



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA

Gerda Žižiūnaitė

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**PAVIRŠIUJE IMOBILIZUOTŲ MEMBRANŲ FORMAVIMOSI
IR SĄVEIKOS SU α -HEMOLIZINU DINAMIKOS TYRIMAS
GREITOSIOS FOURIER TRANSFORMACIJOS
ELEKTROCHEMINIO IMPEDANSO SPEKTROSKOPIJOS
METODU**

Darbo vadovas (-ė)
prof. dr. Aušra Valiūnienė

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Ląstelės membranos struktūra ir funkcijos	7
1.2. Membranų modeliai	8
1.2.1. Plokščias lipidų dvisluoksnis (angl. planar lipid bilayer, black lipid membrane).....	8
1.2.2. Ant substrato imobilizuotos membranos modelis	8
1.3. Savitvarkiai monosluoksniai	9
1.4. Alkilsilanai ir silanizavimas.....	9
1.5. Fosfolipidinio dvisluoksnio formavimo metodai	11
1.6. Vezikulės ir vezikulių liejimo metodai	12
1.7. α -hemolizinas	13
1.8. Membranų modelių tyrimų metodai	13
1.9. Elektrocheminio impedanso spektroskopija	14
1.10. Greitosios Fourier transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopija.....	17
2. METODIKA	19
2.1. Elektrodo paruošimas.....	19
2.2. Silanų mišinio paruošimas	19
2.3. Savitvarkio monosluoksnio formavimas.....	19
2.4. Fosfolipidinio dvisluoksnio formavimas ant silanizuoto FTO	20
2.5. Greitosios Fourier transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopijos (FFT-EIS) tyrimai	20
2.5.1. Tirpalai	20
2.5.2. Celė, elektrodai ir aparatūra	20
2.6. Kontaktinių kampų matavimas	21
3. REZULTATAI.....	22
3.1. Silanizavimui naudoto tirpalo koncentracijos ir sudėties įtaka gautam FTO SAM.....	22
3.1.1. Ant paviršiaus imobilizuoto savitvarkio monosluoksnio charakterizavimas EIS.....	23
3.2. Ant stiklas FTO SAM imobilizuoto fosfolipidinio dvisluoksnio charakterizavimas EIS	26
3.3. Fosfolipidinių dvisluoksnių formavimosi ant silanizuotų paviršių kinetika EIS kompleksinės talpos koordinatinių spektruose.....	29
3.4. Membranos veikimas α -hemolizinu.....	36

3.5. Struktūrinių sistemos pokyčių įvertinimas naudojant ζ parametą	41
IŠVADOS	46
SANTRAUKA	47
SUMMARY	48

SANTRUMPOS

- tBLM – fosfolipidinis dvisluoksnis, imobilizuotas ant kieto substrato per molekulinis inkarus (angl. tethered bilayer membrane)
- FTO – fluoru dopuotas alavo oksidas (angl. fluorine-doped tin oxide)
- SAM – savitvarkis monosluoksnis (angl. self-assembled monolayer)
- TOPS – trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silanas
- FTO|SAM – stiklo plokštelė, padengta fluoru dopuotu alavo oksidu, ant kurios imobilizuotas savitvarkis monosluoksnis.
- ATS – alkiltrichlorosilanas
- VTS – viniltrichlorosilanas
- TOPS:ATS – ekvimoliarinis silanų mišinys, susidedantis iš trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silano ir alkiltrichlorosilano.
- DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholinas
- Chol – cholesterolis.
- EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija
- FFT-EIS – greitosios Furjė transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopija (angl. fast Fourier transform electrochemical impedance spectroscopy)
- α HL – α -hemolizinas
- DMPA – 2,2-dimetoksi-2-fenilacetofenonas

ĮVADAS

Ant elektrai laidžių paviršių per molekulinis inkarus imobilizuoti fosfolipidiniai dvisluoksniai (tBLM) gali būti naudojami kaip realių ląstelės membraną imituojantys modeliai. Tokie modeliai yra svarbus įrankis, padedantis suprasti realių ląstelių membranų elgseną ir yra naudojami, pvz., jonų pernašai per membraną tirti [1] ląstelės sąveikas su baltymais ar kitais su ląstele sąveikaujančiais komponentais analizuoti bei pačios membranos struktūriniais pokyčiams įvairiomis sąlygomis vertinti [2, 3, 4]. Laidus paviršius, ant kurio imobilizuotas fosfolipidinis dvisluoksnis, leidžia tirti sistemą kontroliuojamoje aplinkoje, suteikia jai stabilumo, o taip pat leidžia tirti sistemą įvairiais metodais [1, 2, 3, 4]. Molekuliniai inkarai, per kuriuos fosfolipidinis dvisluoksnis imobilizuotas ant substrato, suteikia sistemai fluidiškumo ir leidžia susidaryti kelių nanometrų storio pomembraniniam rezervuarui, imituojančiam ląstelės citoplazmą [2, 3, 4, 5]. Molekuliniai inkarai taip pat leidžia tirti transmembraninių baltymų įsiterpimą į fosfolipidinį dvisluoksnį jiems nedenantūruojant dėl sąveikos su substratu [1]. tBLM gali būti panaudojami ne tik realių ląstelių savybėms tirti, bet ir biologinio jutiklio kūrimui – į ląstelės membraną gebančios įsiterpti molekulės (pvz., poras ląstelės membranoje formuojantys baltymai), keičia membranos savybes ir kiekybinis tokių pokyčių įvertinimas gali leisti įvertinti molekulių, kuriomis buvo paveikta tBLM, koncentraciją, kas yra ypač aktualu kuriant biologinius jutiklius, skirtus membranoje defektus sukeliančių medžiagų nustatymui [4, 6].

Šio tyrimo metu tBLM buvo formuojama ant kieto puslaidininkinio paviršiaus, sudaryto iš stiklo plokštelės, padengtos fluoru dopuotu alavo oksidu, ant kurio imobilizuotas savitvarakis monosluoksnis (FTO|SAM). Ant tokio paviršiaus vezikulių liejimo būdu buvo imobilizuotas fosfolipidinis dvisluoksnis. Greitosios Fourier transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopija pasitelkta stebėti sistemos pokyčius liejant membraną bei veikiant suformuotą tBLM poras formuojančiu toksinu α -hemolizinu. Šis metodas unikalus tuo, kad leidžia matavimą atlikti labai greitai (matavimus atliekant 0.2 Hz – 10 kHz kintamos srovės dažnių intervale, elektrocheminio impedanso spektras užregistruojamas per ~ 15 s), kas suteikia galimybę fiksuoti sistemos pokyčius pirmomis minutėmis po membranos formavimo ar tBLM poveikio α HL pradžios. Daug tBLM sistemų tyrimų atlikta kaip substratą naudojant plokštelę, padengtą auksu [7, 8, 9]. tBLM sistemos kaip substratą naudojant FTO yra pakankamai mažai iširtos, nors yra perspektyvios biologinių jutiklių kūrimo srityje, kadangi yra pigesnės nei aukso substratai. Pagrandis FTO kaip tBLM substrato trūkumas yra jo heterogeniškumas [10], dėl kurio suformuoti SAM ir fosfolipidiniai dvisluoksniai taip pat pasižymi didesniu heterogeniškumu [11]. Dėl šio aspekto, svarbu įvertinti suformuotų tBLM savybių įtaką fosfolipidinio dvisluoksnio ir α HL veikimo kinetikai bei α HL poveikio mastui. Tokie tyrimai svarbūs, norint nuspėti α HL poveikį įvertinus tBLM parametrus – tai leistų suformuoti α HL biologinį jutiklį. Membranos formavimosi ir α HL poveikio kinetikai tyrimai taip pat leido panaudoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą, paprastai naudojamą makroskopinių sistemų analizei, mikroskopinių struktūrų, pvz. α HL porų, kurių diametras tesiekia 1-3 nm [12], išsidėstymui fosfolipidiniame dvisluoksnyje įvertinti.

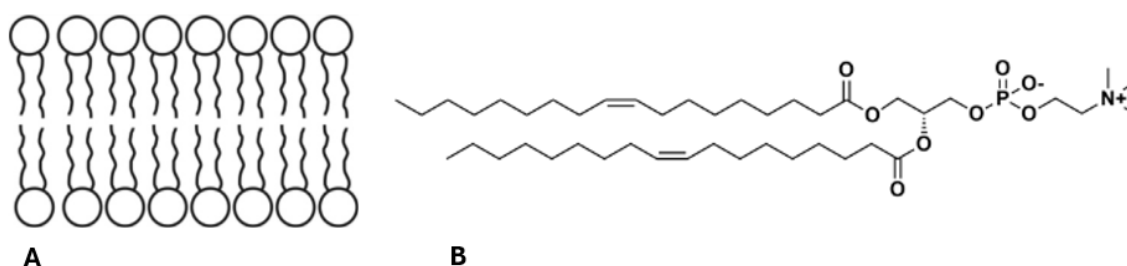
DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

- Suformuoti savitvarkį monosluoksnį ant FTO paviršiaus, naudojant skirtingų koncentracijų TOPS:ATS bei TOPS:ATS ir VTS mišinį.
- Kontaktinių kampų matavimo metodu palyginti skirtingos sudėties savitvarkius monosluoksnius, gautus ant FTO.
- Naudojant FFT-EIS metodą, iširti membranų, suformuotų naudojant 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM Chol vezikulių tirpalą, formavimosi ant FTO|SAM kinetiką.
- Naudojant FFT-EIS metodą, įvertinti α HL sąveikos su fosfolipidiniu dvisluoksniu kinetiką.
- Naudojant FFT-EIS, įvertinti α HK sukeltus struktūrinius pokyčius membranoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Ląstelės membranos struktūra ir funkcijos

Plazminės ląstelės membrana yra ypač svarbus ląstelės komponentas, suteikiantis ląstelei formą ir kontroliuojantis medžiagų patekimą į ląstelę ir iš jos. Apie pusę daugelio gyvūninių ląstelių membranos sudaro lipidai, tarp pastarųjų labiausiai paplitę fosfolipidai. Fosfolipido molekulę sudaro hidrofilinė dalis, kurioje yra fosfato grupė, glicerolis ir ilgos nepolinės riebalų rūgščių molekulių grandys. Dėka fosfolipidų formos bei amfipatiškos prigimties, vandeninėje terpėje fosfolipidai spontaniškai išsidėsto taip, kad hidrofobinės sritys sudaro tvirtus nepolinius ryšius ir yra izoliuotos nuo ląstelės vidaus ir išorės, kai tuo tarpu hidrofilinės sritys kontaktuoja su ląstelės išore ir vidumi – susiformuoja fosfolipidinis dvisluoksnis (1 pav) [13, 14].



Pav. 1. A – supaprastinta fosfolipidinio dvisluoksnio schema [15], B – fosfolipidas 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholinas (DOPC).

Labai svarbi biologinės ląstelės funkcija yra medžiagų transporto iš ir į ląstelę reguliavimas. Fosfolipidinis dvisluoksnis padeda užtikrinti selektyvų molekulių transportą iš ląstelės ar į ląstelę, kadangi membranos pralaidumas priklauso nuo per membraną besiskverbiančių molekulių krūvio ir poliškumo, molekulinės masės. Jonai ir polinės molekulės negali difunduoti per lipidų dvisluoksnį, bet pasyvi hidrofobinių molekulių difuzija yra galima. Plazminė membrana taip pat apima daugybę baltymų, kurie sudaro įvairius kompleksus, poras, kanalus. Šie transmembraniniai baltymai padeda reguliuoti polinių molekulių pernašą per fosfolipidinį dvisluoksnį. Medžiagų transportas per ląstelės sienelę gali būti pasyvus, t.y. nereikalaujantis ląstelės energijos sąnaudų ir sukiamas medžiagų koncentracijos gradiento ląstelėje ir ląstelės išorėje skirtumo, arba aktyvus. Aktyvaus transporto metu ląstelė eikvoja energiją medžiagų pernašai iš mažesnės koncentracijos į didesnės koncentracijos sritį, paprastai transmembraninių baltymų pagalba.

Labai svarbi ląstelės membranos savybė – fluidiškumas. Fosfolipidiniai dvisluoksniai yra klampūs skysčiai, o ne kieti kūnai. Daugumos natūralių fosfolipidų riebalų rūgštys turi vieną ar daugiau dvigubų jungčių, keičiančių nepolinės grandinės dalies geometriją ir trukdančių tvarkingam fosfolipidų išsidėstymui dvisluoksnyje. Taigi, ilgos riebalų rūgščių grandinės laisvai juda membranos viduje, todėl pati membrana yra minkšta ir lanksti. Be to, tiek fosfolipidai, tiek baltymai, esantys membranoje, gali laisvai difunduoti į įvairias membranos vietas – ši savybė labai svarbi daugeliui membranos funkcijų. Tai, kokie lipidai ir kokiais kiekiais sudaro membraną, stipriai įtakoja membranos fluidiškumą bei pralaidumą įvairioms medžiagoms, kadangi lipidų hidrofobinių grandinių ilgis bei sotumo laipsnis įtakoja fosfolipidinio dvisluoksnio tvarkingumą [13, 14].

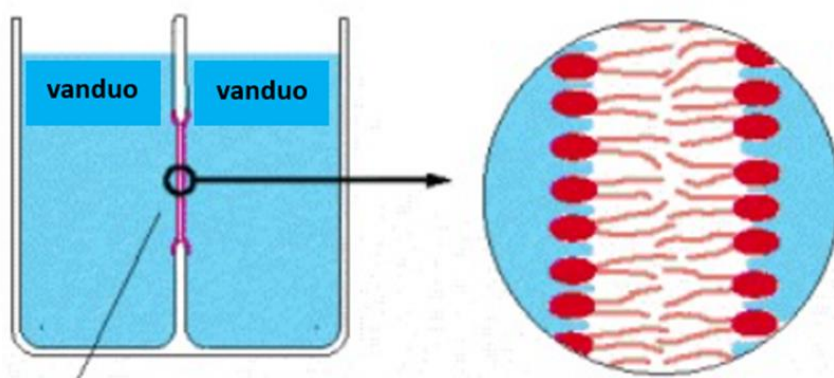
Fluidiškumui daug įtakos turi cholesterolis – viena pagrindinių gyvūninių ląstelių membranų sudedamųjų dalių. Cholesterolio molinis kiekis ląstelės membranoje paprastai yra maždaug toks pats kaip ir fosfolipidų. Dėl savo standžios žiedinės struktūros cholesterolis atlieka išskirtinį vaidmenį membranos struktūroje. Cholesterolis pats savaime nesudaro membranos, bet įsiterpia į fosfolipidų

dvisluoksnį su savo poline hidroksilo grupe, esančia arti fosfolipidų galinių grupių. Priklausomai nuo temperatūros, cholesterolis daro skirtingą poveikį membranos skystumui. Aukštoje temperatūroje cholesterolis trukdo judėti fosfolipidų nepolinėms grandims, todėl išorinė membranos dalis tampa mažiau skysta ir sumažėja jos pralaidumas mažoms molekulėms. Tačiau esant žemai temperatūrai cholesterolis veikia priešingai: trukdydamas riebalų rūgščių grandinių sąveikai, cholesterolis apsaugo membranas nuo užšalimo ir išlaiko membranos skystumą [13, 14, 16, 17].

1.2. Membranų modeliai

1.2.1. Plokščiasis lipidų dvisluoksnis (angl. *planar lipid bilayer*)

Lipidų dvisluoksnio modelis yra *in vitro* sukurta struktūra, imituojanti ląstelės membranos dvisluoksnį *in vivo*. Paprasčiausią modelį sudaro tik vienos rūšies lipidai, bet toks modelis prastai reprezentuoja biologinę sistemą, tad paprastai naudojami bent keli lipidai. Plokščias lipidų dvisluoksnis (angl. *planar lipid bilayer*, *black lipid membrane*) yra fosfolipidų dvisluoksnio plėvelė, iš abiejų pusių besiribojanti su skysčiu (elektrolitu). Tokia sistema gaunama ploname hidrofobinės medžiagos, pvz. teflono, sluoksnyje sukuriant nedidelę, kelių dešimčių ar šimtų mikrometrų angą. Hidrofobinės medžiagos sienelė su anga skiria du vandeninių tirpalų rezervuarus, o angoje suformuotas fosfolipidinis dvisluoksnis (žr. 2 pav.). Modelis plačiai naudojamas baltyminių porų ir jonų kanalų charakterizavimui. Plokščio lipidų dvisluoksnio geometrija suteikia prieigą prie abiejų dvisluoksnio pusių, tad galima nesunkiai tirti tokios fosfolipidinės plėvelės mechanines savybes. Pagrindinis tokių membranų modelių trūkumas – prastas stabilumas [18, 19].



Fosfolipidinis dvisluoksnis

Pav. 2. Lipidų dvisluoksnio, iš abiejų pusių supamo elektrolito, schema.

1.2.2. Ant substrato imobilizuotos membranos modelis

Membranos dvisluoksniai, imobilizuoti ant substrato naudojami kaip universalios biologinių membranų modeliai. Membrana tokiaime modelyje yra ant kieto pagrindo, o viršutinė dvisluoksnio dalis yra sąlytyje su skysčiu (elektrolitu). Vienas didžiausių tokių membranų modelių privalumų yra stabilumas. Kad membranos modelis kuo tiksliau atitiktų tikrą biologinę membraną, reikia pasirūpinti, kad ant substrato imobilizuotas fosfolipidinis dvisluoksnis išliktų fluidiškas ir kad nevyktų į fosfolipidinių dvisluoksnį įsiterpusių molekulių denatūravimas šioms sudarant fizikinius ryšius su substratu. Šiems tikslams įgyvendinti substratas dažnai modifikuojamas molekuliniiais inkarais. Molekulinis inkaras suteikia vandens rezervuarą, pralaidų jonams ir primenantį gelio pavidalo struktūrą bei imituojantį ląstelės citoplazmą. Kaip molekuliniai inkarai membranų

modeliuose gali būti naudojami polimerai, angliavandeniai, baltymai. Dažnai naudojami ant substrato suformuoti savitvarkiai monosluoksniai (SAM) [1, 2 3, 4, 5, 6].

1.3. Savitvarkiai monosluoksniai

Membranos modelio elektrinės savybės stipriai priklauso nuo molekulinų inkarų savybių, jų ilgio, funkcinių grupių. Molekulinų inkarų savybės įtakoja vandens rezervuaro savybes, membranos tankumą, stabilumą, galimybes įterpti į membraną transmembraninius baltymus [2,3,4].

Dažnai kaip molekuliniai inkarai naudojami savitvarkiai monosluoksniai. Savitvarkiai monosluoksniai yra molekulės, spontaniškai išsidėsčiusios ant paviršiaus adsorbcijos būdu ir sudarančios ant paviršiaus vienamolekulinį sluoksnį. Kaip molekulės savitvarkiams monosluoksniams formuoti dažnai naudojami tioliai, disulfidai ar silanai [4, 5 8]. Paprastai savitvarkių monosluoksnių molekulės per funkcinę grupę prisijungia prie substrato chemisorbcijos būdu. Savitvarkio monosluoksnių stabilumui taip pat didelę įtaką daro Van de Valso jėgos – jų dėka susiformuoja tankūs ir stabilūs monosluoksniai [2].

Dažniausiai ant paviršiaus per molekulinus inkarus imobilizuotiems membranų modeliams formuoti naudojami naudojami mišrūs savitvarkiai monosluoksniai, sudaryti iš ilgagrandžių ir trumpagrandžių molekulių. Galinis, lipidą primenantis alifatinis savitvarkio monosluoksnių molekulės motyvas įsiterpia į dvisluoksnį. Trumpagrandės molekulės mišriuose savitvarkiuose monosluoksniuose (dar vadinamos skiedikliais) padeda praretinti savitvarkį monosluoksnį – tai gali būti svarbu ant paviršiaus imobilizuotų fosfolipidinių dvisluoksnių formavime, kadangi praretinimas suteikia daugiau reikalingos erdvės pomembraniniam vandens rezervuarui. [5].

Savitvarkių monosluoksnių formavime ant taurių paviršių, tokių kaip auksas ar sidabras, dažnai naudojami tioliai, per sieros atomą sudarantys stiprų kovalentinį ryšį substratu. Vienas pagrindinių tiolių trūkumų ant paviršiaus imobilizuotų membranų formavime yra tiolių polinkis substrato paviršiuje sudaryti klasterius, dėl ko gaunamas netolygus paviršius, kurio savybės skirtingose jo vietose skiriasi [20].

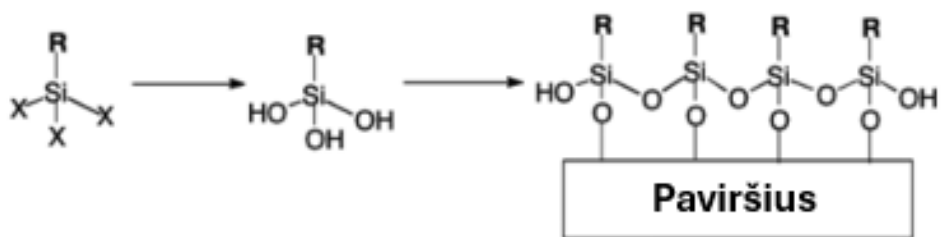
1.4. Alkilsilanai ir silanizavimas

Dažnai savitvarkiams monosluoksniams formuoti pasitelkiami alkilsilanai, pasižymintys mechaniniu tvirtumu [21] ir terminiu stabilumu [22, 23]. Alkilsilanai – organinių junginių grupė, kuriuos sudaro silicio atomas, sudaręs jungtis su keturiais ligandais, iš kurių bent vienas turi alkil grupę. Alkilo grupės alkilsilanoose gali būti modifikuotos įvairiais organiniais ar neorganiniais pakaitais. Bendrą alkilsilano struktūrą galima užrašyti kaip R_nSiX_{4-n} , kur R – alkilo grupė (ši grupė gali būti modifikuota įvairiais organiniais ar neorganiniais junginiais), X – nueinančioji grupė (pvz., chloras, bromas, metoksi grupė). Priimta, kad silanizacijos procesas vyksta pagal tokį mechanizmą (schematiškai pavaizduota pav. 3.) [24]:

- Vyksta alkilsilano hidrolizė, kurios metu susidaro silanolinės grupės.
- Silanolinės grupės prisijungia prie substrato hidroksi grupių, šios jungties susidarymo metu eliminuojama vandens molekulė.
- Ant paviršiaus esantys silanai polimerizuojasi tarpusavyje, sudarydami siloksano (Si–O–Si) jungtis.

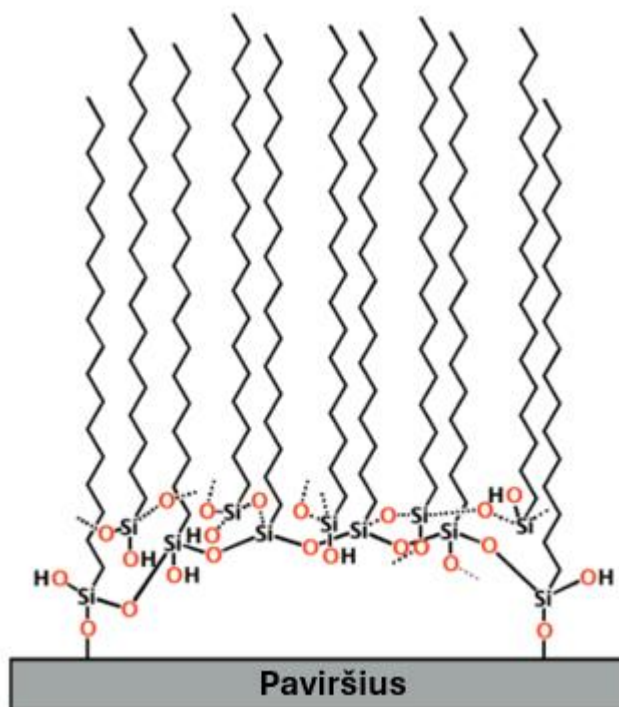
Alkilsilano hidrolizė vyksta pačiame substrato paviršiuje, nueinančiai grupei, pasižyminčiai nukleofilinėmis savybėmis, reaguojant su ant substrato adsorbuota –OH grupe. Paviršiaus silanizavimas paprastai vykdomas bevandeniuose tirpikliuose (tokiuose kaip toluenas ar heptanas),

tam, kad silanizacijos reakcija vyktų paviršiuje. Silanizavimo tirpale esant vandens, hidrolizės ar alkilsilanų tarpusavio poliarizacijos reakcijos gali įvykti tirpale, molekulėms nepasiekus paviršiaus. Tokiais atvejais paviršiaus silanizavimas gali vykti, bet vyks ne taip efektyviai ir bus gaunami mažiau stabilūs savitvarkiai monosluoksniai [25].



Pav. 3. Klasikinis paviršiaus silanizavimo mechanizmas [25].

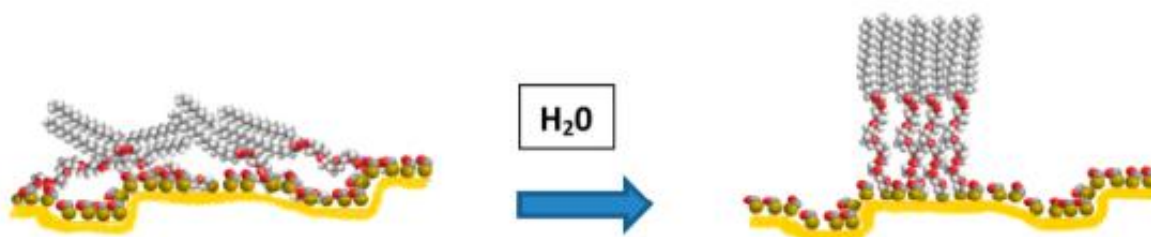
Pav. 3. pavaizduotas siloksano jungčių susidarymas realiose sistemose nevyksta šimto procentų išeiğa, t.y., nėra taip, kad tris nueinančias grupes turintis alkilsilanas būtinai sudarys vieną jungtį su paviršiumi ir dvi siloksano jungtis su kaimyninėmis alkilsilano molekulėmis. Yra galimybė, kad, pvz. kelios nueinančios grupės sudarys kelias jungtis su paviršiumi (taigi, nebeliks arba liks mažiau grupių, galinčių sudaryti siloksaninį ryšį su kaimyninėmis alkilsilano molekulėmis) [25].



