



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Anastasija Aleksandrovič

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**PAVIRŠIUJE IMOBILIZUOTŲ FOSFOLIPIDINIŲ MEMBRANŲ
REGENERACIJA DAUGKARTINIO PANAUDOJIMO
BIOLOGINIŲ JUTIKLIŲ PRITAIKYMU**

Darbo vadovė
prof. dr. Aušra Valiūnienė

Vilnius 2024



**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY**

Anastasija Aleksandrovič

Chemistry
Master thesis

**REGENERATION OF TETHERED PHOSPHOLIPID
MEMBRANES FOR REUSABLE BIOSENSORS**

Scientific adviser
prof. dr. Aušra Valiūnienė

Vilnius 2024

TURINYS

NAUDOJAMOS SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Savitvarkiai monosluoksniai	7
1.2 Biologinių membranų modeliai	9
1.3 Alfa-hemolizinas	11
1.4 Melitinas	11
1.5 Elektrocheminio impedanso spektroskopija	12
2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA	14
2.1 Elektrodo paruošimas	14
2.2 Savitvarkio monosluoksnio formavimas	14
2.3 Kontaktinių kampų matavimas	14
2.4 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai	15
2.5 Membranos formavimas	15
2.6 Baltymų įterpimas	16
2.7 Membranos regeneravimas	16
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	17
3.1 Prikabintos fosfolipidinės membranos (tBLM) tyrimas ir regeneravimas	17
3.1.1 tBLM formavimas, nuplovimas ir regeneravimas	17
3.1.2 tBLM su įterptu toksinu nuplovimas ir regeneravimas	18
3.1.3 tBLM su kraujo serumu nuplovimas ir regeneravimas	24
3.1.4 tBLM su toksinu kraujo serumo terpėje nuplovimas ir regeneravimas	28
3.2 Hibridinės fosfolipidinės membranos (hBLM) tyrimas ir regeneravimas	30
3.2.1 hBLM formavimas, nuplovimas ir regeneravimas	30
3.2.2 hBLM su įterptu toksinu nuplovimas ir regeneravimas	32
3.2.3 hBLM su toksinu kraujo serumo terpėje nuplovimas ir regeneravimas	38
IŠVADOS	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS	41
SANTRAUKA	44
SUMMARY	45

NAUDOJAMOS SANTRUMPOS

- FTO – fluoru legiruotas alavo oksidas (angl. fluorine doped tin oxide)
- SAM – savitvarkis monosluoksnis (angl. self-assembled monolayer)
- tBLM – paviršiuje imobilizuota fosfolipidinė membrana (angl. tethered bilayer membrane)
- hBLM – hibridinė fosfolipidinė membrana (angl. hybrid bilayer membrane)
- α HL – α -hemolizinas
- TOPS – trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silanas
- DOPC – 1,2-dioleoil-3-fosfogliceracholinas (angl. 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
- ATS – aliltrichlorsilanas
- ODT – oktadekantiolis
- EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija
- Chol – cholesterolis
- PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. phosphate buffer solution)
- KS – žmogaus kraujo serumas

IVADAS

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio sulaukia tyrimai, susiję su biologinių jutiklių kūrimu ar tobulinimu [1-7]. Yra kuriami ir tiriami biojutikliai, skirti skirtingų virusų (pavyzdžiui, ne taip seniai išgarsėjusio SARS-CoV-2 viruso [1-2]), toksinų (pavyzdžiui, tokių kaip α -hemolizinas ar melitinas), bakterijų (pavyzdžiui, salmoneliozę sukeliančios bakterijos *Salmonella typhimurium* [3]), bei kitų patogenų [4] ar net metastazinių vėžinių ląstelių [5] aptikimui. Biologiniai jutikliai gali būti pritaikomi labai plačiame sričių ruože – nuo maisto mėginių tyrimo ir maisto produktų kokybės bei saugumo įvertinimo [3, 6], iki medicininių diagnostinių tyrimų [5, 7].

Tačiau, kadangi darbas su gyvomis biologinėmis sistemomis yra gana brangus ir nepatogus dėl daugelio darbo sąlygų apribojimų, yra kuriamos įvairios biopanašios sistemos – t.y. sistemos, pakankamai tiksliai atkartojančios dominančią biologinę sistemą. Viena iš svarbių biosistemų, kurią yra stengiamasi atkartoti – tai ląstelės plazminė membrana. Gyvoje ląstelėje membrana yra atsakinga už reikiamų medžiagų patekimą į ląstelės vidų ir nereikiamų medžiagų šalinimą iš jos – kitaip sakant, už ląstelės „bendravimą“ su aplinka – tad tokių sistemų tyrimas yra labai svarbus ir dėl to sudaro didelę visų tyrimų, susijusių su biosistemomis, dalį.

Kuriant biologinių membranų modelius, siekiant palengvinti tolimesnį darbą su jomis, fosfolipidinės membranos yra imobilizuojamos, arba paprasčiau sakant prikabinamos, ant kieto paviršiaus (paviršius, ant kurio yra imobilizuojama fosfolipidinė membrana, dar yra vadinamas substratu). Nesudėtingas ir nebrangus būdas tą padaryti – tai naudoti inkarines sistemas, per kurias membrana yra prikabinama prie norimo paviršiaus. Tokių inkarinių sistemų vaidmenį atlieka savitvarkiai monosluoksniai (SAM). SAM gali ne tik imobilizuoti fosfolipidines membranas paviršiuje, bet ir pakeisti substrato fizikines ir chemines charakteristikas (pavyzdžiui, paviršiaus optinės savybės, elektrinis laidumas ar hidrofiliškumas) į mūsų norimą pusę.

Dažniausiai, fosfolipidinių membranų imobilizavimui yra pasirenkami elektrai laidūs paviršiai (tokie kaip pavyzdžiui metalai ar metalų oksidai) – tam, kad galima būtų panaudoti elektrocheminius tyrimo metodus (pavyzdžiui, tokius kaip chronoamperometrija [8], ciklinė voltamperometrija [9-11], ar elektrocheminio impedanso spektroskopija [12-14]). Vienas iš dažnai naudojamų substratų yra auksas, tačiau sistemos ant aukso turi savo trūkumų – auksas yra brangus, o taip pat jis denatūruoja baltymus, dėl ko sumažėja tokių sistemų biosuderinamumas. Šiame darbe kaip substratas buvo pasirinktas fluoru legiruotas alavo oksidas (FTO) dėl savo prieinamumo bei geresnio suderinamumo su biologinėmis sistemomis. Taip pat, yra tyrimų, įrodančių kad biologinių membranų modeliai, suformuoti ant FTO, pasižymi geresnėmis regeneracinėmis savybėmis, nei ant aukso [13], kas leidžia panaudoti sistemas ant FTO daugiau nei vieną kartą – tai dar labiau sumažina tyrimų kainą bei tausoja išteklius.

Darbo tikslas:

Ištirti sistemų su prikabintomis prie paviršiaus fosfolipidinėmis membranomis regeneracijos galimybes bei galimą pritaikymą daugkartinio naudojimo biologinių jutiklių kūrimui.

Darbo uždaviniai:

- 1) Chemiškai modifikuoti FTO paviršių silanų savitvarkiu monosluoksniu, bei patikrinti gauto SAM kokybę elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu;
- 2) Suformuoti prikabiną prie paviršiaus fosfolipidinę membraną, bei ištirti gautos membranos kokybę ir elektrochemines savybes EIS metodu;
- 3) Ištirti skirtingų toksinų (α -hemolizino ir melitino) poveikį prikabinai fosfolipidinei membranai;
- 4) Ištirti sistemos stabilumą terpėje, artimoje realiam mėginiui, t. y. ištirti kraujo serumo baltymų poveikį prikabinai fosfolipidinei membranai;
- 5) Ištirti paviršiuje imobilizuotos fosfolipidinės membranos su įterptais baltymais (toksinais ir/ar KS baltymais) regeneravimo galimybes.

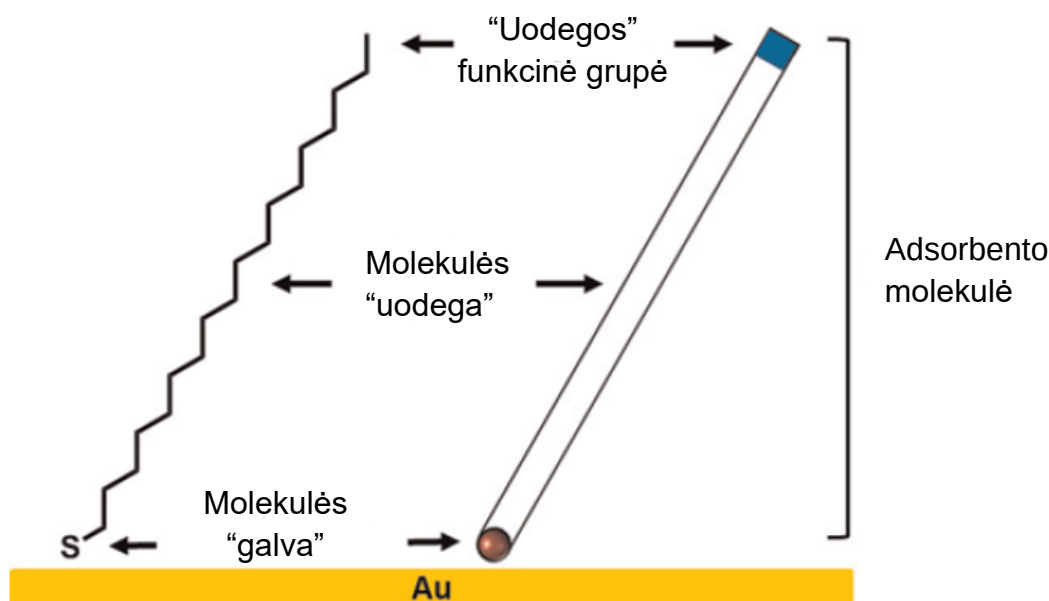
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Savitvarkiai monosluoksniai

Savitvarkiai monosluoksniai (SAM – iš anglų k. self-assembled monolayer) – vienos molekulės storio sluoksniai – gali susidaryti amfifilinėms molekulėms savaime adsorbuojantis ant įvairių paviršių. Iš pradžių savaiminių molekulių jungimąsi lemia fizikinė su paviršiumi besiliečiančių molekulių adsorbcija, tačiau stabilūs monosluoksniai susidaro dėl cheminio giminingumo tarp adsorbento molekulių ir paviršiaus [15]. Paviršiai, ant kurių formuojasi savitvarkiai monosluoksniai, kitaip dar vadinami substratais. Dažniausiai kaip substratai savitvarkiams monosluoksniams formuoti naudojamos tokios medžiagos:

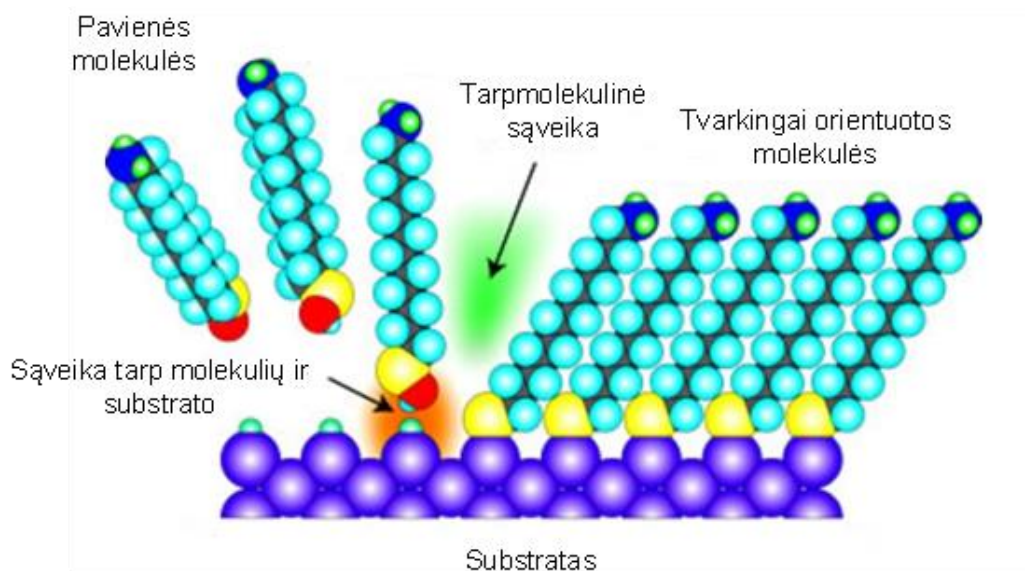
- 1) Metalai (pvz., auksas, platina, sidabras, varis) [15]
- 2) Metalų oksidai (pvz., alavo oksidas, aliuminio oksidas, sidabro oksidas, vario oksidas, titano oksidas)
- 3) Gryni nemetalai (pvz., silicis) [16]
- 4) Nemetalų junginiai (pvz., galio arsenidas GaAs [15], silicio oksidas)
- 5) Stiklas [16]
- 6) Žėrutis

Metalo oksidai, naudojami SAM formavimui, dažnai yra legiruojami skirtingais elementais (fluoru, indžiu, manganu ar stibiu), siekiant pakeisti optines, elektrines ar magnetines savybes. Kadangi susiformavusio savitvarkio monosluoksnio kokybę lemia substrato giminingumas su adsorbento molekulėmis (kitai sakant – molekulėmis, iš kurių ir susidaro SAM), kiekvienam paviršiui yra parenkamos atitinkamos medžiagos, iš kurių formuojami monosluoksniai: ant aukso paviršiaus naudojami sulfidai ar tioliai [15], ant aliuminio, sidabro ar vario oksidų – karboksirūgštys [16], ant stiklo, silicio ar alavo oksidų, žėručio – organosilanai [16]. Taip pat, kaip substratai savitvarkiams monosluoksniams gali būti naudojamos nanodalelės [17-21].



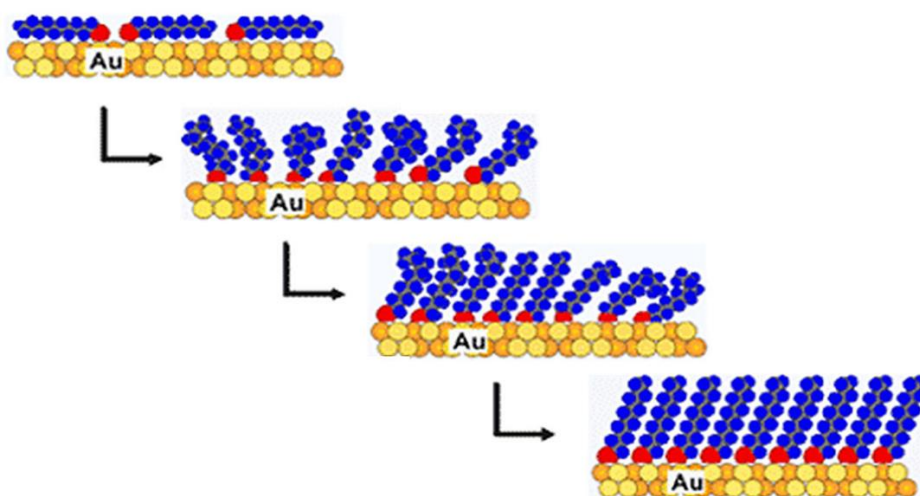
1 pav. Adsorbento molekulės, prikabinotos ant aukso paviršiaus, schema [15]

Su substratu sąveikauja tik viena amfifilinės molekulės dalis – taip vadinama „galva“ (1 pav.) – tam tikra funkcinė grupė, į kurios giminingumą su paviršiumi atsižvelgiama parenkant porą substratas-adsorbentas. Kita molekulės dalis vadinama „uodega“ (1 pav.). Dėl sąveikos tarp „galvos“ ir substrato, SAM prisitvirtina prie paviršiaus, o dėl „uodegų“ tarpusavio sąveikos (Van der Valso ar vandeniliniai ryšiais) susiformuoja tvarkinga struktūra (2 pav.).



2 pav. Savitvarkio monosluoksnio susidarymas¹

Taigi, besiformuojančio SAM tvarkingumui turi įtakos adsorbento molekulių tarpusavio sąveika bei molekulių „uodegų“ ilgis. Vadinasi, galima kontroliuoti monosluoksnio tvarkingumą bei tankumą keičiant naudojamų adsorbentų molekulių ilgius – kitaip sakant, SAM formavimui galima naudoti mišinį iš ilgagrandžių ir trumpagrandžių molekulių (pavyzdžiui, β -merkaptotanolis), ir reguliuojant jų santykį. Tokiu būdu yra gaunami taip vadinami mišrūs savitvarkiai monosluoksniai (angl. mixed self-assembled monolayers) [17].



3 pav. Sulfidų savitvarkio monosluoksnio formavimas ant aukso paviršiaus [22]

¹ Nanoscopic Surface Architecture Laboratory
<http://www.mtl.kyoto-u.ac.jp/english/laboratory/nanoscopic/nanoscopic.htm>

Susiformavusio savitvarkio monosluoksnio tvarkingumas ir tankumas priklauso ir nuo adsorbuojamų molekulių koncentracijos (3 pav.), kuri taip pat lemia ir tai, kiek sluoksnių formuosis ant paviršiaus (ar monosluoksnis, ar daugiau).

