie s koncentráciou 1 mg/ml mal prstenec široký $l_{1N} = 157 \pm 7 \mu\text{m}$. Prstenec s najviac variabilnou šírkou obvodového prstenca mal depozit DOPC z nehomogénnej suspenzie ($\sigma_l = 30,1 \pm \mu\text{m}$).

Plocha depozitu v závislosti na koncentrácii homogénnej suspenzie sa zväčšovala pre všetky lipidy okrem depozitu z lipidu 16:1 PC zo suspenzie s $c = 0,5$ mg/ml, kde bola plocha depozitu najväčšia zo všetkých depozitov z homogénnych suspen-

zií. Pri porovnaní plochy depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml, len u dvoch lipidov (DMPS a DPPC) bola plocha depozitu z homogénnej suspenzie väčšia. V prípade ostatných lipidov (DMPC, 16:1 PC, DOPC, DOPE, výťažok z vaječného žltka a výťažok zo sójových bôbov) bola väčšia plocha depozitu z nehomogénnej suspenzie. Najväčší rozdiel vo veľkosti plochy depozitov z homogénnej a nehomogénnej suspenzie je v prípade DOPE $6,08 \pm 0,08$ mm², čo sa prejavilo aj na kontaktných uhloch homogénnej a nehomogénnej suspenzie DOPE.

Statický kontaktný uhol vody na substráte μ -RIMTM bol $(96 \pm 3)^\circ$. Homogénne suspenzie PC, PE a PS lipidov mali statické kontaktné uhly v rozmedzí $(90 \pm 3)^\circ$ až $(102 \pm 3)^\circ$. Nehomogénne suspenzie PC a PS lipidov mali statický kontaktný uhol v rozmedzí $(84 \pm 3)^\circ$ až $(100 \pm 3)^\circ$. Tieto hodnoty ukazujú na podobnú zmáčavosť vody a suspenzií lipozómov v rozmedzí nami študovaných nízkych koncentrácií. Statický kontaktný uhol nehomogénnej suspenzie z lipidu DOPE bol výrazne odlišný od ostatných nameraných hodnôt, a to $(48 \pm 3)^\circ$. Kvapka zo suspenzie podstatne viac zmáčala povrch substrátu, čo súviselo s usporiadaním lipidov vo vodnej fáze vo forme invertovaných agregátov, ktoré sa v nej spontánne tvoria.

Spektrálne pásy v Ramanových spektrách z obvodových prstencov alebo zhlukov lipidového materiálu v depozitoch sa pri zmene koncentrácie homogénnej suspenzie nelíšili vo vlnočtoch, ale len v hodnotách intenzít, pre depozity zo suspenzií s vyššou koncentráciou boli pásy intenzívnejšie. Pri porovnaní Ramanových spektrier z depozitov z homogénnych a nehomogénnych suspenzií sa tiež vlnočty pásov nelíšili, ale len ich intenzity, ktoré boli v spektrách z nehomogénnych depozitov vyššie alebo rovnako veľké ako v spektrách z homogénnych suspenzií.

Ramanove mapy z koeficientov 1.subspektra z obvodových prstencov z depozitov z homogénnych suspenzií s $c = 1$ mg/ml ukazujú, že usporiadanie lipidového materiálu v prstencoch suchých depozitov nie je uniformné. Silnejší Ramanov signál a viac lipidového materiálu pri vonkajšom okraji obvodového prstenca mali depozity 16:1 PC, DOPC a DOPE. V strede prstenca mali viac lipidového materiálu a tým aj silnejší Ramanov signál lipidy DMPC, lipidy z výťažku z vaječného žltka a z výťažku zo sójových bôbov. Depozit DPPC mal maximum Ramanovho signálu skôr na vnútornej strane obvodového prstenca. Najsilnejší signál na vnútornej strane prstenca mal depozit zo suspenzie z DMPS.