Pav. 4. Netvarkingas silanų išsidėstymas paviršiuje [25].

Silanizacijos efektyvumui ir alkilsilanų polimerizacijos laipsniui didelę įtaką turi silanizuojamo paviršius prigimtis bei heterogeniškumas. Skirtingi paviršiai pasižymi skirtingomis savybėmis, reakingumu ir giminingumu silanams. Taip pat, paviršiai retai kada yra idealiai homogeniški. Paviršių heterogeniškumą sukelia jame esantys natūralūs defektai. Heterogeniškumas įtakoja reaktyvių centrų, reikalingų silanizavimui, pasiskirstymą paviršiuje, pavyzdžiui, skirtingą paviršiaus hidrataciją hidroksi grupėmis, reikalingomis tiek alkilsilanų hidrolizei, tiek hidrolizuotų alkilsilanų reakcijai su paviršiumi. Šiurkštūs paviršiai pasižymi didesniu paviršiaus plotu ir paprastai gali suteikti daugiau aktyvių centrų, bet taip pat paviršiaus geometrijos netolygumai gali trukdyti tvarkingam

savitvarkio monosluoksnio išsidėstymui. Paviršiaus heterogeniškumas trukdo susidaryti tvarkingam savitvarkiui monosluoksniui [11, 25, 26].



Pav. 5. Schema, vaizduojanti netvarkingą savitvarkio monosluoksnio išsidėstymą substrato paviršiuje ir galimą savitvarkio monosluoksnio reorganizaciją, kai savitvarkis monosluoksnis yra vandeninėje terpėje [8].

Tankus savitvarkis monosluoksnis paprastai pasižymi didesniu stabilumu, kadangi arti viena kitos esančios silanų molekulės gali sudaryti tvirtesnius siloksano ryšius [8]. Nors norint efektyviai silanizuoti paviršių pravartu silanizuoti polinius paviršius (tokius kaip metalų oksidai ar silicis), tinkamai paruošiant (aktyvinant) paviršių galima silanizuoti net tokius hidrofobinius paviršius, tokius kaip teflonas [26]. Silanizavimo efektyvumui ir silanizacijos laipsniui taip pat didelę įtaką turi pačios alkilsilano molekulės poliškumas. Labiau poliški silanai pasižymi trumpesnėmis alkilo grandinėmis (pav., trimetilchlorosilanas), ir turi polinių funkcinių grupių (tokių kaip -OH or -Cl. Nepoliški alkilsilanai pasižymi ilgesnėmis alkilo grandinėmis (pvz. oktadeciltrichlorosilanas), kurios sumažina poliariškumą ir padidina hidrofobiškumą. Nepoliški alkilsilanai gali prisijungti prie paviršiaus, bet bus gautas silanų monosluoksnis pasižymės mažesniu polimerizacijos laipsniu. Silanizacijos metu taip pat reikia atsižvelgti į tokius reakcijos parametrus kaip temperatūra bei silanizavimo laikas. Žinoma, kad ilgesnis silanizuoto paviršiaus laikymas aukštesiose temperatūrose gali padidinti silanizacijos laipsnį [27]. Visgi, silanizavimo laikas ir temperatūra yra pasirenkami pagal tai, su kokiais silanais bei silanizuojamais paviršiais dirbama, kokių savybių paviršių norima gauti. Paviršiaus savybės įvertinamos tiriant jo adheziją, drėkinimą, tiriant struktūrą optiniais metodais ar elektrocheminius parametrus [28, 29, 30, 31].

1.5. Fosfolipidinio dvisluoksnio formavimo metodai

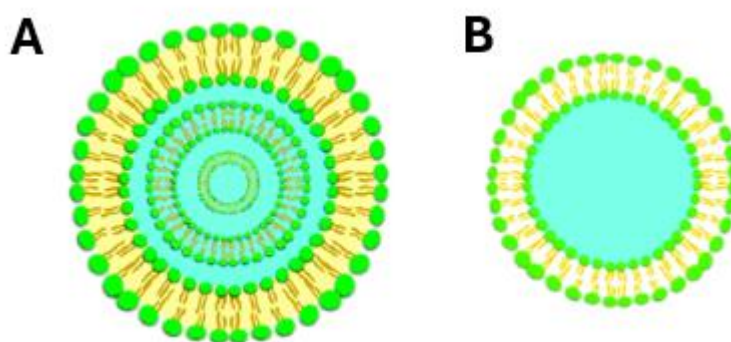
Fosfolipidinių dvisluoksnų formavimui ant kietų paviršių naudojami įvairūs metodai, tokie kaip Langmuir-Blodgett metodas [32], micelių mišinio adsorbicija [33], tirpiklių apsiskeitimo (*angl. solvent exchange*) metodas [34] ar vezikulių liejimas [35]. Langmuir – Blodgett metodas parentas organinių medžiagų (tokių kaip amfifilinės molekulės ar įvairios nanomedžiagos) monosluoksnio homogeniška adsorbicija skysčio paviršiuje. Kietas substratas įmerkiamas į tokį skystį, dėl ko monosluoksnis imobilizuojamas ant paviršiaus. Naudojant šį metodą galima gauti stabiliais bei įvairių norimų bei kontroliuojamą sudėčių struktūras, bet tokiu metodu fosfolipidinis dvisluoksnis gaunamas formuojant po vieną monosluoksnį vienu metu ir norint gauti norimų ir kontroliuojamą savybių dvisluoksnį, reikia sudėtingos įrangos. Tirpiklių apsiskeitimo metodas parentas fosfolipidų ištirpinimu organiniame tirpiklyje (pvz., izopropanolyje) sumaišytame su vandeniniu tirpalu ir lengvai garuojančio tirpiklio išgarinimu. Šis metodas greitas ir leidžia suformuoti fosfolipidinius dvisluoksnius, pasižyminčius fluidiškumu. Šio metodo taikymo sėkmingumas ir gauto fosfolipidinio dvisluoksnio kokybė labai priklauso nuo naudojamo substrato, dvisluoksniui formuoti naudojamų amfifilinių molekulių prigimties bei naudojamo organinio tirpiklio, tad tinka ne visoms sistemoms.

Be to, greitas fosfolipidinio dvisluoksnio formavimasis šiuo metodu neleidžia tirti membranos formavimosi realiu laiku [36, 37].

1.6. Vezikulės ir vezikulių liejimo metodai

Vezikulės yra tridimensiniai polimolekuliniai junginiai, egzistuojantys realiose biologinėse sistemose (pvz. viduląstelinės medžiagų transporto funkciją turinčios vezikulės [38], ar ląstelės išorėje esančios vezikulės [39]). Vezikules sudaro amfifilinės molekulės, turinčios polinę „galvą“ ir nepolinę „uodegą“. Vezikulių susiformavimo principas labai panašus į micelių, tik sudaromas ne amfifilinių molekulių monosluoksnis, o dvisluoksnis (vienasluoksnį vezikulių atveju). Amfifilinės sudaro sferinę formą ir yra išsidėsčiusios taip, kad polinės jų dalys kontaktuoja su poliniu tirpikliu vezikulės viduje (tarp jų ir tirpiklio susidaro poliniai ryšiai), nepolinės dalys išsidėsto tokio amfifilinių molekulių monosluoksnio išorėje, o dėl hidrofobinių ryšių, struktūra pasidengia antru amfifilinių molekulių sluoksniu (antro sluoksnio molekulių hidrofobinėms dalims išsidėstant greta pirmo sluoksnio hidrofobinių dalių, o antro sluoksnio molekulių polinėms dalims esant pačioje struktūros išorėje ir sudarant hidrofiliškus ryšius su tirpikliu, kuriame yra vezikulė. Pagal morfologiją, vezikules galima skirstyti į dvi pagrindines grupes – vienasluoksnės ir daugiasluoksnės. Vienasluoksnės vezikulės, kaip jau aptarta, sudaro amfifilinių molekulių dvisluoksnį, o daugiasluoksnės susideda iš daugiau dvisluoksnų (pav. 6.). Kai kurie autoriai išskiria ir tarpinį variantą – oligolamelines (kelių sluoksnų) vezikules ar įvairius hibridinius darinius – agreguotas vezikulių struktūras, vezikules, savo viduje turinčias vieną ar daugiau mažesnių matmenų vezikulių [40]. Naudojant skirtingos sudėties ir struktūros amfifilines molekules, skirtingus tirpiklius bei sintezės procedūras, galima gauti skirtingų dydžių (kurie paprastai varijuoja tarp 30 nm ir 300 μ M) ir struktūros vezikules [41, 42].

Fosfolipidinių dvisluoksnų formavimui ant substrato, dažnai naudojamos mažų matmenų vienasluoksnės vezikulės, kadangi jos turi didesnę paviršiaus plotą ir pasižymi didesne laisvąja paviršiaus energija, taigi, yra termodinamiškai mažiau stabilios, todėl greičiau plyšta ir greičiau susiformuoja fosfolipidinis dvisluoksnis [43]. Kita vertus, unilamelinių vezikulių sintezė dažnai yra ilgesnis ir sudėtingesnis procesas [28, 44, 45], tuo tarpu daugiasluoksnės vezikulės spontaniškai susiformuoja vandeniiniame tirpale ir gali būti sėkmingai panaudotos mažai defektų turintiems fosfolipidiniams dvisluoksniams formuoti [46].

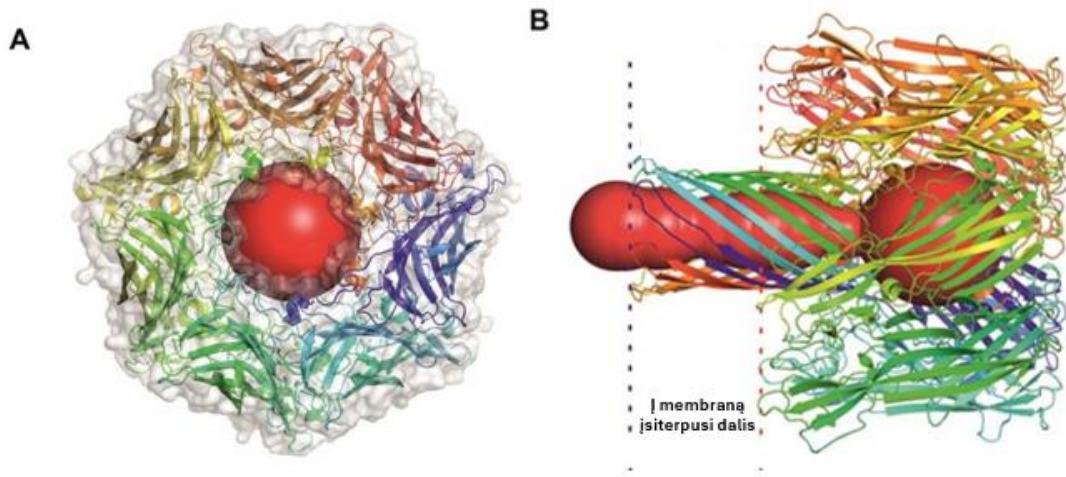


Pav. 6. Schematinis daugiasluoksnės (A) ir vienasluoksnės (B) vezikulių schematinis pavaizdavimas [47].

1.7. α -hemolizinas

α -hemolizinas yra citotoksinis baltymas, gaminamas bakterijos *Staphylococcus aureus*. Šis baltymas bakterijos išskiriamas kaip vandenyje tirpus monomeras, kurio molekulinė masė ~ 33 kD. Didžiąją dalį jo struktūros sudaro β klostės (apie 68 %) ir apie 10 % α -spiralių. α -hemolizino monomerai ląstelėje suformuoja heptamerinius vienetus ir taip suformuoja β -statinės formos ketvirtinę struktūrą – membranos ląstelėje susidaro pora. α -hemolizino heptamero struktūra yra grybo formos (žr. pav. 7.). Šios struktūros aukštis gali siekti 10 nM, į membraną įsiterpusi β -statinės diameras, o sudarytos poros diametras – nuo 1,4 iki 4,6 nM [12, 48]. Ketvirtinę struktūrą, o tuo pačiu ir poros diametrą gali įtakoti tokie veiksniai kaip mutacijos, pH ar temperatūra [49, 50, 51]

α -hemolizinui suformavus poras ląstelėje, vyksta ląstelės mirtis. Esant mažoms α -hemolizino koncentracijoms, poros (1,2 – 1,5 nm skersmens) leidžia vienvalenčių jonų judėjimą į ląstelę ir iš jos, dėl ko sukeliama DNR fragmentacija. Esant didesnėms toksino koncentracijoms, α -hemolizinas nespecifiškai prisijungia prie fosfolipidinio dvisluoksnio, suformuodamas didesnes (2,5 – 3 nm skersmens), Ca^{2+} jonams pralaidžias poras, o tai sukelia nekontroliuojamą Ca^{2+} srautą – vyksta nekrozė [52, 53].



Pav. 7. α -hemolizino transmembraninė pora [54].

1.8. Membranų modelių tyrimų metodai

Norint apibūdinti modelines membranų sistemas ir suprasti jų (o taip pat – ir realių biologinių membranų) savybes bei elgseną įvairiomis sąlygomis, reikia taikyti įvairius analizės metodus. Skirtingi metodai, ypač naudojami komplementariai, gali suteikti daug naudingos informacijos apie sistemą, patvirtinti arba paneigti hipotetinius membranoje ir jos aplinkose vykstančių reakcijų mechanizmus. Svarbūs membranų modelių tyrimuose naudojami analizės metodai yra paviršiaus plazmonų rezonansas [55], elipsometrija [56], atominių jėgų mikroskopija [57], skenuojanti elektronų mikroskopija [9], kvarco kristalo mikrosvarstyklių panaudojimas [58]. Skirtingi metodai turi savų privalumų ir trūkumų, pvz., atominių jėgų mikroskopija turi puikias paviršiaus vaizdinimo galimybes, yra nedestrukcinis metodas, gali suteikti informacijos apie jėgų tarp paviršiuje esančių molekulių stiprumą, apibūdinti paviršiaus mechanines savybes, kita vertus, norint pasiekti gerą skiriamąją gebą, matavimas gali trukti labai ilgai, tad užkertamas kelias tirti kinetinius membranose vykstančius procesus; pats metodas gana sudėtingas ir reikalaujantis brangios įrangos, atominio mikroskopo adata

gali būti užteršta mėginiu ar pažeisti mėginį [59]. Kvarco kristalo mikrosvarstyklės yra puikus metodas paviršiaus fizikinėms savybėms, pvz., membranos tankiui, viskoelastinėms savybėms tirti, todėl suteikia daug informacijos apie sistemas membranų modelių tyrimuose, kita vertus, kvarco kristalo mikrosvarstyklių veikimo principas remiasi masės pokyčiais paviršiuje ir esant labai komplikuotoms sistemoms (pvz. membranai su daug skirtingų poras formuojančių baltymų) gali būti komplikuota ar neįmanoma tirti sistemos struktūrą molekuliniam lygmenyje.

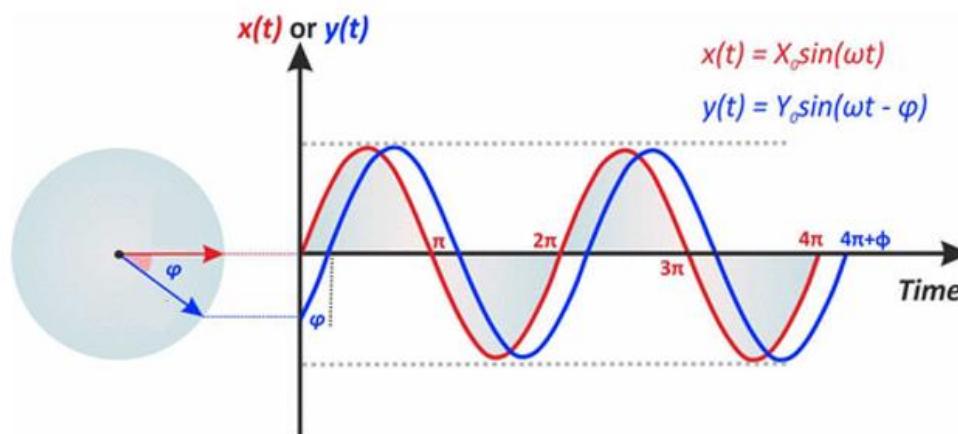
Kadangi ant substrato imobilizuotą membranos modelį galima interpretuoti kaip ant laidaus paviršiaus (substrato) esantį dialektriko sluoksnį, membranos savybes ar jų pokyčius membraną veikiant, pvz., membranoje poras formuojančiais toksiniais, galima įvertinti elektrocheminiais metodais. Membranų elektrinė varža tradiciškai gali būti nustatoma nuolatinės elektros srovės metodais ir skaičiuojama naudojantis Omo dėsnio. Nuolatinės srovės metodai yra paprastesni, bet nuolatinės srovės sukeliama elektrodo poliarizacija gali skatinti krūvininkų kaupimąsi, todėl ne tik gaunami netikslūs, biologinės sistemos nereprezentuojantys rezultatai, bet krūvininkų kaupimasis taip pat gali pakenkti membranos stabilumui. Nuolatinės elektros srovės metodai taip pat neleidžia atskirti pačios membranos varžos nuo membrana|substratas sąlyčio ribos varžos, tad sunku ar neįmanoma nustatyti daug skirtingų tos pačios sistemos parametrų.

Kaip alternatyva nuolatinės srovės metodams, membranų modelių sistemų laidumo ir dialektrinėms savybėms įvertinti naudojama elektrocheminio impedanso spektroskopija. Elektrocheminio impedanso spektroskopijoje srovė kinta plataus dažnių diapazono ribose ir tai suteikia galimybę atskirti skirtingu greičiu vykstančius reiškinis, taigi, ir identifikuoti bei kiekybiškai įvertinti įvairius membranos modelio sistemos parametrus (pvz. membranos varžą, pomembraninio vandens rezervuaro savybes, membranos defektų savybes). EIS metodu galima nustatyti daug skirtingų sistemos parametrų vienu eksperimentu. EIS taip pat turi didelį pranašumą tiriant didelę varžą pasižyminčias sistemas (tokias kaip fosfolipidiniai dvisluoksniai) ir fiksuoti ypač smulkius sistemos laidumo pokyčius. EIS yra greitas, jautrus, neinvazinis metodas. EIS metodo trūkumai dažniausiai susiję su galimais neaiškumais interpretuojant duomenis – gautiems eksperimentiniams rezultatams gali tikt kelios ekvivalentinės schemas, bet teisingos grandinės pasirinkimas turi būti pagrįstas atsižvelgiant į schemas elementų fizikinę prasmę.

1.9. Elektrocheminio impedanso spektroskopija

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) yra metodas, gebantis įvertinti elektrolitų pasipriešinimą elektros srovei kietų kaip dažnio funkcija. EIS matavimų metu, mėginys sužadinas mažos amplitudės kintama pagal sinusoidinę funkciją srove arba įtampa, o tuo tarpu srovės arba įtampos atsakas yra matuojamas plačiame dažnių intervale (paprastai šis dažnių intervalas svyruoja $10^{-3} - 10^6$ Hz ribose) Suteikiamas signalas (srovė arba įtampa) yra pakankamai mažas (paprastai mažiau nei 10 mV), kad būtų galima daryti prielaidą, jog sąryšis tarp srovės ir įtampos pseudolinijinis. Linijinėse ar pseudolinijinėse sistemose, srovės atsakas į užduotą sinusoide kintantį

potencialą yra sinusoidė, kurios vertės kinta tokiu pat dažniu, bet yra pasistūmusios per fazę φ (pav. 8).



Pav. 8. Dvi sinusoidės, kurių viena pasistūmusi per fazę φ , reprezentuojančios galimą kintamos įtampos atsaką į sužadimą kintama srove bei sinusoidžių vertės reprezentavimas besisukančiu vektoriumi [60].

Sinusoidinio signalo vertė yra išreiškiama per besisukantį vektorių, kurio ilgis lygus srovės stiprio ar dažnio amplitudei (X_0) ir kuris sukasi kampiniu dažniu ω . Taigi, sinusoidės vertės konkrečiu laiko momentu gali būti aprašomos formule:

$$x(t) = X_0 \sin(\omega t) \quad (1)$$

Sinusoidinio signalo laiko charakteristiką galima apibūdinti iš dažniu f (vektoriaus apsisukimų skaičius per 1 s) hercais, Hz, ir periodo laiku T (laikas, per kurį vektorius apsisuka 360°) sekundėmis, s , kurie tarpusavyje susieti per kampinį dažnį lygtimi:

$$\omega = 2\pi f = \frac{2\pi}{T} \quad (2)$$

Du tuo pačiu dažniu judantys sinusoidiniai signalai gali skirtis ne tik amplitudė, bet ir fazės kampu ar fazės poslinkiu tarp dviejų skirtingų vektorių. Tuomet, laikydami vieną vektorių kaip atskaitos tašką, kito vektoriaus postūmį jo atžvilgiu galime apibūdinti fazės poslinkiu φ :

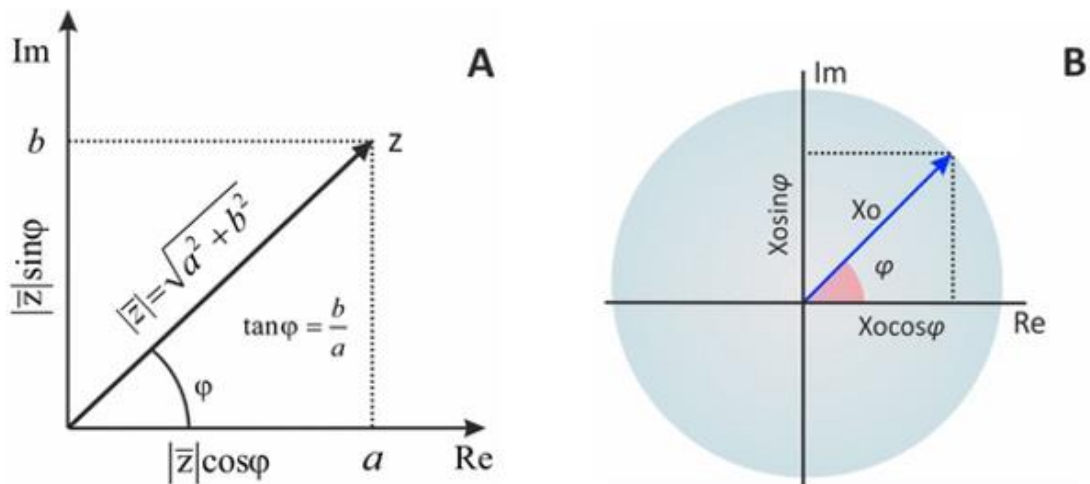
$$y(t) = Y_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (3)$$

Sinusoidinį signalą galima išreikšti kaip kompleksinį skaičių z :

$$z = z' + jz'' \quad (4)$$

Čia z' – reali, o jz'' – kompleksinė skaičiaus dalis (kur $j = (-1)^{0,5}$)

Tokį kompleksinį skaičių galima susieti su jo moduliu per lygtis, skaičių kompleksinius skaičius reprezentuojančia skaičių plokštuma pavaizduota pav. 9:



Pav. 9 Režentacijos kompleksinio skaičiaus (A) ir sinusoidinį signalą reprezentuojančio vektoriaus kompleksinėse koordinatėse [49].

Bendrą impedansą bei jo realią ir menamą dalis galima išreikšti per formules:

$$z = |z|(\cos\varphi + j\sin\varphi) \quad (5)$$

$$z' = |z|\cos\varphi \quad (6)$$

$$z'' = |z|\sin\varphi \quad (7)$$

Naudojantis Eulerio lygtimi kompleksinį skaičių per sinusą ir kosinusą galima išreikšti lygtimi:

$$e^{\pm j\varphi} = \cos(\varphi) \pm j\sin(\varphi) \quad (8)$$

O kompleksinį skaičių galima išreikšti:

$$z = |z|e^{j\varphi} \quad (9)$$

Pasinaudojus matematinėmis funkcijomis, aprašančiomis sinusoidžių kitimo priklausomybę nuo dažnio, kintamos srovės įtampą ($U(\omega)$ [V]) ir srovę ($I(\omega)$ [A]) galime aprašyti kaip kampinių dažnių funkcijas:

$$U_{(\omega)} = U_0 \sin\omega t \quad (10)$$

$$I_{(\omega)} = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (11)$$

Čia U_0 – įtampos amplitudė, I_0 – srovės amplitudė.

Arba, panaudojus Eulerio lygtį:

$$U(\omega) = U_0 e^{j\omega t} \quad (12)$$

$$I(\omega) = I_0 e^{j(\omega t + \varphi)} \quad (13)$$

Tiriamos sistemos kintama varža, impedansas ($Z_{(\omega)}$ [Ω]), gali būti išreiškiamas forma, panašia į Ohmo dėsnį, tik naudojant kintamos srovės ir kintamos įtampos išraiškas:

$$Z_{(\omega)} = \frac{U_0 e^{j\omega t}}{I_0 e^{j(\omega t + \varphi)}} = \frac{U_0}{I_0} e^{j\varphi} = Z \cos\varphi + jZ \sin\varphi \quad (14)$$

Priešingas impedansui dydis, admitansas $Y(\omega)$ [S], aprašomas:

$$Y(\omega) = \frac{1}{Z(\omega)} = G + j\omega C \quad (15)$$

Čia G [S] laidumas, o C [F] talpa.

