

UNIVERZA V LJUBLJANI

Fakulteta za elektrotehniko

Peter Kramar

Meritev porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja

MAGISTRSKO DELO

Mentorica: doc. dr. Alenka Maček Lebar

Ljubljana, 2005

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Alenki Maček Lebar, univ. dipl. inž. el., za koristne nasvete in usmerjanje pri pisanju magistrskega dela.

Za krmarjenje med podiplomskim študijem in delom na projektu se iskreno zahvaljujem študijskemu mentorju in „šefu” prof. dr. Damijanu Miklavčiču, univ. dipl. inž. el.

Hvala vsem sodelavcem iz Laboratorija za biokibernetiko, ki so s svojim vzdušjem pripomogli k nastajanju magistrskega dela.

Zahvala gre tudi mami in ženi Andreji.

Kazalo

1	Uvod	5
2	Merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	13
2.1	Kapacitivnost (C)	13
2.2	Debelina lipidnega dvosloja (d)	16
2.3	Upornost (R) oziroma prevodnost (G)	17
2.4	Merjenje nastanka por in pretok snovi (Ψ)	18
2.5	Porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja (U_{br})	19
2.6	Analiza merjenj lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	19
3	Sistemi za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	23
3.1	Napetostno vzbujanje	24
3.1.1	Pravokotna oblika signalov	24
3.1.2	Sinusna oblika signalov	29
3.2	Tokovno vzbujanje	33
3.3	Pregled sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	35
4	Merjenje porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja z linearno naraščajočim signalom	37
4.1	Materiali in metode	39
4.1.1	Sistem za elektroporacijo lipidnih dvoslojev	39
4.1.2	Priprava raztopin	40
4.1.3	Merilni protokol	41
4.1.4	Določitev življenjske dobe ravninskega lipidnega dvosloja	43
4.1.5	Statistika	44
4.2	Rezultati	45
4.3	Razprava	46
5	Zaključek	49

A Tabela pregleda sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	57
B Tabela lipidnih molekul	61
C Pregled izmerjenih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev	65

Povzetek

Lipidne molekule so v naravi poglavitni del celične membrane tako rastlinskih kot živalskih celic. Sestavljene so iz polarne hidrofilne glave in nepolarne hidrofobne repa. Zaradi njihovih fizikalnih lastnosti in enostavnosti lahko tvorijo široko paleto struktur: enoslojev, dvoslojev, večslojev, veziklov in micel. V tako širokem spektru lipidnih struktur smo se omejili na opazovanje ravninskih lipidnih dvoslojev, ki jih z obeh strani obdaja vodna raztopina.

Lastnosti, ki jih opazujemo na ravninskem lipidnem dvosloju, so: kapacitivnost, debelina, upornost oziroma prevodnost, pretok snovi in porušitvena napetost. Vsaka lastnost zahteva svoj princip merjenja. Signale, s katerimi ravninski lipidni dvosloj vzbujamo, delimo na napetostne in tokovne.

Kadar raziskujemo pojav elektroporacije v biomedicini in biotehnologiji, je porušitvena napetost ena izmed pomembnejših lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Znano je, da je porušitvena napetost odvisna od sestave ravninskega lipidnega dvosloja in koncentracije okoliškega elektrolita ter od trajanja izpostavitve električnemu polju.

Najpogosteje uporabljen protokol za merjenje porušitvene napetosti je vzbujanje ravninskega lipidnega dvosloja s pravokotnimi napetostnimi signali. Napetost prvega pulza je nizka, tako da še ne poruši ravninskega lipidnega dvosloja. Vsak naslednji pulz, ko ravninski lipidni dvosloj še ni porušen, povečamo za izbran napetostni korak. Amplitudi pulza, pri katerem se ravninski lipidni dvosloj poruši, pravimo porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja. Pri uporabi takšnega protokola število pulzov, ki jih dovedemo na ravninski lipidni dvosloj, ni vnaprej znano. Ravno tako ni znano, kolikšen bo vpliv seštevek vseh signalov, ki ga definiramo kot pred-izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja.