Mapy vytvorené z pomerov intenzít spektrálnych pásov $\nu_s(\text{CH}_2)$ (~ 2850 cm⁻¹) a $\nu_a(\text{CH}_2)$ (~ 2880 cm⁻¹) vibrácií indukujú možné fázové zmeny v suchých obvodových prstencoch. Pomer I_{2880}/I_{2850} mal maximálne hodnoty tam, kde Ramanova mapa z koeficientov 1.subspektra, v prípade DMPS, DOPC a výťažku z vaječného žltka. Minimálne hodnoty pomeru I_{2880}/I_{2850} na rovnakých miestach ako boli maximálne hodnoty na Ramanovej mape sme pozorovali pri DMPC a v niektorých častiach prstenca aj pri DOPE. V prípade DOPE je zaradenie nejednoznačné, pretože prstenec depozitu z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml bol úzky a obsahoval

málo lipidového materiálu, takže aj Ramanove spektrá z neho sú menej intenzívne v porovnaní s obvodovými prstencami ostatných vzoriek. Pre DPPC a 16:1 PC bolo rozdelenie hodnôt pomeru I_{2880}/I_{2850} nepravidelné v rámci prstenca.

Rozsahy hodnôt pomeru I_{2880}/I_{2850} a parametra S_L dokazujú, že variabilita usporiadaní v prstenci suchého depozitu je výrazná a prsteneц nie je uniformný oproti meraniam z lipozomálnych suspenzií v literatúre. Jednoznačná interpretácia si však vyžaduje ďalšie štúdium. Najväčší rozsah sledovaných hodnôt mal výťažok zo sójových bôbov $I_{CH_2} = \langle 1,12; 1,85 \rangle$, najmenší DOPC $I_{CH_2} = \langle 0,98; 1,11 \rangle$. Minimum $I_{CH_2}(\text{min}) \sim 0,9$ mal výťažok z vaječného žĺtka, okolo $I_{CH_2}(\text{min}) \sim 1$ lipidy 16:1 PC, DOPC a DOPE. Minimum pomeru intenzít okolo $I_{CH_2}(\text{min}) \sim 1,1$ DMPC a výťažok zo sójových bôbov, $I_{CH_2}(\text{min}) \sim 1,25$ až $1,3$ bolo v prípade DMPS a DPPC. Maximum pomeru intenzít do hodnoty $1,17$ majú lipidy 16:1 PC, DOPC, DOPE a výťažok z vaječného žĺtka. Maximum s hodnotou $I_{CH_2}(\text{max}) = 1,35$ je len pri DMPC, okolo hodnoty $I_{CH_2}(\text{max}) \sim 1,5$ pri lipidoch DMPS a DPPC. Maximum s najvyššou hodnotou má výťažok zo sójových bôbov $I_{CH_2}(\text{max}) \sim 1,85$. Jemné zmeny v Ramanových spektrách ukazujú, že metóda DCDR je citlivá a umožňuje študovať zmeny v usporiadanosti suchých lipidových agregátov.

Literatúra

- [1] SCHRADER, B., editor (2008). *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and applications*. John Wiley & Sons, New York. ISBN 3-527-26446-9.
- [2] CAREY, P. (1982). *Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopes*. Academic Press, New York. ISBN 0-12-159650-8.
- [3] HORÁK, M. a VÍTEK, A. (1980). *Zpracování a interpretace vibračních spekter*. SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha. ISBN 04-605-80.
- [4] MILATA, V., PETER, S., BREZOVÁ, V., GATIAL, A. a KOVÁČIK, V. (2008). *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. Vydavatelstvo STU, Bratislava. ISBN 978-80-227-2960-4.
- [5] LARMOUR, I. A., GRAY, J. P. a BELL, S. E. (2009). Universal Raman enhancement by solvent removal. *Spectroscopy Europe*, **21**(3), 6.
- [6] KOČIŠOVÁ, E. a PROCHÁZKA, M. (2011). Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes. *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**(8), 1606–1610. doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.2915>.
- [7] ZHANG, D., XIE, Y., MROZEK, M. F., ORTIZ, C., DAVISSON, V. J. a BEN-AMOTZ, D. (2003). Raman detection of proteomic analytes. *Analytical chemistry*, **75**(21), 5703–5709.
- [8] KUIŽOVÁ, A., PŘIKRYL, M., PROCHÁZKA, M. a KOČIŠOVÁ, E. (2021). Drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy of contaminants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **262**, 120109.
- [9] KOČIŠOVÁ, E. a KUIŽOVÁ, A. (2024). Drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy: Fundamentals and potential applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, **0**(0), 1–15. doi: 10.1080/05704928.2024.2314534.
- [10] KUIŽOVÁ, A. a KOČIŠOVÁ, E. (2023). Drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy of biologically important molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, **54**(7), 694–705.
- [11] ADAMSON, A. W. a GAST, A. P. (1990). *Physical Chemistry of surfaces*. John Wiley & Sons, 6th edition.
- [12] LARSON, R. G. (2014). Transport and deposition patterns in drying sessile droplets. *AIChE Journal*, **60**(5), 1538–1571.