Laidumas ir talpa gali būti išskaičiuoti iš impedanso ir fazės poslinkio kampo pagal formulę:

$$G = \frac{1}{Z} \cos\varphi \quad (16)$$

$$C = \frac{1}{\omega Z} \sin\varphi \quad (17)$$

Impedanso spektrai dažniausiai modeliuojami naudojantis ekvivalentinėmis schemomis, sudarytomis iš įvairių elementų, tokių kaip varžos, talpos, induktyvumas, neidealų kondensatorių aprašantis pastovios fazės elementas (CPE), difuziją aprašantis Varburgo elementas. Kaip minėta, didelis EIS privalumas - duomenų (impedanso spektro) modeliavimas pagal sistemą atitinkančią ekvivalentinę schemą ir taip gaunamos grandinėje esančių komponentų skaitinės vertės. Pavyzdžiui, kai grandinėje yra tik varža, impedansas lygus realiosios dalies varžai, o menama dalis lygi nuliui:

$$Z = R + j0 \quad (18)$$

Kai grandinėje yra tik kondensatorius, impedanso realioji dalis lygi nuliui, o menama dalis atvirkščiai proporcinga talpai (C) ir dažniui:

$$Z = 0 + \frac{1}{j\omega C} \quad (19)$$

Nuosekliai sujungtų elementų bendras impedansas yra atskirų impedansų sudėtis:

$$Z_{bendras} = Z_1 + Z_2 + Z_n \quad (20)$$

Paraleliai sujungtų elementų impedansas skaičiuojamas:

$$\frac{1}{Z_{bendras}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} + \frac{1}{Z_n} \quad (21)$$

EIS rezultatai analizuojami atidedant rezultatus skirtingose koordinatėse, tokiose kaip Nyquisto koordinatės (impedanso realios dalis priklausomybė nuo menamos dalies), Bode koordinatės (impedanso modulio bei fazės priklausomybės nuo dažnio), kompleksinės talpos koordinatės (talpos realios dalis priklausomybė nuo menamos dalies).

1.10. Greitosios Furjė transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopija

Fizikoje, inžinerijoje ir matematikoje Furjė transformacija (FT) - tai integralinė transformacija, kurios įvestis yra funkcija, o išvestis - kita funkcija, nusakanti, kiek įvairių dažnių yra pradinėje funkcijoje. Transformacijos rezultatas yra kompleksinė dažnio funkcija. Terminas Furjė transformacija reiškia ir šią kompleksinės vertės funkciją, ir matematinę operaciją. Furjė transformacija dar vadinamas pradinės funkcijos atvaizdavimu dažnių srityje [61]

Naudojantis greitosios Furjė transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu (FFT-EIS), tiriama sistema sužadinama ne nuosekliai ir atskirai skleidžiamais skirtingo dažnio kintamos srovės signalais, o naudojant 30-50 sinusinių bangų superpoziciją (t.y. sudėtį). Kai naudojantis EIS sistema sužadinama ne vieno dažnio kintama srove, aprašoma viena sinusine banga, o daugelio bangų superpozicija, gautas atsakas yra įtampos priklausomybė nuo dažnio, taip pat išreikšta kaip 30-50 sinusinių bangų superpozicija. Greitos Furjė transformacijos algoritmas leidžia perskaiciuoti tokią bangų superpoziciją į atskiras dedamąsias bangas ir gauti EIS būdingą spektrą – įtampos atsakus, sistemą sužadinant skirtingų dažnių kintamos srovės bangomis. Naudojant sinusinių

bangų superpoziciją, galima vienu metu gauti sistemos atsakus esant skirtingiems kintamos srovės dažniams, todėl elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimas trunka daug greičiau, pvz. išmatuoti sistemos atsaką dažnių srityje nuo 0,2 Hz iki 10 kHz užtrunka apie 15 sekundžių. Taigi, greitosios FFT–EIS ypač naudingas metodas tirti greitai vykstančius EIS spektrų pokyčius ⁶².

2. METODIKA

2.1. Elektrodo paruošimas

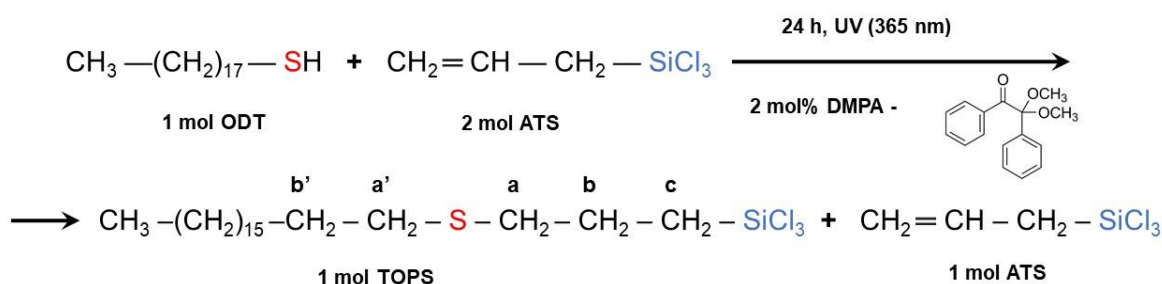
Naudota fluoru dopuoto alavo oksido plokštelė (FTO, Sigma Aldrich), kurios matmenys 80 mm x 140 mm, o paviršiaus varža ~ 7 Ω. Plokštelė plaunama tokia eiga:

- 1) Nuvaloma plaušelių nepaliekiančia servetėle, pavilgyta 2 % „Micro 90“ laboratorinių indų ploviklio vandeniniu tirpalu.
- 2) 8 min plaunama ultragarsinėje vonelėje „Micro 90“ laboratorinių indų ploviklio vandeniniame tirpale.
- 3) 30 min laikoma 96 % sieros rūgštyje (H₂SO₄).
- 4) 16 min plaunama ultragarsinėje vonelėje distiliuotame vandenyje.

Po plovimo plokštelė parai paliekama stiklinėje su distiliuotu vandeniu, kadangi pastebėta, jog taip plokštelės paviršius hidratuojasi ir silanizavimo metu plokštelė tolygiau pasidengia savitvarkiu monosluoksniu.

2.2. Silanų mišinio paruošimas

Silanų mišinio sintezei stikliame buteliuke sumaišomas oktadekantiolis (ODT) ir aliltrichlorosilanas (ATS) moliniu santykiu 1:2, bei pridedama 2 mol % fotoiniatoriaus 2,2-dimetoksi-2-fenilacetofenono (DMPA). Mišinys 24 h laikomas apšviestas 365 nm bangos ilgio UV spinduliuote ir maišomas naudojant magnetinę maišyklę. Sintezės metu ODT ir ATS sureaguoja moliniu santykiu 1:1 ir susidaro trichloro(3-(octadecyltio)propil)silanas (TOPS), o pusė mišinyje buvusio ATS lieka nesureagavusio. Sintezės reakcija pavaizduota pav. 10 [63, 64].



Pav. 10. TOPS:ATS sintezės reakcija [65]

2.3. Savitvarkio monosluoksniu formavimas

Silanizavimas vykdomas stiklinėje Petri lėkštelėje, į kurią įpilta 10 mL tolueno (Sigma Aldrich), pašildyto iki silanizavimo temperatūros (35 °C). Į tirpiklį dedamas norimas kiekis silanų mišinio (atšildyto iki kambario temperatūros), po to į tirpiklį su silanais dedama FTO plokštelė, kuri prieš tai kruopščiai nupučiama azoto dujomis, siekiant išvengti silanų reakcijos su vandeniu. FTO plokštelė laikoma tirpiklyje su silanais 60 min. Įdėjus plokštelę Petri lėkštelė uždengiama dangteliu, kad nevyktų spartus tirpiklio garavimas iš lėkštelės. Po to, silanizuota FTO plokštelė plaunama toluene. Plovimui naudojami keturi atskiri indai su švairiu tirpikliu – pirmame ir antrame induose FTO

plokštelė palaikoma po 3 min, trečiame inde 1min plaunama iki 35 °C pakaitintame toluene ultragarso vonelėje, o po to dar palaikoma toluene 3 min ketvirtajame inde. Kruopštus silanizuoto FTO plovimas skirtas pašalinti silpnais fizikiniais ryšiais prisijungusius silanų viršsluoksnius. Nuplautas silanizuotas FTO nupučiamas azoto dujomis ir valandą kaitinamas krosnyje 100 °C temperatūroje, kad būtų pašalinta drėgmė ir tirpiklio liekanos [31].

2.4. Fosfolipidinio dvisluoksnio formavimas ant silanizuoto FTO

Fosfolipidis dvisluoksnis formuotas naudojant vezikulių liejimo metodą, naudojant DOPC ir cholesterolį. DOPC ir cholesterolio 10 mM tirpalai chloroforme (Avanti Polar Lipids, Inc.) yra sumaišomi santykiu 6:4, o chloroformas išgarinamas pučiant į buteliuką azoto dujas (apie 30 min). Chloroformui išgaravus ant buteliuko sienelių lieka balkšvos spalvos lipidų plėvelės. Į buteliuką pilama tiek buferio (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, pH 4,6), kad bendra lipidų koncentracija buferyje būtų 1 mM (0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio). Automatine pipete buferis pakartotinai stipriai srove įtraukiamas ir išleidžiamas, kad susidarytų homogeniškas balkšvos spalvos tirpalas ir neliktų ant indo sienelių prilipusios lipidinės plėvelės. Fosfolipidinis dvisluoksnis formuojamas užlašinant vezikulių tirpalą ant silanizuoto FTO paviršiaus. Vykdamas α-hemolizino poveikio membranai tyrimus elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu, prieš

2.5. Greitosios Fourier transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopijos (FFT-EIS) tyrimai

2.5.1. Tirpalai

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai atliekami:

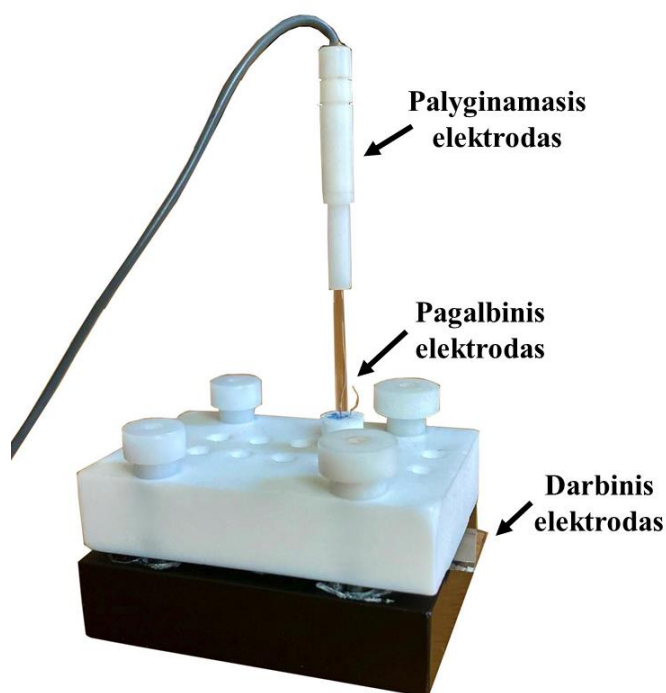
- Tiriant membranų formavimosi kinetiką – vezikulių buferiniame tirpale (0,6 mM DOPC, 0,4 mM cholesterolio, PBS 0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, pH 4,6, kaip aprašyta 2.4 skyriuje).
- Tiriant α-hemolizino poveikį membranai –7,1 pH buferiniame tirpale (PBS 0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄).Prieš lašinant α-hemolizino tirpalą į celę, celė (su fosfolipidiniu dvisluoksniu, susiformavusiu ant silanizuotos FTO plokštelės) stipriai srove plaunama buferiniu tirpalu (naudojama 5 mL 7,1 pH buferinio tirpalo), kad būtų nuplauti membranos formavimo metu susidarę fosfolipidų viršsluoksniai. Fosfolipidai, suformavę hidrofobines sąveikas su savitvarčiu monosluoksniu, turėtų nenusiplauti. Plovimas svarbus užtikrinti, kad ant paviršiaus turime fosfolipidų dvisluoksnį (o ne storesnį sluoksnį) ir kad sistema būtų stabili.
- Tyrimams α-hemolizinas iš Staphylococcus aureus (Sigma-Aldrich, Vokietija), praskiestas iki 2,72 μM koncentracijos buferiniu tirpalu (7,1 pH).

2.5.2. Celė, elektrodai ir aparatūra

FFT-EIS matavimai buvo atlikti EIS-128/16 impedanso spektrometru. Matavimai atlikti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). Tyrimams naudota iš teflono pagaminta celė, kurios nuotrauka pateikta pav. 11. Celę sudaro 12 šulinėlių (tyrimams naudoti 8). Celėje yra gaminiai žiedeliai, užtikrinantys celės hermetiškumą. Prieš naudojimą celė ir guminiai žiedeliai plaunami ultragarsinėje vonelėje, naudojant 2% „Micro – 90“ ploviklį, propanolį ir distiliuotą vandenį (kiekvieniu plovikliu plaunama 8 min., tarp plovimų plovikliai nuplaunami distiliuotu vandeniu).

Matavimai atlikti naudojant trijų elektrodų sistemą, kurią sudaro:

- Darbinis elektrodas: silanizuota FTO plokštelė (FTO|SAM) arba silanizuota FTO plokštelė su fosfolipidiniu dvisluoksniu (tBLM).
- Palyginamasis [Ag|AgCl, NaCl_{sat.}] mikroelektrodas (M-401F, Microelectrodes, Bedford, NH).
- Pagalbinis elektrodas: 0,25 nm platinos viela (99,99 % puriss p.a.), apvyniota aplink palyginamąjį elektrodą



Pav. 11. Darbo metu naudota elektrocheminė sistema.

2.6. Kontaktinių kampų matavimas

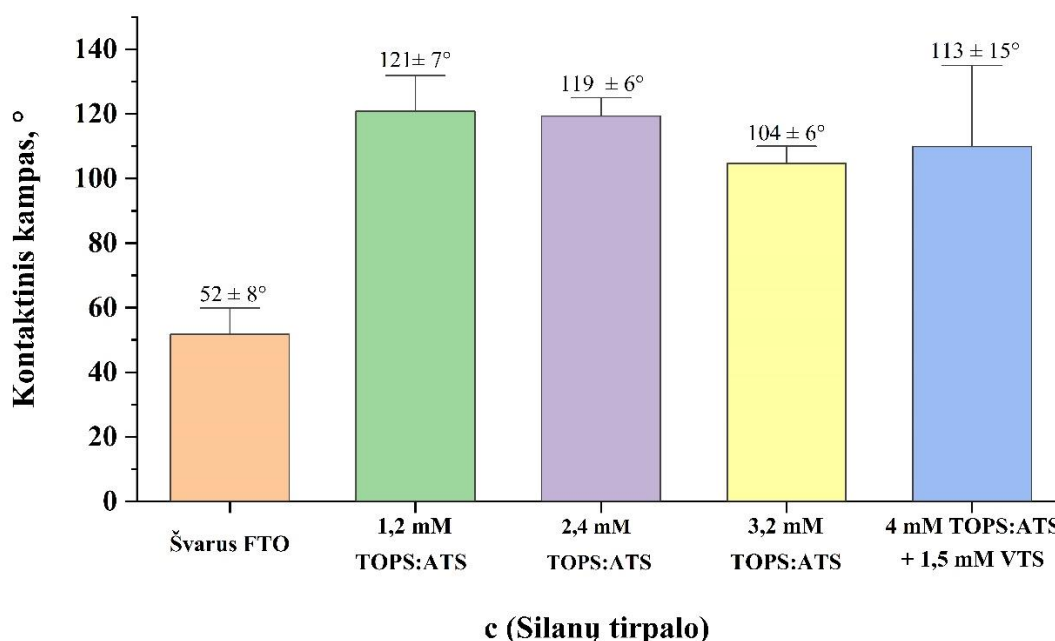
Paviršiaus hidrofobiškumas įvertintas naudojant Theta Lite optinį tensiometrą iš Biolin Scientific (Švedija). Dešimt 5 μ L tūrio distiliuoto vandens lašų padėta skirtingose silanizuotos FTO plokštelės paviršiaus vietose, o gauti rezultatai suvidurkinti.

3. REZULTATAI

3.1. Silanizavimui naudoto tirpalo koncentracijos ir sudėties įtaka gautam FTO|SAM

Šio tyrimo metu, silanizuojant FTO bandyta naudoti kelias skirtingas alkilsilanų sudėtis ir koncentracijas, siekiant gauti fosfolipidinius dvisluoksnius, į kuriuos įsiterptų α -hemolizinas. Svarbu, kad α -hemolizino veikimo mastas (pokyčiai, fiksuojami EIS dėl α -hemolizino formuojamų porų fosfolipidiniame dvisluoksnyje), būtų kuo didesnis, kadangi tai leistų sukurti jautresnį α -hemolizino biologinį jutiklį. Šiame poskyryje aptariama alkilsilanų, naudotų FTO silanizavimui, koncentracijos ir sudėties įtaka gauto savitavarkio monosluoksni savybėms. |

Šio tyrimo metu, stiklas|FTO plokštelė silanizuota naudojant tris skirtingas ekvimoliarinio TOPS ir ATS (TOPS:ATS) silanų mišinio koncentracijas – 1,2 mM, 2,4 mM ir 3,2 mM, bei 1,2 mM TOPS:ATS ir 1,5 mM VTS (viniltrichlorosilano) mišinį. Pav. 12. pateiktos paviršiaus kontaktinių kampų vertės, gautos silanizavimo metu naudojant skirtingas TOPS:ATS koncentracijas bei naudojant TOPS:ATS ir VTS mišinį. Žinoma, kad paviršiaus kontaktinių kampų vertės tiesiogiai proporcingos paviršiaus hidrofobiškumui. Ryškus kontaktinio kampo padidėjimas (nuo $52 \pm 8^\circ$ nesilanizuoto FTO atveju iki vidutiniškai $>100^\circ$ silanizuotam FTO) įrodo sėkmingą hidrofobinėmis savybėmis pasižymintio alkilsilanų sluoksni susiformavimą hidrofiliškoms savybėmis pasižymintio FTO paviršiuje. Nors tikėtasi, kad naudojant didesnę TOPS koncentraciją ant sFTO bus gautas tankesnis SAM, pasižymintis didesniu hidrofobiškumu, kontaktinio kampo matavimai parodė, jog vykdant silanizavimą metodinėje dalyje pateiktomis sąlygomis, SAM tankumas mažėja didėjant silanizavimui naudoto TOPS koncentracijai. Siekiant gauti retesnę SAM, į silanizavimo mišinį, susidedantį iš 1,2 mM TOPS:ATS toluene, papildomai pridėta 1,5 mM trumpagrاندžio silano VTS. Papildomo skiediklio pridėjimas leido suformuoti hidrofiliškesnį paviršių ($112 \pm 12^\circ$ su VTS ir $121 \pm 9^\circ$ be VTS esant tai pačiai TOPS:ATS koncentracijai), bet skiediklio įtaka SAM tankumui buvo pakankamai nežymi, o gautų rezultatų sklaida naudojant trijų, o ne dviejų alkilsilanų mišinį, išaugo.



Pav. 12. Kontaktinių kampų priklausomybė nuo silanizavimui naudotų TOPS ir VTS koncentracijų.

FTO silanizavus 3,2 mM TOPS:ATS gauta sistema, pasižyminti rečiausiai ir pakankamai homogeniškais (mažiausia kontaktinio kampo verčių sklaida pasižymintiais) savitavarkiais

monosluoksniais. Vengta formuoti pernelyg tankius SAM, kadangi per didelis SAM tankumas lemia sumažėjusią membranos fluidiškumą, dėl ko α -hemolizinas turėtų prastai įsiskverbti į membraną, o net α -hemoliziniui įsiskverbti, mažas membranos fluidiškumas gali trukdyti α -hemolizino monomerams judėti SAM paviršiuje ir suformuoti poras, kadangi vienai porai sudaryti reikia septynių α -hemolizino monomerų [34, 35]. Žinoma, kad optimalios silanizuoto aukso substrato paviršiaus kontaktinių kampų vertės lygios 95° [66]. Taigi, toliau pasirinkta tirti sistemą, gautą FTO silanizavus 3,2 mM TOPS:ATS.

3.1.1. Ant paviršiaus imobilizuoto savitvarkio monosluoksnio charakterizavimas EIS

Toliau, savitvarkio monosluoksnio savybėms tirti pasitelkta EIS. Kompleksinės talpos koordinatėse vaizduojama kompleksinės talpos realios dalies (C_{Re}) priklausomybė nuo kompleksinės talpos menamos dalies (C_{Im}). Atitinkamai, reali ir menama dalys skaičiuojamos pagal formules:

$$C_{Re} = \frac{Z_{Im}}{\omega|Z|^2} \quad (22)$$

$$C_{Im} = \frac{Z_{Re}}{\omega|Z|^2} \quad (23)$$

Sistemą, kurią sudaro ant laidaus paviršiaus imobilizuotas dielektriko (SAM) sluoksnis, galima pavaizduoti naudojant ekvivalentinę schemą, kurioje nesukompensuota (tirpalo) varža nuosekliai sujungta su kondensatoriumi. Tuo tarpu kondensatoriaus talpa susideda iš substrato ir savitvarkio monosluoksnio talpų. Šių nuosekliai sujungtų talpų sudėtį galima išreikšti per formulę:

$$\frac{1}{C_{bendra}} = \frac{1}{C_{FTO}} + \frac{1}{C_{SAM}} \quad (24)$$

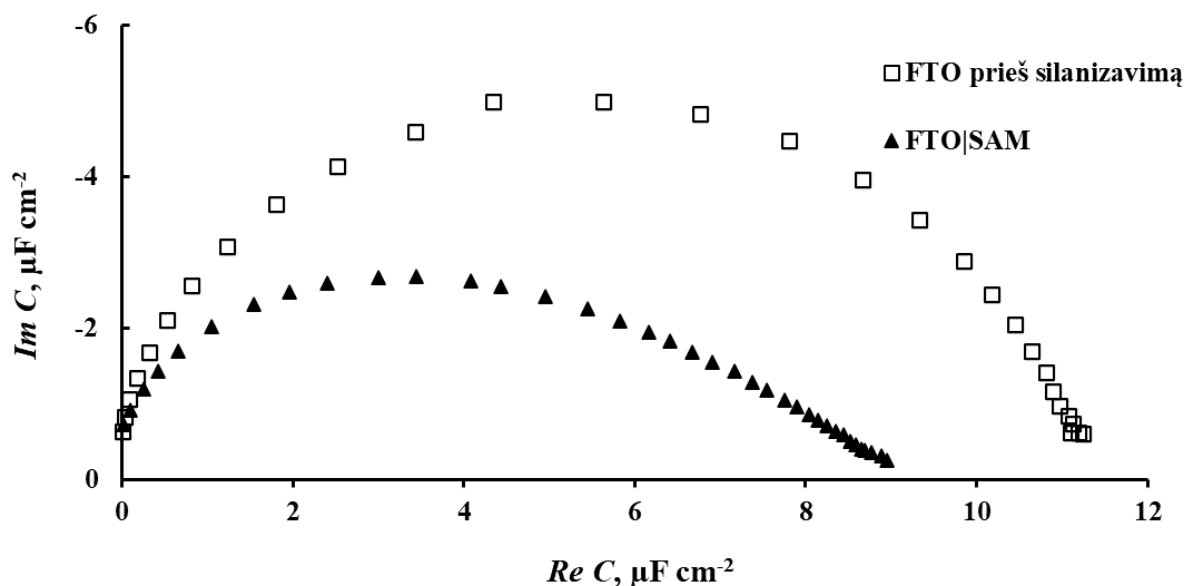
Čia C_{bendra} – silanizuoto FTO talpa, C_{FTO} – talpa, susidaranti FTO ir PBS sąlyčio riboje dėl fizikinės PBS molekulių adsorocijos, C_{SAM} – talpa, atsirandanti dėl izoliacinėmis savybėmis pasižymintio alkilsilanų sluoksnio FTO paviršiuje jį silanizavus.

Atitinkamai plokščio kondensatoriaus talpa tiesiogiai proporcinga dielektrinei skvarbai ir atvirkščiai proporcinga kondensatoriaus (šiuo atveju, SAM arba FTO sluoksnių) storiui:

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_0}{d} \quad (25)$$

Čia ϵ – dielektrinė skvarba (SAM arba FTO), ϵ_0 – dielektrinė skvarba vakuume, d – kondensatoriaus storis.