V svojem magistrskem delu sem želel poiskati metodo, s katero bi omejil vlogo pred-izpostavitve ter naključnosti življenjskega časa ravninskega lipidnega dvosloja in mu določiti „pravo“ porušitveno napetost.

Predlagal sem merilni protokol, ki je sestavljen iz dveh korakov. V prvem koraku izmerimo kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja s pravokotnim pulzom nizke napetosti. Le-ta mora biti dovolj nizka, da ravninskega lipidnega dvosloja ne porušimo. V

drugem koraku izmerimo porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja z linearno naraščajočim signalom.

Rezultati kažejo, da sta porušitvena napetost in življenjska doba ravninskega lipidnega dvosloja odvisni od naklona linearno naraščajočega napetostnega signala. Pri manjšem naklonu signala je ravninski lipidni dvosloj dalj časa pred-izpostavljen električnemu polju in ima nižjo porušitveno napetost. Ob večjem naklonu je ravninski lipidni dvosloj izpostavljen električnemu polju krajši čas, izmerjena porušitvena napetost pa je višja. Linearno naraščajoč napetostni signal povzroči, da se deformacije, ki nastanejo na membrani zaradi električnega polja, ne povrnejo v prvotno stanje, temveč se proces konča z porušitvijo ravninskega lipidnega dvosloja.

Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami, ki so jih dobili z molekularno dinamičnimi modeli ravninskih lipidnih dvoslojev. Prav tako so primerljivi s poizkusi na veziklih, kjer so namesto porušitvene napetosti opazovali mehansko trdnost lipidnega dvosloja ob linearnem naraščanju tlaka.

Abstract

Lipid molecules are an important part of the cell membrane. They are composed of polar hydrophobic heads and nonpolar hydrophilic tails. Due to physical properties and simplicity they can build a wide spread of self assembly systems such as: monolayer, bilayer, vesicles and micelles. We studied planar lipid bilayer surrounded by water solution from both sides.

The properties studied on planar lipid bilayer were: capacity, thickness, conductivity, resistivity, fluctuations and voltage breakdown. Each property demands its own measurement principal. The signal used, are voltage clamp or current clamp.

Voltage breakdown is one of the most important properties when studying the phenomena of electroporation in biomedicine and biotechnology.

The most common protocol for measuring voltage breakdown is using square shaped signals. The first pulse is low, so that the planar lipid bilayer does not break down. Every subsequent pulse amplitude is higher for the selected voltage step until the planar lipid bilayer is broken down. We define the amplitude, at which the planar lipid bilayer layer is broken down as the voltage breakdown of planar lipid bilayer. Using this particular protocol, the number of pulses is not known in advance. The summation of all the applied pulses before the voltage breakdown, the so called pretreatment is thus not known.

With my research, I wanted to find the method that would allow me to restrict the role of pretreatment and the coincidence of the planar lipid bilayer's lifetime, thus establishing its "true" voltage breakdown.

We suggested a new measurement protocol for determinate planar lipid bilayer voltage breakdown. According to our measuring protocol each planar lipid bilayer is exposed to a voltage signal only twice. In the first step bilayer capacitance is determined by a rectangular low voltage signal. The capacitance measurement reveals an intact planar lipid bilayer before inducing its breakdown. In the next step, the planar lipid bilayer breakdown is induced by the linearly rising voltage signal.

Our results show that the planar lipid bilayer lifetime depends on the slope of the linearly rising voltage signal and the voltage breakdown is function of the linearly rising voltage signal slope. Gently sloping voltage signal pre-treats the lipid bilayer at a relatively

lower voltages then steep voltage signal, before lipid bilayer breakdown occurs. By the linearly rising signal the deformation of the planar lipid bilayer does not reseal to its initial state, but concludes with the planar lipid bilayer breakdown.

Our results are consistent with other experiments treated in various articles. They correspond to planar lipid bilayer molecular models on and to experiments on vesicles, where linearly rising pressure was used to observe the mechanical stress on the membrane.