- [13] HU, H. a LARSON, R. G. (2002). Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, **106**(6), 1334–1344.
- [14] DEEGAN, R. D., BAKAJIN, O., DUPONT, T. F., HUBER, G., NAGEL, S. R. a WITTEN, T. A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, **389**(6653), 827–829.
- [15] HU, H. a LARSON, R. G. (2006). Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**(14), 7090–7094.
- [16] ZANG, D., TARAFDAR, S., TARASEVICH, Y. Y., CHOUDHURY, M. D. a DUTTA, T. (2019). Evaporation of a droplet: From physics to applications. *Physics Reports*, **804**, 1–56.
- [17] KUIŽOVÁ, A. (2019). *Ramanova spektroskopie kvapkovo nanášaných povlaků biologicky významných molekul*. Diplomová práce, vedúci Kočišová, Eva., Praha: Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK.
- [18] VELLA, D. a MAHADEVAN, L. (2005). The “Cheerios effect”. *American journal of physics*, **73**(9), 817–825.
- [19] YUNKER, P. J., STILL, T., LOHR, M. A. a YODH, A. (2011). Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. *nature*, **476** (7360), 308–311.
- [20] WEON, B. M. a JE, J. H. (2010). Capillary force repels coffee-ring effect. *Physical Review E*, **82**(1), 015305.
- [21] YAN, Q., GAO, L., SHARMA, V., CHIANG, Y.-M. a WONG, C. (2008). Particle and substrate charge effects on colloidal self-assembly in a sessile drop. *Langmuir*, **24**(20), 11518–11522.
- [22] RAY, M. A., KIM, H. a JIA, L. (2005). Dynamic self-assembly of polymer colloids to form linear patterns. *Langmuir*, **21**(11), 4786–4789.
- [23] STILLWELL, W. (2013). *An introduction to biological membranes: From bilayers to rafts*. Elsevier, San Diego. ISBN 978-0-444-52153-8. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52153-8.05001-7>.
- [24] CZAMARA, K., MAJZNER, K., PACIA, M., KOCHAN, K., KACZOR, A. a BARANSKA, M. (2015). Raman spectroscopy of lipids: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, **46**(1), 4–20. ISSN 0377-0486. doi: 10.1002/jrs.4607.