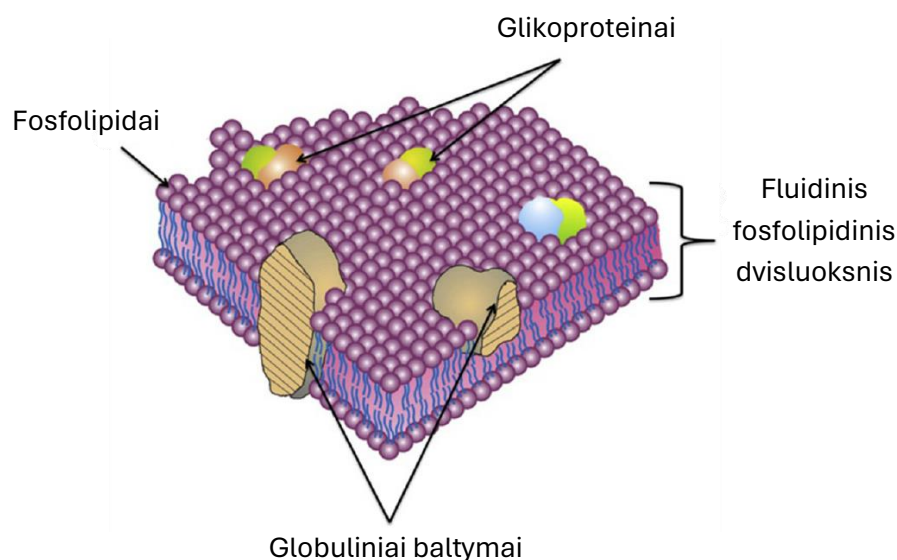
Savitvarkiai monosluoksniai gali būti formuojami iš tirpalo tūrio, kai substratas yra įmerkiamas į adsorbento tirpalą; iš tirpalo lašo, kai ant paviršiaus yra užlašinamas adsorbento tirpalo lašas; taip vadinamu sausu būdu, kai ant sauso paviršiaus antspaudavimo būdu yra užnešamas adsorbentas; arba Langmuir-Blogett metodu, dėl skirtingo hidrofobiškumo ant tirpalo paviršiaus susiformuojant plonai plėvelei.

Savitvarkių monosluoksnių panaudojimas apima labai skirtingas sritis: SAM gali būti naudojami siekiant pakeisti paviršiaus chemines ir/ar fizikines savybes (pavyzdžiui, laidumą ar optines savybes), paviršiui specifiškai modifikuoti ir/ar nanostruktūrizuoti norimais junginiais (pavyzdžiui, siekiant pagerinti substrato biologinį suderinamumą). Taip pat, SAM gali būti pritaikomi paviršių valymui ar tvarkingam daugiasluoksnių auginimui [23]. Be to, savitvarkiai monosluoksniai yra naudojami kuriant biomedžiagas (pavyzdžiui, kurios vėliau yra naudojamos medicininuose prietaisuose ar implantuose) [24], ir siekiant pagerinti organinių optoelektroninių prietaisų charakteristikas [25].

1.2 Biologinių membranų modeliai

Biologinės membranos atlieka svarbų vaidmenį ląstelėje – membrana yra ne tik riba tarp išorinės terpės ir ląstelės sudedamųjų dalių, bet ji taip pat kontroliuoja ląstelės sąveiką su aplinka ir reguliuoja medžiagų pernešimą bei signalų perdavimą per barjerą. Tad biologinių membranų tyrimai gali padėti suprasti ar net paveikti daugelį svarbių procesų ląstelėje. Tačiau tyrimai susiję su biologinėmis sistemomis visada yra gana sudėtingi ir brangūs dėl daugelio darbo apribojimų, tokių kaip, pavyzdžiui, bandinių didelis jautrumas temperatūrai, terpės pH, ir kitų išskylančių sunkumų. Dėl to, siekiant išvengti visų galimų sunkumų, susijusių su biologinių membranų tyrimu, yra kuriamos modelinės sistemos, kurios palengvina darbą, tačiau vis tiek imituoja svarbiausias biologinių membranų savybes.

1972 metais Singer ir Nicolson pristatė fluidinės membranos modelį [26]. Tokio modelio scheminis pavaizdavimas yra pateiktas 4 pav.



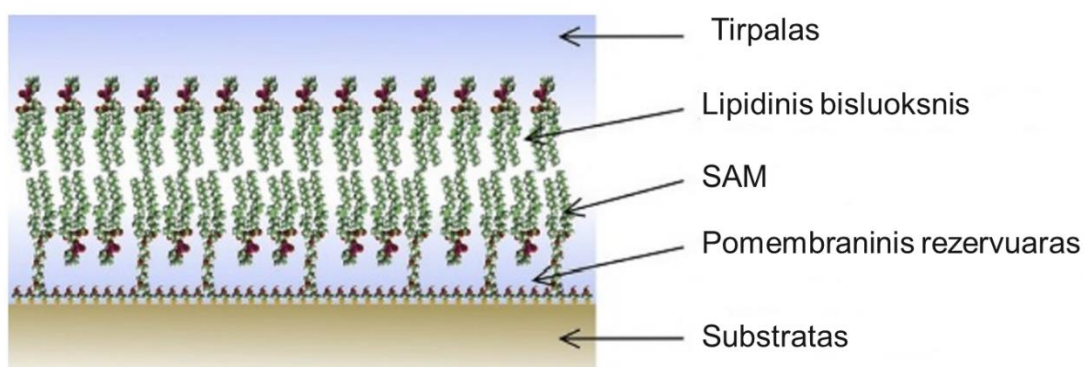
4 pav. Scheminis biologinės membranos atvaizdavimas, remiantis Singer ir Nicolson pateiktu fluidinės membranos modeliu [27]

Globuliniai baltymai (integraliniai arba periferiniai) yra atsitiktinai pasiskirstę homogeniškoje fluidinėje terpėje, kurią sudaro lipidų dv sluoksnis (4 pav.). Pagrindiniai lipidiniai dv sluoksniai sudarantys lipidai tai: fosfolipidai, sfingolipidai ir steroliai. Membraniniai baltymai apima transmembraninius (integralinius) baltymus, periferinius membraninius baltymus arba lipiduose įtvirtintus baltymus, kurie atitinkamai yra įterpti į lipidų dv sluoksnį, prikabinėti dv sluoksnio paviršiuje arba kovalentiškai prisijungę prie membranos riebalų rūgščių. Baltymai yra pagrindiniai ląstelės medžiagų apykaitos, t. y. mainų arba biokatalitinių procesų, veiksniai. Jie dalyvauja tarpląstelinėje sąveikoje, signalų perdavime, jonų ir maistinių medžiagų pernašoje [27].

Remiantis 4 pav. pavaizduotu biologinės membranos modeliu kuriamos biopanašios modelinės sistemos. Tokias sistemas galima suskirstyti į tris pagrindines grupes: monosluoksniai, liposomos ir dv sluoksniai. Kiekvieno iš šių tipo membranai analizuoti gali būti panaudojami tam tikri tyrimo metodai [28], todėl kiekvienas tipas turi savo pranašumų ir trūkumų. Gana platų galimų analizės metodų ruožą turi lipidiniai dv sluoksniai, todėl verta detaliau apžvelgti būtent juos. Lipidiniai dv sluoksniai (arba kitaip dar bisluoksniai – nuo angl. bilayers) savo ruožtu gali būti padalinami į tokias grupes [27]:

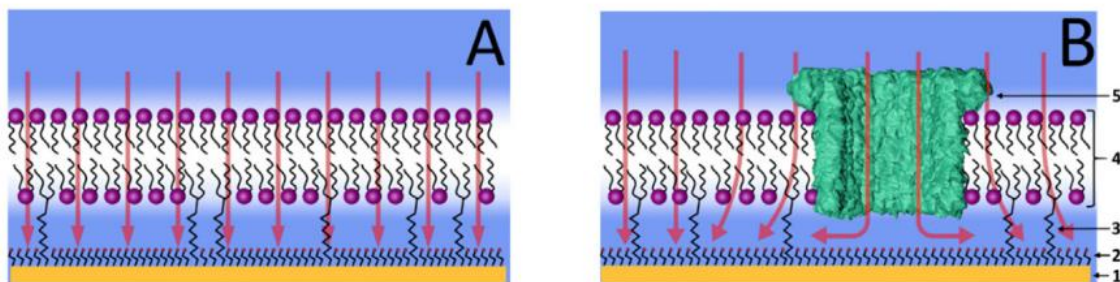
- 1) „Juodosios“ lipidinės membranos (angl. black lipid membranes – BLM)
- 2) Paviršiaus paremti lipidiniai dv sluoksniai (angl. supported lipid bilayers – SLB):
 - a) prikabinotos lipidinės membranos (angl. tethered bilayer lipid membranes – tBLM)
 - b) hibridinės membranos
 - ir kt.

Paviršiuje imobilizuotos (prikabinotos) membranos yra prikabinamos prie norimo paviršiaus (dar kitaip vadinamo substratu) naudojant tam tikrus „inkarus“, kurių vaidmenį dažnai atlieka savitvarkiai monosluoksniai (SAM). Tokiu būdu gauta membrana su SAM ir substratu sudaro struktūrą, parodytą 5 pav.



5 pav. Paviršiuje prikabinotos lipidinės membranos schema [12]

Biologinių membranų modelių formavimas ant kietų elektrai laidžių paviršių leidžia tokių sistemų analizei pritaikyti elektrocheminius tyrimo metodus – pavyzdžiui, elektrocheminio impedanso spektroskopiją [12, 28]. Šis metodas leidžia stebėti, kaip keičiasi membranos elektrinės savybės priklausomai nuo jos kokybės ir defektiškumo. 6 pav. parodyta, kaip defektai tBLM veikia jos elektrines savybes.



6 pav. Scheminis atvaizdavimas kaip defektai membranoje veikia jos elektrines savybes.

A – homogeniška tBLM be defektų, B – tBLM su pavieniu defektu.

1 – substratas, 2 – trumpagrandės SAM molekulės, 3 – ilgagrandės SAM molekulės, 4 – fosfolipidinis dvisluoksnis, 5 – pora (suformavusi natūraliai ar dėl baltymo poveikio). Strėlytės vaizduoja elektrinio lauko linijų kryptį [14]

tBLM elektrinių savybių pasikeitimas priklauso nuo ją veikiančio toksino aktyvumo. Vadinas, užfiksavus šį pokytį galima gauti informacijos apie tam tikros membranos sąveiką su tam tikru toksinu. Toks būtų biojutiklių, reaguojančių į toksino poveikį membranai ir kuriuos galima sukurti biologinių membranų modelių pagrindu, veikimo principas.

1.3 Alfa-hemolizinas

α -hemolizinas – tai toksinas iš bakterinių poras formuojančių toksinų šeimos. α -hemolizinas veikia tokiu būdu: monomerai įsiterpia į ląstelės membraną, 6-7 monomerai susijungia į maždaug 8,5-10 nm skersmens [29] oligomerinę struktūrą tokiu būdu suformuojant taip vadinamą β -statinės (angl. β -barrel) formos porą (vidinės poros skersmuo – apie 2-3 nm [29]), per kurią galimas Ca^{2+} ir K^{+} jonų, ATP ir mažos molekulinės masės molekulių judėjimas [30]. α -hemolizino veikimui reikalingas cholesterolis [30].

Tai į membranas orientuotų toksinų šeimos narys, sukeliantis vaikų periodontitą, pneumoniją, kokliušą ir žmonių bei gyvūnų žaizdų infekcijas [31].

1.4 Melitinas

Melitinas – tai pagrindinis bičių nuodų polipeptidas, sudarytas iš 26 aminorūgščių liekanų, savo savybėmis prilygstantis bičių apitoksinui. Jis pasižymi biologiniu, farmakologiniu ir toksiniu poveikiu. Jis atsakingas už ląstelių suardymą ir žudymą, taip pat būtent dėl jo yra jaučiamas skausmas po įgėlimo. Melitinas yra atsparus rūgštims, tačiau šarmuose yra denatūruojamas [32].

Jis gali sumažinti paviršiaus įtempimą, ląstelių membranose sukurdamas poras, dėl kurių membrana tampa pralaidesnė ir pro ją gali prasiskverbti jonai ir net didesnės molekulės, pavyzdžiui, gliukozė. Taip sudaromas kelias patekti kitiems toksiškiems nuodų komponentams. Melitinas sukelia uždegimą ir mažina kraujo krešėjimą [32].

Melitinas yra polipeptidas, kuris gali egzistuoti kaip pavienė struktūrinė forma arba polimeras. Tirpale melitinas elgiasi kaip monomeras ir, priklausomai nuo galutinės koncentracijos, sudaro antrines arba ketvirtines struktūras [33]. Šio polipeptido amino-galinė dalis yra labiau hidrofobinė, o karboksi-galinė sritis, priešingai, yra hidrofilinė, nes joje yra teigiamai įkrautų aminorūgščių fragmentas. Dėl šios amfifilinės melitino savybės jis naudojamas kaip tipinis peptidas lipidų ir baltymų sąveikai membranose stebėti [34].

1.5 Elektrocheminio impedanso spektroskopija

Pastaraisiais metais elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) tapo vienu iš galingiausių ir informatyviausių metodų sudėtingiems procesams, vykstantiems elektrocheminėse sistemose, tirti. Didėjantį susidomėjimą kelia unikalūs metodo privalumas – galimybė vienu matavimu atskirti ir apibūdinti skirtingus sudėtingo proceso etapus [35].

Elektrocheminio impedanso spektroskopija – tai vienas iš taip vadinamų AC (nuo angl. alternating current), arba kitaip – kintamosios srovės, tyrimo metodas. Kintamąją srovę vadinama tokia elektros srovė kurios dydis, ir kryptis keičiasi laikui einant.

EIS esmė – jei į sistemą yra paduodamas harmoniškai kintantis sinusinės bangos signalas, tai išeinantis signalas taip pat bus sinusoidė, bet skirtingos fazės ir amplitudės. Paduodamo signalo ar gauto atsako kitimąsi (jeigu jie keičiasi pagal sinuso dėsnį) galima aprašyti tokiomis formulėmis [12]:

$$I = I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi_0) \quad (1)$$

$$U = U_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (2)$$

čia $I(U)$ – srovės stipris (įtampa);

$I_0(U_0)$ – maksimali srovės stiprio (įtampos) vertė;

ω – ciklinis dažnis;

φ_0 – pradinė fazė;

t – laikas.

Ciklinį dažnį ω su kintamosios srovės dažniu f galima susieti tokia lygtimi:

$$\omega = 2\pi f \quad (3)$$

Išeinančio ir paduodamo signalų santykis vadinamas impedansu (Z):

$$Z = \frac{\Delta U}{\Delta i} \quad (4)$$

Impedansas yra kompleksinis skaičius ir priklauso nuo dažnio bei tiriamos sistemos savybių. Sistemos charakterizavimui taip pat galima naudoti atvirkštinį impedansui dydį – elektrocheminį admitansą (Y):

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{\Delta i}{\Delta U} \quad (5)$$

EIS metodas yra pagrįstas tiriamos sistemos lyginimu su tam tikrais modeliais. Vadinasi, prieš pradedant matavimą visiškai nieko nežinant apie tiriamą sistemą ir jos galimas savybes, prasmingai interpretuoti eksperimento metu gautą atsaką nepavyks [12].

Dažniausiai naudojamų ekvivalentinėms elektros grandinėms (t.y. modelių, su kuriais lyginami EIS spektrai) sudaryti elementai [36]:

- 1) Rezistorius (varža) – šis komponentas atspindi energijos nuostolius, elektroninį ir joninį laidumą kietose ir vandeninėse terpėse. Šis elementas nepriklauso nuo taikomo dažnių diapazono.
- 2) Induktorius (induktyvumas) – šis komponentas susijęs su magnetiniu lauku, sukuriama matavimo sistemos laidininkuose ir tiriamos elektrocheminės sistemos elektroduose.
- 3) Kondensatorius (talpa) – šis komponentas atspindi elektrostatinio krūvio kaupimąsi tarp dviejų medžiagų.
- 4) Varburgo elementas – šis elementas atspindi cheminių formų difuzijos pasipriešinimą baigtinėje arba pusiau baigtinėje plokščioje srityje dažnių ruože.
- 5) Pastovios fazės elementas – šis elementas atspindi laiko konstantų pasiskirstymą elektrocheminės sistemos elektrodo ir elektrolito sąlyčio riboje.