1 Uvod

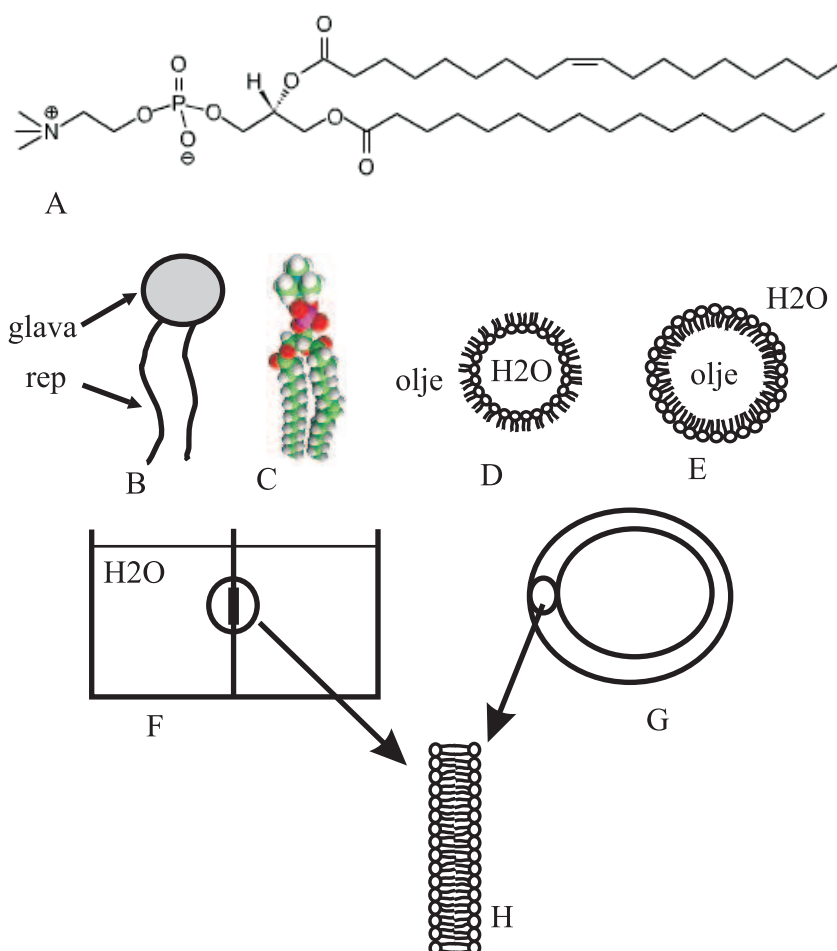
Lipidi so v naravi poglavitni del celične membrane tako rastlinskih kot živalskih celic. Lipidne molekule so sestavljene iz polarne hidrofilne glave in nepolarne hidrofobnega repa (slika 1A-C). Zato skupek molekul v vodi tvori energijsko ugodno strukturo tako, da repi nikoli niso izpostavljeni vodnim molekulam. Prav ta lastnost in njihova preprostost jim omogoča uporabnost na različnih področjih kot so biologija, kemija, fizika in medicina. Obstaja široka paleta lipidnih struktur: enoslojev (slika 1D,E), dvoslojev (slika 1F-H), večslojev, zaprtih dvoslojev oziroma veziklov (slika 1G) in zaprtih enoslojev oziroma micel (slika 1D,E) ter veliko različnih sistemov za tvorjenje teh struktur, saj jih lahko tvorimo v različnih okoljih (tabela 1). Nekaj v eksperimentalnih študijah najpogosteje uporabljenih lipidnih molekul smo zbrali v dodatku B.