- [25] KOYNOVA, R. a CAFFREY, M. (1998). Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, **1376**(1), 91–145.
- [26] ISRAELACHVILI, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, Boston, Third edition.
- [27] NEW, R. R. C. (1990). *Liposomes: A practical approach: Introduction*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York. ISBN 0-19-963077-1.
- [28] DOBROTA, D. a KOL. (2012). *Lekárska biochémia, Vysokoškolská učebnica*. Osveta, Martin, 1. vyd. edition. ISBN 9788080634445.
- [29] JAIN, M. K., WAGNER, R. C. A KOL. (1988). *Introduction to biological membranes*. Wiley New York. ISBN 978-0471844716.
- [30] UHRÍKOVÁ, D. a KOL. (2015). *Biofyzika - Vybrané kapitoly: Učebnica pre vysoké školy*. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava. ISBN 978-80-223-3800-4.
- [31] LUZZATI, V., VARGAS, R., MARIANI, P., GULIK, A. a DELACROIX, H. (1993). Cubic phases of lipid-containing systems: Elements of a theory and biological connotations. *Journal of molecular biology*, **229**(2), 540–551.
- [32] DARAEI, H., ETEMADI, A., KOUHI, M., ALIMIRZALU, S. a AKBARZADEH, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **44**(1), 381–391.
- [33] BHASKARWAR, M., JOSHI, A. a BHASKARWAR, A. N. (2019). *Liposomes: Fundamentals, properties, and applications for targeted drug delivery*. Momentum Press.
- [34] AKBARZADEH, A., REZAEI-SADABADY, R., DAVARAN, S., JOO, S. W., ZARGHAMI, N., HANIFEHPOUR, Y., SAMIEI, M., KOUHI, M. a NEJATI-KOSHKI, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, **8**, 1–9.
- [35] ANWEKAR, H., PATEL, S. a SINGHAI, A. (2011). Liposome - as drug carriers. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, **2**, 945–951.
- [36] DWIVEDI, C. a VERMA, S. (2013). Review on preparation and characterization of liposomes with application. *Int. J. Sci. Innov. Res.*, **2**, 486–508.

- [37] PAULI, G., TANG, W.-L. a LI, S.-D. (2019). Development and characterization of the solvent-assisted active loading technology (SALT) for liposomal loading of poorly water-soluble compounds. *Pharmaceutics*, **11**(9), 465.
- [38] SHARMA, A. a SHARMA, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International journal of pharmaceutics*, **154**(2), 123–140.
- [39] VOCETKOVÁ, K., MÍČKOVÁ, A., JAROŠÍKOVÁ, T., ROSINA, J., HANDL, M. a AMLER, E. (2014). Liposomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace do nanovláknenných nosičů. *Lékař a technika - Clinician and Technology*, **44**(2), 11–17.
- [40] HERNANDEZ, C. a SHUKLA, S. (2022). Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer’s disease. *Neural regeneration research*, **17**(6), 1190–1198.
- [41] EL-HAMMADI, M. M. a ARIAS, J. L. (2019). An update on liposomes in drug delivery: A patent review (2014-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **29**(11), 891–907.
- [42] PANDE, S. (2023). Liposomes for drug delivery: Review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **51**(1), 428–440.
- [43] GREGORIADIS, G., editor (2007). *Liposome Technology, Volume II, Entrapment of Drugs and Other Materials into Liposomes*. Informa Healthcare USA, Inc., New York, Third edition. ISBN 0-8493-8828-7.
- [44] MACDONALD, R. C., MACDONALD, R. I., MENCO, B. P., TAKESHITA, K., SUBBARAO, N. K. a RONG HU, L. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1061**(2), 297–303. ISSN 0005-2736. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90295-J](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90295-J).
- [45] BioTools. μ -RIMTM slide. [online]. Dostupné na: <https://biotools.us/product/%c2%b5-rim-slide-5-slides/>. Cit. 3. 10. 2023.
- [46] ŠTEFANÍKOVÁ, R. (2017). *Dynamika schnutí kapek na površích s různou smáčivostí*. Bakalářská práce, vedoucí Kylián, Ondřej., Praha: Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra makromolekulární fyziky.
- [47] PALACKÝ, J., MOJZEŠ, P. a BOK, J. (2011). SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**(7), 1528–1539.