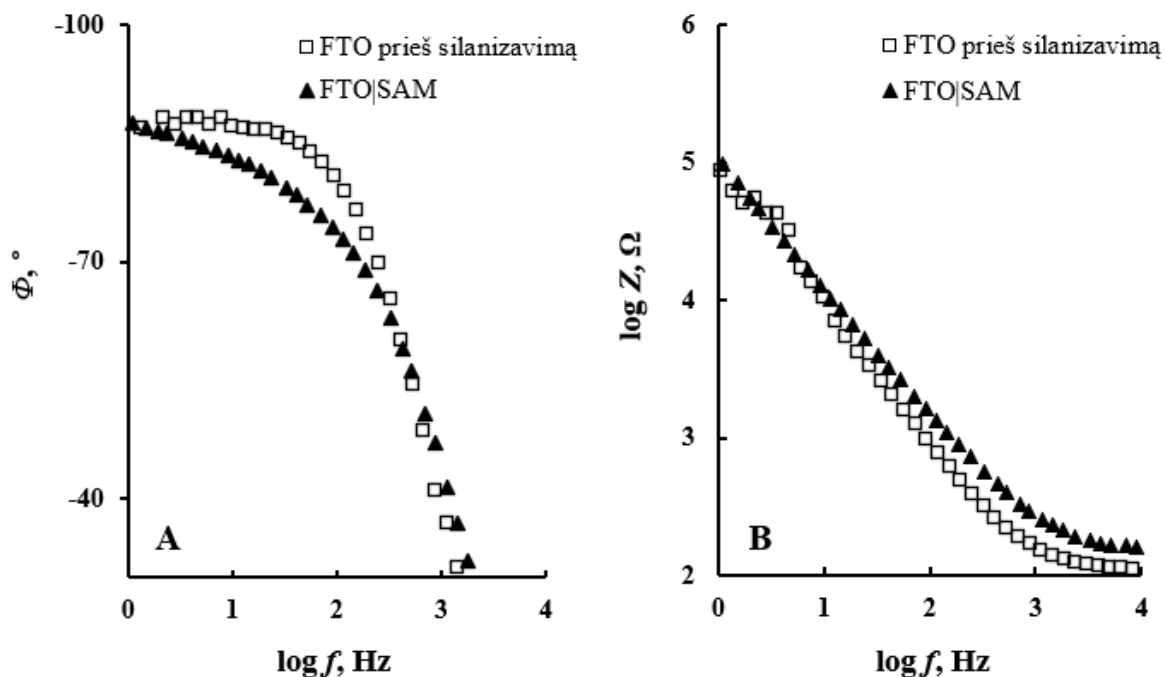
$C_{SAM} > C_{FTO}$, kadangi silanų sluoksnis pasižymi didesne dielektrine svarba. Taigi, silanizavus stiklas|FTO stebimas ryškus talpos sumažėjimas (pav. 13).



Pav. 13. Švaraus (\square) ir silanizuoto FTO (\blacktriangle) paviršiaus elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, KCl_{sat.}) kintamosios srovės dažnių intervale 0,2 Hz-10 kHz. Silanizavimas vykdytas naudojant 3,2 mM TOPS:ATS mišinį toluene. EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1).

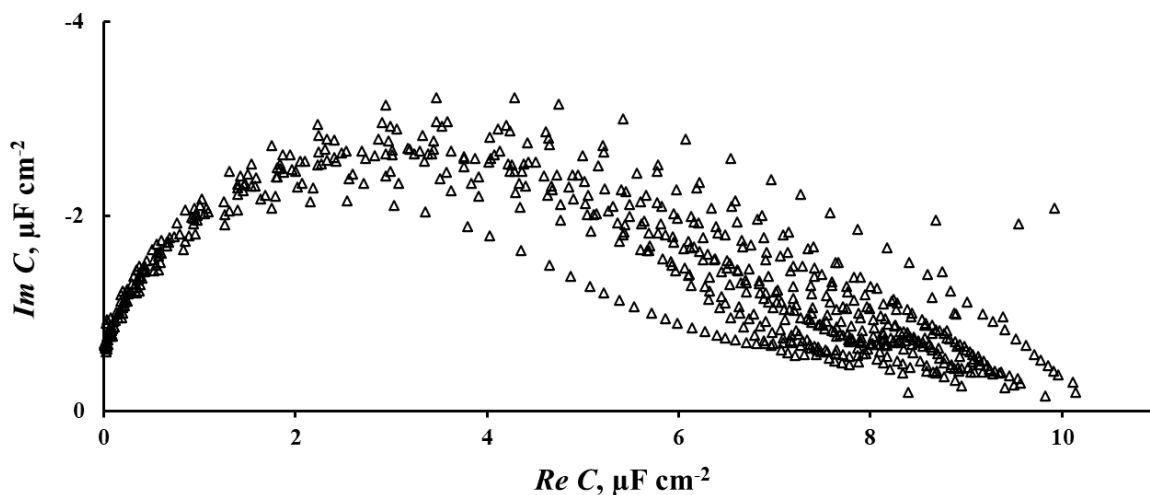
Pav. 13 pavaizduotų spektrų (ypač silanizuoto FTO atveju) formos neatitinka idealaus pusapskritimio, kurį turėtume stebėti sistemai atitinkant idealų plokščią kondensatorių – matomas menamos talpos sumažėjimas (palyginus su idealiu pusapskritimiu), kuris ryškėja žemų dažnių srityje – dėl ko taip pat gaunama iškreipta pusapskritimio forma. Šį efektą sukelia substrato paviršiaus netolygumai – kaip kad galima matyti iš 23 ir 24 lygčių, kompleksinės talpos reikšmės atvirkščiai proporcingos EIS matavimo metu naudojamam sužadinto dažniui. Mažų dažnių srityje (kada kintamos srovės skleidimas vyksta ilgesnį laiko tarpą), kintamos srovės sukeltas elektrinis laukas geba prasiskverbti į paviršiuje esančius defektus, dėl krūvio pernašos apribojimų atsiranda papildomos varžos – sumažėja sistemos talpuminės savybės [67]. Pav. 14 pavaizduoti Bode koordinatinių pokyčiai, silanizavus FTO. Tiek nesilanizuoto, tiek silanizuoto FTO dažnio ($\log f$, Hz) priklausomybės nuo fazės ($\arg Z$, laipsniai) spektrai (pav. 14A) pasižymi būdinga talpuminėms sistemoms įprasta zigmoidine forma. Silanizavus FTO, stebimas nežymus fazės reikšmių sumažėjimas. Tuo tarpu dažnio ($\log f$, Hz) priklausomybės nuo impedanso modulio ($\log Z$, Ω) spektre (pav. 14B) silanizavus FTO matomas modulio reikšmės padidėjimas. Bode spektrų pokyčiai tokiose

sistemose nulemti sistemos laidumo sumažėjimo (ir tuo pačiu kintamos varžos, impedanso, padidėjimo) ant FTO imobilizavus hidrofobinėmis savybėmis pasižymintį monosluoksnį.



Pav. 14. Švaraus (\square) ir silanizuoto FTO (\blacktriangle) paviršiaus elektrocheminio impedanso spektrai Bode koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (*vs* Ag|AgCl, NaCl_{sat.}). Silanizavimas vykdytas naudojant 3,2 mM TOPS:ATS tirpalą toluene. EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1).

Naudojant tą pačią silanizavimo procedūrą, stebėta EIS spektrų sklaida. Pav. 15. pateikti FTO|SAM kompleksinės talpos koordinačių spektrai, gauti silanizavimui naudojant 3,2 mM TOPS:ATS. Pastebimą rezultatų sklaidą galima paaiškinti FTO paviršiaus netolygumais – tiek tiesiogiai, t.y., dėl FTO defektų papildomų varžų, atsirandančių žemų dažnių srityje, tiek dėl netolygaus paviršiaus pasidengimo savitvarkiu monosluoksniu. Kaip jau aptarta 2.1.4. skyrelyje, silanizavimo rezultatas ir gauto monosluoksniu tankumas bei tvarkingumas priklauso nuo hidrolizuoto paviršiaus defektų inicijavimo centrų, kurie paviršiuje gali būti išsidėstę netolygiai. Taip pat, ir nuo molekulinų inkarų išsidėstymo geometrijos, kuri priklauso tiek nuo alkilsilanų tarpusavio sąveikos, tiek nuo substrato defektų. Visgi, pusapskritimo diametras menamos talpos koordinatėse gali būti naudojamas apytiksliai kompleksinės talpos įvertinimui. Silanizavimui naudojant 3,2 mM TOPS:ATS, gauto FTO|SAM dvigubo elektrinio slauksnio talpa lygi $5,2 \pm 0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$. Palyginus su švaraus FTO dvigubo elektrinio slauksnio talpa (kuri lygi apie $11,3 \pm 0,4 \mu\text{F cm}^{-2}$), dvigubo elektrinio slauksnio talpa sumažėja daugiau nei perpus. Apibendrinant galima teigti, kad modifikuojant FTO 3,2 mM TOPS:ATS silanų mišiniu, gaunamas stabilus kompleksinės talpos sumažėjimas, kas, lygiagrečiai su stebėtu paviršiaus kontaktinio kampo padidėjimu įrodo dielektrinėmis savybėmis pasižymintį savitvarčio monosluoksniu susiformavimą ant FTO paviršiaus.



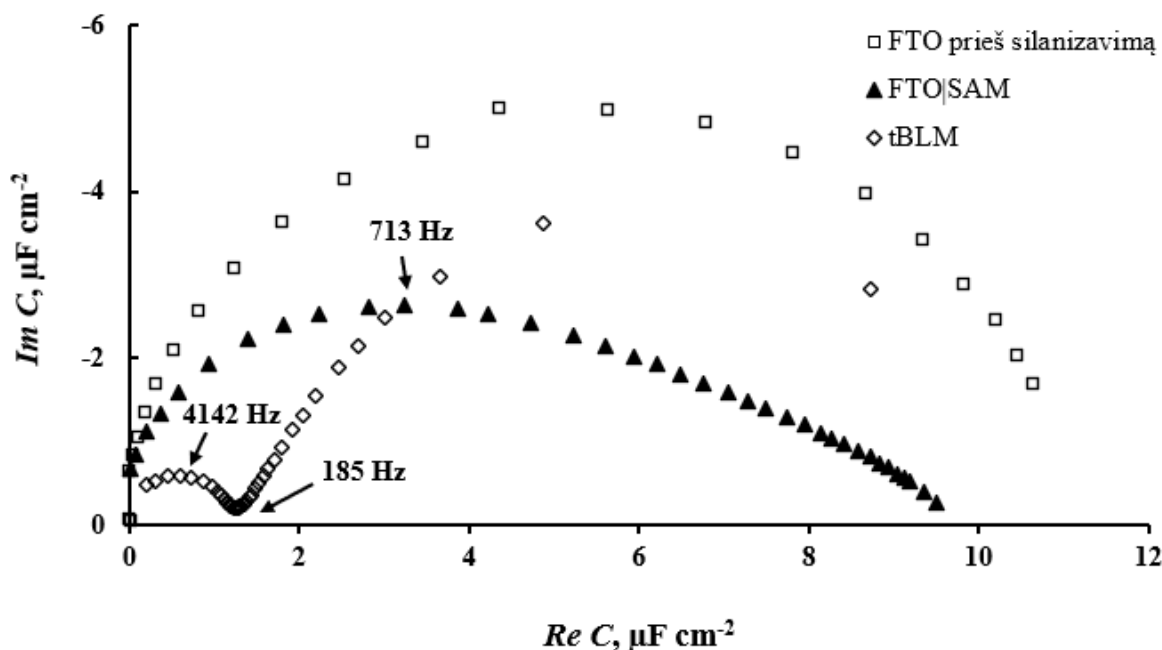
Pav. 15. FTO|SAM elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). Silanizavimas vykdytas naudojant 3,2 mM TOPS:ATS tirpalą toluene. EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1).

3.2. Ant stiklas|FTO|SAM imobilizuoto fosfolipidinio dvisluoksnio charakterizavimas EIS

Ant silanizuoto FTO paviršiaus imobilizavus fosfolipidinį dvisluoksnį, sistemos talpa išreiškiama:

$$\frac{1}{C_{bendra}} = \frac{1}{C_{FTO}} + \frac{1}{C_{SAM}} + \frac{1}{C_m} \quad (26)$$

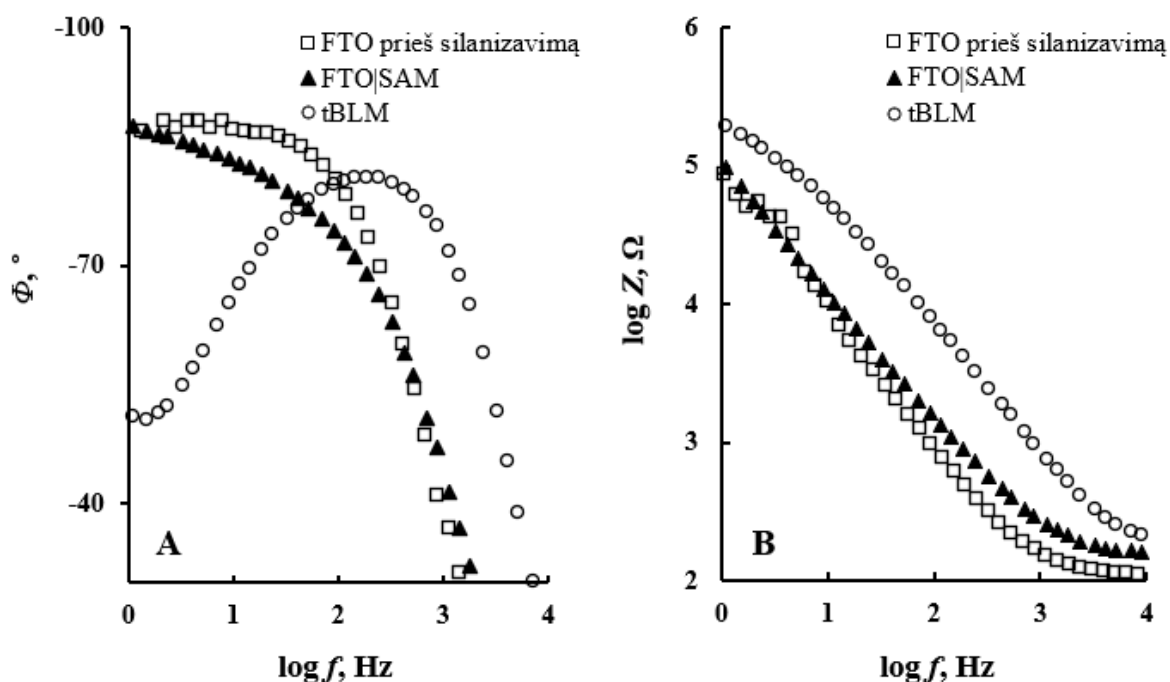
Čia C_m – fosfolipidinio dvisluoksnio dvigubo elektrinio sluoksnio talpa.



Pav. 16. Nesilanizuoto FTO (□), FTO|SAM (▲) ir tBLM (◊) elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}).

Kaip matoma iš pav. 16, dialektrinėmis savybėmis pasižyminčio fosfolipidinio dvisluoksnio imobilizavimas sukelia dar ryškesnį pusapskritimio sumažėjimą kompleksinės talpos koordinatėse ($C_m > C_{SAM} > C_{FTO}$). Po valandos nuo vezikulių, sudarytų iš 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio liejimo, gauta tBLM dvigubo elektrinio sluoksnio talpa lygi $1,2 \pm 0,2 \mu\text{F cm}^{-2}$. Pav. 16. pavaizduoti tipiniai kompleksinės talpos spektrai, gauti matuojant švaraus FTO, FTO|SAM ir tBLM impedansą. Be jau aptarto pusapskritimio suplokštėjimo menamos talpos koordinatėse, stebimas kitas sistemos defektiškumą nusakantis požymis – žemų dažnių srityje atsirandanti „uodega“ – baigus formuoti pusapskritimiu, menama talpa ima didėti [68]. „Uodega“ atsiranda dėl natūralių membranos defektų – žemų dažnių srityje kintamos srovės sukeltas elektrinis laukas prasiskverbia pro natūralius membranos defektus ir kompleksinė talpa ima didėti – žemų dažnių srityje sistema elgiasi panašiai kaip FTO|SAM, o šio efekto mastas (t.y. „uodegos“ ilgis) proporcingas membranos defektiškumui [69].

Pav. 17. Pavaizduoti tipiški Bode koordinačių spektrai, gauti po valandos nuo vezikulių užliejimo ant silanizuoto substrato. Šie spektrai palyginti su nesilanizuoto ir silanizuoto FTO Bode spektrais. Dažnio ($\log f$, Hz) priklausomybės nuo impedanso modulio ($\log Z$, Ω) spektre (pav. 18B) matomas dar didesnis modulio reikšmės padidėjimas, nei stebėtas silanizavus FTO, kadangi fosfolipidinis dvisluoksnis pasižymi geresnėmis izoliacinėmis savybėmis nei FTO FTO|SAM. Vienas ryškiausių EIS spektrų pokyčių ant FTO|SAM suformavus fosfolipidinį dvisluoksnį – tBLM charakteringo fazės minimumo žemų dažnių srityje susiformavimas Bode koordinatėse (pav. 17A).



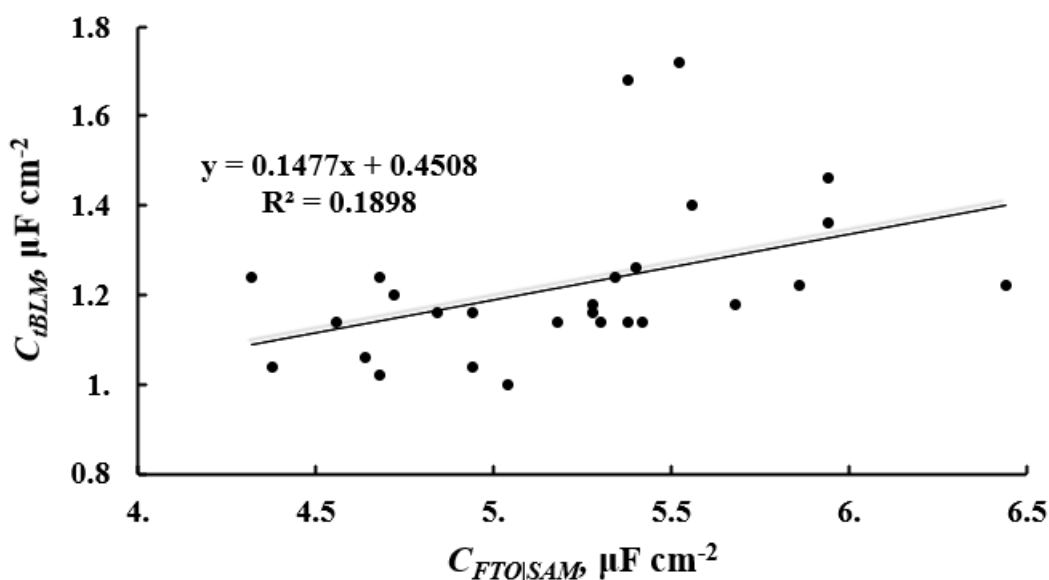
Pav. 17. Nesilanizuoto FTO (\square), FTO|SAM (\blacktriangle) ir tBLM (\circ) elektrocheminio impedanso spektrai Bode koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, KCl_{sot.}). tBLM spektrai matuoti 1 h po vezikulių liejimo. Fosfolipidiniam dvisluoksniiui formuoti naudotas vezikulių tirpalas (60 % DOPC, 40 % Chol., 4,6 pH PBS). EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1).

Žinoma, kad dažnis, kuriame stebimas šis minimumas, yra tiesiogiai proporcingas membranoje esančių defektų skaičiui ir atvirkščiai proporcingas pomembraninio vandens rezervuaro specifinei varžai ρ_{sub} :

$$N_{def} = \frac{\log f_{min}}{\rho_{sub}} \quad (27)$$

Ši priklausomybė leidžia palyginti suformuotų membranų defektiškumą. Tiesa, rezultatų interpretavimo neapibrėžtumas gali iškilti, kai tiek defektų skaičius, ties pomembraninio rezervuaro specifinė varža nėra žinomos – negalima vienareikšmiškai pasakyti, ar skirtingomis $\log f_{min}$ reikšmėmis pasižyminčios tBLM skiriasi fosfolipidiniame dvisluoksnyje natūraliai susiformavusių defektų skaičiumi, ar pomembraninio rezervuaro savybėmis. Tikėtina, kad net tokiomis pačiomis sąlygomis suformuotos tBLM skiriasi tiek defektų skaičiumi, tiek pomembraninio rezervuaro savybėmis. To priežastis yra substrato defektiškumas ir ant defektiško substrato susiformavusio SAM heterogeniškumas bei stochastiška vezikulių liejimosi ant silanizuoto substrato prigimtis. Silanizavimui naudojant 3,2 mM TOPS:ATS ir tolueno tirpalą, ir ant gauto FTO|SAM liejant vezikules, sudarytas iš 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio, (PBS pH 4,6) suformuotų tBLM $\log f_{min}$ reikšmės svyruoja tarp -0,05 ir 1,22 (23 matavimų serijoje vidurkis lygus $0,31 \pm 0,39$). Koreliacijos tarp gautų $\log f_{min}$ reikšmių bei SAM savybių (iš kompleksinės talpos spektrų įvertinamos FTO|SAM dvigubo elektrinio sluoksnio talpos, kokybinių SAM heterogeniškumą atspindinčių kompleksinės talpos koordinatėse stebimo pusapskritimio formos įvertinimo) nerasta. Koreliacijos nebuvimas leidžia manyti, jog Bode koordinatėse stebimo tBLM fazės minimumo sklaidos priežastys yra daugialypės – nulemtos tiek skirtingo membranų defektiškumo, tiek skirtingų pomembraninio sluoksnio savybių.

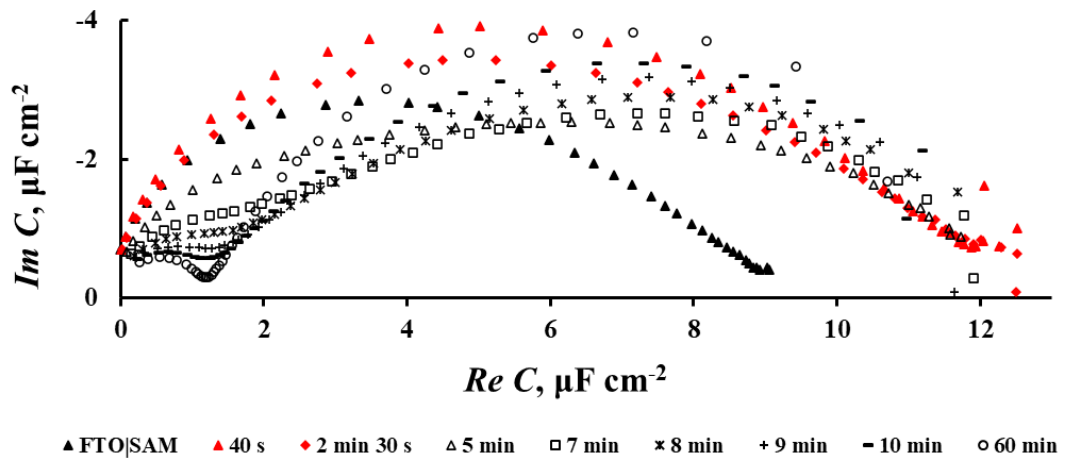
Pav. 18 pavaizduota silanizuoto paviršiaus dvigubo elektrinio sluoksnio talpos priklausomybė nuo talpos, gautos ant paviršiaus suformavus fosfolipidinį dvisluosknį. Tikėtina, kad nepriklausomai nuo silanizuoto paviršiaus kompleksinės talpos, užliejamas fosfolipidinis dvisluoksnis turėtų pasižymėti tomis pačiomis elektrinėmis savybėmis, t. y. kiekvieną kartą bus gaunama vienodos talpos tBLM. Visgi, gauta nežymi tiesinė koreliacija ($R^2 = 0,1898$). Galima teigti, kad ant mažesnę dvigubo sluoksnio talpą turinčio (t.y., tankesnio savitvarkio monosluoksnio) tikėtina gauti tankesnį fosfolipidinį dvisluosknį. Ši koreliacija galimai susijusi su tuo, kad retesnis SAM dažnai būna heterogeniškesnis nei tankesnis SAM. Ant heterogeniško SAM labiau tikėtina gauti membranas, pasižyminčias prastesnėmis talpuminėmis savybėmis. Vis dėlto, tikėtina, kad rezultatų sklaidai daugiau įtakos daro kiti, jau aptarti faktoriai, t.y. sistemos heterogeniškumas, o vykdant silanizavimą ir membranos formavimą vienodomis sąlygomis, tikėtina gauti $1,2 \pm 0,2 \mu\text{F cm}^{-2}$ dvigubo elektrinio sluoksnio talpa pasižyminčias membranas.



18 pav. FTO|SAM dvigubo elektrinio sluoksnio talpos priklausomybė nuo tBLM dvigubo elektrinio sluoksnio talpos, gautos ant atitinkamo FTO|SAM užliejus membraną (60 % DOPC, 40 % Chol.). EIS spektrai matuoti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sat.}). tBLM spektrai fiksuoti po valandos nuo membranos liejimo pradžios. Dvigubo elektrinio sluoksnio talpos įvertintos pagal pusapskritinio diametrą menamos talpos koordinatėse. Matavimai atlikti PBS pH 7,1.