Matavimo metu gauti duomenys (ω , Z_0 , φ), arba iš jų išskaičiuoti dydžiai gali būti atvaizduojami grafiškai. Pagrindiniai grafinio pavaizdavimo būdai:

- Nyquist koordinatės – tai kompleksinė plokštuma, kurioje ant x ašies atidedama realioji varžos Z sudedamoji, o ant y ašies – menamoji
- Bode koordinatės – susideda iš dviejų kreivių: amplitudės kreivė parodo amplitudės priklausomybę kaip dažnio logaritmo funkciją $\log(Z_0) = Z_0(\log \omega)$, o fazės kreivė vaizduoja fazės kampo φ (dar gali būti žymimas θ) laipsniais priklausomybę nuo dažnio logaritmo $\varphi = f(\log \omega)$.
- Kompleksinės talpos koordinatės – taip pat kompleksinė plokštuma, kurioje ant x ašies atidedama realioji talpos C sudedamoji, o ant y ašies – menamoji.

EIS metodas gali būti efektyvus mikrobiologinės analizės, korozijos kontrolės, dangų ir cemento pastos kokybės kontrolės, kietųjų elektrolitų apibūdinimo ir žmogaus kūno analizės įrankis [37].

2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

2.1 Elektrodo paruošimas

Pirmas žingsnis – tai elektrodo plovimas. Elektrodai – tai stiklo plokštelės (18 mm × 25 mm arba 18 mm × 35 mm dydžio), kurios yra padengtos fluoru legiruotu alavo oksidu (FTO). Elektrodo plovimo procedūra yra tokia: pirmiausia, elektrodai palaikomi 8 min ultragarso vonelėje su 1% komerciškai prieinamo ploviklio „Alconox“ tirpalu, tada laikomi 30 min koncentruotoje H₂SO₄, po rūgšties elektrodai 2 kartus laikomi ultragarso vonelėje su dejonizuotu vandeniu (kiekvieną kartą po 8 min), ir paliekami dejonizuotame vandenyje.

2.2 Savitvarkio monosluoksnio formavimas

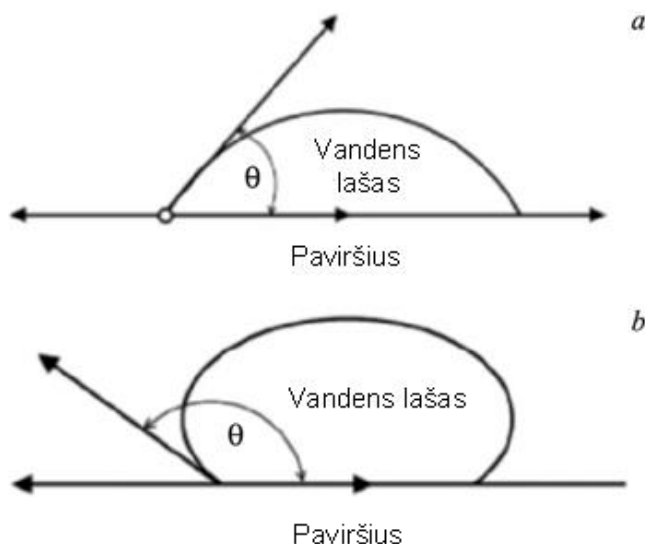
Kitas žingsnis – silanų savitvarkio monosluoksnio formavimas, arba kitaip vadinamas elektrodo silanizavimas. Šiame darbe elektrodo silanizavimui yra naudojamas trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silanas (TOPS), kuris yra sintetinamas tokiu būdu: sumaišomi aliltrichlorsilanas (ATS) ir oktadekantolis (ODT) moliniu santykiu 2(ATS):1(ODT); dedama fotoiniciatoriaus 2,2-dimetoksi-2-fenilacetofenono ir mišinys paliekamas po UV lempa parai.

SAM formavimui elektrodai yra įmerkami į silanų tirpalą – stikliukai yra dedami horizontaliai ant Petri lėkštelės ar stiklinės (priklausomai nuo stikliuko dydžio) dugno laidžia puse į viršų – ir laikomi 1 val. Silanų tirpalo paruošimas – į 10 ml tirpiklio (heptano arba tolueno) dedama 13 µl junginio TOPS. Silanizavimo metu yra palaikoma pastovi silanizavimo mišinio temperatūra – 30°C.

Išėmus elektrodus iš tirpalo, jie yra praplaunami tirpiklyje, kuris buvo naudojamas silanų tirpalui (atitinkamai – heptane arba toluene). Praplovus elektrodus tirpiklyje, jie yra kaitinami 100°C temperatūroje 1 val. tam, kad išgaruotų likusi drėgmė ar tirpiklis.

2.3 Kontaktinių kampų matavimas

Po savitvarkio monosluoksnio formavimo ant FTO substrato (SAM) nustatomas paviršiaus hidrofobiškumas. Tai daroma siekiant patikrinti, ar tikrai susiformavo SAM – silanų sluoksnio suformavimas turėtų padaryti substrato paviršių labiau hidrofobinį negu švarus FTO paviršius. Šiam tikslui ant paviršiaus lašinama 5 µl dejonizuoto vandens ir optiniu tensiometru Theta Lite iš Biolin Scientific matuojamas kontaktinis kampas tarp susiformavusio vandens lašelio ir paviršiaus (7 pav.). Kuo kontaktinis kampas didesnis, tuo paviršius yra labiau hidrofobinis. Matuojama po 5-8 lašelius (priklausomai nuo elektrodo dydžio) kiekvienam elektrodai ir kaip rezultatas imamas vidurkis.



7 pav. Kontaktinis kampas θ tarp paviršiaus ir vandens lašo.
(a) – hidrofilinis paviršius, (b) – hidrofobinis paviršius

2.4 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai

Taip pat, savitvarkio monosluoksnio kokybės nustatymui atliekami elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) tyrimai. EIS tyrimai atliekami naudojant Autolab FRA programinę įrangą, trijų elektrodų sistemoje: darbinis elektrodas – FTO plokštelė, palyginamasis – Ag/AgCl, NaCl_{sot.}, pagalbinis – Pt viela. Kaip buferinis tirpalas yra naudojamas 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH₂PO₄ tirpalas dejonizuotame vandenyje, pH reguliuojamas pridėdant NaOH ar/ir HCl, pH 7,1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai atliekami esant 0 V potencialui Ag/AgCl, NaCl_{sot} elektrodo atžvilgiu, kintamosios srovės dažnių intervale nuo 0,1 Hz iki 50 kHz.

EIS metodu tiriami sistemos talpuminės varžos realiosios ir menamosios dalių pokyčiai, ant FTO paviršiaus susiformuojant savitvarkiui monosluoksniui (o vėliau ir membranai). Vienas ant kito susiformuojantys sluoksniai veikia kaip nuosekliai sujungti kondensatoriai, vadinasi, jų talpos susideda kaip atvirkštiniai dydžiai ir didėjant sluoksnių skaičiui bendra sistemos talpa turėtų mažėti. Taip, stebint sistemos talpuminės varžos realiosios ir menamosios dalių pokyčius galima spręsti apie susiformavusių SAM (bei membranos) kokybę, o paskui ir apie toksinų poveikį membranai.

2.5 Membranos formavimas

Jei FTO paviršių pavyko sėkmingai silanizuoti, toliau ant SAM yra formuojama fosfolipidinė membrana vezikulių liejimo metodu. Vezikulių tirpalas – tai 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholino (DOPC) ir cholesterolio (Chol) moliniu santykiu 6:4 (bendra lipidų koncentracija 1 mM), arba tik DOPC, tirpalas fosfatiniame buferyje (pH 4,5). Ant elektrodų į celę įpilama vezikulių tirpalo ir paliekama 30-60 min. Vezikulės išplaunamos PBS (pH 7,1), kuriame toliau ir atliekami EIS matavimai.

2.6 Baltymų įterpimas

Atlikus membranos EIS matavimus, į celę pridedama toksino (alfa-hemolizino arba melitino) ir paliekama. Toksino veikimo laikas – 30 min. Praėjus reikiamam laikui, atliekami EIS matavimai, ir fiksuojamas toksino poveikis membranai – t.y. EIS spektrų Bode koordinatėse minimumo poslinkis į didesnių dažnių pusę. Kuo minimumas yra labiau pasislinkęs į didesnių dažnių pusę, tuo labiau defektiškesnė ir heterogeniškesnė pasidarė membrana (kitai sakant – pablogėjo jos kokybė) po toksino įterpimo.

Taip pat, siekiant patikrinti būsimojo biojutiklio veikimą realioje terpėje, buvo atliekami tyrimai žmogaus kraujo serumo (KS) terpėje ir stebima, kaip KS esantys baltymai įsiterpia į membraną, koks yra jų poveikis membranos kokybei, toksinų poveikiui bei tolimesniam membranos regeneravimui (kuris yra aprašytas 2.7 skyrelyje). Tam tikslui į celę į buferinį tirpalą pridedama kraujo serumo, kad bendra KS koncentracija celėje būtų nuo 10 iki 50 %, ir atliekami EIS matavimai tokioje terpėje (pagal aprašytą 2.4 skyrelyje metodiką).

2.7 Membranos regeneravimas

Įterpus į membraną toksiną ir/arba kraujo serumo baltymus ir užfiksavus jų sukeltus pokyčius membranos kokybėje EIS metodu, membrana kartu su įterptais baltymais yra nuplaunama, ir ant likusio SAM vėl formuojama nauja membrana pagal 2.5 skyrelyje aprašytą metodiką. Nuplovimas vyksta tokiu būdu:

- 1) iš celės išpilamas buferinis tirpalas (kartu su serumu, jei jo yra),
- 2) įpilama 450 arba 250 μ l (priklausomai nuo celės dydžio) atitinkamo ploviklio: komercinio detergento Alconox 1% tirpalas, urėjos (karbamido) 8M tirpalas, skruzdžių rūgšties 50% tirpalas,
- 3) priklausomai nuo ploviklio palaukiama tam tikrą laiką (detergentas – 3 min, kiti – nelaukiama),
- 4) tirpalas prapumpuojamas kelis kartus su automatine pipete ir išpilamas,
- 5) 2-4 žingsniai kartojami su 2-propanolio 50% tirpalu ir su dejonizuotu vandeniu
- 6) į celę įpilama buferinio tirpalo (PBS, pH 7,1), su kuriuo toliau atliekami matavimai.

Nuplovus membraną su įterptais baltymais, atliekami EIS matavimai, siekiant įvertinti likusio savitvarkio monosluoksnio kokybę (bei patikrinti, ar apskritai yra likęs SAM, ar jis nenusiplovė kartu su lipidais ir baltymais). Tada ant likusio po nuplovimo silanų monosluoksnio pakartotinai yra liejama fosfolipidinė membrana ir kartojami visi sekantys žingsniai (2.5 – 2.7 skyreliai).

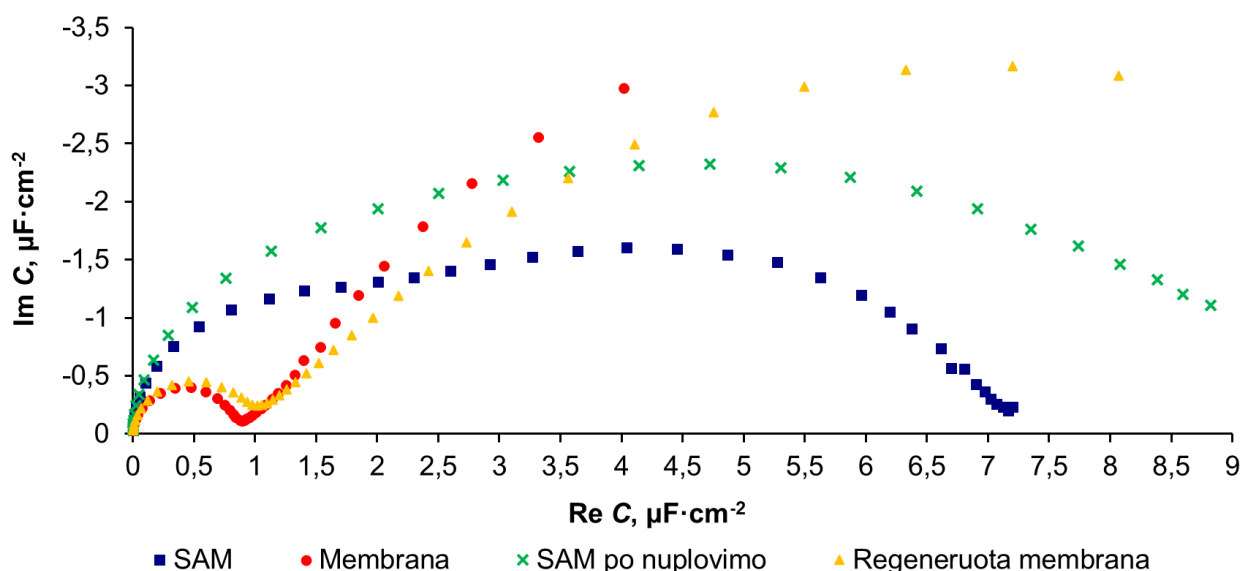
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Prikabintos fosfolipidinės membranos (tBLM) tyrimas ir regeneravimas

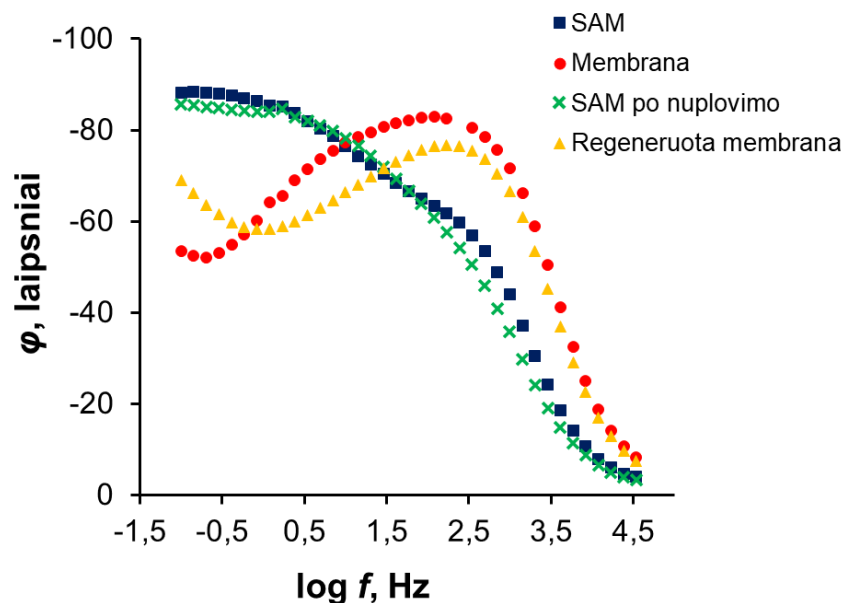
3.1.1 tBLM formavimas, nuplovimas ir regeneravimas

Pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką FTO paviršius buvo funkcionalizuojamas silanų savitvarkiu monosluoksniu, ant kurio pagal 2.5 skyrelyje aprašytą metodiką formuojama paviršiuje prikabinta fosfolipidinė membrana (tBLM). Membrana nuplaunama ir regeneruojama (2.7 skyrelis). EIS metodu patikrinama po regeneravimo suformuotos membranos kokybė.

Kadangi lipidai yra lengvai nuplaunami alkoholiniais tirpikliais, o baltymai – ne, buvo siekiama parinkti baltymams išplauti tinkamą ploviklį, nepažeidus savitvarkio monosluoksnio, kad po nuplovimo galima būtų pakartotinai suformuoti ant jo tBLM. Buvo atlikti bandymai su skirtingais neorganiniais tirpikliais (pavyzdžiui, 2M sieros rūgšties tirpalas), tačiau gauti neigiami rezultatai (po nuplovimo membrana nesiregeneruoja). Teigiamas rezultatas gautas nuplovimui naudojant komerciškai prieinamo detergento Alconox 1% tirpalą:



8 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žali kryžiuikai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (geltoni trikampiai – regeneruota membrana)



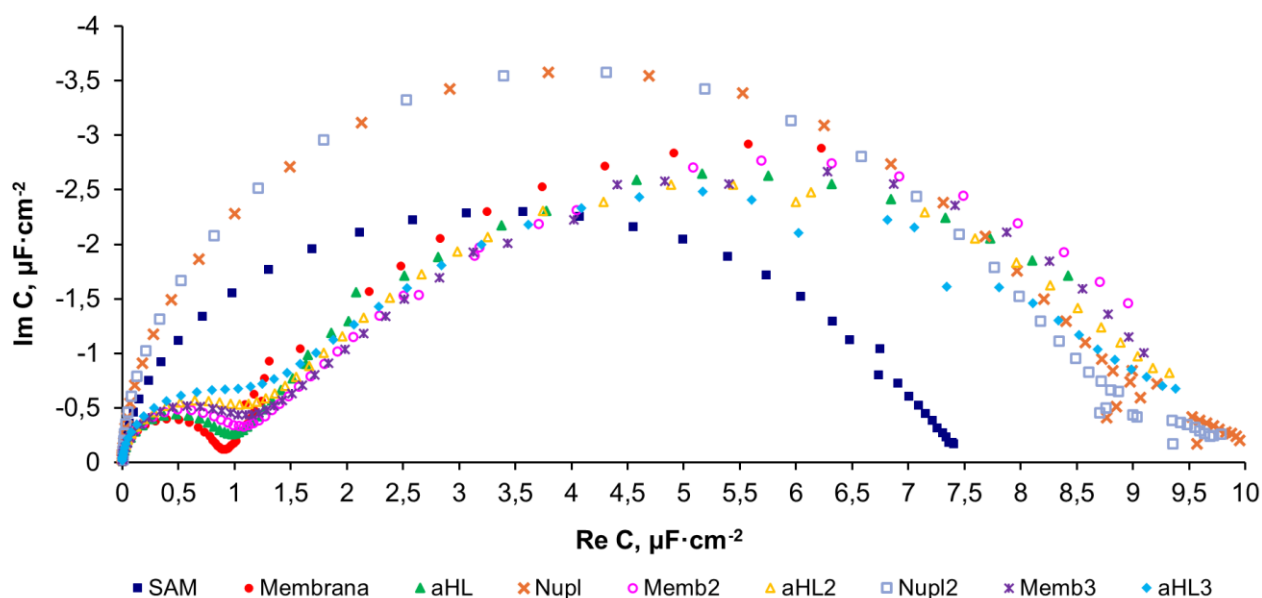
9 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žali kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (geltoni trikampiai – regeneruota membrana)

Po nuplovimo SAM talpa padidėjo – tą galime matyti iš pusapskritimio padidėjimo kompleksinės talpos koordinatėse (8 pav.). Iš mažo pusapskritimio kompleksinės talpos koordinatėse (8 pav.) bei minimumo Bode koordinatėse (9 pav.) galime spręsti, kad po nuplovimo membrana sėkmingai susiformavo – tai įrodo, kad nepaisant talpos padidėjimo, savitvarakis monosluoksnis išliko funkcionalus po nuplovimo. Taip pat, iš $\log f_{min}$ poslinkio į didesnių dažnių pusę Bode koordinatėse (9 pav.) galime pamatyti, kad po nuplovimo regeneruota membrana yra blogesnės kokybės (t.y. turi daugiau defektų), negu pirminė.