- [48] LEVIN, I. W. (1984). *Vibrational Spectroscopy of Membrane lipids*. Wiley Heyden, London; New York, volume 11 edition edition. ISBN 978-0471262671.
- [49] WONG, P., CHAGWEDERA, T. a MANTSCH, H. (1987). Structural aspects of the effect of pressure on the Raman and infrared spectra of n-hexadecane. *The Journal of chemical physics*, **87**(8), 4487–4497.
- [50] LIDDLE, W. K. a TU, A. T. (1985). Interaction of myotoxin with a artificial membranes: Raman spectroscopic investigations. *Biochemistry*, **24**(26), 7635–7640.
- [51] BUNOW, M. R. a LEVIN, I. W. (1977). Comment on the carbon-hydrogen stretching region of vibrational Raman spectra of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, **487**(2), 388–394.
- [52] OKAMURA, E., UMEMURA, J. a TAKENAKA, T. (1991). High-sensitivity Raman spectroscopic study on surface-pressure dependence of the structure in thin langmuir–blodgett films of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Journal of Raman spectroscopy*, **22**(12), 759–762.
- [53] JAMIESON, L. E., LI, A., FAULDS, K. a GRAHAM, D. (2018). Ratiometric analysis using Raman spectroscopy as a powerful predictor of structural properties of fatty acids. *Royal Society open science*, **5**(12), 181483.
- [54] O’LEARY, T. J. a LEVIN, I. W. (1984). Raman spectroscopic study of an interdigitated lipid bilayer. Dipalmitoylphosphatidylcholine dispersed in glycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **776**(2), 185–189.
- [55] YOVA, D., ZOUBOULIS, I., LIAROKAPIS, E. a LOUKAS, S. (1990). Raman spectroscopic study of the effects of opiates on dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions. *Journal of Raman spectroscopy*, **21**(4), 251–254.
- [56] HUANG, C. H., LAPIDES, J. R. a LEVIN, I. W. (1982). Phase-transition behavior of saturated, symmetric chain phospholipid bilayer dispersions determined by Raman spectroscopy: Correlation between spectral and thermodynamic parameters. *Journal of the American Chemical Society*, **104**(22), 5926–5930.
- [57] LEE, C. a BAIN, C. D. (2005). Raman spectra of planar supported lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1711**(1), 59–71. ISSN 0005-2736. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.02.006>.

- [58] LARSSON, K. a RAND, R. (1973). Detection of changes in the environment of hydrocarbon chains by Raman spectroscopy and its application to lipid-protein systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **326**(2), 245–255. ISSN 0005-2760. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(73\)90250-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(73)90250-6).
- [59] GABER, B. P. a PETICOLAS, W. L. (1977). On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **465**(2), 260–274.
- [60] NOOTHALAPATI, H., IWASAKI, K., YOSHIMOTO, C., YOSHIKIYO, K., NISHIKAWA, T., ANDO, M., HAMAGUCHI, H.-O. a YAMAMOTO, T. (2017). Imaging phospholipid conformational disorder and packing in giant multilamellar liposome by confocal Raman microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **187**, 186–190.
- [61] SHIPP, D. W., SINJAB, F. a NOTINGHER, I. (2017). Raman spectroscopy: Techniques and applications in the life sciences. *Advances in Optics and Photonics*, **9**(2), 315–428.
- [62] O’LEARY, T. J. a LEVIN, I. W. (1984). Raman spectroscopic study of the melting behavior of anhydrous dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *The Journal of Physical Chemistry*, **88**(9), 1790–1796.
- [63] SCHULTZ, Z. D. a LEVIN, I. W. (2011). Vibrational spectroscopy of biomembranes. *Annual review of analytical chemistry*, **4**, 343–366.