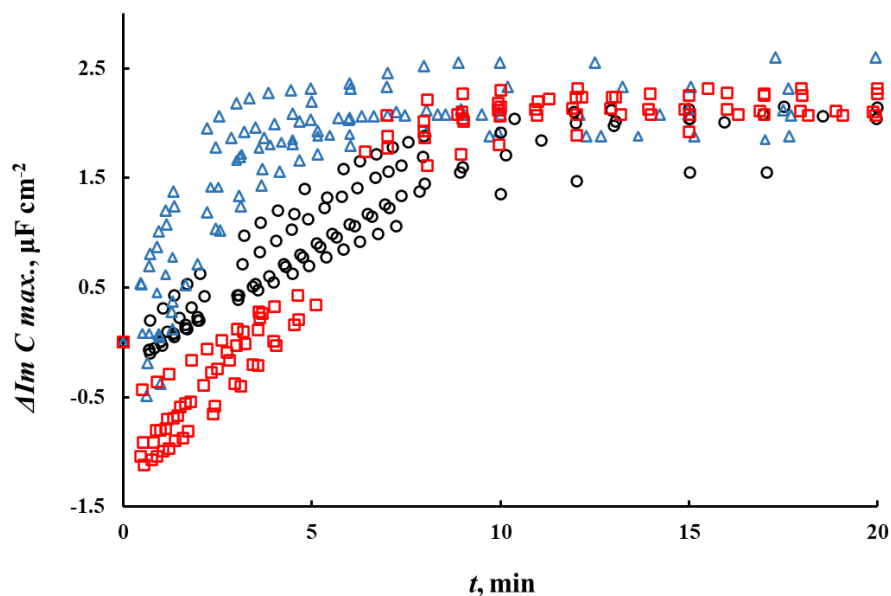
3.3. Fosfolipidinių dvisluoksnių formavimosi ant silanizuotų paviršių kinetika EIS kompleksinės talpos koordinatėse

EIS spektrų pokyčiai laike formuojantis membranai, gali suteikti daug informacijos apie membranos formavimosi procesą. FFT-EIS leidžia matuoti spektrus ypač greitai (0,2 Hz - 10 kHz intervale spektras matuojamas ~15 sekundžių), tad galima fiksuoti sistemos pokyčius, vykstančius pirmomis membranos formavimosi minutėmis. Kompleksinės talpos koordinatėse stebimi pokyčiai formuojantis membranai pateiki pav. 19. Pirmomis minutėmis (dažniausiai iki 1–2 min), stebėtas laikinas kompleksinės talpos padidėjimas, po kurio kompleksinės talpos vėl ima mažėti. Tai galima paašškinti netvarkinga savitvarkio monosluoksnio struktūra – dalis silanų molekulių yra „sugriuvusios“ (žr. 5 pav.). Vezikulėms priartėjus prie SAM bet dar neplyšus, „sugriuvę“ silanai „pakyla“ dėl hidrofobinės sąveikos su vezikulėmis, dėl ko „atsiveria“ nesilanizuoto, didesniu laidumu nei SAM pasižymintis FTO plotas – tai pagerina elektronų pernašą ir dvigubo elektrinio sluoksnio talpa padidėja (Pav. 19. FTO|SAM spektrą. plg. su 40 s ir 2 min 30 s spektrais, pažymėtais raudonais pilnaviduriais simboliais).



Pav. 19. Membranos formavimosi ir silanizuoto substrato kinetikos pavyzdys – elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, gauti matuojant stiklas|FTO|SAM be vezikulių (SAM), bei skirtingais laikais po vezikulių užliejimo. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). Matavimai atlikti vezikulių tirpale (60 % DOPC, 40 % Chol., 4,6 pH PBS).

Formuojantis fosfolipidiniam dvisluoksniui, kompleksinės talpos ima mažėti. Pav. 20 pateiktos kompleksinės talpos koordinatėse stebimo pusapskritimio skersmens (menamos talpos skalėje) kitimas laike.

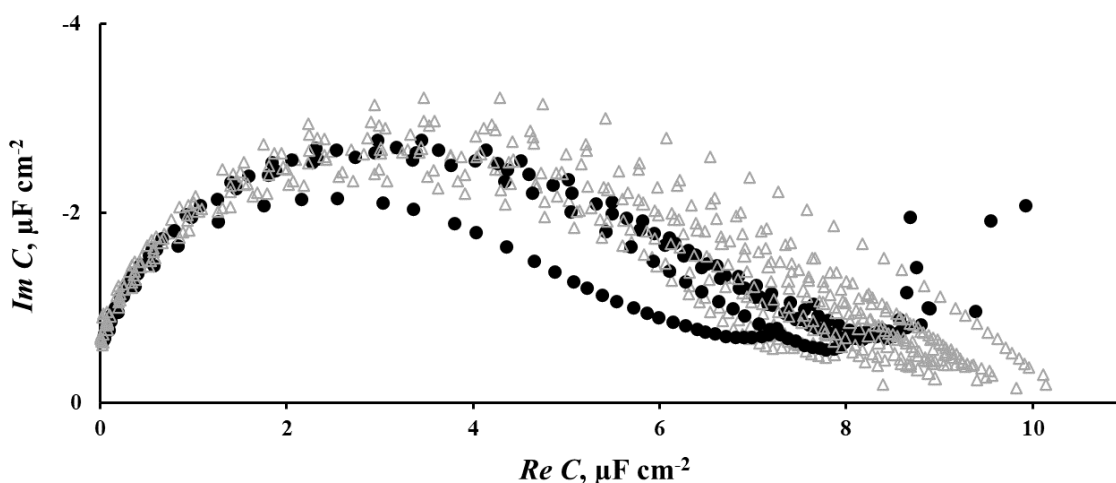


Pav. 20. EIS spektrų kompleksinės talpos koordinatėse gauto pusapskritimio skersmens (menamos talpos ašyje) kitimas laike besiformuojant membranai (60 % DOPC, 40 % Chol.) ant FTO|TOPS. Atidėtas skersmens pokytis nuo FTO|SAM matavimo metu gautos vertės. Elektrocheminio impedanso spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}).

Pastovi pusapskritimio menamos dalies skersmens vertė nusistovi per 20 min arba greičiau, nors pradinė pusapskritimio evoliucijos kinetika reikšmingai skiriasi. Visgi, galima atskirti trijų skirtingų pobūdžių kinetiką:

- 1) \triangle simboliais pažymėtos priklausomybės – pasižymi greičiausiu kompleksinės talpos pokyčiu, spektrai įgauna pastovias reikšmes greitai (per 9 ± 2 min), kompleksinės talpos išaugimo pirmomis minutėmis arba nėra, arba jis labai trumpas (kompleksinės talpos reikšmės didesnės nei FTO|SAM tik iki 1-os minutės nuo vezikulių liejimo pradžios.
- 2) \circ simboliais pažymėtos priklausomybės – pasižymi lėčiausiu kompleksinės talpos pokyčiu, įgauna pastovias reikšmes lėčiausiai (per 19 ± 2 min), kompleksinės talpos reikšmės didesnės nei FTO|SAM 1-2 min nuo vezikulių liejimo pradžios
- 3) \square simboliais pažymėtos priklausomybės – kompleksinės talpos pokyčio greitis vidutinis (14 ± 3 min), kompleksinės talpos reikšmės didesnės nei FTO|SAM 2,5-4 min nuo vezikulių liejimo pradžios

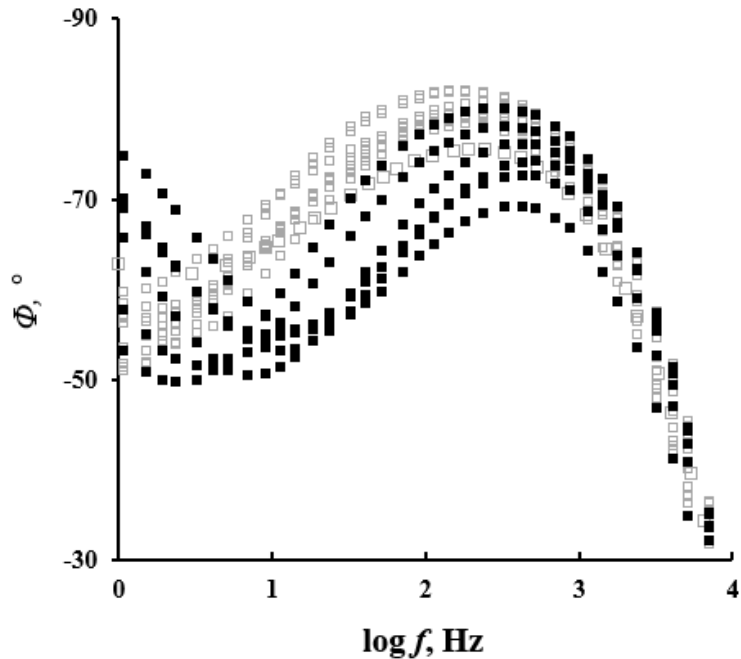
Kaip matome iš pav. 21, 2-u atveju, FTO|SAM spektrai, ant kurių formuotos membranos (atitinkami spektrai taip pat pažymėti \bullet simboliais, kai tuo tarpu kitas kinetines kreives atitinkantys spektrai pažymėti \triangle simboliais), pasižymi, žemų dažnių srityje atsiradusia „uodega“, leidžiančia įvertinti SAM sluoksnį kaip išskirtinai heterogenišką, palyginus su kitais gautais FTO|SAM spektrais.



21 pav. FTO|SAM elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse, nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). tBLM spektrai matuoti 1 h po vezikulių liejimo.

Silanizavimas vykdytas naudojant 3,2 mM TOPS:ATS tirpalą toluene.

3-iu atveju, FTO|SAM spektrai atrodo gana tipiški, bet išsiskiria jau suformuoto tBLM spektrai. Pav. 21. \blacksquare simboliais pažymėti 3-iaame punkte aptarti atvejai, o \square simboliais pažymėti kiti pav. 20 kinetines kreives atitinkantis jau suformuoti tBLM. 3-io atveju jau gauti susiformavusio tBLM Bode spektrai pasižymi išskirtinai didelėmis $\log f$ minimumo reikšmėmis ($\log f_{\min}$ lygus $0,86 \pm$ jau susiformavusiotBLM Bode spektrai pasižymi išskirtinai didelėmis $\log f$ minimumo reikšmėmis ($\log f_{\min}$ lygus $0,86 \pm 0,3$, tuo tarpu $\log f_{\min}$ vidurkis neįtraukiant šių atvejų lygus $0,2 \pm 0,3$).

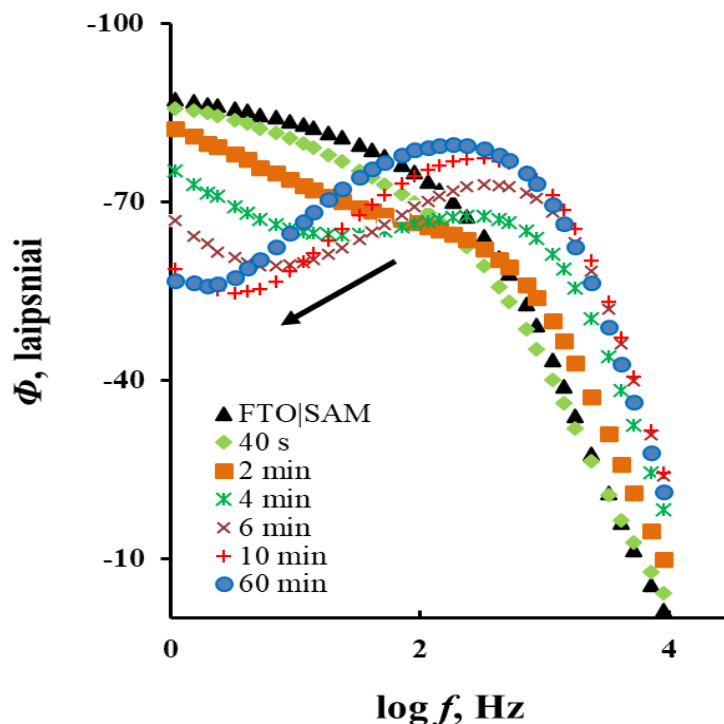


22 pav. Elektrocheminio impedanso spektrai Bode koordinatėse, gauti po 1 h nuo membranų, kurių formavimosi kinetika įvertinta pav. 20., formavimosi pradžios. ■ simboliais pažymėti spektrai, atitinkantys pav. 20 atitinkančias kinetines kreives, □ simboliais pažymėti likusias pav. 20 kinetines kreives atitinkantys suformuotos tBLM Bode spektrai. EIS matavimai atlikti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sat}).

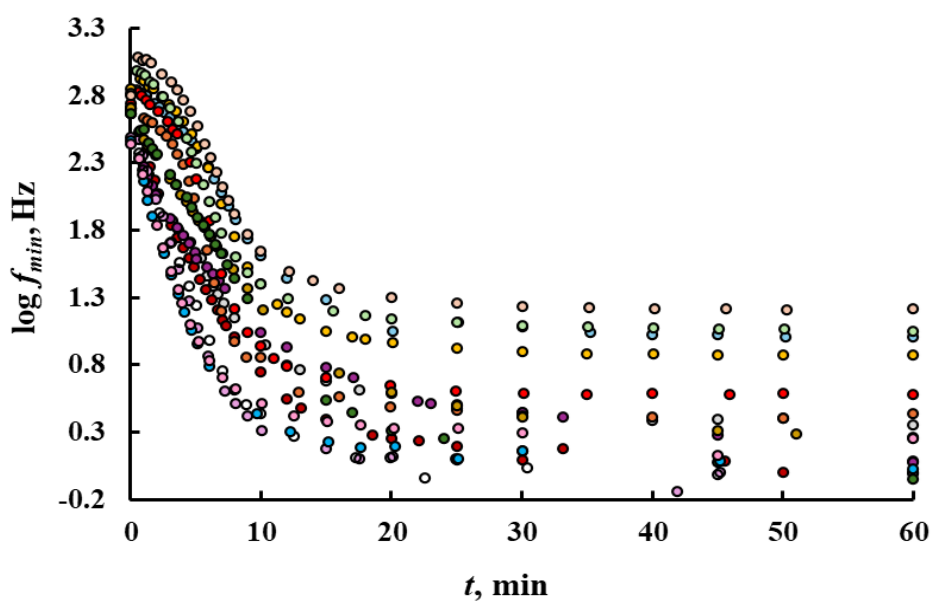
Tikėtina, kad 2-o varianto atveju, vientiso fosfolipidinio dvisluoksniu formavimosi procesą lėtino heterogeniška SAM prigimtis – jei ant FTO susiformavusio savitvarkio monosluoksniu molekulės išsidėsčiusios labai netolygiai, tikėtina, kad paviršius bus sudarytas iš regionų, kuriuose lipidams daugiau ar mažiau energetiškai palanku sudaryti ryšius su alkilsilano molekulėmis. 3-io varianto atveju, pakankamai lėta (palyginus su pirmo varianto atveju) kinetika ir ypač ilgas induktyvumo laikotarpis (t.y. reikalingos 2-4,5 min, kad kompleksinės talpos pusapskritimo skersmuo imtų mažėti) leidžia manyti, jog gautą SAM sudaro daug „sugriuvusių“ molekulių. Toks SAM palankus tiek defektuotai membranai susidaryti (nes, tikėtina, yra heterogeniškas), tiek leidžia daryti hipotezę apie gauto tBLM mažą specifinę varžą, kadangi „sugriuvusiomis“ SAM molekulėmis gausus paviršius, joms sudarant ryšius su DOPC ir cholesteroliu ir „išsitiesiant“, turėtų suteikti daugiau erdvės vandens molekulėms bei buferyje esantiems jonams.

Tipiški Bode spektrai, gauti besiformuojant membranai, pateikti pav. 23. Stebimas tBLM būdingo minimumo susidarymas ir jo slinkimasis link mažesnių $\log f$ reikšmių, kadangi membranai formuojantis ir savitvarkiam monosluoksniui besidengiant fosfolipidiniu dvisluoksniu, defektų mažėja. Bode spektrų pokytis trunka ilgiau nei kompleksinės talpos spektrų, apie 30 min (pav. 24), bet spektrų nusistovėjimo laikas yra pastovus visų tirtų tBLM atveju, nepriklausomai nuo EIS matavimų metu nustatytų skirtingų FTO|SAM ar jau gautų tBLM savybių (pvz. Defektiškumo ar

dvigubo elektrinio sluoksnio talpos). Nustatyta, kad per tokį pat laiką fosfolipidinis dvilsuoksnis susiformuoja ir ant silanizuoto aukso substrato [46].

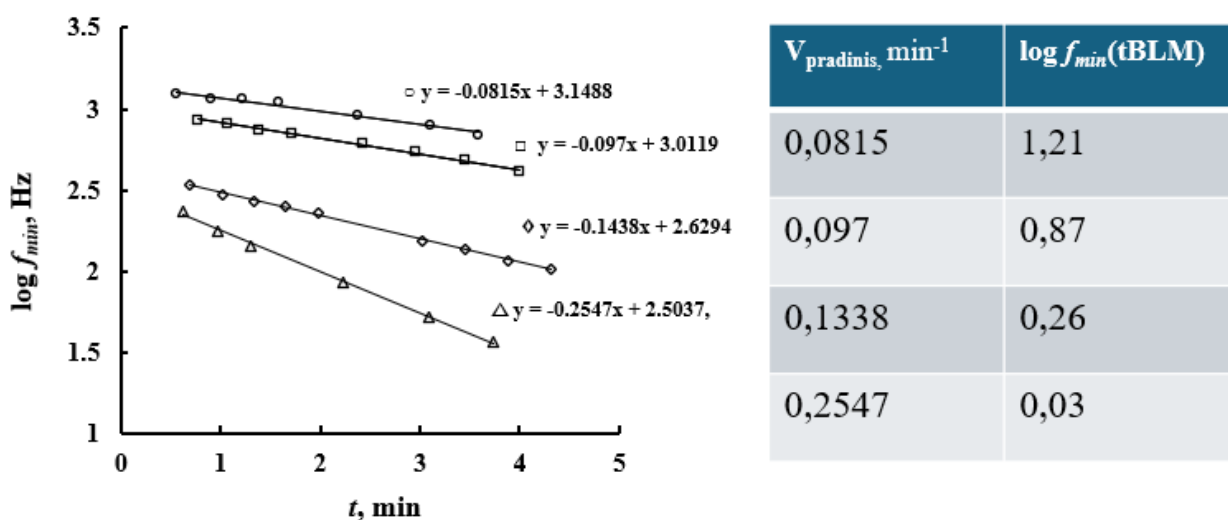


Pav. 23. Membranos formavimosi (vezikulių sudėtis 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio 4,6 pH PBS) ir silanizuoto substrato kinetikos pavyzdys – Bode koordinačių spektrai, gauti matuojant FTO|SAM be vezikulių (SAM), bei skirtingais laikais po vezikulių užliejimo. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). Minimumo padėties kitimo trajektorija pavaizduota rodykle.

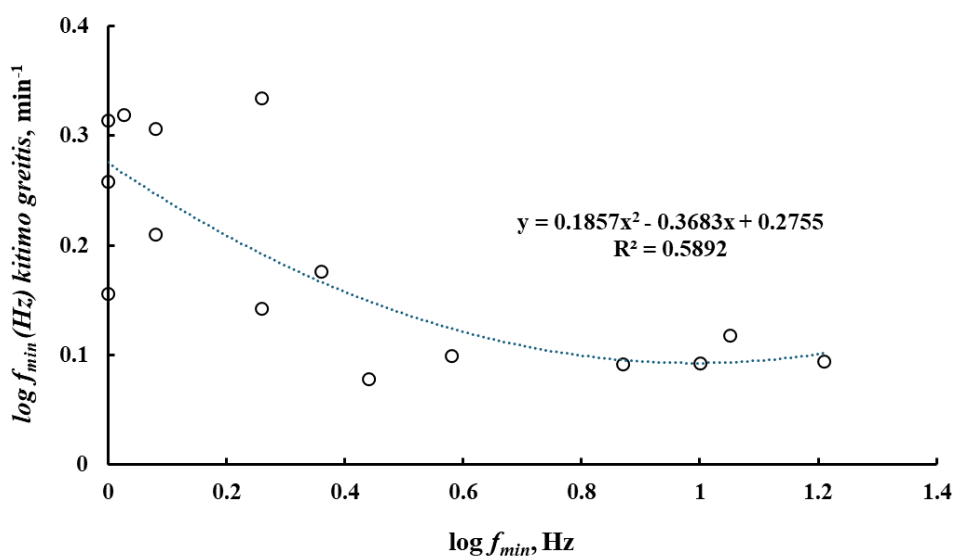


Pav. 24. Bode koordinatėse stebimo fazės minimumo padėties ($\log f_{min}$) kitimas laike besiformuojant membranai ant FTO|TOPS:ATS. EIS matavimai atlikti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, KCl_{sot.}).

Nepaisant to, kad Bode $\log f$ minimumo padėtis nustoja kisti per ~ 30 min visais atvejais, reikšmingai skiriasi pirmų minučių $\log f$ minimo reikšmės kitimo greitis. Tyrimų, kurių metu suformuotos tBLM pasižymi palyginti didele $\log f_{min}$ padėtimi, $\log f_{min}$ kitimo greitis reikšmingai sulėtėjęs. Pav. 25 palyginti 4 membranų formavimosi greičiai pirmomis membranų formavimosi minutėmis, o pav. 26. pavaizduota priklausomybė tarp susiformavusio tBLM (EIS spektras matuotas 60 min nuo membranų formavimo pradžios) $\log f_{min}$ ir tiesės, $\log f_{min}(t)$ pirmomis membranų formavimosi minutėmis nuolinkio kampo. Matome, kad yra neryški koreliacija ($R^2 = 0,5892$) tarp gautos membranų $\log f_{min}$ reikšmės (taigi, tikriausiai ir membranų tankumo ir/arba pomembraninio savitosios varžos) ir membranų formavimosi greičio pirmomis minutėmis.

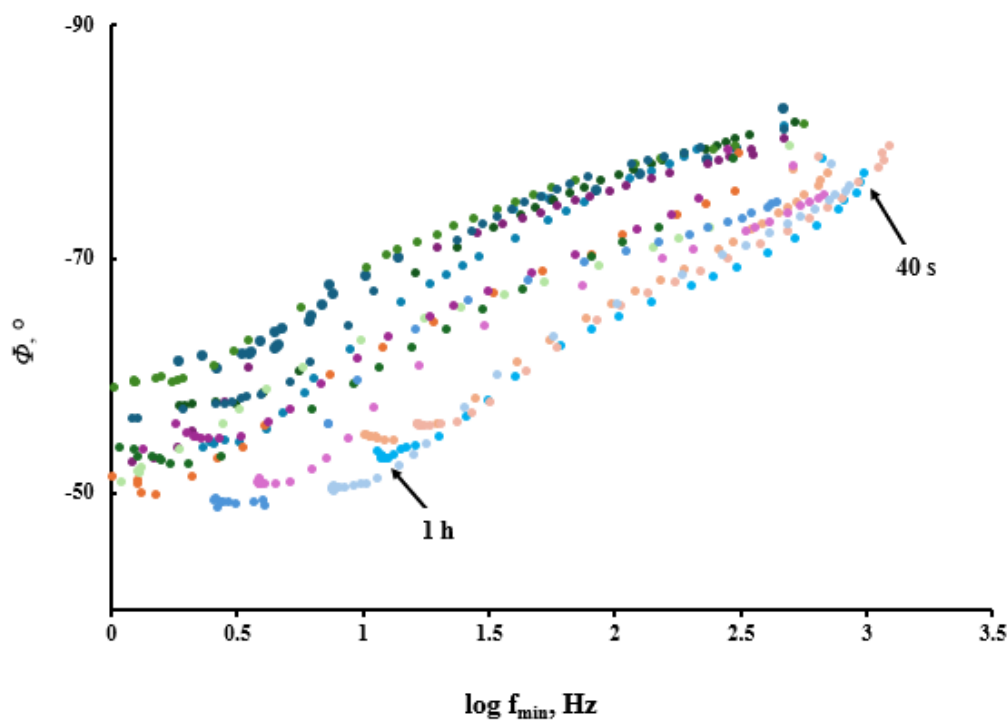


Pav. 25. Pradinio $\log f_{min}$ kitimo greitis ($v_{pradinis}$) pirmomis membranų formavimosi minutėmis (iki 5 min). Lentelėje $v_{pradinis}$ palygintas su $\log f_{min}$ reikšmėmis, gautomis inkubavus tBLM 100 nM α HL 1 h.



Pav. 26. Pradinio $\log f_{min}$ kitimo greičio (iki 5 min) priklausomybė nuo $\log f_{min}$ reikšmės gautos inkubavus tBLM 100 nM α HL 1 h.

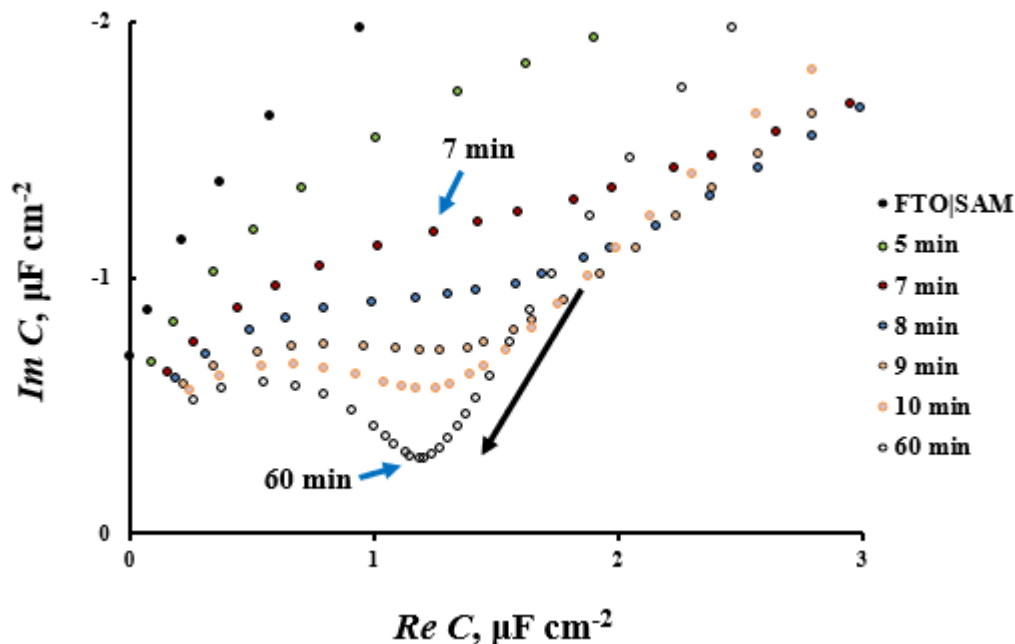
Analizuojant Bode bei kompleksinės talpos koordinatėse pavaizduotų membranos formavimosi elektrocheminio impedanso spektrų judėjimo trajektorijas, galima daryti išvadas apie membranos formavimosi mechanizmą. Teorinė spektrų analizė parodė, kad kokybiniai EIS spektrų parametrai gali būti panaudoti įvertinant defektų pasiskirstymo membranoje heterogeniškumą bei defektų tankį [70, 71]. Jei sistemoje stebimas klasterių formavimasis, minimumas, susiformavęs kompleksinės talpos koordinatėse, pusapskritimio dalis žemų dažnių srityje ir „uodega“ defektų skaičiui didėjant juda „iš šiaurės į rytus“. Tuo pačiu, ir Bode koordinatėse mažuose dažniuose stebimas $\arg Z$ minimumas juda ta pačia trajektorija, „iš šiaurės į rytus“. Priešingu atveju, kai defektų išsidėstymas tolygus, kompleksinės talpos koordinatėse žemų dažnių srityje stebimas judėjimas „iš šiaurės į vakarus“, tuo tarpu Bode spektre minimumas juda paraleliai y ašiai, t.y. „į rytus“ [71]. Vezikulių liejimas gali būti suvokiamas kaip atvirkščias procesas defektų formavimuisi. Taigi, stebimos tos pačios tendencijos, tik atvirkščia kryptimi. Kaip matoma pav. 23 ir pav. 27, jau pirmomis membranos formavimosi sekundėmis, $\arg Z$ minimumas ima judėti „iš šiaurės į vakarus“.o kompleksinės talpos koordinatėse stebimas ryškus ne tik ryškus pusapskritimio mažėjimas žemesnių dažnių srityje stebimas judėjimas „iš šiaurės į vakarus“.