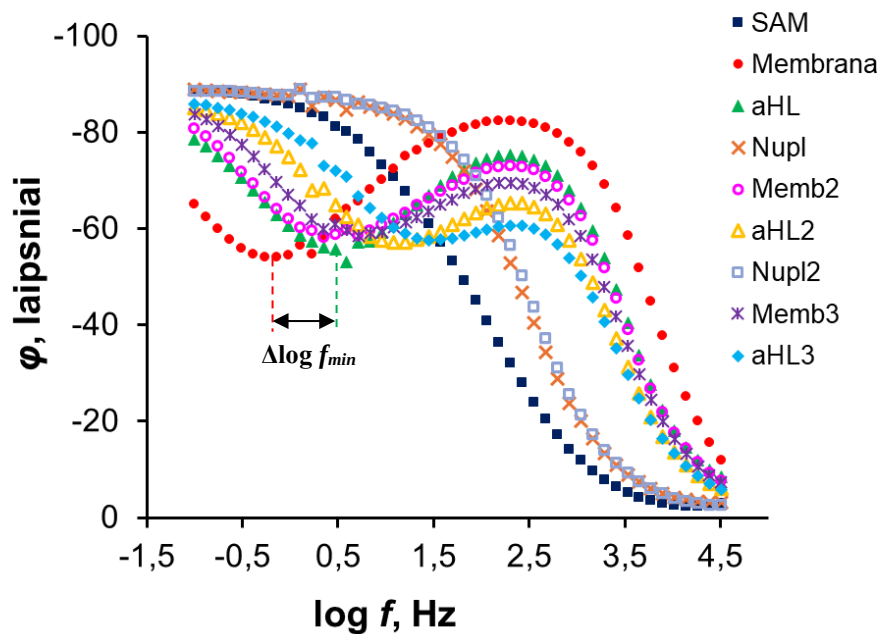
3.1.2 tBLM su įterptu toksinu nuplovimas ir regeneravimas

Kadangi pavyko sėkmingai nuplauti ir regeneruoti prikabiną fosfolipidinę membraną, nuplovimui naudojant detergentą Alconox, bandoma nuplauti membraną su įterptu alfa-hemolizinu (toksinų įterpimo metodika aprašyta 2.6 skyrelyje).

Po nuplovimo sėkmingai regeneravus membraną, ji vėl yra veikiamą toksinu, ir fiksuojamas jo poveikis (apie toksino poveikį yra sprendžiama iš Bode koordinatėse minimumo poslinkio į didesnių dažnių pusę).



10 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai ir tuščiaviduriai kvadratai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir violetinės žvaigždutės), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai)



11 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai ir tuščiaviduriai kvadratai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir violetinės žvaigždutės), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai)

Iš gautų EIS spektrų (10 ir 11 pav.) matome, kad po kiekvieno nuplovimo sėkmingai regeneruojasi membrana. Taip pat, galime pastebėti, kad po pirmo nuplovimo padidėja savitvarkio monosluoksnio talpa – tą matome iš pusapskritimio kompleksinėse koordinatėse (10 pav.) padidėjimo. Tai galimai įvyksta dėl to, kad detergento polinės molekulės įsiterpia tarp SAM sudarančių amfifilinių molekulių. Tačiau matome, kad inkarų sistema po pirmo nuplovimo stabilizuojasi ir po antro nuplovimo jau grįžta į tą pačią būseną (kai SAM talpa yra apie $7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$).

Taip pat matome, kad naujai suformuota membrana išlieka funkcionali, nepaisant talpos padidėjimo, kadangi kiekvieną kartą stebimas toksino poveikis membranai. Siekiant patikrinti, ar toksino sukelta membranos pažeida yra vienoda po kiekvieno regeneravimo, buvo apskaičiuoti $\log f$ minimumo poslinkiai, t.y. $\Delta \log f_{\min}$, naudojantis 11 pav. pateiktais duomenimis. Apskaičiuotos $\log f_{\min}$ bei $\Delta \log f_{\min}$ vertės yra pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Membranos $\log f$ minimumo Bode koordinatėse poslinkiai, sukelti toksino poveikio, apskaičiuoti iš 11 pav. pateiktų duomenų

	$\log f_{min}, \text{Hz}$	$\Delta \log f_{min}$
Membrana pradinė	-0,27	0,74
+ αHL	0,47	
Membrana po pirmo nuplovimo	0,35	0,74
+ αHL	1,08	
Membrana po antro nuplovimo	0,71	0,74
+ αHL	1,45	

Iš 1 lentelėje pateiktų verčių matome, kad po kiekvieno sistemos regeneravimo toksino poveikis membranai išlieka pastovus logaritminėje skalėje ($\Delta \log f_{min} = 0,74$).

Membranos $\log f_{min}$ padėtis (Bode koordinatėse) siejasi su defektų tankiu pagal tokią priklausomybę [38]:

$$\log N_{def} \approx 0,93 \log f_{min} + const \quad (6)$$

čia N_{def} – tai defektų, esančių membranoje, tankis;

$const$ – konstanta, į kurią įeina pomembraninio sluoksnio savitoji varža ρ_{sub} .

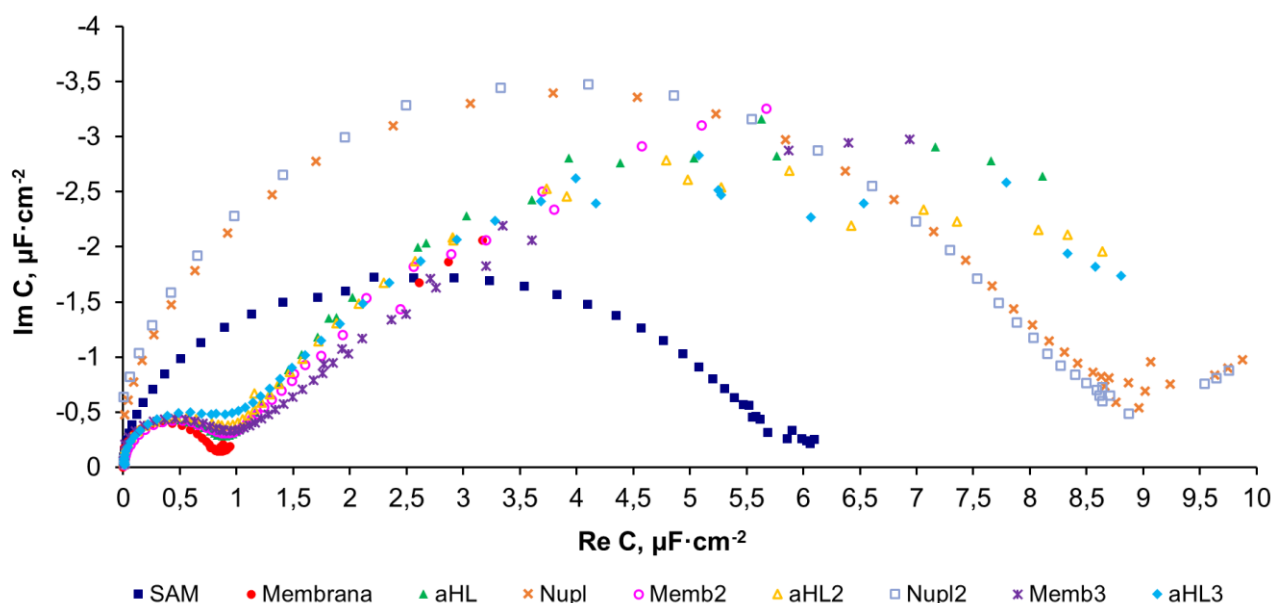
Iš (6) lygties galima išvesti paprastesnę priklausomybę:

$$\log f_{min} \sim \frac{N_{def}}{\rho_{sub}} \quad (7)$$

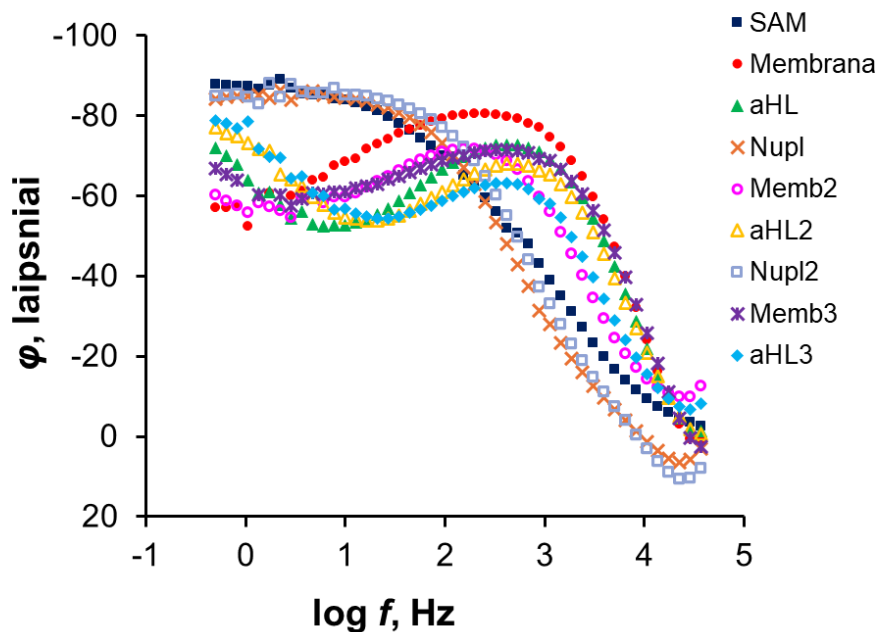
Iš (7) lygties matome, kad galime susieti suformuotų membranų $\log f_{min}$ padėtį su defektų tankiu N_{def} , jei pomembraninio sluoksnio savitoji varža yra pastovi ($\rho_{sub} = const$). Jei suformuotų membranų defektų tankis (N_{def}) yra pastovus, tai šių membranų $\log f_{min}$ padėties kitimas reiškia, kad keičiasi pomembraninio sluoksnio savitoji varža (ρ_{sub}).

Šių tyrimų metu nustatyta, kad α -hemolizinas kiekvieną kartą sukelia vienodą $\log f_{min}$ poslinkį ($\Delta \log f_{min} = 0,74$) nepriklausomai nuo pradinės membranų $\log f_{min}$ padėties (11 pav., 1 lentelė). Kadangi kiekvieną kartą membrana buvo veikiamą vienodu tos pačios koncentracijos toksino kiekiu (100 nM), tai tikėtina, kad po sąveikos su toksinu membranose susidarė vienodas defektų skaičius N_{def} . Iš eksperimentinių duomenų galima matyti, kad membranų $\log f_{min}$ padėtis po kiekvieno regeneravimo slenkasi į didesnių dažnių pusę (11 pav.), o pagal (7) lygtį matome, kad jei $\log f_{min}$ didėja, o N_{def} išlieka pastovus, vadinasi, turėtų mažėti ρ_{sub} narys. Vadinasi, remiantis eksperimentiniais EIS duomenimis galime teigti, kad po fosfolipidinio dvisluoksnio nuplovimo ir regeneravimo mažėja pomembraninio sluoksnio savitoji varža (ρ_{sub}).

Siekiant patikrinti rezultatų atsikartojamumą buvo atliktas pakartotinis tyrimas identiškėmis sąlygomis. Gauti rezultatai pateikiami 12 ir 13 pav.



12 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai ir tuščiaviduriai kvadratai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir violetinės žvaigždutės), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai)



13 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai ir tuščiaviduriai kvadratai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir violetinės žvaigždutės), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai)

Šiuo atveju taip pat buvo apskaičiuoti $\log f$ minimumo poslinkiai $\Delta \log f_{min}$, naudojantis 13 pav. pateiktais duomenimis. Nustatytos $\log f$ minimumų bei $\Delta \log f_{min}$ vertės yra pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. Membranos $\log f$ minimumo Bode koordinatėse poslinkiai, sukelti toksino poveikio, apskaičiuoti iš 13 pav. pateiktų duomenų

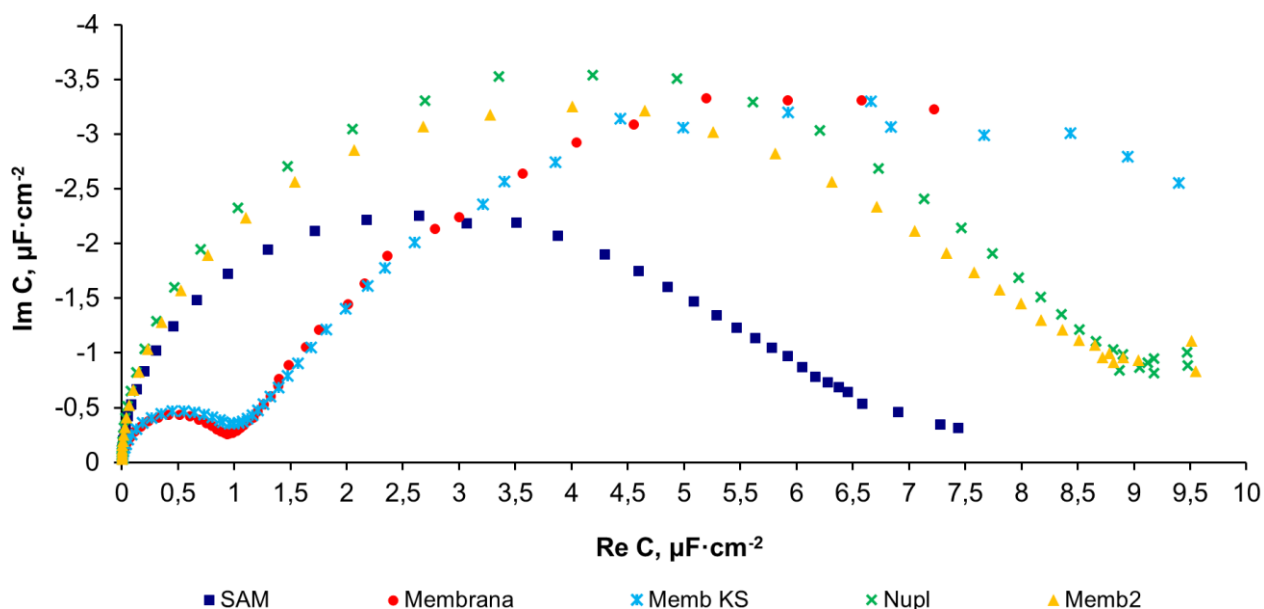
	$\log f_{min}$, Hz	$\Delta \log f_{min}$
Membrana pradinė	0,02	0,86
+ α HL	0,89	
Membrana po pirmo nuplovimo	0,46	0,86
+ α HL	1,32	
Membrana po antro nuplovimo	0,46	0,86
+ α HL	1,32	

Iš 2 lentelėje pateiktų verčių matome, kad rezultatai atsikartoja – po kiekvieno nuplovimo membranos minimumo poslinkis po toksino veikimo išlieka pastovus logaritminėje skalėje ($\Delta \log f_{min} = 0,86$).