Zoznam obrázkov

1.1	Jablonského diagram pre Rayleighov, Ramanov Anti-Stokesov a Ramanov Stokesov rozptyl. Podľa práce Careyho [2].	5
1.2	Lineárny harmonický oscilátor.	5
1.3	Vibrácie trojatómovej lomenej molekuly XY_2 alebo funkčnej skupiny $-XY_2$, ktoré delíme na: <i>a</i>) valenčné symetrické ν_s , <i>b</i>) valenčné antisymetrické ν_a , <i>c</i>) nožnicové δ_n , <i>d</i>) kyvadlové ρ , <i>e</i>) krútiace (torzné) τ , <i>f</i>) vejárové ω . Prevzaté a upravené podľa práce Milatu a kol. [4].	8
1.4	Vibrácie štvoratómovej molekuly XY_3 alebo funkčnej skupiny $-XY_3$, ktoré delíme na: <i>a</i>) valenčné symetrické ν_s , <i>b</i>) valenčné antisymetrické ν_a <i>c</i>) deformačné rovinné symetrické δ_s , <i>d</i>) deformačné rovinné antisymetrické δ_a . Prevzaté a upravené podľa práce Milatu a kol. [4].	8
1.5	<i>a</i>) Kontaktné uhly θ_1 a θ_2 pri pohľade z boku na kvapku s výškou h a kontaktnou líniou (priemerom kvapky) d . <i>b</i>) Delenie pevných povrchov (substrátov) podľa kontaktného uhla: super-hydrofilné ($\theta \approx 0^\circ$), hydrofilné ($\theta < 90^\circ$), hydrofóbne ($\theta > 90^\circ$), super-hydrofóbne ($\theta > 150^\circ$). Prevzaté a upravené podľa práce Larmoura a kol. [5] a Adamsona a Gasta [11].	10
1.6	<i>a</i>) Schnutie kvapky po kvapnutí pri zafixovanej kontaktnej línii rozpúšťadlo-substrát. <i>b</i>) Schnutie kvapky na konci procesu vysychania pri konštantnom kontaktnom uhle.	11
1.7	Počas vysychania sa v kvapke vytvoria Marangoniho prúdy (naznačené žltými prúdicami). Podľa práce Hua a kol. [15].	14
1.8	Všeobecná štruktúra molekuly fosfolipidu: nepolárny chvost s dvomi zvyškami mastných kyselín R_1 a R_2 , glycerolový most a polárna hlavička. na mieste X v hlavičke môže byť alkohol alebo iná organická skupina.	16
1.9	Tvary molekúl lipidu: <i>a</i>) kónický tvar, <i>b</i>) invertovaný kónický tvar, <i>c</i>) cylindrický tvar.	16
1.10	Všeobecná štruktúra molekuly fosfatidylserínu (PS), fosfatidyletanolamínu (PE) a fosfatidylcholínu (PC) sa líši len aminoalkoholom na mieste X . V prípade PS je namiesto X serín, pri PE etanolamín a pri PC cholín. Prevzaté a upravené podľa práce Dobroty a kol. [28].	18
1.11	Lamelárne fázy lipidov: <i>a</i>) kryštalická alebo pseudokryštalická fáza L_c , <i>b</i>) gélová fáza L_β , <i>c</i>) gélová fáza s naklonenými reťazcami $L_{\beta'}$, <i>d</i>) zvlhnená gélová fáza P_β , <i>e</i>) tekutokryštalická fáza L_α . Prevzaté a upravené podľa práce Jaina a kol.[29].	19

1.12	Agregáty fosfolipidov: <i>a</i>) planárna dvojvrstva, <i>b</i>) normálna micela, <i>c</i>) invertovaná micela, <i>d</i>) unilamelárny lipozóm, <i>e</i>) multilamelárny lipozóm.	22
2.1	Štruktúrne vzorce použitých lipidov: <i>a</i>) DMPS (14:0 PS), <i>b</i>) DMPC (14:0 PC), <i>c</i>) DPPC (16:0 PC), <i>d</i>) 16:1 PC (16:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PC), <i>e</i>) DOPC (18:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PC), <i>f</i>) DOPE (18:1 ($\Delta 9$ - <i>cis</i>) PE), <i>g</i>) výťažok z vaječného žĺtka s acylovými reťazcami R_1 a R_2	28
2.2	Schéma extrudera LiposoFast-Basic od firmy Avestin, Inc. [44]. <i>A</i> - kovový obal, <i>B</i> - teflonové valce s nylonovou siečkou orientované smerom k membráne, <i>C</i> - polykarbonátová membrána, <i>D</i> - O-krúžky po obvode valcov, ktoré zabráňujú pretekaniu suspenzie pri extrudácii a držia nylonovú siečku, <i>E</i> - Hamiltonove striekačky, ktoré sú upevnené na nerezových kapilárach vedúcich z valcov.	31
2.3	Substrát μ -RIM TM so zaschnutými depozitmi.	31
2.4	Schéma Ramanovho mikrospektrometru Horiba Jobin-Yvon Lab-RAM HR800.	33
2.5	Aparatúra na meranie kontaktných uhlov.	34
2.6	Farebnosť záberov homogénneho depozitu DOPE s koncentráciou 0,1 mg/ml (vľavo) a fotografia pripravená na meranie plochy s pozadím zafarbeným zelenou farbou (vpravo).	36
3.1	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DMPS z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	42
3.2	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DMPC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	43
3.3	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DPPC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	44
3.4	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z 16:1 PC z homogénnych suspenzií s koncentraciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	45