Pav. 27. Membranos formavimosi (vezikulių sudėtis 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio 4,6 pH PBS) ir silanizuoto substrato kinetikos pavyzdys – Bode koordinačių spektrai, gauti matuojant stiklas|FTO|SAM be vezikulių (SAM), bei skirtingais laikais po vezikulių užliejimo. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sat.}). Minimumo padėties kitimo trajektorija pavaizduota rodykle.

Kompleksinės talpos koordinatėse, be pusapskritimio mažėjimo, taip pat stebimas minimo ir žemų danių srityje atsirandančios „uodegos“ slinkimasis „iš šiaurės į vakarus“ (pav. 28). Tokia elektrocheminio impedanso spektrų judėjimo trajektorija formuojantis membranai leidžia manyti, jog membranos formavimosi metu, defektai (t.y. dar fosfolipidiniu dvisluoksniu nepasidengęs FTO|SAM) telkiasi į klasterius – taigi, pirmomis membranos formavimosi momentais, fosfolipidinis dvisluoksnis taip pat susitelkęs į klasterius, kurių membranai formuojantis vis mažėja. Tikėtina, kad

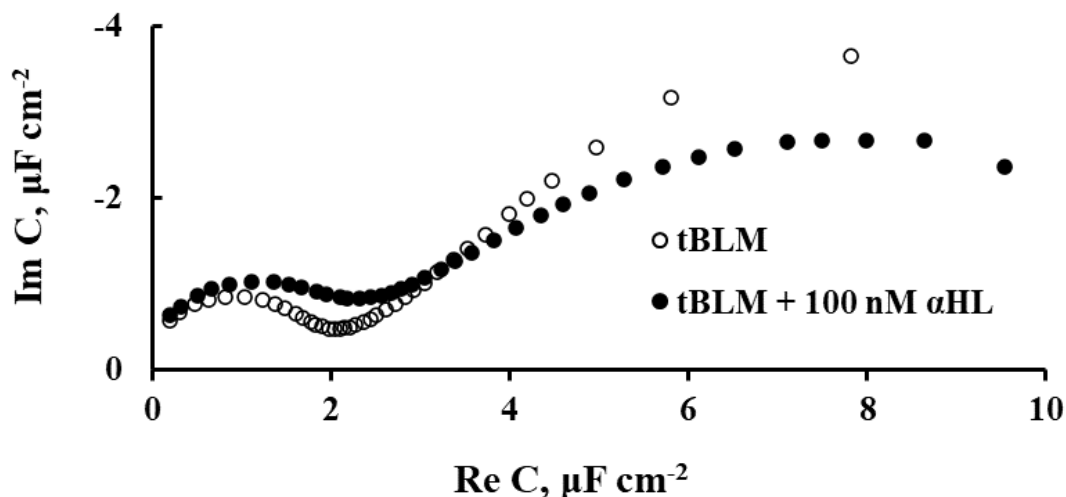
tokiu atveju membranos formavimosi pradžioje susidaro mažai membranos formavimosi centrų, kurie jai formuojantis plečiasi. Tikėtina, kad šie centrų buvimas susijęs su FTO|SAM heterogenišku – fosfolipidinis dvisluoksnis ima formuotis tam energetiškai palankiausiose vietose.



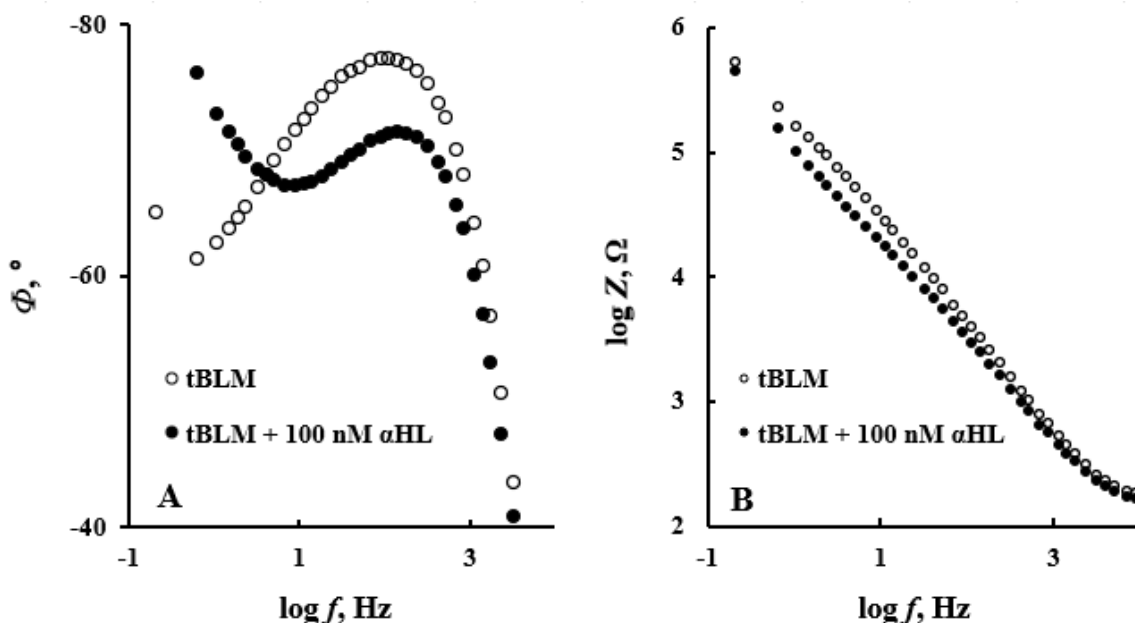
28 pav. Membranos formavimosi (vezikulių sudėtis 0,6 mM DOPC ir 0,4 mM cholesterolio 4,6 pH PBS) ir silanizuoto substrato kinetikos pavyzdys – kompleksinės talpos koordinačių spektrai, gauti matuojant FTO|SAM be vezikulių, bei skirtingais laikais po vezikulių užliejimo. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sot.}). Spektro kitimų trajektorija pavaizduota rodykle.

3.4. Membranos veikimas α -hemolizinu

Žinoma, kad toksinas α -hemolizinas ląstelės membranoje sudaro jonams pralaidžias poras [37, 38, 39, 40, 41, 42]. Tokių porų susidarymas tBLM stebimas naudojant EIS. Šio tyrimo metu tBLM veikta 100 nM α -hemolizino. Tyrimo metu siekta analizuoti kaip α -hemolizino poveikis membranai priklauso nuo pačios membranos savybių, tad fiksuota toksino koncentracija pasirinkta siekiant sumažinti kintamųjų skaičių. Kompleksinės talpos koordinatėse stebimi α -hemolizinu paveiktos membranos pokyčiai. Pav. 29 pavaizduotas tBLM būdingo pusapskritimio didėjimas, kadangi α -hemolizino poros pralaidžios PBS jonams, todėl padidina sistemos laidumą. Pav. 30 pateikti tipiški tBLM ir α -hemolizinu paveiktos tBLM elektrocheminio impedanso spektrai Bode koordinatėse. Matome fazės minimumo poslinkį į didesnių reikšmių pusę. Kaip jau aptarta nagrinėjant membranos formavimosi kinetiką (pav. 23), $\log f_{min}$ padidėjimas stebimas todėl, kad išauga membranoje esančių defektų skaičius. Apibendrinant eksperimentinius EIS duomenis (pav. 29 ir pav.30), galima teigti, kad α -hemolizinas sėkmingai įsiterpė į fosfolipidinį dvisluoksnį.



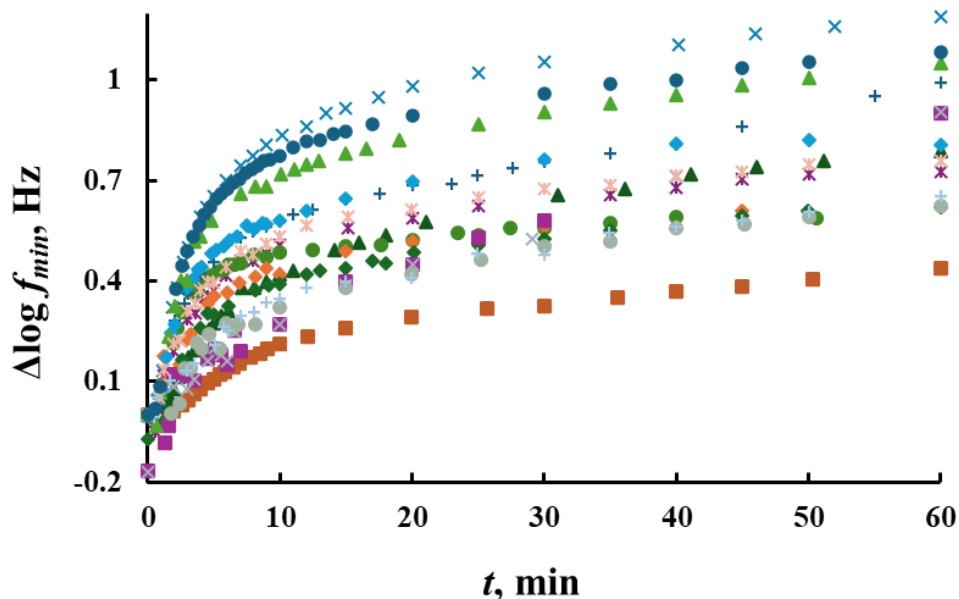
Pav. 29. tBLM elektrocheminio impedanso spektrai kompleksinės talpos koordinatėse prieš (○) ir po (●) poveikio 100 nM α HL. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{tot.}). EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1). α HL paveiktos tBLM spektrai fiksuoti po 1 nuo poveikio α HL.



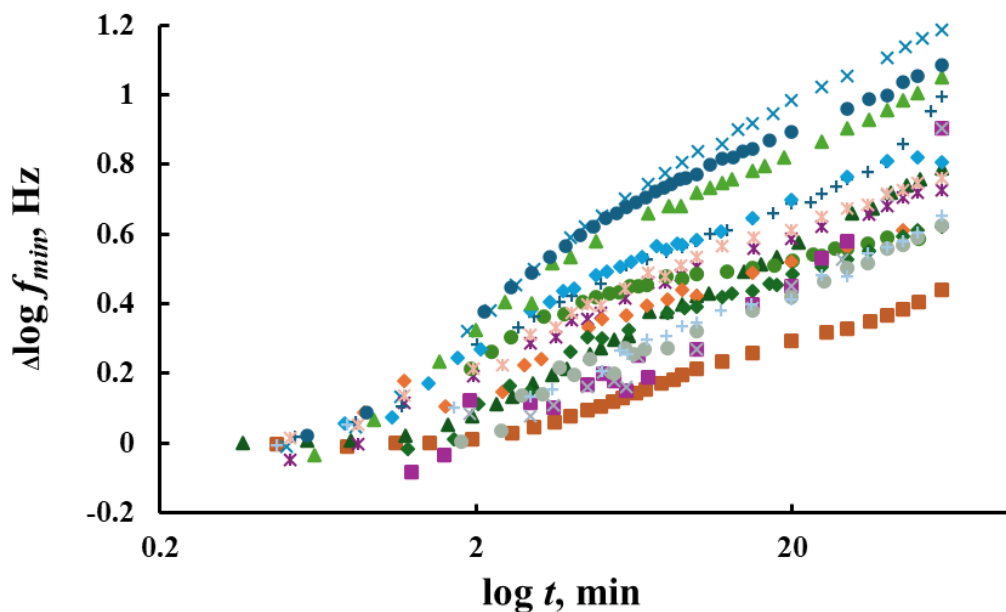
Pav. 30. tBLM elektrocheminio impedanso spektrai Bode koordinatėse prieš (○) ir po (●) poveikio 100 nM α HL. Spektrai nustatyti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{tot.}). EIS matavimai atlikti PBS (pH 7,1). α HL paveiktos tBLM spektrai fiksuoti po 1h nuo poveikio α HL.

Pav. 32 pateikti šiame darbe tirtų tBLM'ų $\log f_{min}$ kitimai laike sistemą paveikus 100 nM α HL. Visų tBLM atveju buvo stebimas logaritminio pobūdžio kitimas ir nustatyta, kad tokiomis pačiomis sąlygomis suformuotas membranas veikiant 100 nM α -hemolizino, nestebima koreliacijos tarp pradinio tBLM $\log f_{min}$ ir jo pokyčio ($\Delta \log f_{min}$) po 1 h nuo tBLM inkubacijos α HL $\log f_{min}$ poslinkis po 1 h nuo membranos paveikimo toksinu pradžios vidutiniškai lygus 0,69, bet skirtingoms tBLM svyruoja nuo 0,1 iki 1,37. $\Delta \log f_{min}$ kitimas laike membraną paveikus α HL panašus į logaritminės prigimties kitimą (31 pav. ir 32 pav.), bet dažnu atveju fiksuojant pačius pirmus laikus (iki 1-2 min) stebimas lėtas kilimas – tam tikras indukcinis laikotarpis (geriau šitai pastebima 32 pav.). Tikėtina, kad tiek α HL veikimo kinetikai, tiek pagal $\Delta \log f_{min}$ įvertintai tBLM pažaidai, įtakos turi tai, kad

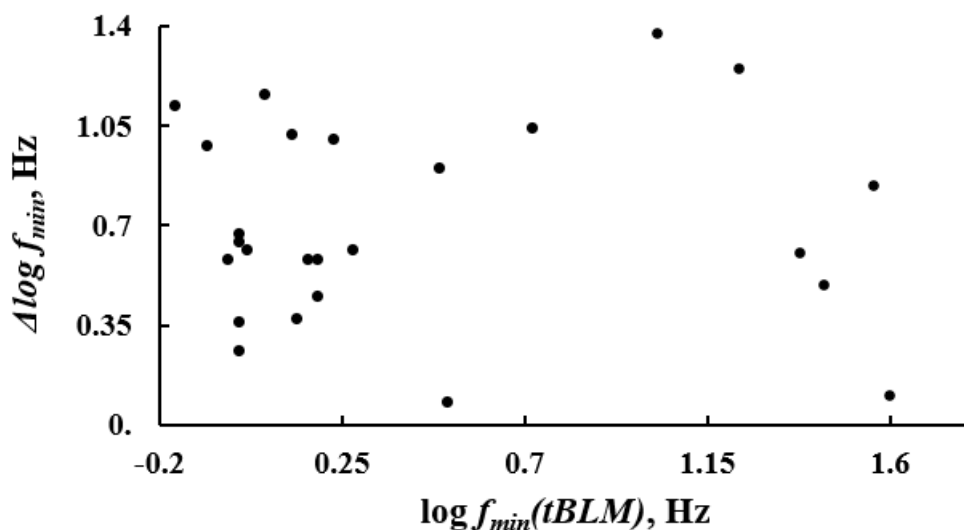
suformuotos tBLM skiriasi tiek natūralių defektų kiekiu, tiek pomembraninio vandens rezervuaro savybėmis –vien tBLM $\log f_{min}$ nėra α HL poveikio masto ar kinetikos prediktorius.



31. pav. Bode koordinatėse stebimo fazės minimumo padėties ($\log f_{min}$) kitimas laike po tBLM poveikio 100 nM α HL. EIS matavimai atlikti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sol.}). $\log f_{min}$ reikšmės nustatytos iš bendro impedanso atėmus tirpalo varžos dedamąją, siekiant gauti tikslesnius rezultatus.

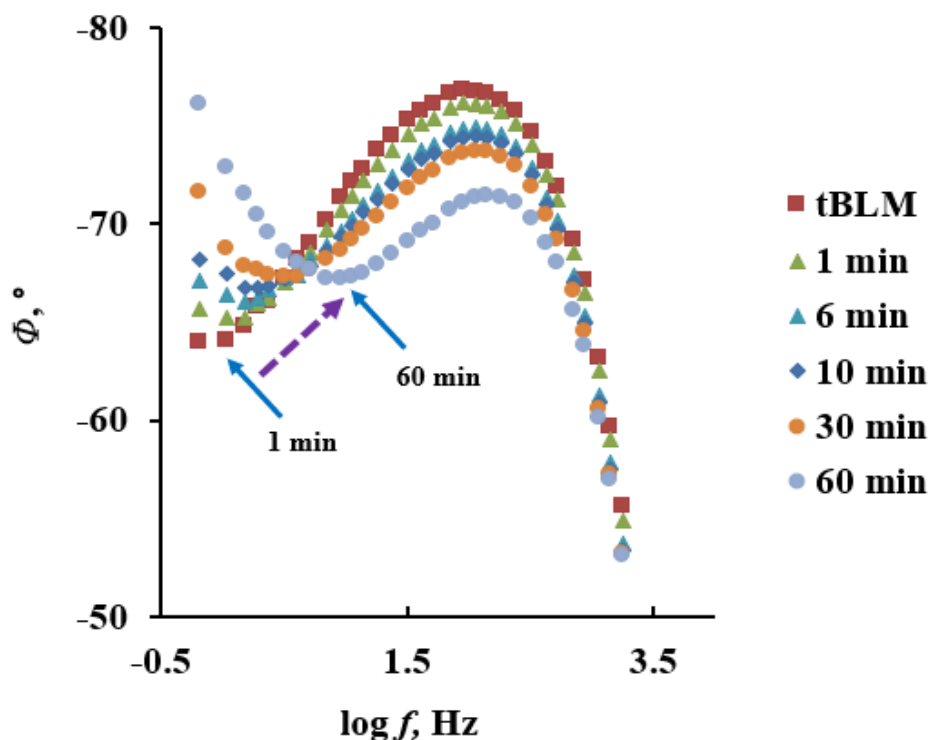


32 pav. Bode koordinatėse stebimo fazės minimumo padėties ($\log f_{min}$) kitimas laike logaritminėje skalėje ($\log t$) po tBLM poveikio 100 nM α HL. EIS matavimai atlikti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sol.}) $\log f_{min}$ reikšmės nustatytos iš bendro impedanso atėmus tirpalo varžos dedamąją, siekiant gauti tikslesnius rezultatus.



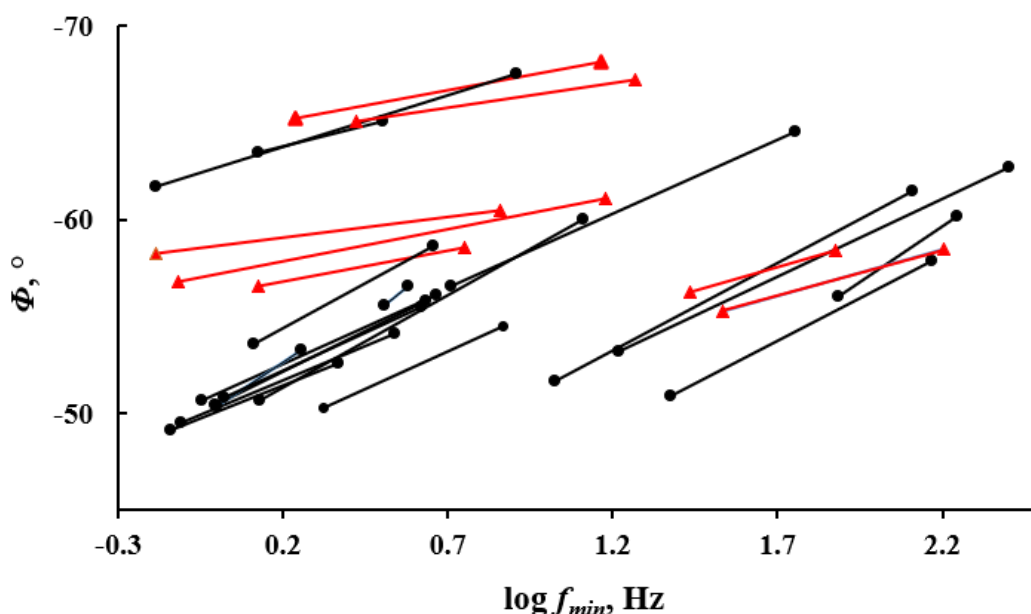
33 pav. $\log f_{min}$ pokyčio po tBLM inkubacijos α HL priklausomybė nuo pradinės tBLM $\log f_{min}$ reikšmės. Matavimai atlikti 7,1 pH PBS.

Kita vertus, svarbios informacijos apie α HL poveikį suteikia elektrocheminio impedanso spektrų Bode koordinatėse stebimo $\log f_{min}$ ir jį atitinkančios fazės vertės pokyčiai laike. Priešingai nei tBLM formavimosi atveju (28 pav.), stebima $\log f_{min}$ kitimo trajektorija „iš pietų į rytus“, kaip pavaizduota pav. 34.

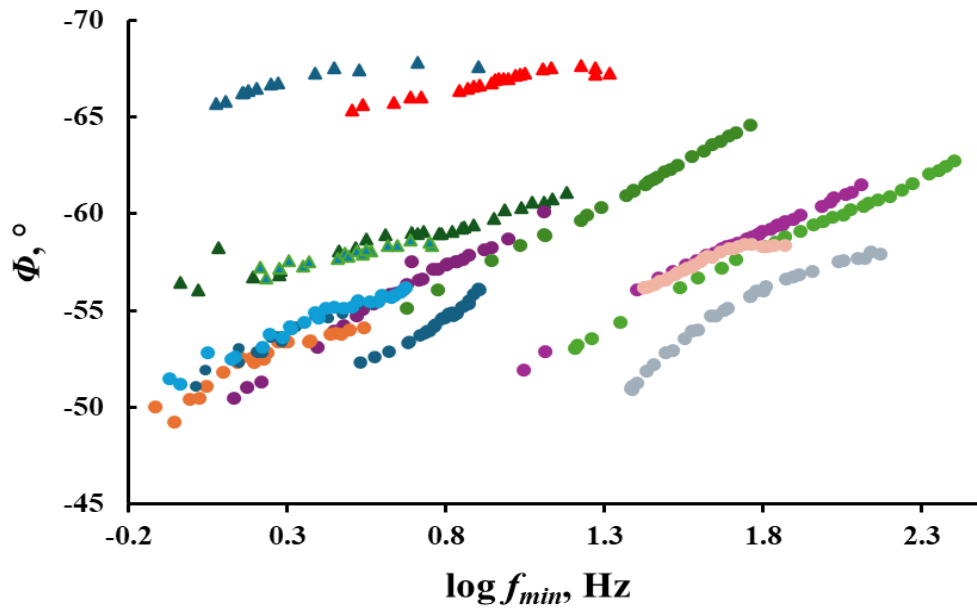


34 pav. Elektrocheminio impedanso Bode spektrų pokyčiai laike tBLM paveikus 100 nM α HL. Spektrai matuoti esant 0 V potencialui (vs Ag|AgCl, NaCl_{sol.}). Minimumo padėties kitimo trajektorija pavaizduota rodykle.