Apibendrinant gautus rezultatus (10-13 pav.), galima teigti, kad ant silanizuoto FTO paviršiaus suformuotų dvisluoksnių DOPC-Chol membranų EIS duomenų analizė leidžia daryti išvadas apie membranos struktūrą, t. y. įrodyti pomembraninio sluoksnio savybių pasikeitimą veikiant membraną Alconox plovikliu. Nustatyta, kad po nuplovimo sumažėja pomembraninio sluoksnio savitoji varža ρ_{sub} , kuri gali lemti būsimojo jutiklio veikimo zoną. Kadangi buvo stebimas vienodas toksino sukeltas poveikis membranai ir šie rezultatai atsikartojo, vadinasi, tokio tipo fosfolipidinių dvisluoksnių sistemos galėtų būti naudojamos biojutiklių, skirtų toksinų detekcijai, konstravimui.

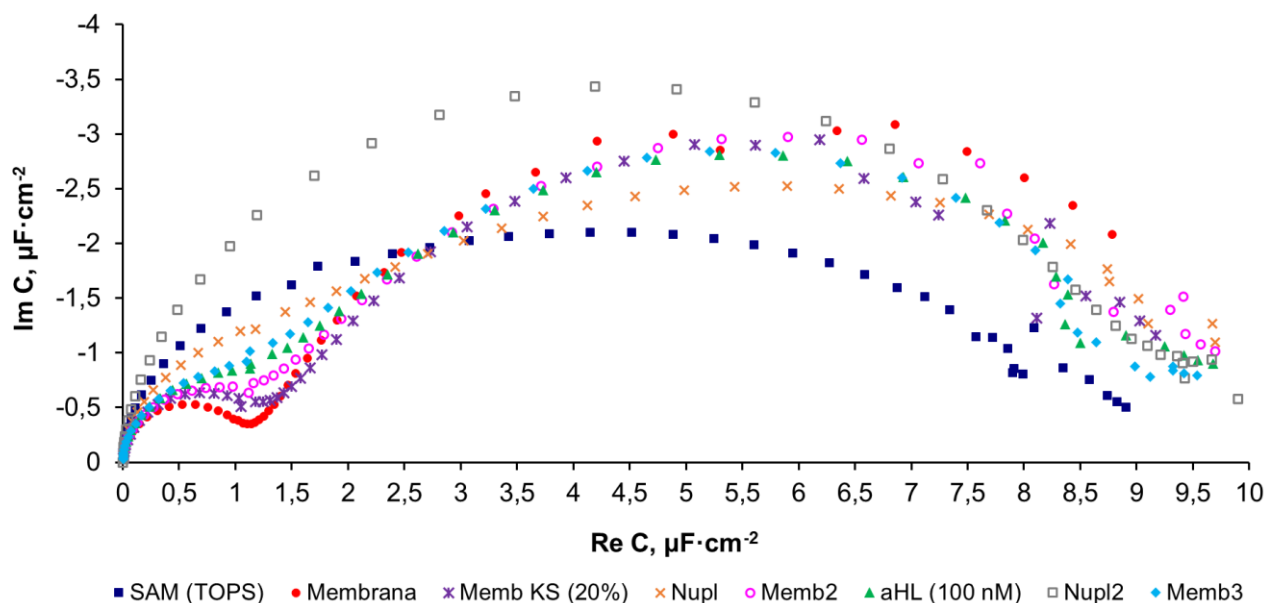
3.1.3 tBLM su kraujo serumu nuplovimas ir regeneravimas

Kadangi pavyko sėkmingai nuplauti ir regeneruoti tBLM su įterptu α -hemolizinu, nuplovimui naudojant detergentą Alconox, atliekamas tyrimas, bandant nuplauti bei regeneruoti membraną, paveikus ją kraujo serumu. Nuplovimui naudojant tokią pačią metodiką, kraujo serumą išplauti nepavyko (14 pav.), todėl buvo bandomi kiti tirpikliai – urėjos 8M tirpalas, skruzdžių rūgšties 50% tirpalas.

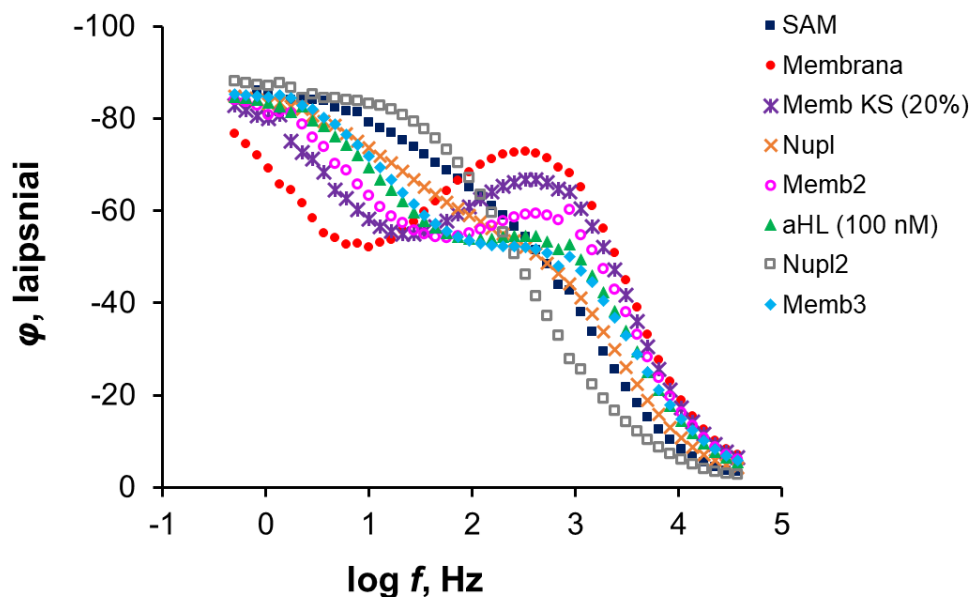


14 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (žydros žvaigždutės), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žali kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – geltoni trikampiai)

Nuplovimui naudojant skruzdžių rūgšties 50% tirpalą, gauti teigiami rezultatai (15-16 pav.). Po nuplovimo sėkmingai regeneravus membraną, ji yra veikiamą toksinu, ir fiksuojamas jo poveikis – tai daroma siekiant patikrinti, ar naujai suformuota membrana išlieka funkcionali ir tinkama toksinų detekcijai naudoti.



15 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (violetinės žvaigždutės), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir žydri rombai), po regeneruotos membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai), ir po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (tuščiaviduriai kvadratai)

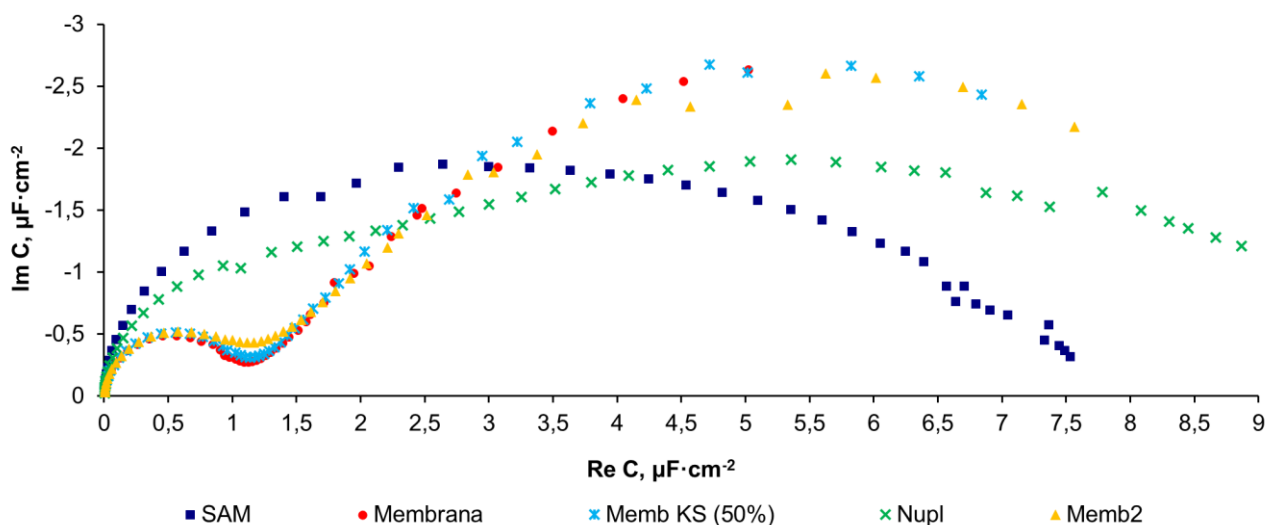


16 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (violetinės žvaigždutės), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir žydri rombai), po regeneruotos membranos veikimo 100 nM α -hemolizino (tuščiaviduriai trikampiai ir žydri rombai), ir po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (tuščiaviduriai kvadratai)

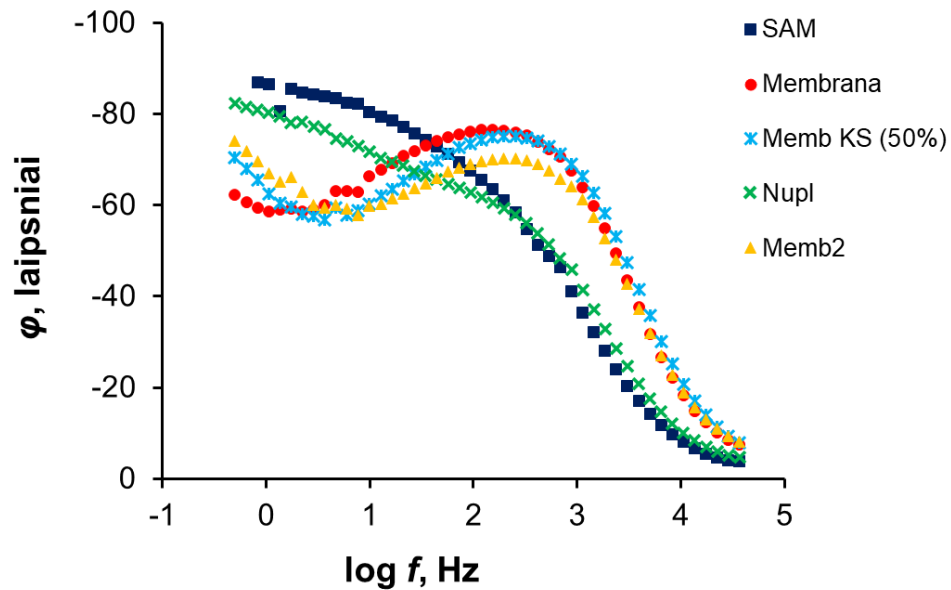
Iš mažo pusapskritimio kompleksinės talpos koordinatėse (15 pav.) bei minimumo Bode koordinatėse (16 pav.) matome, kad nuplovus membraną, kuri buvo paveikta 20% kraujo serumu, pavyksta sėkmingai pakartotinai suformuoti membraną. Naujai suformuota membrana išlieka funkcionali, nepaisant talpos padidėjimo – ją paveikus toksinu (α -hemolizinu) stebima membranos pažaida. Tačiau galime pastebėti, kad kraujo serumas gana stipriai užblokuoja tBLM, kadangi net ir po KS išplovimo į regeneruotą membraną pridėjus toksino, jo poveikis yra daug menkesnis, nei buvo stebimas pirminei membranai (11 ir 13 pav.). Taip gali įvykti dėl to, kad kraujo serume esantys baltymai galimai prasiskverbia į pomembraninį sluoksnį, taip užblokuodami galimybę poras formuojančiam α -hemolizinui tinkamai veikti ir pažeisti membraną. Nuplovimo metu pomembraniniame sluoksnyje esantys junginiai neišsiplauna, todėl dalis kraujo serumo lieka ir po nuplovimo – tai paaiškina, kad net ir po nuplovimo regeneruotai membranai toksino poveikis yra menkas.

Taip pat, galime pastebėti, kad po KS nuplovimo (kaip ploviklį naudojant skruzdžių rūgšties tirpalą) SAM negrįžta į „didesnės talpos“ būseną (15 pav.), kaip tai buvo stebima nuplovimo su Alconox atveju (10, 12, 14 pav.). Tačiau, nuplovus membraną su įterptu toksinu (15 pav. 2 nuplovimas), likusio savitvarkio monosluoksni talpa vėl padidėja iki maždaug $7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

17 ir 18 pav. pateikiamos eksperimentinės EIS kreivės, nustatytos tiriant suformuotų membranų regeneravimo galimybes po poveikio su 50% KS, naudojant tokią pačią plovimo metodiką, kaip ir eksperimentuose, aprašytuose aptariant 15 ir 16 pav.



17 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 50% kraujo serumo (žydros žvaigždutės), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žali kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – geltoni trikampiai)

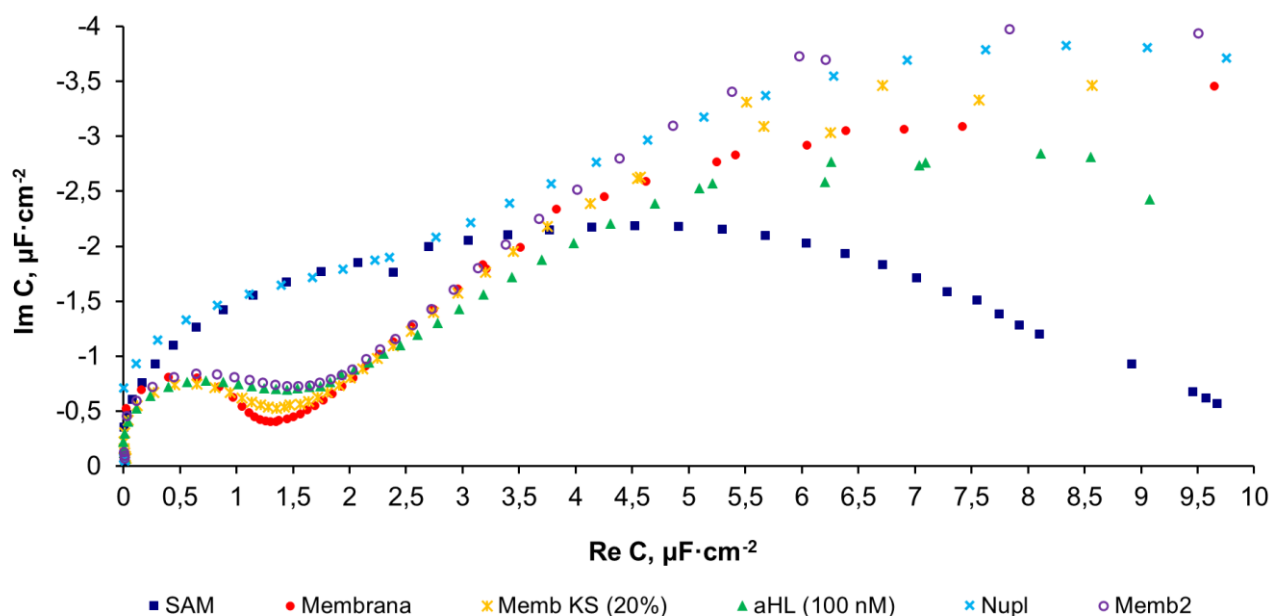


18 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 50% kraujo serumo (žydros žvaigždutės), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žali kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – geltoni trikampiai)

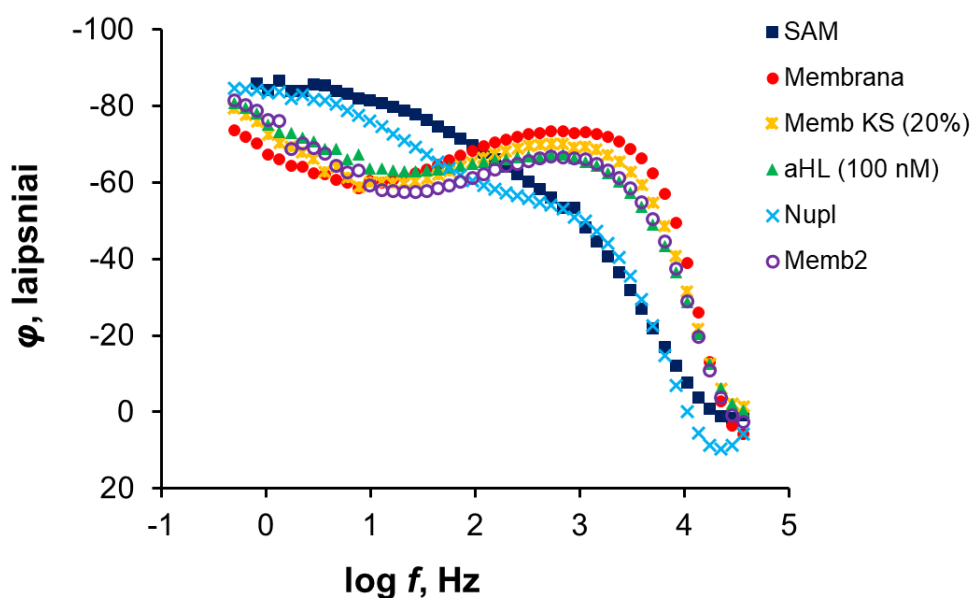
Iš minimumo Bode koordinatėse (18 pav.) bei talpos sumažėjimo (mažas pusapskritimis kompleksinės talpos koordinatėse, 17 pav.) galime matyti, kad po 50% kraujo serumo nuplovimo pavyko sėkmingai pakartotinai suformuoti tBLM. Dėl to tolimesniems eksperimentams buvo pasirinkta tokia fosfolipidinių dvisluoksnių plovimo procedūra: skruzdžių r. 50% tirpalas + 2-propanolio ir vandens mišinys (1:1) + dejonizuotas vanduo (2 kartus).