3.5	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DOPC z homogénnych suspenzií s koncentráciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	46
3.6	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z DOPE z homogénnych suspenzií s koncentráciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	47
3.7	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z výťažku z vaječného žĺtka z homogénnych suspenzií s koncentráciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	48
3.8	Obrázky depozitov z lipozomálnej suspenzie z výťažku zo sójových bôbov z homogénnych suspenzií s koncentráciami 0,1 mg/ml (riadok 1), 0,5 mg/ml (riadok 2), 1 mg/ml (riadok 3) a z nehomogénnej suspenzie s koncentraciou 1 mg/ml (riadok 4).	49
3.9	a) Závislosť priemernej šírky prstenca l na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie. b) Štandardná odchýlka šírky prstenca σ_l v závislosti na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie .	51
3.10	a) Porovnanie priemernej šírky prstenca l . b) Porovnanie štandardnej odchýlky σ pre depozity z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s koncentraciou $c = 1$ mg/ml.	51
3.11	a) Závislosť priemernej plochy depozitu S na koncentrácii c pre depozity z homogénnej suspenzie. b) Porovnanie priemernej plochy depozitu S pre depozity z homogénnej a nehomogénnej suspenzie s koncentraciou $c = 1$ mg/ml.	53
3.12	a) Závislosť priemerného statického kontaktného uhla θ od koncentracie homogénnej suspenzie lipozómov c . Chyba určenia statického kontaktného uhla bola 3° , vyznačená len pre vodu modrým pásom. b) Porovnanie priemerného statického kontaktného uhla θ vody, homogénnych a nehomogénnych suspenzií lipozómov s koncentraciou $c = 1$ mg/ml.	56
3.13	Porovnanie spektrálneho intervalu 250 až 3400 cm^{-1} Ramanových spektier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentraciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií.	57
3.14	Porovnanie spektrálneho intervalu $700 - 1000\text{ cm}^{-1}$ Ramanových spektier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentraciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií.	59

- 3.15 Porovnanie spektrálneho intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} Ramanových spektier depozitov z homogénnej suspenzie lipozómov s koncentráciou 1 mg/ml. Spektrá majú odčítané pozadie pomocou metódy ortogonálnych diferencií. 63
- 3.16 Depozit DMPS z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. 67
- 3.17 Depozit DMPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. 68
- 3.18 Depozit DPPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. *e*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov. 69
- 3.19 Depozit 16:1 PC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: *a*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *b*) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). *c*) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). *d*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. *e*) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov. 70

3.20	Depozit DOPC z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: <i>a</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>b</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>c</i>) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). <i>d</i>) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.	71
3.21	Depozit DOPE z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: <i>a</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>b</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>c</i>) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). <i>d</i>) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.	72
3.22	Depozit výťažku z vaječného žĺtka z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: <i>a</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>b</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>c</i>) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). <i>d</i>) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi. <i>e</i>) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi vytvorený pomocou dvoch skrížených polarizátorov.	73
3.23	Depozit výťažku zo sójových bôbov z homogénnej suspenzie s koncentráciou $c = 1$ mg/ml: <i>a</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 250 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>b</i>) Ramanova mapa z koeficientov 1. subspektra z intervalu 2500 až 3400 cm^{-1} (vľavo) a prvé subspektrum (vpravo). <i>c</i>) Mapa pomeru intenzít I_{2880}/I_{2850} (vľavo) a prvé subspektrum s vyznačenými spektrálnymi pásmi použitými v pomere (vpravo). <i>d</i>) Obrázok obvodového prstenca s meranými bodmi.	74
3.24	Závislosť maxím a miním z pomeru $I_{\text{CH}_2} = I_{2880}/I_{2850}$ na teplote fázového prechodu T_m . Závislosť je fitovaná kubickým fitom $I_{\text{CH}_2} = a + bT_m + cT_m$. Pomer I_{CH_2} je určený zo sady Ramanových spektier z obvodových prstencov depozitov homogénnych suspenzií jednozložkových lipidov s $c = 1$ mg/ml.	75