$\log f_{min}$ kitimo trajektorija „iš pietų į rytus“ leidžia daryti išvadą, kad membranoje sudaryti α HL defektai formuojasi į klasterius [1]. Membranos formavimosi atveju (pav. 28), $\arg Z_{min}$ priklausomybės nuo $\log f_{min}$ tiesės nuolinkio kampas visų tirtų tBLM atveju beveik sutampa. Tikėtina, jog taip yra todėl, kad membranai formuojantis, defektų klasteriai, t.y. FTO|SAM vietos, kuriose dar nespėjo susiformuoti fosfolipidinis dvisluoksnis, nyksta atsitiktine tvarka. Tokių klasterių skaičius mažėja plečiantis membranos formavimosi centrams ir šių centrų formavimasis yra atsitiktinis. tBLM veikiant α HL, klasterių atsiradimas nėra atsitiktinis, nes klasterizaciją lemia α HL monomerų formavimasis į heptamerus. Tikėtina, kad šios klasterizacijos mastas (t.y. $\arg Z$ kitimo greitis kintant $\log f$) priklauso nuo α HL koncentracijos. Pav. 35 pateiktos $\arg Z_{min}$ priklausomybės nuo $\log f_{min}$, nustatytos tiriant tBLM prieš 100 nM α HL poveikį ir po 1 h α HL poveikio. Matome, kad $\arg Z_{min}$ kitimo greitis kintant $\log f_{min}$ gali būti išskirstytas į dvi grupes – lėtesnį (pažymėta raudonais trikampaiais) ir greitesnį (pažymėta juodais apskritimais). Kiekvienos grupės viduje, kitimo greičiai labai panašūs, tačiau toks kinetinių parametrų įvertinimas nėra labai tikslus, nes kai kuriais atvejais $\arg Z_{min}$ priklausomybės nuo $\log f_{min}$ nėra idealiai tiesiškos (pav. 35 B arba 36?). Galimos netiesiškumo priežastys yra pirmomis minutėmis po α HL įterpimo stebimas indukcinis periodas bei išaugusios FFT-EIS matavimų paklaidos žemų dažnių srityje. Visgi tikėtina, kad veikiant tomis pačiomis sąlygomis suformuotas tBLM toksinu α HL, $\arg Z_{min}$ pokytis $\log f_{min}$ atžvilgiu yra bimodalinis. Iš EIS duomenų negalima pasakyti, kas lemia tokį rezultatų pasiskirstymą, tačiau galima daryti prielaidą, kad lėtesnį arba greitesnį $\arg Z$ kitimą $\log f_{min}$ atžvilgiu lemia skirtinga tBLM struktūra. Reikalingi papildomi eksperimentiniai tyrimai tam, kad dar prieš veikiant tBLM toksinu, $\arg Z_{min}$ priklausomybes nuo $\log f_{min}$ būtų galima priskirti kuriai nors iš šiame darbe nustatytų grupių, nes taip būtų galima numatyti α HL poveikio kinetiką membranai.



39 pav. Fazės minimumo (laipsniais) priklausomybė nuo $\log f_{min}$ (Hz) vertės – prieš ir po tBLM poveikio 100 nM α HL. Kiekviena tiesė atitinka atskiros membranos $\log f_{min}$ ir $\arg Z$ pokyčius per 60 min inkubacijos su α HL. Reikšmės nustatytos iš bendro impedanso atėmus tirpalo varžos dedamąją, siekiant gauti tikslesnius rezultatus.



Pav. 36. Fazės minimumo logaritmo (laipsniais) priklausomybė nuo $\log f_{min}$ (Hz) vertės membraną veikiant 100 nM α HL. Kiekviena kreivė atitinka atskiros membranos $\arg Z(\log f_{min})$ pokytį laike membraną veikiant α HL. Reikšmės nustatytos iš bendro impedanso atėmus tirpalo varžos dedamąją, siekiant gauti tikslesnius rezultatus.

3.5. Struktūrinių sistemos pokyčių įvertinimas naudojant ζ parametą

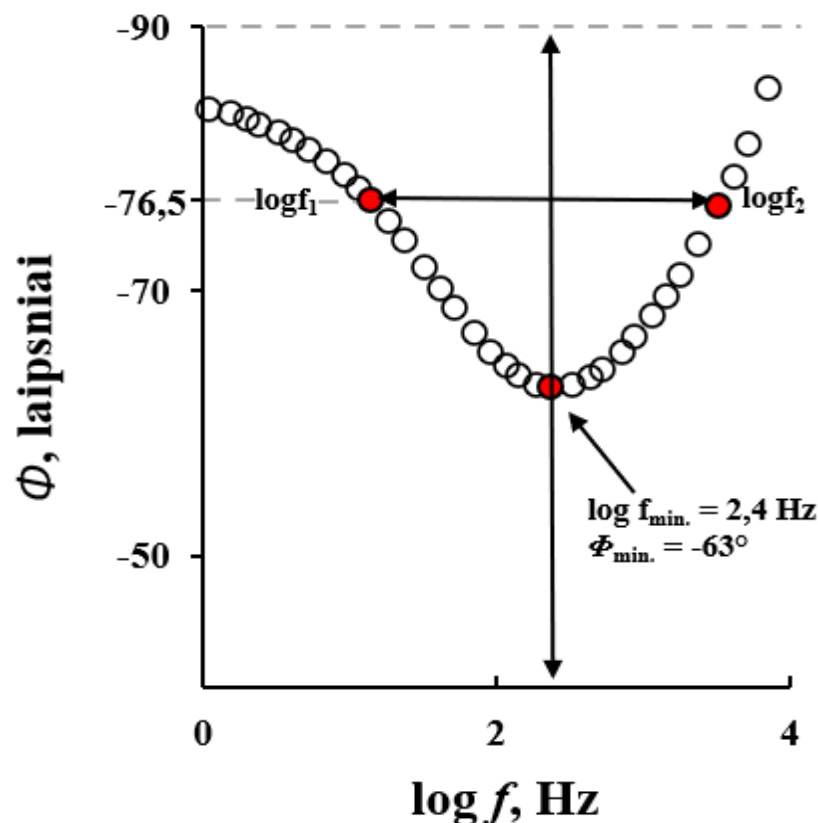
Naudojantis matematiniu modeliavimu yra pastebėta, kad klasterių formavimosi metu Bode koordinatėse kinta ne tik $\arg Z$, bet ir minimumo plotas. Minimo plotui įvertinti pasitelktas parametras ζ . Šis parametras išreiškiamas pagal formulę [Klaida! Žymelė neapibrėžta.]:

$$\zeta = \frac{\log f_{min.}}{\log f_2 - \log f_1} \quad (27)$$

Čia $\log f_{min}$ – dažnio, atitinkančio fazės minimumą ($\arg Z_{min.}$) reikšmė, o $\log f_1$ ir $\log f_2$ – parabolės, kurią sudaro minimumas, reikšmės, kai $\arg Z = \frac{-90 - \arg Z_{min}}{2}$ (žr. pav. 37).

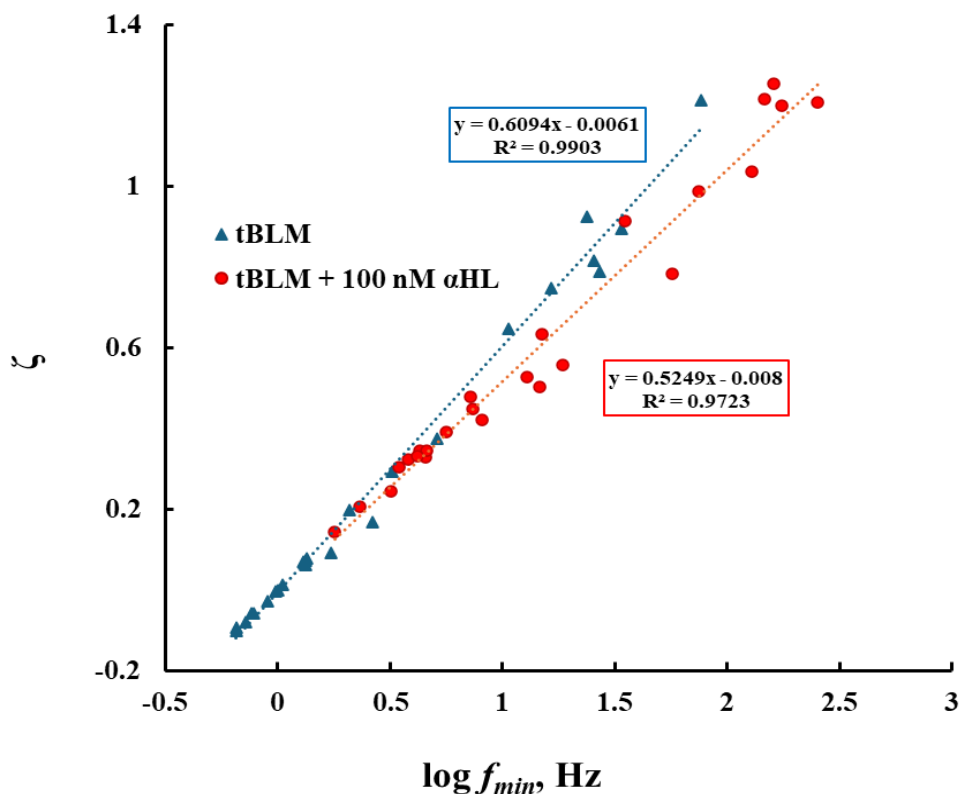
Klasterizacijos mąstas vertinamas naudojant heksagonines Voronoi diagramas, kuriose homogeniškai, heterogeniškai bei atsitiktinai į klasterius susitelkusiems defektams paviršiaus plotas priskiriamas taip, kad šio ploto ribos dalintų atstumą tarp bet kurių dviejų defektų perpus. Tada, toks paviršius aprašomas kaip tikimybės rasti defektą už šio ploto ribų skirstinys, o klasterizacijos mąstas įvertinamas šio skirstinio standartiniu nuokrypiu δ . ζ parametro priklausomybė nuo $\log f_{min}$ leidžia įvertinti membranoje esančių defektų išsidėstymą. Esant smulkiems defektams, kurių skersmuo svyruoja tarp 0,5 ir 1 nm (α HL porų skersmuo 0,6-1 nm [12]), pagal $\zeta(\log f_{min})$ nuolinkio kampą, defektų pasiskirstymą sistemoje galima klasifikuoti į šias grupes:

- Nuolinkio kampas $\sim 0,65$ – defektų pasiskirstymas homogeniškas.
- Nuolinkio kampas $\sim 0,59$ defektai pasiskirstę heterogeniškai, bet atsitiktinai, t.y. nesudaro klasterių.
- Nuolinkio kampas $\sim 0,52$ defektai sudaro klasterius, bet klasterizacija silpna (už klasterių zonos esantis defektų tankis nėra nulinis).
- Nuolinkio kampas $\sim 0,43$ paviršius stipriai klasterizuotas už (klasterių zonos defektų tankis ar tėja į nulį) [72]



37 pav. Elektrocheminio impedanso spektras Bode koordinatėse, kuriame pažymėtos dažnių reikšmės, reikalingos ζ parametro skaičiavimui. Spektre iš bendro impedanso atima tirpalo varžos dedamoji, siekiant gauti tikslesnius rezultatus.

Pav. 38 atidėtos α HL nepaveiktų ir 100 nM α HL paveiktų tBLM (spektrai fiksuoti 1 h po tBLM poveikio α HL) $\zeta(\log f_{\min})$ reikmės. Gautas tiesinės priklausomybės tarp ζ ir $\log f_{\min}$. α HL nepaveiktų tBLM atveju, gautos tiesės nuolinkio kampas lygus 0,61 – ši vertė artimiausia tolygiai, bet atsitiktinai išsidėšusių defektų modelinės sistemos tiesės nuolinkio vertei. Toks rezultatas tikėtinas – kaip jau aptarta šio darbo metu, ant FTO|SAM susiformavę fosfolipidiniai dvisluoksniai yra defektiški, o heterogeniška FTO ir SAM struktūra lemia tokių defektų heterogenišką išsidėstymą. Tuo tarpu α HL paveiktų membranų $\zeta(\log f_{\min})$ tiesės nuolinkio kampas lygus 0,53 – toks nuolinkio kampas būdingas silpnai klasterizuotiems defektams. Žinoma, kad α HL iš tiesų linkęs sudaryti klasterius ląstelių membranose. Tokių klasterių formavimasis vyksta α HL heptamerams sąveikaujant tarpusavyje ir paspartina porų formavimąsi bei ląstelės suardymą [73].



38 pav. α HL nepaveiktų (\triangle) ir paveiktų (\circ) membranų. ζ priklausomybė nuo $\log f_{min}$ (Hz) vertės. Membranos veiktos 100 nM α HL, elektrocheminio impedanso spektrai fiksuoti po 1 h nuo tBLM veikimo α HL pradžios. Rezultatai gauti

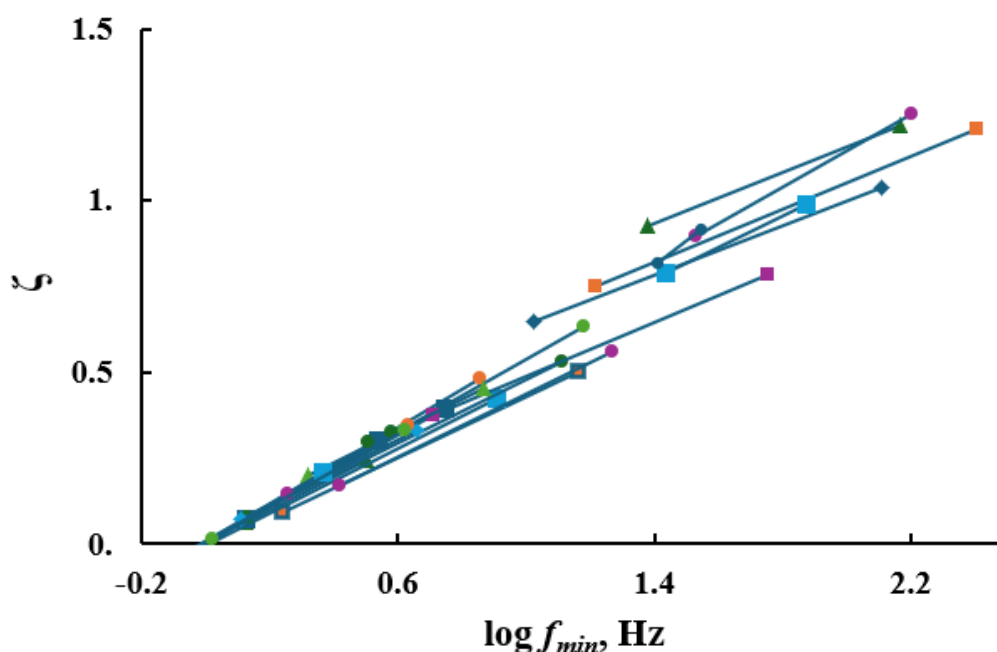
Kinetiniai α HL poveikio membranoms tyrimai leidžia įvertinti parametro $\zeta(\log f_{min})$ nuolinkio kampo evoliuciją laike, taigi, ir defektų klasterizacijos membranoje dinamiką, augant paviršinei α HL defektų koncentracijai. Kai nagrinėjame tos pačios membranos EIS spektrinius pokyčius, galime būti tikri, kad $\log f_{min}$ kaitą lemia būtent defektų tankio didėjimas laike, o ne pomembraninio sluoksnio fizinių savybių, konkrečiai – pomembraninio sluoksnio savitosios varžos kitimas. Taigi, ζ parametro kitimas laiko koordinatėje gali parodyti, ar didėjant α HL defektų tankiui membranose kinta defektų pasiskirstymo topologija, pavyzdžiui didėja, ar ne defektų polinkis formuoti paviršinius telkinius (klasterius).

Klasterizacijos mąstas gali būti įvertintas stebint nuolinkio kampo $\partial\zeta/\partial\log f_{min}$ kitimą didėjant defektų tankiui [Klaida! Žymelė neapibrėžta.]. Tiesių šeima, pavaizduota 39 pav., gauta išmatavus EIS spektrus prieš ir po α HL poveikio (60 min) tBLM mėginiams. Kaip matome, teisės, gautos skirtingų pavyzdžių matavimų serijose pasižymi ir akimi matomais skirtumais, rodančiais, kad ζ pokytis įsiterpiant ir besiformuojant α HL poroms membranose gali pastebimai skirtis. Atidėjus stebėtų parametro ζ pokyčius $\Delta\zeta$ kaip funkciją nuo α HL sukeliama EIS spektro $\log f_{min}$ postūmio, t.y., $\Delta\log f_{min}$, stebime patenkinamą tiesinę koreliaciją tarp šių dydžių su vidutiniu nuolinkio kampo koeficientu 0.43 (40 pav.). Tokios nedidelės koeficiento reikšmės rodo, kad įsiterpiant α HL į darbe tirtos sudėties (60% DOPC ir 40% Chol) tBLM membraną, α HL rodo aiškias tendencijas telktis į paviršinius klasterius, o ne išsidėstyti tolygiai atsitiktinai. Šie duomenys gerai dera su duomenimis 38 pav., kuriuose pavaizduota koreliacija tarp galutinių $\log f_{min}$ reikšmių ir jas atitinkančių ζ verčių. 38 pav. stebėtas nuolinkio kampo koeficientas šiek tiek didesnis, t.y., 0.52, tačiau turint mintyje, jog 38 pav. tiesės nuolinkio koeficientą gali įtakoti

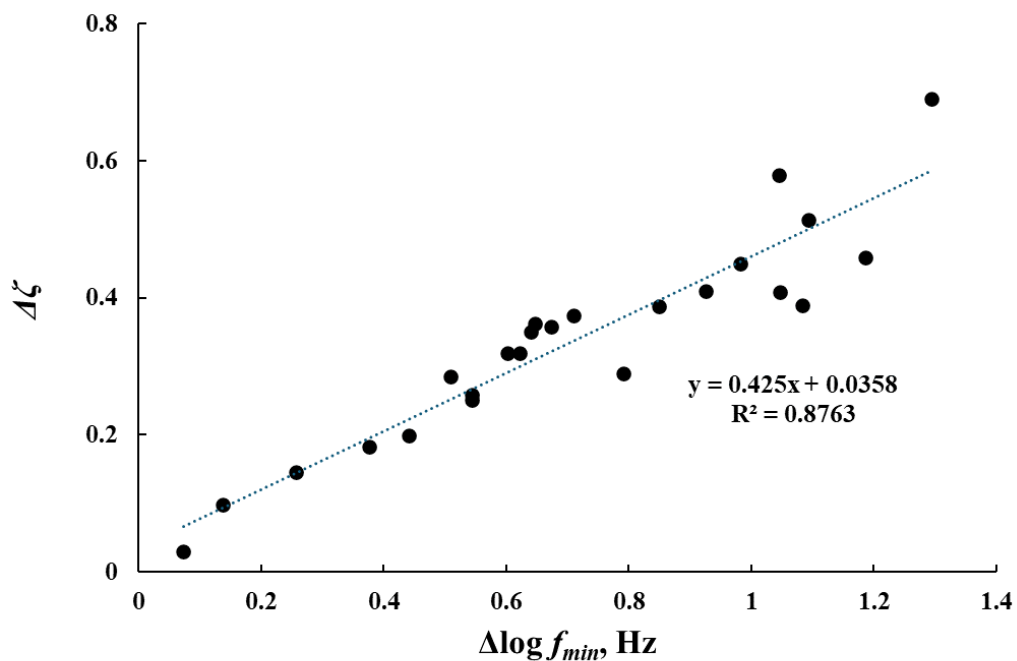
pomembraninio sluoksnio savitosios varžos variacija tarp mėginių, toks neatitikimas pilnai tikėtinas ir abu parametrai indikuoja klasterizacijos proceso dominavimą, vykstant α HL įsiterpimui į membranas.

Duomenys 39 ir 40 paveiksluose atitinka diskretinių parametrų pokytį, stebimą 60 min bėgyje vykstant sąveikai tarp tBLM ir α HL ir šio baltymo porų membranoje formavimąsi. Tačiau detalesnis žvilgsnis į kinetines α HL poveikio kreives rodo, kad ζ parametro kaita, kintant membranos pažaidos mastui nevyksta pastoviu greičiu, t.y. išvestinė $\partial\zeta/\partial\log f_{min}$ yra nebūtinai konstanta. Kaip matome iš 41 pav., kai kurie kreivių šeimos atstovai (žali trikampiai, šviesiai rudi kvadratai) rodo beveik tiesinį kitimo pobūdį, tačiau, akivaizdu, kad kiti šios kreivių šeimos nariai rodo lėtėjantį kitimo pobūdį, kas rodo, kad nuolinkio kampo koeficientas ima mažėti augant membranos pažaidai ir didėjant poras formuojančio toksino sukuriamų defektų paviršinei koncentracijai. Šis rezultatas gerai dera su anksčiau paskelbtais rezultatais ant aukso [74], rodančiais, kad būtent didėjant α HL paviršinei koncentracijai, didėja defektų polinkis telktis į klasterius.

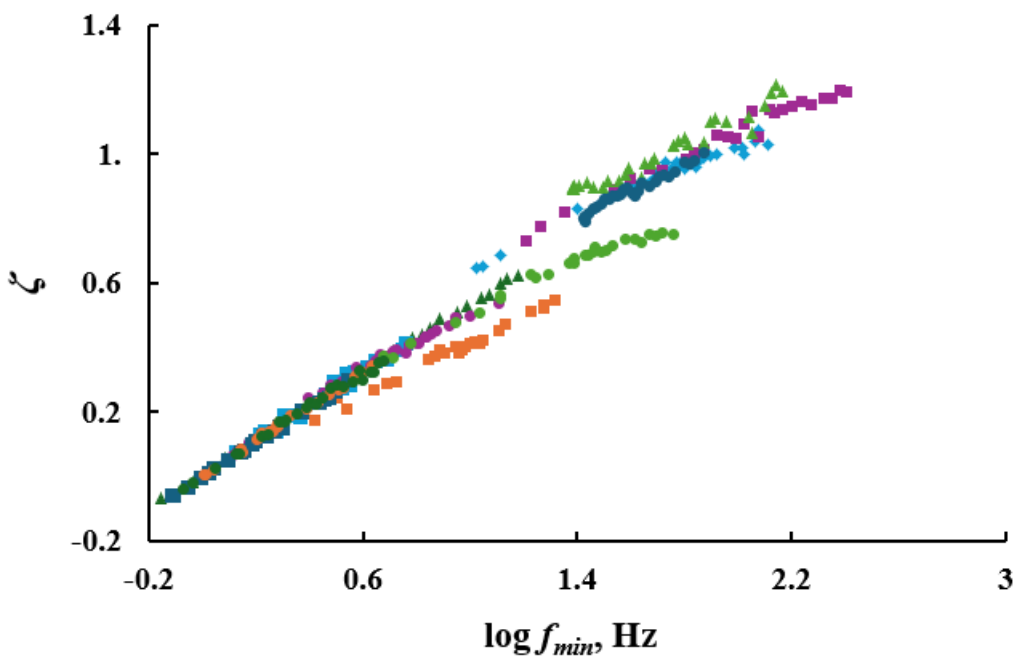
Galima pastebėti, kad tiesės/kreivės pateiktos 39 ir 41 pav. pasižymi gana dideliu nuolinkio kampo reikšmių ir kitimo modų (tiesinė, netiesinė) sklaida. Vadinasi, tirtoje tBLM sistemoje toksino defektų klasterizacijos procesas stipriai varijuoja tarp skirtingų mėginių, kas galimai atspindi darbe naudoto paviršiuje imobilizuotų membranų substrato, FTO, paviršiaus heterogeniškumą. Taip pat galima pastebėti, kad nuolinkio kampai nekoreliuoja su pradine $\log f_{min}$ reišme, kurią galimai lemia ir pradinė defektų koncentracija, ir pomembraninio sluoksnio savitoji varža. Tai rodo, kad α HL įsiterpimo kinetiką galimai lemia ir dvisluoksnių membranų, ir pomembraninio sluoksnio savitosios varžos variabilumai, kurie savo ruožtu gali būti tBLM substrato, FTO paviršiaus cheminio bei fizinio heterogeniškumo pasekmė.



39 pav. ζ priklausomybė nuo $\log f_{min}$ (Hz) vertės – prieš ir po tBLM poveikio 100 nm α HL. Kiekviena tiesė atitinka atskiros membranos parametrų ζ ir $\arg Z(\log f_{min})$ pokyčius per 60 min inkubacijos su α HL.



40 pav. ζ pokyčio priklausomybė nuo 100 nM α HL per 60 min sukkelto pažaidos mąsto, išreikšto $\log f_{min}$ pokyčiu. Kiekvienas eksperimentinis taškas atitinka atskirą testuotą tBLM mėginį.



41 pav. ζ priklausomybė nuo $\log f_{min}$ (Hz) vertės, membraną veikiant 100 nM α HL. Kiekviena kreivė atitinka atskirą testuotą tBLM mėginį.