Tabela 1. Lipidne strukture in okolja v katerih jih tvorimo [1].

ime lipidne strukture	vmesniki
1. milni filmi	zrak milnica zrak
2. lipidni enosloji	zrak plast lipidov voda
3. miceli (voda v olju)	voda plast lipidov olje
miceli (olje v vodi)	olje plast lipidov voda
4. večsloji	zrak plasti molekul voda
5. ravninski lipidni dvosloj	voda lipidni dvosloj voda
6. liposomi, vezikli	voda lipidni dvosloj voda
7. lipidni enosloj na zlatu	zrak plast lipidov zlato
8. lipidni dvosloj na kovini	voda lipidni dvosloj kovina
9. lipidni dvosloj na gelu	voda lipidni dvosloj vodni gel
10. vezani lipidni dvosloj	zlato vezne molekule lipidni dvosloj

Leta 2001 je bila 40. obletnica prve uspešne postavitve ravninskega lipidnega dvosloja kot modela celične membrane [2]. Vendar se je zgodovina lipidnih dvoslojev začela že mnogo pred tem. Eden prvih mejnikov v zgodovini je bilo leto 1672, ko je Robert Hooke, fizik, ki je dal ime „celici“ in je znan predvsem po preučevanju elastičnih lastnosti snovi, opazoval črne lise na milnih mehurčkih in filmih. Raziskovanje umetnih membran je potekalo vzporedno z odkrivanjem lastnosti bioloških celic, odkritjem osmoze in preučevanju gibanja snovi skozi membrano. Odkrili so tudi, da ima membrana rdečih krvnih telesc izredno visoko električno upornost. Leta 1925 je bila prvič izmerjena kapacitivnost mem-

brane rdečih krvnih teles. Kopica zanimivih lastnosti, ki jih ima biološka membrana, je botrovala nastanku različnih merilnih sistemov, namenjenih določanju teh lastnosti. V devetdesetih letih so veliko časa posvetili kemični strukturi umetnih membran. Preučevali so vplive različnih koncentracij lipidnih molekul na kapacitivnost lipidnih dvoslojev, njihovo prevodnost ter stabilnost. Poleg tega so preučevali vplive različnih koncentracij soli v okoliški vodni raztopini na stabilnost lipidnega dvosloja ter obnašanje lipidnega dvosloja pri različnih temperaturah. V kasnejših raziskavah so dodajali ravninskemu lipidnemu dvosloju različne molekule, ki so njegove lastnosti spremenile.



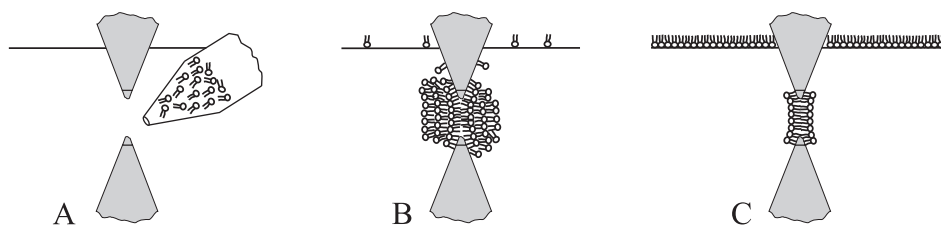
Slika 1. A) Kemična struktura lipidne molekule POPC. B) Shema lipidne molekule. C) Model lipidne molekule POPC. D) Micela (voda v olju). E) Micela (olje v vodi). F) Ravninski lipidni dvosloj tvorjen v komori. G) Liposom. H) Lipidni dvosloj [1, 3–5].

Celična membrana in membrane celičnih organelov so v večini sestavljene iz lipidnih

dvoslojev, v katerem so tudi proteinske molekule. Zaradi oblike celice je težko meriti lastnosti membrane, saj bi morali posegati v notranjost celice ali celo celične strukture. Umeten lipidni dvosloj je sicer preprost, a velikokrat zadovoljiv model celične membrane. Tvorimo lahko vezikle ali liposome, katerih oblika je podobna celici, vendar je zgradba membrane v obeh primerih zelo poenostavljena v primerjavi s pravo celično membrano (slika 1G). Druga možnost je ravninski lipidni dvosloj, ki si ga lahko predstavljamo kot del membrane. Poglavitna prednost ravninskega lipidnega dvosloja je, da je med merjenjem dostopen z obeh strani.