3.25	a) Hodnoty pomeru I_{2850}/I_{2880} v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml. b) Rozsah hodnôt pomeru I_{2850}/I_{2880} označený ako ΔI_{CH_2} v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml.	79
3.26	a) Hodnoty parametra S_L v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml. b) Rozsah hodnôt parametra ΔS_L v mapách Ramanových spektier z obvodového prstenca depozitov z homogénnej suspenzie s $c = 1$ mg/ml.	79
3.27	Porovnanie máp parametra S_L z obvodového prstenca depozitov z homogénnych suspenzií s koncentráciou 1 mg/ml. Depozity lipidov: a) 16:1 PC, b) DMPS, c) DMPC, d) DOPC, e) DOPE, f) DPPC, g) výtazok z vaječného žltka, h) výtazok zo sójových bôbov.	80

Zoznam tabuliek

2.1	Priemerné zastúpenie lipidov a mastných kyselín vo výťažku zo sójových bôbov a vo výťažku z vaječného žĺtka.	29
2.2	Teplota fázového prechodu a molekulárna hmotnosť použitých lipidov. * T_m je teplota hlavného fázového prechodu z gélovej fázy do tekutokryštalickej fázy, M_r je molekulárna hmotnosť. Údaje sú prevzaté z stránok firmy Avanti Polar Lipids (https://avantilipids.com).	29
3.1	Priemerné statické kontaktné uhly θ pre homogénne (H) a nehomogénne (N) suspenzie lipozómov s koncentraciami c	56
3.2	Koeficienty kubických fitov $I_{CH_2} = a + bT_m + cT_m$ z grafu na Obr.3.24.	76
3.3	Maximálne a minimálne hodnoty parametra laterálneho usporiadania S_L , rozsah hodnôt parametra usporiadania ΔS_L , maximálne a minimálne hodnoty pomeru intenzít $I_{CH_2} = I_{2880}/I_{2850}$, rozsah hodnôt pomeru intenzít ΔI_{CH_2}	77

Zoznam použitých skratiek

- 16:1 PC** - 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín,
- ATP** - adenzíntrifosfát,
- CCD** - nábojovo viazaná súčiastka na snímanie obrazovej informácie (Charge – Coupled Device),
- CL** - difosfatidylglycerol,
- DCDR** - metóda kvapkovo nanášaných povlakov (Drop Coating Deposition Raman),
- DMPC** - 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfochol (14:0 PC),
- DMPS** - 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serín (14:0 PS),
- DOPC** - 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín (18:1 ($\Delta 9$ -*cis*) PC),
- DOPE** - 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamín (18:1 ($\Delta 9$ -*cis*) PE),
- DPPC** - 1,2-dipalmityl-*sn*-glycero-3-fosfocholín (16:0 PC),
- GUV** - gigantické unilamelárne lipozómy (giant unilamellar vesicle),
- LED** - luminiscenčná dióda (Light - Emitting Diode),
- LUV** - veľké unilamelárne lipozómy (large unilamellar vesicle),
- MGDG** - monogalaktozyl-diacylglycerol,
- MLV** - multilamelárne lipozómy (multilamellar vesicle),
- PA** - fosfatidová kyselina,
- PC** - fosfatidylcholín,
- PE** - fosfatidyletanolamín,
- PEG** - polyetylénglykol,
- PG** - fosfatidylglycerol,
- PI** - fosfatidylinositol,
- PS** - fosfatidylserín,

SUV - malé unilamelárne lipozómy (small unilamellar vesicle),

SVD - metóda singulárneho rozkladu (Singular Value Decomposition),

ULV - unilamelárne lipozómy (unilamellar vesicle),

ULWD - ultra dlhá pracovná vzdialenosť (Ultra Long Working Distance).