3.1.4 tBLM su toksinu kraujo serumo terpėje nuplovimas ir regeneravimas

Nuplovimui naudojant 50% skruzdžių rūgšties tirpalą buvo atliktas bandymas nuplauti prikabiną fosfolipidinę membraną, paveiktą α -hemolizino kraujo serumo terpėje, siekiant atkurti sąlygas, maksimaliai artimas realiems mėginiam.



19 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (geltonos žvaigždutės) ir 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žydri kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai)



20 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC+Chol mišinį moliniu santykiu 6:4 (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (geltonos žvaigždutės) ir 100 nM α -hemolizino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žydri kryžiuokai), ir po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai)

Iš gautų duomenų (19-20 pav.) matome, kad esant kraujo serumui, jis užblokuoja prikabiną fosfolipidinę membraną ir α -hemolizinas nebeturi galimybės įsiterpti. Dėl to nebuvo nustatytas joks toksino poveikis membranai, t. y. Bode koordinatėse (20 pav.) $\log f$ minimumas po α -hemolizino veikimo lieka toje pačioje vietoje, kaip ir prieš poveikį α -hemolizinu membraną paveikus 20% kraujo serumu.

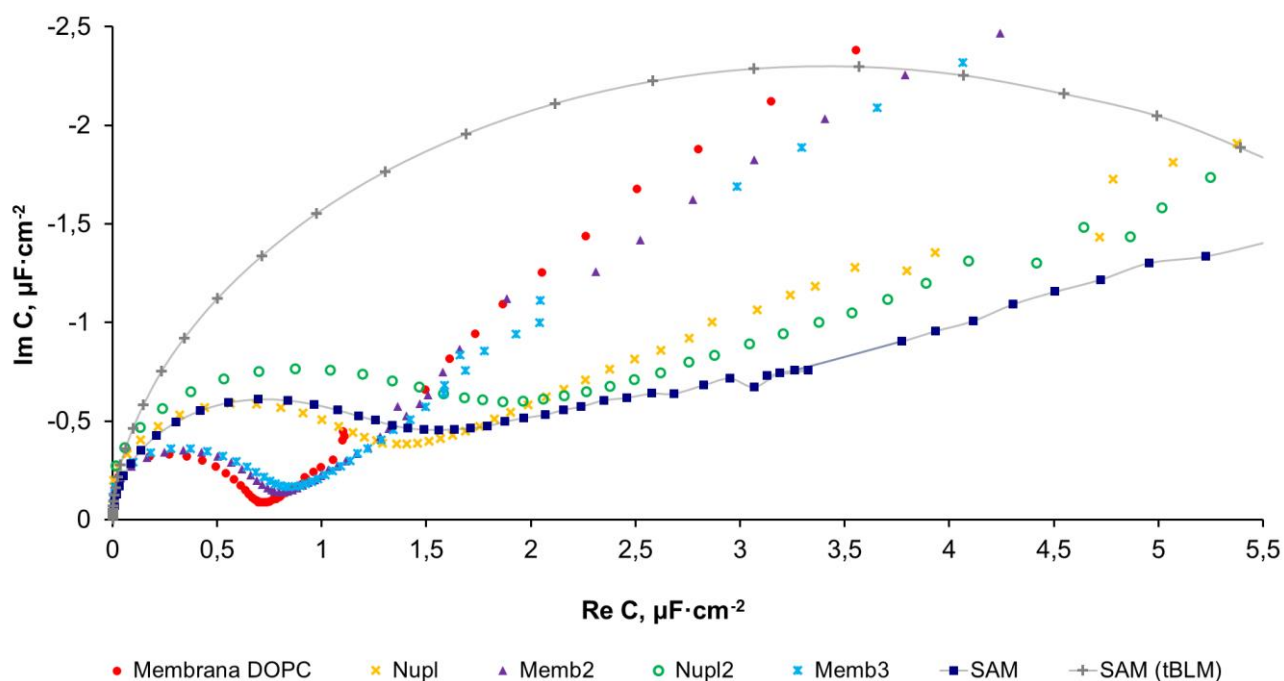
3.2 Hibridinės fosfolipidinės membranos (hBLM) tyrimas ir regeneravimas

3.2.1 hBLM formavimas, nuplovimas ir regeneravimas

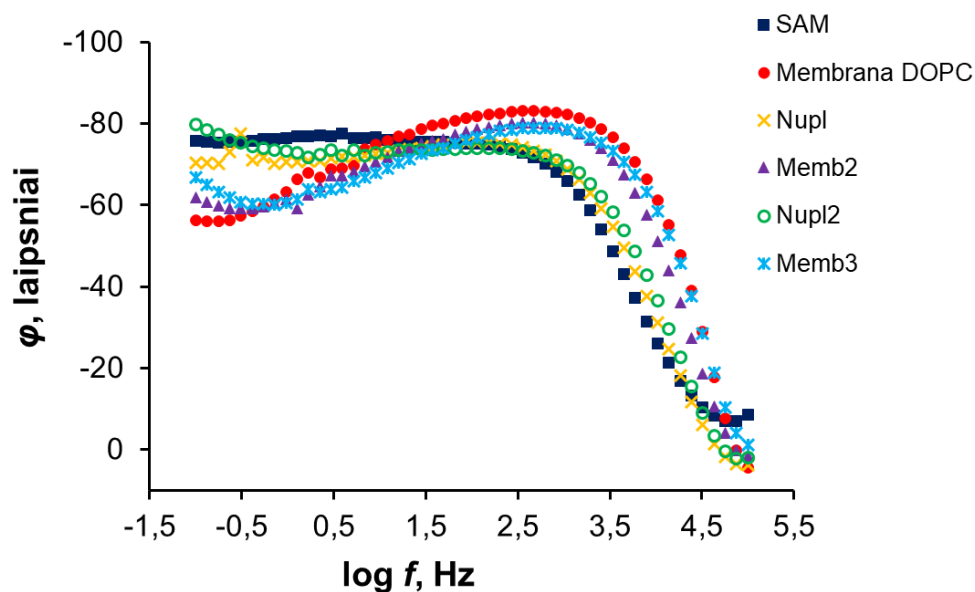
Pakeitus SAM formavimo sąlygas, kompleksinės talpos vertės, nustatomos iš EIS kreivės pusapskritimio skersmens, ryškiai sumažėjo (21, 25 pav.), lyginant su prieš tai suformuotų SAM kompleksinių talpų vertėmis (10, 12, 14, 15, 17 ir 19 pav.). Toks talpos sumažėjimas gali būti siejamas su tuo, kad FTO paviršiuje susiformavo tankesnis SAM. Žinant SAM kompleksinės talpos vertę arba, kitaip tariant, savitvarkio monosluoksnio menamos talpos ($\text{Im } C$) priklausomybę nuo realios talpos ($\text{Re } C$), galime įvertinti, kokios kokybės membrana susiformuos ant paviršiaus [39]. Tuo atveju, kai SAM kompleksinė talpa yra apie $4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, formuojasi prikabinata membrana (tBLM), o kai SAM kompleksinė talpa yra truputį didesnė, nei $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, tai formuojasi hibridinė membrana (hBLM).

Kaip matyti iš 21 pav., suformuoto SAM kompleksinė talpa apytiksliai lygi $1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, dėl ko susiformavo hibridinė membrana. Buvo atliekami analogiški tyrimai, kaip ir su tBLM – nuplovimai membraną paveikus toksinu (šiuo atveju vietoj α -hemolizino buvo naudotas melitinas, nes hibridinės membranos atveju yra netinkamas naudoti α -hemolizinas, kadangi jis turi įsiskverbti į membraną, o hBLM yra tam per tanki). Nuplovimai ir regeneravimas atliekami pagal 2.7 skyrelyje aprašytą metodiką.

Taip pat buvo atliktas tyrimas, nuplovimui naudojant Alconox 1% tirpalą – analogiškai kaip ir 3.1.1. skyrelyje aprašytame eksperimente. Gauti rezultatai pateikti 21-22 pav.



21 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos nuplovimų Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (geltoni kryžiuokai ir tuščiaviduriai apskritimai), ir po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimo (regeneruotos membranos – violetiniai trikampiai ir žydros žvaigždutės)

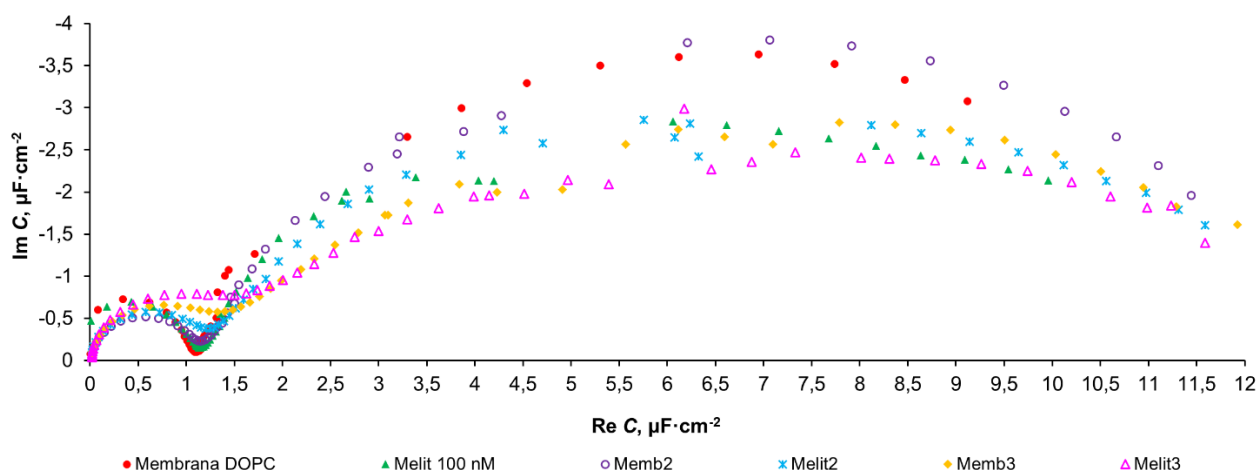


22 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos nuplovimų Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (geltoni kryžiuokai ir tuščiaviduriai apskritimai), ir po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimo (regeneruotos membranos – violetiniai trikampiai ir žydros žvaigždutės)

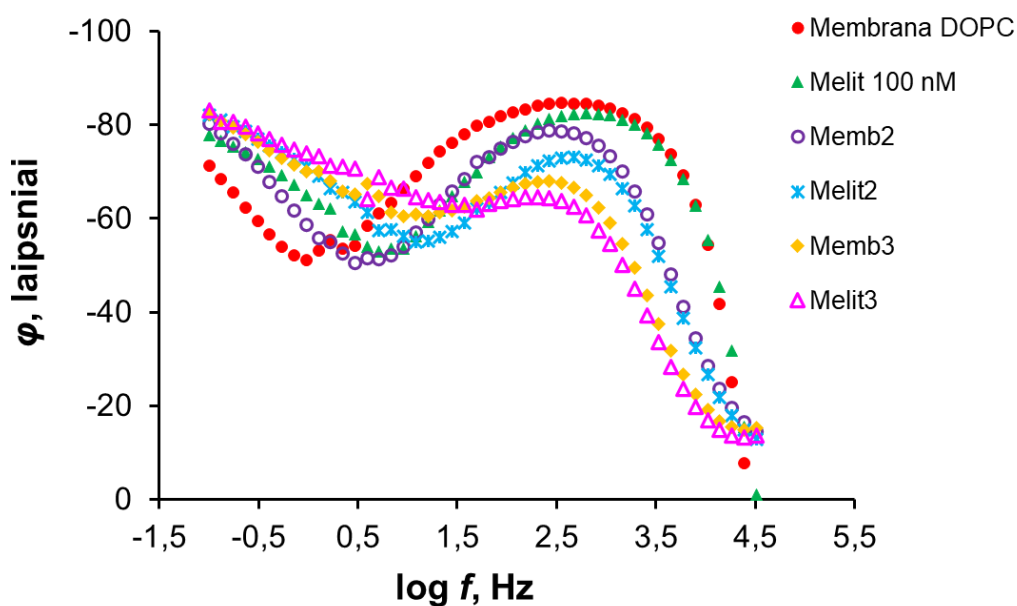
Iš gautų EIS spektrų (21-22 pav.) matome, kad naudojant Alconox ploviklį pavyksta sėkmingai nuplauti ir regeneruoti ne tik prikabinatą fosfolipidinę membraną (3.1.1 skyrelis, 8-9 pav.), bet ir hibridinę membraną.

3.2.2 hBLM su įterptu toksinu nuplovimas ir regeneravimas

Pagal 2.6 skyrelyje aprašytą metodiką hibridinė membrana buvo veikiamą 100 nM melitino, fiksuojamas jo poveikis (atliekami EIS matavimai prieš ir po toksino įterpimo), ir sistema nuplaunama ir pakartotinai liejama membrana, kaip ir buvo daryta tBLM atveju. Hibridinės membranos atveju yra netinkamas naudoti α -hemolizinas, kadangi jis turi įsiskverbti į membraną, o hBLM yra tam per tanki, dėl to šiuo atveju kaip toksinas buvo pasirinktas melitinas.



23 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane, po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (žali trikampiai), po membranos nuplovimų skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu, po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir geltoni rombai), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM melitino (žydros žvaigždutės ir tuščiaviduriai trikampiai)



24 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane, po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (žali trikampiai), po membranos nuplovimų skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu, po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimų (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir geltoni rombai), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM melitino (žydros žvaigždutės ir tuščiaviduriai trikampiai)

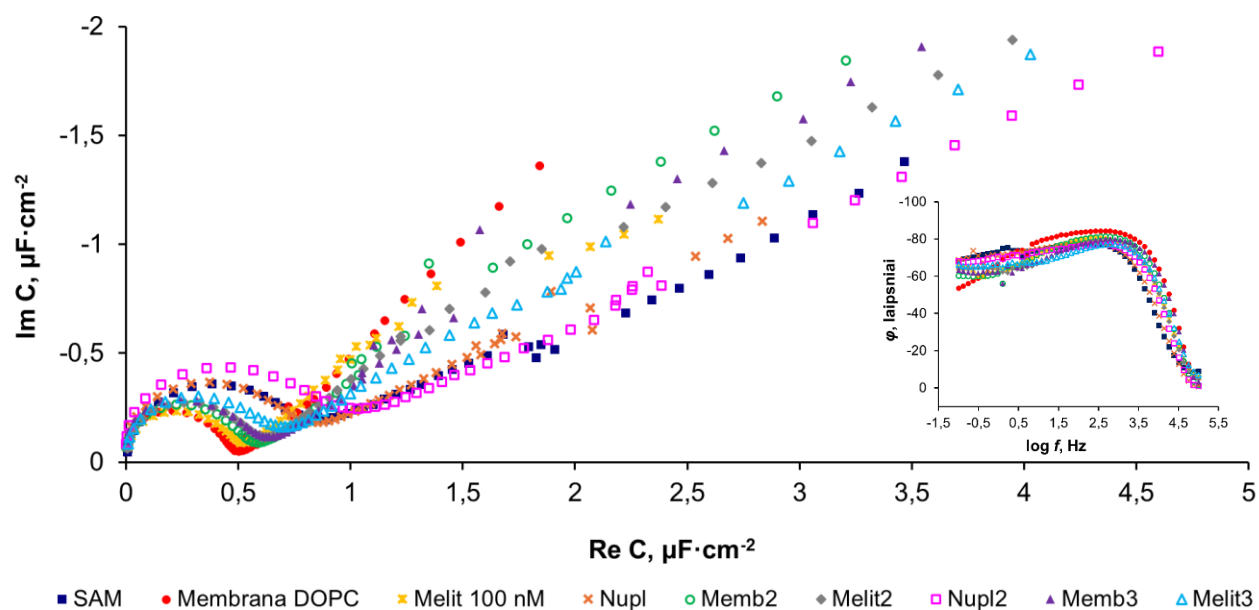
Iš gautų EIS spektrų (23-24 pav.) matome, kad po kiekvieno nuplovimo sėkmingai regeneruojasi membrana, kuri išlieka funkcionali – kiekvieną kartą stebimas toksino poveikis. Taip pat, kaip ir 3.1.2 skyrelyje aprašytu atveju, buvo apskaičiuoti $\log f_{\min}$ minimumo poslinkiai, t.y. $\Delta \log f_{\min}$, naudojantis 21 pav. pateiktais duomenimis. Apskaičiuotos $\log f_{\min}$ bei $\Delta \log f_{\min}$ vertės yra pateiktos 3 lentelėje.