Z širokega nabora lipidnih struktur smo se omejili na opazovanje ravninskih lipidnih dvoslojev. Ravninske lipidne dvosloje običajno pripravimo v posebni komori, ki je sestavljena iz dveh prekatov. Prekata ločuje teflonska folija, v kateri je majhna luknjica s premerom od 0,1 do 1 mm. Na rob luknjice napnemo ravninski lipidni dvosloj z eno od naslednjih metod: metodo barvanja, metodo dvigovanja gladine ali metodo potopitve konice [6, 7].

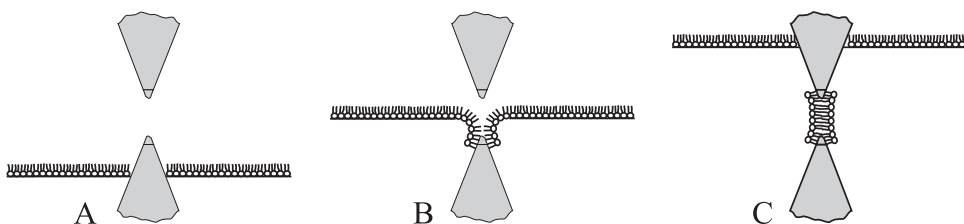
Metoda barvanja (*ang. painted bilayer*) ali Muller - Rudinova metoda se je razvila med prvimi. Vodna raztopina soli je pripravljena v komori, s pipeto pa nanesemo (obarvamo) lipide na teflonsko folijo, ki ločuje prekata komore (slika 2A). V začetku so lipidne molekule združene v veliko gmoto (slika 2B), sčasoma pa se enakomerno porazdelijo po teflonski foliji in na luknjici nastane ravninski lipidni dvosloj (slika 2C).



Slika 2. Metoda barvanja. A) Komora z vodo in nanos lipidov na teflonsko folijo, ki deli prekata komore. B) Gmota nanešenih lipidov se enakomerno razporedi po teflonski foliji, odvečni odplavajo na gladino. C) Po določenem času nastane lipidni dvosloj.

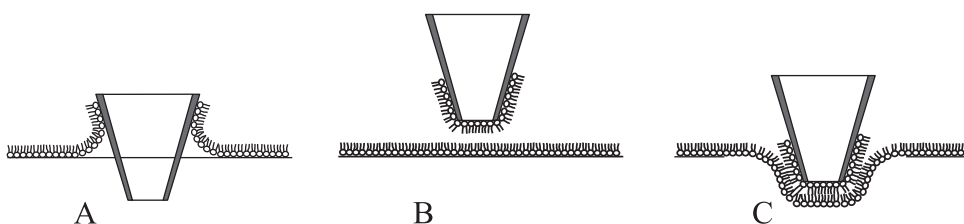
Metoda dvigovanja gladine (*ang. folded bilayer*) oziroma Montal - Mullerjeva metoda je ena od najpogostejših metod za preučevanje lipidnih dvoslojev. Oba prekata komore napolnimo z vodno raztopino soli pod nivojem luknjice v teflonski foliji. Na gladino obeh

prekatov nanese lipidne molekule in počakamo, da se enakomerno porazdelijo po gladini (slika 3A). Obe gladini nato sočasno dvignemo tako, da je luknjica potopljena v tekočini (slika 3B). Na luknjici v teflonski foliji tako nastane lipidni dvosloj (slika 3C). Prednost te metode pred metodo barvanja je predvsem v tem, da lahko s spuščanjem in dviganjem gladine v prekatih tvorimo lipidne dvosloje enega za drugim, brez daljšega čakanja.



Slika 3. Metoda dviganja gladine. A) Gladino vode postavimo tik pod luknjico v teflonski foliji. Na površino nanese lipidne molekule in počakamo, da se porazdelijo enakomerno po gladini. B) V obeh prekatih enakomerno dvignemo gladino vode. C) Na luknjici teflonske folije tvorimo lipidni dvosloj.