IŠVADOS

1. Darbo metu ant FTO paviršiaus formuoti savitvarčiai monosluoksniai iš TOPS:ATS bei TOPS:ATS ir VTS mišinio. FTO|SAM, gautas silanizavimo metu naudojant 3,2 μM TOPS:ATS pasirinktas kaip optimaliausias. Sėkmingą savitvarčio monosluoksnio susidarymą ant FTO paviršiaus patvirtina išaugusios paviršiaus kontaktinių kampų vertės, lygios $104 \pm 6^\circ$ (plg. nesilanizuotam FTO šios vertės $\sim 50^\circ$) bei pakitę elektrocheminio impedanso spektrai (iš šių pokyčių ryškiausias – dvigubo elektrinio sluoksnio talpos sumažėjimas nuo $11,3 \pm 0,4 \mu\text{F cm}^{-2}$ iki $5,2 \pm 0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$).
2. Ant FTO|SAM formuotas fosfolipidinis dvisluoksnis, naudojant 0,4 mM Chol ir 0,6 mM DOPC vezikulių tirpalą. Sėkmingą fosfolipidinio dvisluoksnio susiformavimą patvirtina sumažėjusios iki $1,2 \pm 0,2 \mu\text{F cm}^{-2}$ dvigubo elektrinio sluoksnio vertės bei tBLM charakteringos elektrocheminio impedanso spektrų kompleksinės talpos koordinatėse žemų dažnių srityje susiformavusios „uodegos“ atsiradimas bei Bode koordinatėse susiformavęs fazės minimumas.
3. Fosfolipidinis dvisluoksnis susiformuoja per ~ 30 min nepriklausomai nuo substrato ir molekulinio inkaro FTO|SAM savybių. Kinetikos pobūdis priklauso tiek nuo molekulinio inkaro heterogeniškumo, tiek nuo susiformuojančios membranos pradinio parametro $\log f_{min}$.
4. FFT-EIS parametrų kitimo pobūdis membranų formavimo metu leidžia manyti, kad proceso pradžioje susidaro nedidelis kiekis (paviršinis tankis) fosfolipidinio dvisluoksnio „salų“, kurios membranai formuojantis sparčiau plečiasi, užpildydamos visa paviršių, tačiau pasiekiant nedideliame natūralių defektų tankiui.
5. tBLM paveikus 100 nM αHL , $\log f_{min}$ slinkimasis į didesnių verčių pusę ir kompleksinės talpos koordinatėse stebimo pusapskritimio didėjimas įrodo αHL įsiterpimą į fosfolipidinį dvisluoksnį, o šių spektrų kitimo trajektorija leidžia spręsti, jog αHL poros membranoje sudaro klasterius.
6. αHL poveikio mastas bei sąveikos su tBLM kinetika skiriasi, bet vyrauja logaritminis membranos pažaidos mastą atspindinčio parametro $\log f_{min}$ kitimas laike.
7. tBLM veikiant αHL , gautos tiesinės priklausomybės tarp $\log f_{min}$ bei minimumo fazės vertės ($\arg Z_{min}$) – pagal šias priklausomybes, $\arg Z$ kitimas $\log f_{min}$ atžvilgiu gali būti išskirtas į lėtesnį ir greitesnį, kas leidžia daryti prielaidą, kad αHL poveikio tBLM dinamika yra bimodalinės prigimties.
8. Bode koordinatėse stebimo $\log f_{min}$ priklausomybė nuo fazės minimumo suformuotos parabolės pločio kitimo, aprašyto parametru ζ , leidžia įvertinti suformuotas tBLM kaip turinčias heterogeniškai paviršiuje išsidėsčiusių, bet klasterių nesudarančių defektų, o αHL paveiktas tBLM kaip klasterius sudarančių defektų turinčias struktūras.
9. EIS metodas, paprastai nenaudojamas struktūrinei nanometrų lygmens struktūrų analizei, gali būti pasitelktas kaip įrankis tBLM natūralių bei baltymų suformuotų defektų klasterizacijos mastui įvertinti.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

GERDA ŽIŽIŪNAITĖ

Paviršiuje imobilizuotų membranų formavimosi ir sąveikos su α -hemolizinu dinamikos tyrimas greitosios Fourier transformacijos elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu.

Ant laidaus paviršiaus per molekulinis inkarus imobilizuoti fosfolipidiniai dvisluoksniai (tBLM) naudojami kaip realios ląstelės membranų modeliai. Šio darbo metu toks modelis sukurtas naudojant stiklo plokštelę, padengtą fluoru dopuotu alavo oksidu (FTO), ant kurios, per silanų savitavarkį monosluoksnį (TOPS:ATS) imobilizuotas fosfolipidinis dvisluoksnis (60 % DOPC ir 40 % Chol). Darbo metu, panaudojus FFT-EIS metodą, tirta fosfolipidinio dvisluoksnio formavimosi kinetika bei poras formuojančio toksino, α -hemolizino įsiterpimo į tBLM dinamika. FFT-EIS metodas unikalus tuo, kad leidžia užfiksuoti impedanso spektrą ypač greitai, per ~ 15 s (matuojant spektrus 0,2 – 10 kHz kintamos srovės intervale). Tirtos sistemos atveju, fosfolipidinis dvisluoksnis, nepriklausomai nuo skirtingų tBLM savybių susiformuoja per ~ 30 min, bet kinetiniai tyrimai parodė, kad pradinė membranų formavimosi kinetika priklauso nuo SAM heterogeniškumo. Taip pat, FFT elektrocheminio impedanso spektrų kitimo trajektorija leido daryti išvadą, kad fosfolipidinis dvisluoksnis ant FTO|SAM formuojasi susidarant nedideliu fosfolipidinio dvisluoksnio salų kiekiui, kurios, membranai formuojantis, plečiasi. FFT elektrocheminio impedanso spektrų pokyčiai, sukelti α HL pažaidos, taip pat stebimi jau pirmą minutę nuo α HL poveikio pradžios. α hemolizino nustatymas padeda diagnozuoti *S. aureus* sukeltas infekcijas, įskaitant odos ir minkštųjų audinių infekcijas, pneumoniją ir sepsį – greitas infekcijos nustatymas leidžia išvengti jos sukeltų komplikacijų, kurios gali būti mirtinos. Tradiciniai α HL nustatymo metodai, tokie kaip bakterijų kultivavimas, netinkami greitai α HL detekcijai. Dėl šios priežasties, ypač greitas α HL toksino nustatymas FFT-EIS būtų labai patrauklus α HL biologinio jutiklio formavimui. Darbo metu tBLM buvo veikta ta pačia, 100 nM α HL koncentracija, norint iširti, kaip tBLM savybės įtakoja α HL poveikio kinetiką bei mąstą. Nustatyta, kad skirtingiems tBLM, α HL poveikio kinetika skiriasi – tikėtina, kad didelę įtaką jai daro substrato bei pačios tBLM sistemos heterogeniškumas. Naudojantis FFT-EIS, tai pat įvertintas α HL polinkis formuoti klasterius – tiek EIS Bode koordinatėse stebimas fazės minimumo kitimas logaritmo atžvilgiu ($\arg Z_{min}(\log f_{min})$), tiek sistemos heterogeniškumui įvertinti pasitelkto ζ parametro vertės leido daryti išvadą, kad α HL šioje sistemoje linkęs formuoti klasterius. Skirtingas klasterizacijos lygis stebimas, vėlgi, dėl substrato ir pačios tBLM heterogeniškumo. Tiriant ζ parametro kitimą laike taip pat, kai kurių tBLM sistemų tyrimo metu, pastebėtas klasterizacijos mąsto augimas laike. Šio darbo naujumas yra tai, kad jame pademonstruota, jog EIS metodas, paprastai naudojamas elektrocheminių charakteristikų nustatymui ir nenaudojamas struktūrinei nanometrų lygmens struktūrų analizei, gali būti pasitelktas kaip įrankis tBLM natūralių bei baltymų suformuotų defektų klasterizacijos mąstui įvertinti.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

GERDA ŽIŽIŪNAITĖ

Study of the Dynamics of Tethered Bilayer Membrane Formation and Interaction with α -hemolysin by Fast Fourier Transform Electrochemical Impedance Spectroscopy.

Tethered bilayer membranes (tBLM) are used as models that mimic biological cell membranes. In this work, such a model was developed using a glass slide coated with fluorine-doped tin oxide (FTO), on which a phospholipid bilayer (60 % DOPC and 40 % Chol.) was immobilised via self-assembled monolayer (TOPS:ATS). The kinetics of the formation of the phospholipid bilayer and the dynamics of the incorporation of the pore-forming toxin, α -hemolysin, into tBLM were investigated using FFT-EIS. FFT-EIS is unique in that it allows to measure electrochemical impedance spectra very rapidly, within ~ 15 s (measuring spectra in the 0.2-10 kHz AC range). In the case of the system studied, the phospholipid bilayer was formed within ~ 30 min, independently of the different properties of the tBLM, but kinetic studies showed that the initial kinetics of membrane formation depends on the heterogeneity of the SAM. Also, the trajectory of the electrochemical impedance spectra suggested that the formation of the phospholipid bilayer on the FTO|SAM occurs via the formation of a small number of phospholipid bilayer “islands“, which expand as the membrane forms. Changes in the electrochemical impedance spectra induced by α HL damage are also observed already within the first minute after the onset of α HL exposure. The detection of α HL aids in the diagnosis of infections, including skin and soft tissue infections, pneumonia and sepsis - early detection of the infection can help prevent potentially fatal complications. Traditional methods for α HL detection, such as culturing bacteria, are not suitable for rapid detection of α HL. For this reason, the ultra-fast detection of α HL toxin by FFT-EIS would be very attractive for the development of an α HL biosensor. In this work, tBLM was incubated using the same, 100 nM concentration of α HL to investigate how the properties of tBLM influence the kinetics and extent of α HL exposure. The work revealed that the kinetics of α HL exposure varies between different tBLMs, which is likely to be strongly influenced by the heterogeneity of the substrate and the tBLM system itself. Using FFT-EIS, the tendency of α HL to form clusters was also assessed: both the variation of the phase minimum with logarithm ($\arg Z_{\min}(\log f_{\min})$) observed in electrochemical impedance Bode coordinates and the values of the ζ parameter used to assess the heterogeneity of the system led to the conclusion that α HL in this system tends to form clusters. The different levels of clustering observed are again due to the heterogeneity of the substrate and the tBLM itself. An increase in the rate of clustering with time was also observed in the study of the variation of the ζ parameter with time for some tBLM systems. The EIS method, which is not usually used for structural analysis at the nanometre level, can be used as a tool to estimate the clustering rate of natural and protein-formed defects in tBLM.

- ¹ Köper, I., Vockenroth, I. K., & Knoll, W. (2009). Ion Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes on Au Electrodes. *Nanobioelectronics - for Electronics, Biology, and Medicine*, 211–223. doi:10.1007/978-0-387-09459-5_9.
- ² Andersson, J., Köper, I., & Knoll, W. (2018). Tethered Membrane Architectures—Design and Applications. *Frontiers in Materials*, 5. doi:10.3389/fmats.2018.00055.
- ³ Jackman, J., Knoll, W., & Cho, N.-J. (2012). Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials*, 5(12), 2637–2657. doi:10.3390/ma5122637.
- ⁴ Gabriunaite, I., Valiūnienė, A., Sabirovas, T., & Valincius, G. (2021). Mixed Silane-based Self-assembled Monolayers Deposited on Fluorine Doped Tin Oxide as Model System for Development of Biosensors for Toxin Detection. *Electroanalysis*, 33(5), 1315–1324. DOI: 10.1002/elan.202060578.
- ⁵ Aleknavičienė, I.; Talaikis, M.; Budvytyte, R.; Valincius, G. The Impact of an Anchoring Layer on the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes on Silver Substrates. *Molecules* 2021, 26, 6878. <https://doi.org/10.3390/molecules26226878>.
- ⁶ Shivabalan AP, Ambrulevicius F, Talaikis M, Pudzaitis V, Niaura G, Valincius G. Effect of pH on Electrochemical Impedance Response of Tethered Bilayer Lipid Membranes: Implications for Quantitative Biosensing. *Chemosensors*. 2023; 11(8):450. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11080450>.
- ⁷ Maccarini, M., Watkins, E. B., Stidder, B., Alcaraz, J.-P., Cornell, B. A., & Martin, D. K. (2016). Nanostructural determination of a lipid bilayer tethered to a gold substrate. *The European Physical Journal E*, 39(12). doi:10.1140/epje/i2016-16123-5.
- ⁸ Rakovska, B., Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Jankunec, M., Niaura, G., Vanderah, D. J., & Valincius, G. (2015). Structure and Function of the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, 31(2), 846–857. doi:10.1021/la503715b.
- ⁹ Budvytyte, R., Valincius, G., Niaura, G., Voiciuk, V., Mickevicius, M., Chapman, H., ... Vanderah, D. J. (2013). Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules. *Langmuir*, 29(27), 8645–8656. doi:10.1021/la401132c.
- ¹⁰ Jeong, S.-J., Kim, K.-H., & Ahn, H.-J. (2021). Net-Patterned Fluorine-Doped Tin Oxide to Accelerate the Electrochromic and Photocatalytic Interface Reactions. *Catalysts*, 11(2), 249. doi:10.3390/catal11020249.
- ¹¹ Muneyasu, R., Yamada, T., Akai-Kasaya, M., & Kato, H. S. (2022). Self-assembly of heterogeneous bilayers stratified by Au-S and hydrogen bonds on Au(111). *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(36), 24164–24170. doi:10.1039/d2cp03356a.
- ¹² Gouaux, E. (1998). α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of β -Barrel, Channel-Forming Toxins. *Journal of Structural Biology*, 121(2), 110–122. doi:10.1006/jsbi.1998.39.
- ¹³ *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science; 2002.
- ¹⁴ *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- ¹⁵ Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004.
- ¹⁶ Parker, A., Miles, K., Cheng, K. H., & Huang, J. (2004). Lateral Distribution of Cholesterol in Dioleoylphosphatidylcholine Lipid Bilayers: Cholesterol-Phospholipid Interactions at High Cholesterol Limit. *Biophysical Journal*, 86(3), 1532–1544. doi:10.1016/s0006-3495(04)74221-6.
- ¹⁷ Popescu, D., Ion, S., Popescu, A., & Movileanu, L. (2003). Elastic properties of bilayer lipid membranes and pore formation. *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and Their Applications*, 173–204. doi:10.1016/s0927-5193(03)80029-3.
- ¹⁸ Tsemperouli, M., Amstad, E., Sakai, N., Matile, S., & Sugihara, K. (2019). Black Lipid Membranes: Challenges in Simultaneous Quantitative Characterization by Electrophysiology and Fluorescence Microscopy. *Langmuir*. doi:10.1021/acs.langmuir.9b00673.
- ¹⁹ Winterhalter, M. (2000). Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 250–255. doi:10.1016/s1359-0294(00)00063-7.
- ²⁰ Schaefer, Andreas & Seidel, Ch & Chi, Lifeng & Harald, Fuchs. (1998). STM investigations of thiol self-assembled monolayers. *Adv.Mater.* 10. 839-842.
- ²¹ Lessel, M., Bäumchen, O., Klos, M., Hähl, H., Fetzer, R., Paulus, M., ... Jacobs, K. (2015). Self-assembled silane monolayers: an efficient step-by-step recipe for high-quality, low energy surfaces. *Surface and Interface Analysis*, 47(5), 557–564. doi:10.1002/sia.5729.
- ²² Srinivasan, U., Houston, M. R., Howe, R. T., & Maboudian, R. (1998). Alkyltrichlorosilane-based self-assembled monolayer films for stiction reduction in silicon micromachines. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 7(2), 252–260. doi:10.1109/84.679393.
- ²³ Chandekar, A., Sengupta, S. K., & Whitten, J. E. (2010). Thermal stability of thiol and silane monolayers: A comparative study. *Applied Surface Science*, 256(9), 2742–2749. doi:10.1016/j.apsusc.2009.11.020.
- ²⁴ Naik, V. V., Crobu, M., Venkataraman, N. V., & Spencer, N. D. (2013). Multiple Transmission-Reflection IR Spectroscopy Shows that Surface Hydroxyls Play Only a Minor Role in Alkylsilane Monolayer Formation on Silica. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(16), 2745–2751. doi:10.1021/jz401440d.

- ²⁵ Naik, V. V., Städler, R., & Spencer, N. D. (2014). Effect of Leaving Group on the Structures of Alkylsilane SAMs. *Langmuir*, 30(49), 14824–14831. doi:10.1021/la503739j.
- ²⁶ Primc, G. (2020). Recent Advances in Surface Activation of Polytetrafluoroethylene (PTFE) by Gaseous Plasma Treatments. *Polymers*, 12(10), 2295. doi:10.3390/polym12102295.
- ²⁷ Jin, J., Noordermeer, J. W. M., Dierkes, W. K., & Blume, A. (2020). The Effect of Silanization Temperature and Time on the Marching Modulus of Silica-Filled Tire Tread Compounds. *Polymers*, 12(1), 209. doi:10.3390/polym121020209.
- ²⁸ Bhushan, B. (2004). Self-Assembled Monolayers (SAMs) for Controlling Adhesion, Friction, and Wear. In *Springer Handbook of Nanotechnology* (pp. 1379–1416). doi:10.1007/978-3-540-29857-1_43.
- ²⁹ Li, Y., He, S., Xu, Z., Luo, Z., Xiao, H., Tian, Y., & Jiang, L. (2022). Investigation on the intrinsic wetting thresholds of liquids by measuring the interaction forces of self-assembled.
- ³⁰ Pulsipher, A., Yousaf, M.N. (2010). Self-Assembled Monolayers as Dynamic Model Substrates for Cell Biology. In: Börner, H., Lutz, J.F. (eds) *Bioactive Surfaces. Advances in Polymer Science*, vol 240. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/12_2010_87.
- ³¹ Sabirovas, T., Valiūnienė, A., Gabriunaite, I., & Valincius, G. (2020). Mixed hybrid bilayer lipid membranes on mechanically polished titanium surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 183232. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183232.
- ³² L.K. Tamm, H.M. McConnell, Supported Phospholipid-Bilayers, *Biophys. J.*, 47 (1985) 105–113.
- ³³ H.P. Vacklin, F. Tiberg, R.K. Thomas, Formation of supported phospholipid bilayers, via co-adsorption with beta-D-dodecyl maltoside, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1668 (2005) 17-24.
- ³⁴ Onaizi, S. A., Nasser, M. S., & Twaiq, F. (2014). Lysozyme binding to tethered bilayer lipid membranes prepared by rapid solvent exchange and vesicle fusion methods. *European Biophysics Journal*, 43(4-5), 191–198. doi:10.1007/s00249-014-0955-z.
- ³⁵ Spinke, J., Yang, J., Wolf, H., Liley, M., Ringsdorf, H., & Knoll, W. (1992). Polymer-supported bilayer on a solid substrate. *Biophysical Journal*, 63(6), 1667–1671. doi:10.1016/s0006-3495(92)81742-3.
- ³⁶ Hohner, A. O., David, M. P. C., & Rädler, J. O. (2010). Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces. *Biointerphases*, 5(1), 1–8. doi:10.1116/1.3319326.
- ³⁸ Rothman, J. E., & Wieland, F. T. (1996). Protein Sorting by Transport Vesicles. *Science*, 272(5259), 227–234. doi:10.1126/science.272.5259.227.
- ³⁹ Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7), 940–948. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
- ⁴⁰ Walde, P., Beterelli Giuliano, C., Cvjetan, N., & Ayache, J. (2020). Multivesicular Vesicles.– Preparations and Applications. *ChemSystemsChem*. doi:10.1002/syst.202000049.
- ⁴¹ Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., & Stano, P. (2010). Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem*, 11(7), 848–865. doi:10.1002/cbic.201000010.
- ⁴² Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9(1), 467–508. doi:10.1146/annurev.bb.09.060180.
- ⁴³ Lasic, D. D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256(1), 1–11. doi:10.1042/bj2560001.
- ⁴⁴ Karthika S. Nair, Harsha Bajaj, Advances in giant unilamellar vesicle preparation techniques and applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 318, 2023, 102935, ISSN 0001-8686, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102935>.
- ⁴⁵ Tamm, L. K., & McConnell, H. M. (1985). Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 47(1), 105–113. doi:10.1016/s0006-3495(85)83882-0.
- ⁴⁶ Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Rakovska, B., Penkauskas, T., Vanderah, D. J., Heinrich, F., & Valincius, G. (2017). Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(5), 669–678. doi:10.1016/j.bbamem.2017.01.015.
- ⁴⁷ Bonaccorso, A.; Privitera, A.; Grasso, M.; Salamone, S.; Carbone, C.; Pignatello, R.; Musumeci, T.; Caraci, F.; Caruso, G. The Therapeutic Potential of Novel Carnosine Formulations: Perspectives for Drug Development. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 778. <https://doi.org/10.3390/ph16060778>.
- ⁴⁸ Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Kamio, Y., Yao, M., & Tanaka, I. (2011). 2-Methyl-2,4-pentanediol induces spontaneous assembly of staphylococcal α -hemolysin into heptameric pore structure. *Protein Science*, 20(2), 448–456. doi:10.1002/pro.579
- ⁴⁹ Ervin, E. N., Barrall, G. A., Pal, P., Bean, M. K., Schibel, A. E. P., & Hibbs, A. D. (2013). Creating a Single Sensing Zone Within an Alpha-Hemolysin Pore via Site-Directed Mutagenesis. *BioNanoScience*, 4(1), 78–84. doi:10.1007/s12668-013-0119-0.
- ⁵⁰ Bonome, E. L., Cecconi, F., & Chinappi, M. (2017). Electroosmotic flow through an α -hemolysin nanopore. *Microfluidics and Nanofluidics*, 21(5). doi:10.1007/s10404-017-1928-1
- ⁵¹ Qiu, J., Wang, D., Zhang, Y., Dong, J., Wang, J., & Niu, X. (2013). Molecular Modeling Reveals the Novel Inhibition Mechanism and Binding Mode of Three Natural Compounds to Staphylococcal α -Hemolysin. *PLoS ONE*, 8(11), e80197. doi:10.1371/journal.pone.0080197

- ⁵² Berube, B., & Wardenburg, J. (2013). Staphylococcus aureus α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*, 5(6), 1140–1166. doi:10.3390/toxins5061140.
- ⁵³ Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U. (2001). α -Toxin is a mediator of Staphylococcus aureus-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *The Journal of Cell Biology*, 155(4), 637–648. doi:10.1083/jcb.200105081.
- ⁵⁴ Lukáš Pravda, David Sehnal, Dominik Toušek, Veronika Navrátilová, Václav Bazgier, Karel Berka, Radka Svobodová Vařeková, Jaroslav Koča, Michal Otyepka, MOLEonline: a web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update), *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue W1, 2 July 2018, Pages W368–W373, <https://doi.org/10.1093/nar/gky309>.
- ⁵⁵ Šakanovič, A., Hodnik, V., & Anderluh, G. (2019). Surface Plasmon Resonance for Measuring Interactions of Proteins with Lipids and Lipid Membranes. *Lipid-Protein Interactions*, 53–70. doi:10.1007/978-1-4939-9512-7_3.
- ⁵⁶ Budvytyte, R., Valincius, G., Niaura, G., Voiciuk, V., Mickevicius, M., Chapman, H., ... Vanderah, D. J. (2013). Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules. *Langmuir*, 29(27), 8645–8656. doi:10.1021/la401132c.
- ⁵⁷ Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W.-C., & Longo, M. L. (2009). AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), 254–266. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.021.
- ⁵⁸ Swana KW, Camesano TA, Nagarajan R. (2022) Formation of a Fully Anionic Supported Lipid Bilayer to Model Bacterial Inner Membrane for QCM-D Studies. *Membranes (Basel)*,12(6):558. doi: 10.3390/membranes12060558..
- ⁵⁹ M. Joshua, G. Cheng, E.V. (2023) Lau, Soft matter analysis via atomic force microscopy (AFM): A review, *Applied Surface Science Advances*, Volume 17, 100448, <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100448>.
- ⁶⁰ Alexandros Ch. Lazanas, Mamas I. Prodromidis, *Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial*, *ACS Meas. Sci. Au* 2023, 3, 3, 162–193, <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresci.2c00070>.
- ⁶¹ Higgins, R. J. (1976). Fast Fourier transform: An introduction with some minicomputer experiments. *American Journal of Physics*, 44(8), 766. doi:10.1119/1.10128.
- ⁶² C. Lyu, H. Liu, W. Luo, T. Zhang and W. Zhao, "A Fast Time Domain Measuring Technique of Electrochemical Impedance Spectroscopy Based on FFT," 2018 Prognostics and System Health Management Conference (PHM-Chongqing), Chongqing, China, 2018, pp. 450-455, doi: 10.1109/PHM-Chongqing.2018.00083.
- ⁶³ Tucker-Schwartz, A. K., Farrell, R. A., & Garrell, R. L. (2011). Thiol-ene Click Reaction as a General Route to Functional Trialkoxysilanes for Surface Coating Applications. *Journal of the American Chemical Society*, 133(29), 11026–11029. doi:10.1021/ja202292q.
- ⁶⁴ I. Gabriūnaitė, G. Valinčius, A. Žilinskas, A. Valiūnienė. Membrane Formation on Silanized Fluorine Doped Tin Oxide Surface.
- ⁶⁵ Gabriūnaite, I., Valincius, G., Žilinskas, A., & Valiūnienė, A. (2022). "Tethered Bilayer Membrane Formation on Silanized Fluorine Doped Tin Oxide Surface." *Journal of The Electrochemical Society*, 169(3), 037515. DOI: 10.1149/1945-7111/ac5c96.
- ⁶⁶ I. McGillivray, D.J.; Valincius, G.; Vanderah, D.J.; Febo-Ayala, W.; Woodward, T.J.; Heinrich, F. Kasianowicz, J.J.; Losche, M. Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases*. 2, 21-32 (2007).
- ⁶⁷ Kerner, Z., & Pajkossy, T. (1998). Impedance of rough capacitive electrodes: the role of surface disorder. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 448(1), 139–142. doi:10.1016/s0022-0728(98)00025-4.
- ⁶⁸ McGillivray, D. J., Valincius, G., Vanderah, D. J., Febo-Ayala, W., Woodward, J. T., Heinrich, F., ... Lösche, M. (2007). Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases*, 2(1), 21–33. doi:10.1116/1.2709308.
- ⁶⁹ Kwak, K. J., Valincius, G., Liao, W.-C., Hu, X., Wen, X., Lee, A., ... Lee, L. J. (2010). Formation and Finite Element Analysis of Tethered Bilayer Lipid Structures. *Langmuir*, 26(23), 18199–18208. doi:10.1021/la1021802.
- ⁷⁰ Valincius, G., Meškauskas, T., & Ivanauskas, F. (2011). Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes. *Langmuir*, 28(1), 977–990. doi:10.1021/la204054g.
- ⁷¹ Valincius, G., & Mickevicius, M. (2015). Tethered Phospholipid Bilayer Membranes. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 27–61. doi:10.1016/bs.adplan.2015.01
- ⁷² Tomas Raila, Filipas Ambrulevicius, Tadas Penkauskas, Marija Jankunec, Tadas Meškauskas, David J. Vanderah, Gintaras Valincius. Clusters of protein pores in phospholipid bilayer membranes can be identified and characterized by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*. Vol. 364, 137179 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137179>.
- ⁷³ Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00012.
- ⁷⁴ Ambrulevičius F, Valinčius G. Electrochemical impedance spectrum reveals structural details of distribution of pores and defects in supported phospholipid bilayers. *Bioelectrochemistry*. 2022 Aug;146:108092. doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108092. Epub 2022 Mar 11. PMID: 35367931.