3 lentelė. Membranos $\log f$ minimumo Bode koordinatėse poslinkiai, sukelti toksino poveikio, apskaičiuoti iš 24 pav. pateiktų duomenų

	$\log f_{\min}$, Hz	$\Delta \log f_{\min}$
Membrana pradinė	-0,02	0,73
+ melitinas	0,71	
Membrana po pirmo nuplovimo	0,47	0,61
+ melitinas	1,08	
Membrana po antro nuplovimo	0,96	0,73
+ melitinas	1,69	

Iš gautų $\Delta \log f_{\min}$ verčių (3 lentelė) matome, kad minimumo poslinkiai, sukelti melitino poveikio nėra identiški, kaip tai buvo α -hemolizino atveju (3.1.2 skyrelis, 1 ir 2 lentelės), tačiau poslinkių vertės logaritminėje skalėje yra labai artimos ($\Delta \log f_{\min} = 0,61-0,73$). Tai įrodo galimybę potencialiuose jutikliuose naudoti skirtingus membranų tipus (tBLM ir hBLM) bei galimybę naudoti tokius biojutiklius skirtingų toksinų detekcijai.

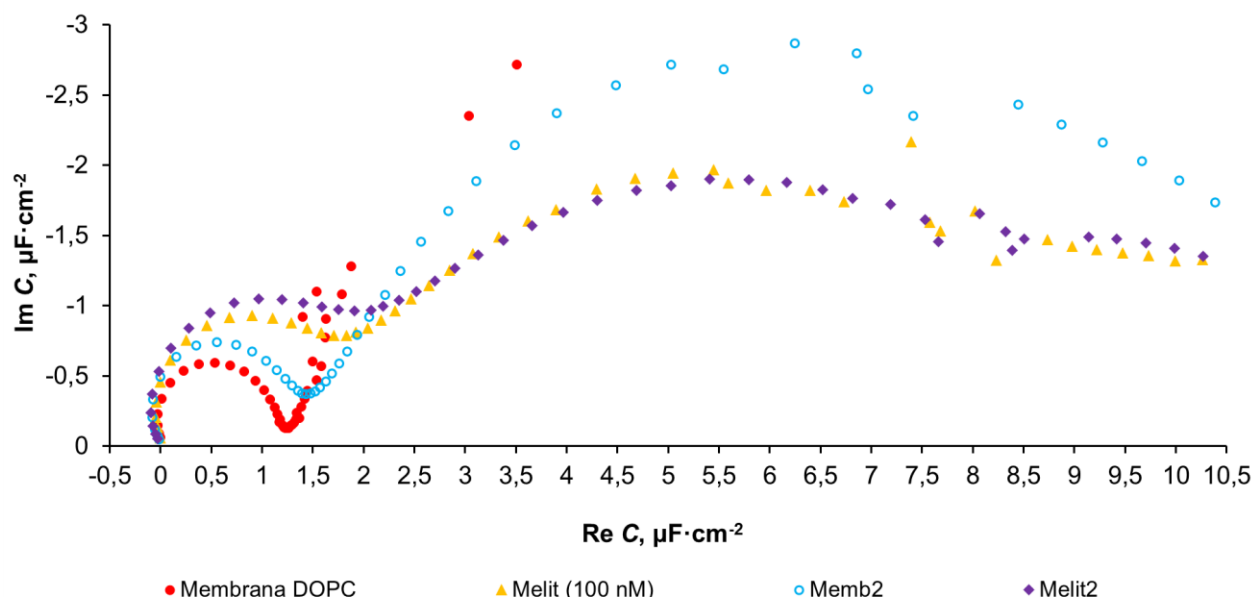
Taip pat buvo atliktas tyrimas, hBLM + melitinas sistemos nuplovimui naudojant Alconox 1% tirpalą (identišškai kaip buvo daryta 3.1.2 skyrelyje aprašytame eksperimente). Gauti rezultatai pateikiami 25 pav.



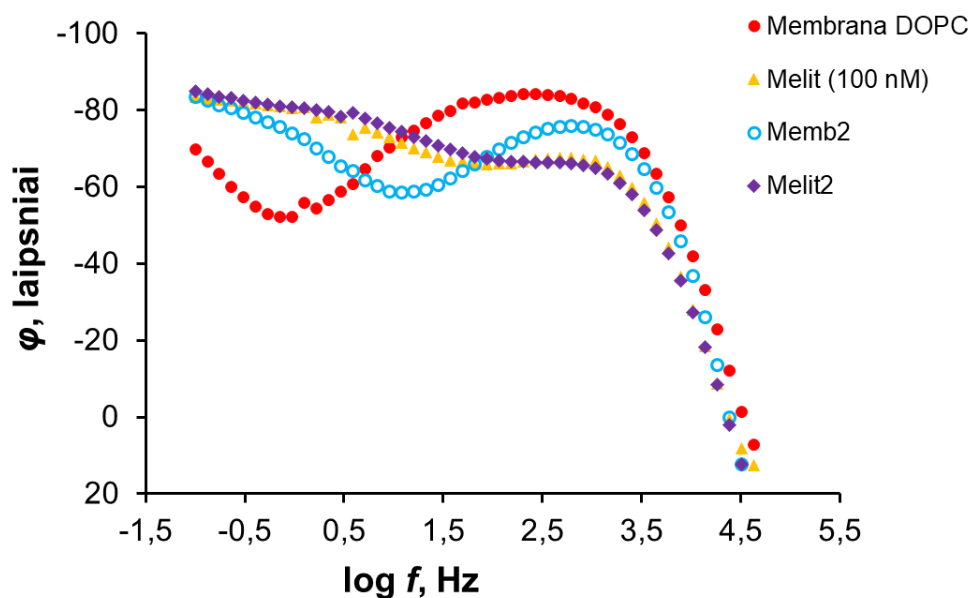
25 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (geltonos žvaigždutės), po membranos nuplovimų Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (oranžiniai kryžiuokai), po pakartotinių fosfolipidinių membranų suformavimo (regeneruotos membranos – tuščiaviduriai apskritimai ir violetiniai trikampiai), ir po regeneruotų membranų veikimo 100 nM melitino (pilki rombai ir tuščiaviduriai trikampiai).

Intarpas: EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti tomis pačiomis sąlygomis

Iš gautų rezultatų (25 pav.) matome, kad hBLM nuplovimui naudojant Alconox 1% tirpalą taip pat po kiekvieno nuplovimo sėkmingai regeneruojasi membrana, tačiau dėl menkai stebimų minimumų Bode koordinatėse (25 pav. intarpas) nebuvo galimybės patikimai nustatyti minimumų padėties bei apskaičiuoti melitino sukeltus minimumų poslinkius. Tad buvo atliktas identiškas tyrimas su mažiau tankia membrana (26-27 pav.). Šiame tyrime suformuotos membranos kompleksinė talpa padidėjo nuo 0,4 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (25 pav.) iki 1,1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (26 pav.). Šis požymis rodo, kad buvo suformuota mažiau tanki hibridinė membrana.

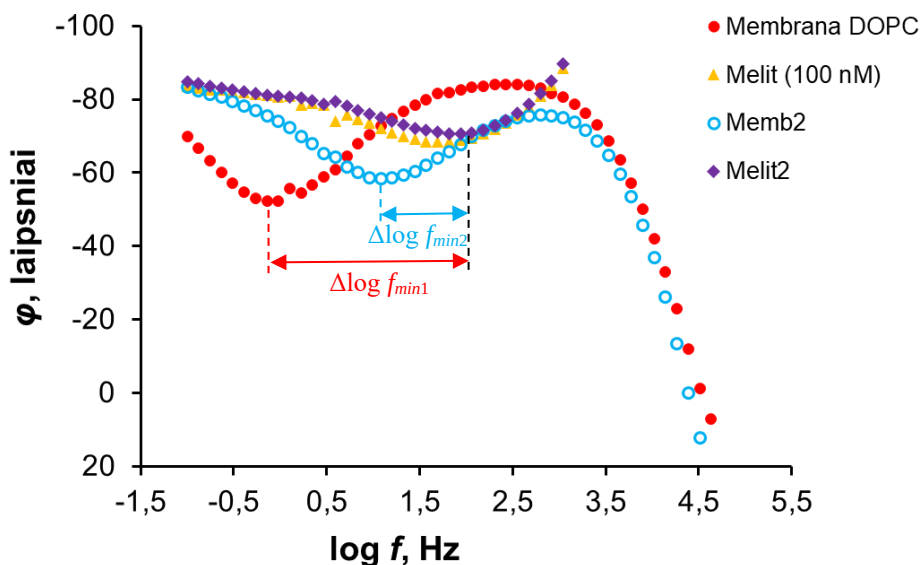


26 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane, po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (geltoni trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu, po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai), ir po regeneruotos membranos veikimo 100 nM melitino (violetiniai rombais)



27 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane, po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (geltoni trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu, po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai), ir po regeneruotos membranos veikimo 100 nM melitino (violetiniai rombais)

Siekiant tiksliau nustatyti minimumų padėtis Bode koordinatėse (27 pav.) kiekvieną kartą (prieš ir po regeneracijos) paveikus membraną melitinu („Melit“ ir „Melit2“) bei atitinkamai apskaičiuoti toksino sukeltus poslinkius, šiuose dviejuose spektruose iš bendro impedanso buvo atimta tirpalo varža, tokiu būdu gaunant akivaizdesnius minimumus (28 pav.).



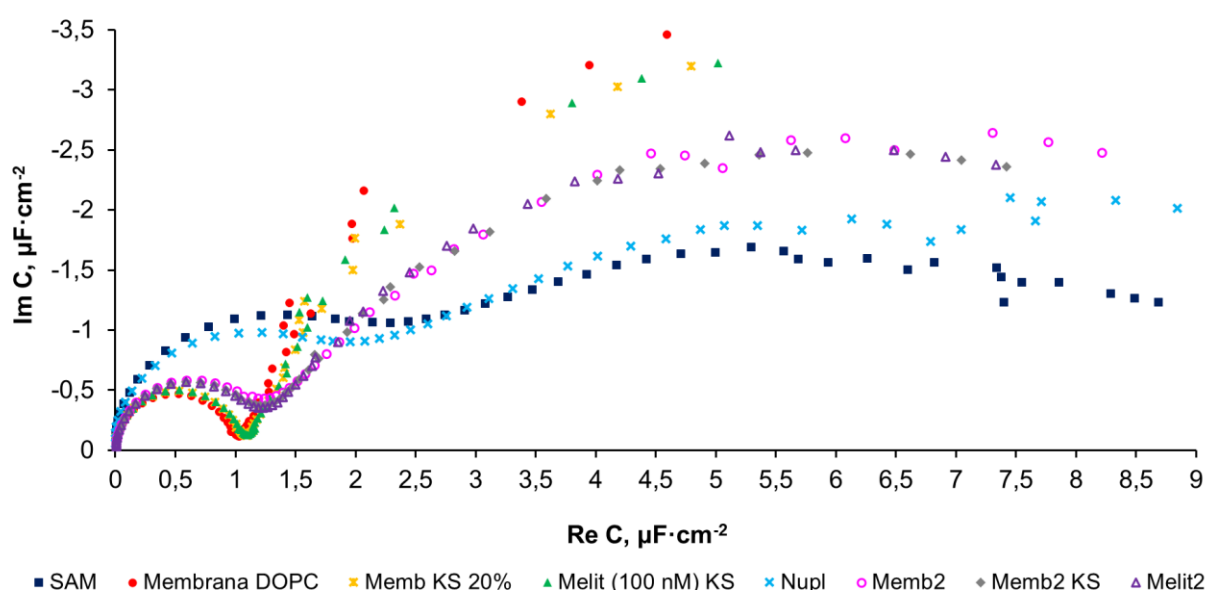
28 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse (dviejuose spektruose, pateiktuose 27 pav., iš bendro impedanso atėmus tirpalo varžą), užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane, po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 100 nM melitino (geltoni trikampiai), po membranos nuplovimo Alconox 1% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu, po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai), ir po regeneruotos membranos veikimo 100 nM melitino (violetiniai rombai)

28 pav. pateiktos dviejų membranų (iki ir po regeneracijos) Bode fazinės kreivės (raudona ir žydra). Kaip ir ankstesnėse sistemose matome, kad fazės minimumo padėtis po regeneracijos pasistumia į didesnių dažnių pusę (žydra). Tačiau, priešingai nei stebėta aHL atveju (11 ir 13 pav.) paveikus toksinu, šiuo atveju melitinu, fazės minimumo padėtis abiejų membranų atvejais (iki ir po regeneracijos) sutampa. Tai reiškia, kad šiuo atveju fazės minimumo postūmių logaritmai $\Delta \log f_{min}$ nėra vienodi, kaip kad aHL atveju, o skirtingi. Laikantis prielaidos, kad tos pačios sudėties (100% DOPC) membranose tos pačios koncentracijos melitinas sukelia tokį patį defektų tankį, dažnio logaritmo minimumo postūmio skirtumai ($\Delta \log f_{min1} \neq \Delta \log f_{min2}$) gali atsirasti tik tada, kai pradinės ir regeneruotos membranos natūralių defektų tankiai skiriasi, o pomembraninio sluoksnio savitosios varžos yra vienodos. Manome, kad šiuo atveju, kai membranos pagal jų elektrocheminius požymius yra hibridinės ir pomembraniniame sluoksnyje yra labai mažai vandens ir krūvininkų, tai esminių pomembraninio sluoksnio savybių, tame tarpe ir pomembraninio sluoksnio savitosios varžos ρ_{sub} , skirtumų negalime tikėtis. Taigi, šiuo atveju galimai prieš ir po regeneracijos membranos skiriasi pradiniais defektų tankiais, kurie gali atsirasti dėl dalinio (ir menkai kontroliuojamo) detergento molekulių įsiterpimo (adsorbcijos) į inkarinį SAM.

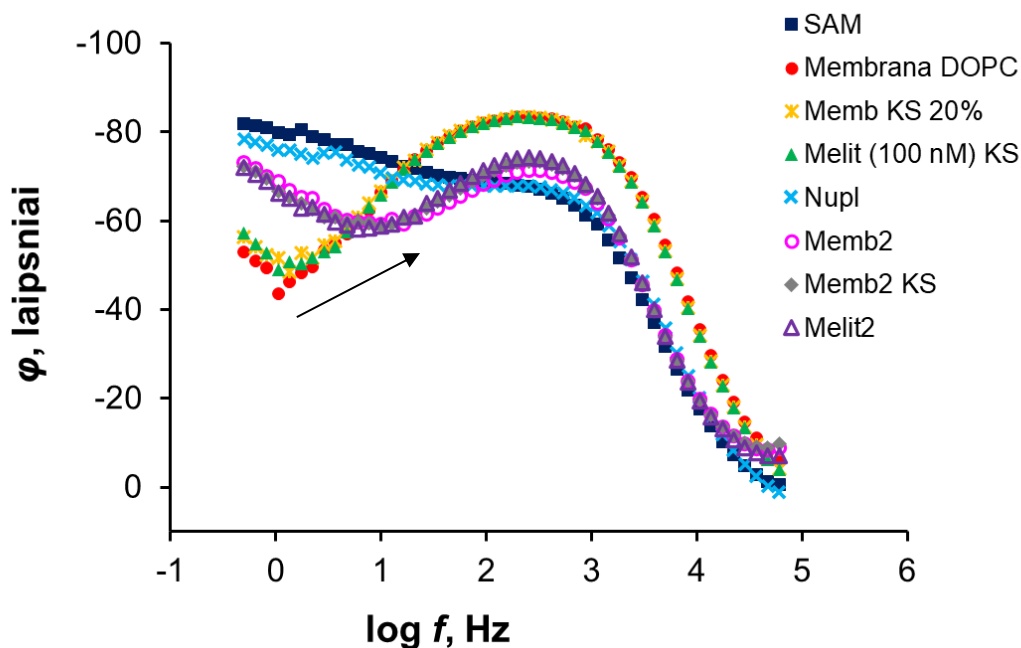
Taigi, galime teigti, kad nuo naudojamos membranos tipo priklauso ir kinta regeneruojamų membranų savybės. Praskiestose paviršiuje imobilizuotose membranose (tBLM), kurių SAM pasižymi didelėmis elektrinėmis talpomis, regeneracija sukelia popaviršinio sluoksnio elektrinių savybių pokyčius, sumažindama kiekvienoje regeneracijos stadijoje ρ_{sub} . O hibridinių membranų atveju, kaip matome iš 28 pav. duomenų, regeneracija menkai paveikia popaviršinio sluoksnio savybes, bet padidina natūralių defektų tankį toksinu nepaveiktose membranose.

3.2.3 hBLM su toksinu kraujo serumo terpėje nuplovimas ir regeneravimas

Kadangi sėkmingai pavyko regeneruoti membranas po hBLM + melitinas sistemų nuplovimo, bandoma atlikti tyrimą sąlygomis, artimomis realiems mėginiams (analogiškai kaip ir 3.1.4 skyrelyje aprašytame eksperimente).



29 pav. EIS spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (geltonos žvaigždutės) ir 100 nM melitino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žydri kryžiuikai), po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai), ir po regeneruotos membranos veikimo 20% kraujo serumo (pilki rombais) ir 100 nM melitino (tuščiaviduriai trikampiai)



30 pav. EIS spektrai Bode koordinatėse, užregistruoti naudojant FTO elektrodą po silanizavimo 1 val. 30°C temperatūroje 4 mM TOPS tirpale heptane (mėlyni kvadratai), po fosfolipidinės membranos suformavimo, naudojant DOPC (raudoni apskritimai), po membranos veikimo 20% kraujo serumo (geltonos žvaigždutės) ir 100 nM melitino (žali trikampiai), po membranos nuplovimo skruzdžių r. 50% tirpalu, 2-propanoliu ir dejonizuotu vandeniu (žydri kryžiuokai), po pakartotino fosfolipidinės membranos suformavimo (regeneruota membrana – tuščiaviduriai apskritimai), ir po regeneruotos membranos veikimo 20% kraujo serumo (pilki rombais) ir 100 nM melitino (tuščiaviduriai trikampiai)

Iš gautų rezultatų (29-30 pav.) matome, kad po nuplovimo membrana sėkmingai regeneruojasi. Tačiau, tiriant hBLM nėra stebimas nei kraujo serumo, nei toksino poveikis, nes $\log f$ minimumas Bode koordinatėse (30 pav.) išlieka toje pačioje vietoje. Galime įtarti, kad kraujo serumas neveikia hibridinės membranos, kadangi hBLM yra per daug tanki ir neleidžia KS prasiskverbti į pomembraninį sluoksnį. Tačiau matome, kad pridėjus kraujo serumo į tiriamą sistemą ne visada yra matomi registruojamų EIS signalų pokyčiai, tačiau po melitino pridėjimo galima matyti, kad kraujo serumas vis tiek užblokuoja hBLM ir dėl to visiškai nestebimas melitino poveikis abiem atvejais – ir pirminės membranos, ir regeneruotos.

Dar vienas svarbus aspektas, kurį galime pastebėti iš gautų EIS kreivių Bode koordinatėse (30 pav.) – visos serijos po nuplovimo (t.y. spektrai „Memb2“, „Memb2 KS“ ir „Melit2“) $\log f_{min}$ padėtys palyginus su pradinėmis pasislinko ne tik į dešinę (t.y. į didesnių dažnių pusę), bei ir į viršų (30 pav., juoda rodyklė). Tai reiškia, kad ne tik padidėjo defektų skaičius membranoje, bet ir kad esantys defektai susitelkė į telkinius [40]. Jeigu $\log f$ minimumo padėtis tik horizontaliai slinktųsi į didesnių dažnių pusę, bet nekeistų savo aukščio (pavyzdžiui, kaip tai buvo stebima tBLM + α -HL atveju – 11 pav.), tai galėtų reikšti, kad N_{def} nekinta, bet keičiasi pomembraninio sluoksnio savitoji varža ρ_{sub} , arba pakinta N_{def} ir ρ_{sub} , bet defektų pasiskirstymas išlieka idealiai toks pats (nesusidaro telkinių). Tačiau tokio scenarijaus mes nestebėjome.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad naudojant Alconox ploviklį galima sėkmingai regeneruoti prikabiną fosfolipidinę DOPC-Chol membraną, paveiktą α -hemolizinu. Kiekvieną kartą EIS spektruose fiksuotas vienodas toksino poveikis reiškia, kad tBLM atveju po regeneracijos mažėja pomembraninio sluoksnio savitoji varža.
2. Nustatyta, kad kraujo serumas užblokuoja prikabiną fosfolipidinę membraną, neleidamas veikti poras formuojančiam toksinui α -hemoliziniui.
3. Darbe parodyta, kad regeneracija pakeičia savitvarkio monosluoksnio elektrines savybes. SAM elektrinės savybės (kompleksinė talpa) po fosfolipidinės membranos nuplovimo priklauso nuo naudojamo ploviklio: naudojant Alconox detergentą po pirmo nuplovimo stebėtas savitvarkio monosluoksnio kompleksinės talpos padidėjimas apytiksliai iki $7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ir stabilizavimasis, o naudojant skruzdžių rūgšties tirpalą tokios tendencijos nebuvo pastebėta.
4. Nustatyta, kad kraujo serumas neveikia hibridinės membranos, tačiau vis tiek ją blokuoja, sumažindamas melitino veikimo galimybes.
5. Nustatyta, kad hibridinės membranos atveju, nuplaunant hBLM, paveiktą melitinu, pomembraninio sluoksnio savybės nesikeičia, tačiau keičiasi defektų skaičius N_{def} , bei atsirandantys defektai susitelkia į telkinius.
6. Darbe parodyta, kad EIS tradiciškai laikoma elektrinių parametrų matavimo metodu, gali būti panaudojama atskleidžiant subtilius molekulinio lygio struktūros ir fizinių savybių pokyčius, vykstančius regeneruojant biologinių membranų modelis. Svarbu pabrėžti, kad šie pokyčiai vyksta ypatingai mažose dimensijose, apimančiose 1-2 nm storio sritis, skiriančias dvisluoksnes membranas nuo kietų paviršių.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. V. Liustrovaite, M. Drobysh, V. Ratautaite, A. Ramanaviciene, A. Rimkute, M. Simanavicius, I. Dalgediene, I. Kucinskaite-Kodze, I. Plikusiene, C.-F. Chen, R. Viter, A. Ramanavicius, Electrochemical biosensor for the evaluation of monoclonal antibodies targeting the N protein of SARS-CoV-2 virus, *Science of the Total Environment* 924 (2024).
2. X. Yang, Z. Liu, Y. Kong, Z. Yin, G. Zheng, H. Zhang, An anti-fouling surface molecularly imprinted ratiometric electrochemical biosensor for SARS-CoV-2 spike protein, *Microchemical Journal* 201 (2024).
3. L. Gong, J. Liang, Y. Zhang, M. Zhang, H. Ao, T. Yang, An antifouling electrochemical biosensor using self-signal for *Salmonella typhimurium* direct detection in food sample, *Food Chemistry* 452 (2024).
4. Y. Wang, Z. Wang, Y. Shang, J. Wang, Z. Zhu, L. Xi, J. Xie, Q. Wu, Y. Shen, Y. Ding, Next-generation pathogen detection: Exploring the power of nucleic acid amplification-free biosensors, *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 513, 2024.
5. M. Y. Kalashgrani, S. M. Mousavi, M. H. Akmal, A. Gholami, N. Omidifar, W.-H. Chiang, C. W. Lai, Md. R. Uddin, R. H. Althomali, M. M. Rahman, Biosensors for metastatic cancer cell detection, *Clinica Chimica Acta* 559 (2024).
6. M. Zoratti, L. Colombo, F. Garay, Optimization of a reusable sandwich-type amperometric phenol biosensor. Experimental and theoretical outcomes, *Electrochimica Acta*, 2024.
7. J. Sengupta, C. M. Hussain, Molybdenum Disulfide-based field effect transistor biosensors for medical diagnostics: Exploring a decade of advancements (2014–2024), *Trends in Analytical Chemistry* 176 (2024).
8. M. Naumowicz, Z. A. Figaszewski, Chronoamperometry Insight into the pH Effect on the Electrical Properties of Bilayer Lipid Membrane Formed from Phosphatidylcholine, *International Journal of Electrochemical Science*, Vol. 9, 2014.
9. X. Han, Y. Tong, W. Huang, E. Wang, Study of the interaction between lanthanide ions and a supported bilayer lipid membrane by cyclic voltammetry and ac impedance, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 523, 2002.
10. P. Diao, D. Jiang, X. Cui, D. Gu, R. Tong, B. Zhong, Unmodified supported thiol/lipid bilayers: studies of structural disorder and conducting mechanism by cyclic voltammetry and AC impedance, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Vol. 48, 1999.
11. L. Ding, E. Wang, Cyclic voltammetry of dye-modified supported bilayer lipid membranes (s-BLMs), *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Vol. 43, 1997.
12. Valincius G., Mickevicius M., *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 1st ed., Vol. 21, Chapter 2, Tethered Phospholipid Bilayer Membranes: An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response, 2015. ISBN: 978-0-12-802116-3
13. Inga Gabriunaite, Aušra Valiūnienė, Gintaras Valincius, Formation and properties of phospholipid bilayers on fluorine doped tin oxide electrodes, *Electrochimica Acta*, 2018.
14. G. Valincius, M. Mickevicius, T. Penkauskas, M. Jankunec, Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes: An Effect of Heterogeneous Distribution of Defects in Membranes, *Electrochimica Acta*, Vol. 222 (2016).
15. C.S. Park, R. Colorado Jr., A.C. Jamison, and T.R. Lee, Thiol-Based Self Assembled Monolayers: Formation, Organization, and the Role of Adsorbate Structure, *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2016.

16. H. Sugimura, *Nanocrystalline Materials*, Chapter 3, Self-Assembled Monolayer on Silicon, 2006.
17. V. Vasumathi, M.N.D.S. Cordeiro, *Mixed Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications*, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, 2018.
18. E. Colangelo, J. Comenge, D. Paramelle, M. Volk, Q. Chen, and R. Lévy, *Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles*, *Bioconjugate Chemistry*, 28 (1), 2017.
19. D.-M. Ma, Y. Xian, A. Ding, H. Guo, D.-J. Qian, *Interfacial self-assembled thioxathone monolayers on the surfaces of silica nanoparticles as efficient heterogeneous photocatalysts for the selective oxidation of aromatic thioethers under air atmosphere*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 611 (2021).
20. Q. Zhang, W. Guo, L. He, L. He, Y. Chen, X. Shen, D. Wu, *A new SERS substrate of self-assembled monolayer film of gold nanoparticles on silicon wafer for the rapid detection of polycyclic aromatic hydrocarbons*, *Materials Chemistry and Physics* 250, (2020).
21. Z. Wang, H. Sha, K. Yang, Y. Zhu, J. Zhang, *Self-assembled monolayer silver nanoparticles: Fano resonance and SERS application*, *Optics and Laser Technology* 157 (2023).
22. R.G. Nuzzo, D.L. Allara, *Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983).
23. Y. Sun, Z. Li, Z. Wang, *Self-assembled monolayer and multilayer films based on L-lysine functionalized perylene bisimide*, *J. Mater. Chem.* 22 (2012).
24. A. Hasan, L.M. Pandey, *Self-assembled monolayers in biomaterials*, *Nanobiomaterials*, 2018.
25. J. Rittich, S. Jung, D. Meyer, C. Jodocy, M. Wuttig, *Surface Modifications by Self-Assembled Monolayers to Improve Organic Opto-Electronic Devices*, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, 2018.
26. S.J. Singer, G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*, *Science* 175, 1972.
27. C. Sebaaly, H. Greige-Gerges, C. Charcosset, *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*, Chapter 11, *Lipid Membrane Models for Biomembrane Properties' Investigation*, Elsevier, 2019.
28. V. Rosilio, *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, Chapter 4, *How Can Artificial Lipid Models Mimic the Complexity of Molecule-Membrane Interactions?*, Academic Press, Vol. 27, 2018.
29. R. Fussle, S. Bhakdi, A. Sziegoleit, J. Trantum-Jensen, T. Kranz, H.J. Wellensiek, *On the mechanism of membrane damage by Staphylococcus aureus α -toxin*, *Journal of Cell Biology* 91, 1981.
30. M. M. L. de Armentia, M. I. Colombo, *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, Chapter 7, *Intracellular Pathogen Invasion of the Host Cells: Role of α -Hemolysin-Induced Autophagy*, Academic Press, 2015.
31. V. Koronakis, C. Hughes, *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*, Chapter 13, *Hemolysin*, Elsevier, 2002.
32. B. Sawicka, M. Messaoudi, R. R. Achar, MU Himathi, P. Pszczółkowski, *Antidotes to Toxins and Drugs*, Chapter 2, *Antidotes to insect toxins, bee venom; wasp and hornet venoms*, Elsevier, 2024.
33. A. A. Abd El-Wahed, S. A.M. Khalifa, B. Y. Sheikh, M. A. Farag, A. Saeed, F. A. Larik, U. Koca-Caliskan, M. F. AlAjmi, M. Hassan, H. A. Wahabi, M.-E. F. Hegazy, A. F. Algethami, S.

Büttner, H. R. El-Seedi, *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 60, Chapter 13, *Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity*, Elsevier, 2019.

34. M. I. Nassar, *Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries*, Chapter 15, *Bee venom: Antitumor activity and its therapeutic applications*, Academic Press, 2022.

35. Z. B. Stoyanov, D. E. Vladikova, *MEASUREMENT METHODS | Electrochemical: Impedance Spectroscopy*, *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, Elsevier, 2009.

36. S. Cruz-Manzo, P. Greenwood, *Electrochemical Phenomena in the Cathode Impedance Spectrum of PEM Fuel Cells*, Chapter 1, *Introduction to electrochemical impedance spectroscopy*, Elsevier, 2022.

37. Iman Khosravi Bigdeli, Mahdi Yeganeh, Mohammadreza Tavakoli Shoushtari, Maryam Kahvazi Zadeh, *Nanosensors for Smart Manufacturing*, Chapter 23, *Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for biosensing*, Elsevier, 2021.

38. G. Valincius, T. Meškauskas, F. Ivanauskas, *Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes*, *Langmuir*, 2012.

39. B. Rakovska, T. Ragaliauskas, M. Mickevicius, M. Jankunec, G. Niaura, D. J. Vanderah, and G. Valincius, *Structure and Function of the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers*, *Langmuir*, 2015.

40. T. Raila, T. Penkauskas, M. Jankunec, G. Dreizas, T. Meškauskas, G. Valinčius, *Electrochemical impedance of randomly distributed defects in tethered phospholipid bilayers: Finite element analysis*, *Electrochimica acta*, Vol. 299, 2019.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

ANASTASIJA ALEKSANDROVIČ

Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių membranų regeneracija daugkartinio panaudojimo biologinių jutiklių pritaikymui

Šiame darbe ant fluoru legiruoto alavo oksido paviršiaus buvo formuojami biologinių membranų modeliai: suformuojamas savitvarakis monosluoksnis naudojant trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silaną (TOPS), ant gauto SAM liejamos fosfolipidinės membranos, naudojant 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholino (DOPC) ir cholesterolio (Chol) mišinį moliniu santykiu 6:4 (bendra lipidų koncentracija 1 mM), arba tik DOPC. Gautos dviejų tipų membranų modeliai – paviršiuje prikabinotos membranos (tBLM) ir hibridinės membranos (hBLM). Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu patikrintos gautų SAM elektrinės savybės bei ant jų gautų membranų kokybė.

Abiejų tipų membranos buvo veikiamos toksinais (naudojami α -hemolizinas ir melitinas) ir/arba kraujo serumu ir EIS spektruose fiksuojamas toksinų/kraujo serumo poveikis membranai. Užfiksavus membranos charakteristikų pokytį, membrana su įterptais baltymais buvo nuplaunama, naudojant atitinkamą ploviklį (naudoti komerciškai prieinamo detergento Alconox 1% tirpalas ir skruzdžių rūgšties 50% tirpalas) bei regeneruojama. Regeneruotų membranų elektrinės savybės bei sąveika su toksinais arba kraujo serumu taip pat buvo ištirtos elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu.

Iš gautų EIS duomenų buvo padarytos išvados apie regeneravimo bei sąveikos su toksinais/KS metu įvykstančius pokyčius membranų struktūroje ir taip pat apie pradinių skirtingų tipų (prikabinotos ir hibridinės) membranų struktūros ypatumus.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

ANASTASIJA ALEKSANDROVIČ

Regeneration of Tethered Phospholipid Membranes for Reusable Biosensors

In this study, models of biological membranes were formed on the surface of fluorine-doped tin oxide: formed a self-assembled monolayer using trichloro(3-(octadecylthio)propyl)silane (TOPS), then formed phospholipid membranes on the resulting SAM using a mixture of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and cholesterol (Chol) in a molar ratio of 6:4 (1 mM total lipid concentration), or DOPC only. Two types of membrane models were obtained: tethered bilayer lipid membranes (tBLM) and hybrid bilayer lipid membranes (hBLM). The electrical properties of the obtained SAMs and the quality of the membranes obtained on them were investigated by electrochemical impedance spectroscopy.

Both types of membranes were affected by toxins (α -hemolysin and melittin) and/or blood serum, and the effect of toxins/blood serum on the membrane was evaluated by recording EIS spectra. After observing a change in membrane characteristics, the membrane with the incorporated proteins was removed by washing with an appropriate detergent (commercially available detergent Alconox 1% solution and formic acid 50% solution were used) and then regenerated. The electrical properties of the regenerated membranes and the interaction with toxins or blood serum were also investigated by electrochemical impedance spectroscopy.

From the obtained EIS data, conclusions about the changes in membrane structure during regeneration and interaction with toxins/serum were made, and also about the structural features of the different types of initial membranes (tethered and hybrid).