Pri metodi potopitve konice (*ang. Tip-Dip bilayer*) potrebujemo kopel, v katero potopimo cevko premera nekaj milimetrov. Na gladino vodne raztopine soli nanese lipidne molekule, ki se porazdelijo po celotni gladini in na rob cevke (slika 4A). Ko cevko, dvignemo iz kopeli, na njej nastane lipidni enosloj, nato počakamo nekaj časa, da se molekule lipidov na gladini ponovno razporedijo (slika 4B). Ko cevko ponovno potopimo, nastane na njeni konici ravninski lipidni dvosloj (slika 4C).



Slika 4. Metoda potopitve konice. A) V kopel potopimo ozko cevko in nanese molekule lipidov. B) Cevko dvignemo, C) in jo ponovno potopimo, tako da se na njej tvori ravninski lipidni dvosloj.

Če želimo uporabiti ravninski lipidni dvosloj kot model celične membrane, se moramo zavedati razlik med lastnostmi lipidnih dvoslojev ter lastnostmi biološke membrane. V tabeli 2 so zapisana območja vrednosti, ki smo jih za različne lastnosti biološke membrane

in lipidnih dvoslojev zasledili v literaturi. Zanimive lastnosti tako celične membrane kot ravninskega lipidnega dvosloja so predvsem njegova debelina, transmembranska napetost, električna upornost oziroma prevodnost membrane, porušitvena napetost in kapacitivnost membrane.

Tabela 2. Primerjava lastnosti različnih bioloških membran ter lipidnih dvoslojev [3, 4].

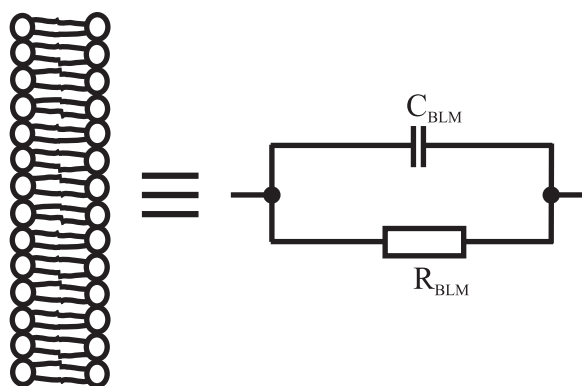
lastnost -metoda	biološka membrana	lipidni dvosloj
debeline (nm)		
-elektronska mikroskopija	4 - 13	9 - 6
-odklon rendgenskega valovanja	4 - 8,5	—
-optične metode	—	4 - 8
-s kapacitivnostjo (ob predpostavki vrednosti dielektrične konstante)	3 -15	4 - 13
transmembranska napetost (mV)	10 - 88	0 - 140
specifična upornost (Ωcm^2)	$10^2 - 10^5$	$10^3 - 10^9$
porušitvena napetost (mV)	$10^5 - 10^6$	100 - 550
specifična kapacitivnost ($\mu F/cm^2$)	0,5 - 1,3	0,3 - 1,3
indeks svetlobne odbojnosti	okoli 1,6	1,37 -1,66
natezna napetost ($\mu J/cm^2$)	0,3 - 30	2 - 60

Lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev večinoma določamo z meritvijo toka oziroma napetosti preko ravninskega lipidnega dvosloja ali z optičnim opazovanjem, kjer opazujemo odklon žarka ter absorpcijo svetlobe v ravninskem lipidnem dvosloju. Obe vrsti meritev lahko med seboj tudi kombiniramo.

Omenjeni načini merjenja so osnova za opazovanje tako enostavnih ravninskih lipidnih dvoslojev kot tudi dvoslojev, ki smo jim dodali različne molekule ter na ta način spremenili njihovo kapacitivnost, prevodnost ali stabilnost [8, 9]. V ravninski lipidni dvosloj lahko vgradimo tudi proteine, ki delujejo kot senzor za opazovanje prehoda molekul skozi membrano. Sestavo ravninskega lipidnega dvosloja lahko izberemo poljubno in jo s tem približamo sestavi prave celične membrane [1]. Na takem preprostemu modelu lahko tudi preučujemo, kako na celično membrano vplivajo elektromagnetna valovanja [10]. Ravninske lipidne dvosloje pa je mogoče uporabiti tudi kot enostaven model tankih plasti

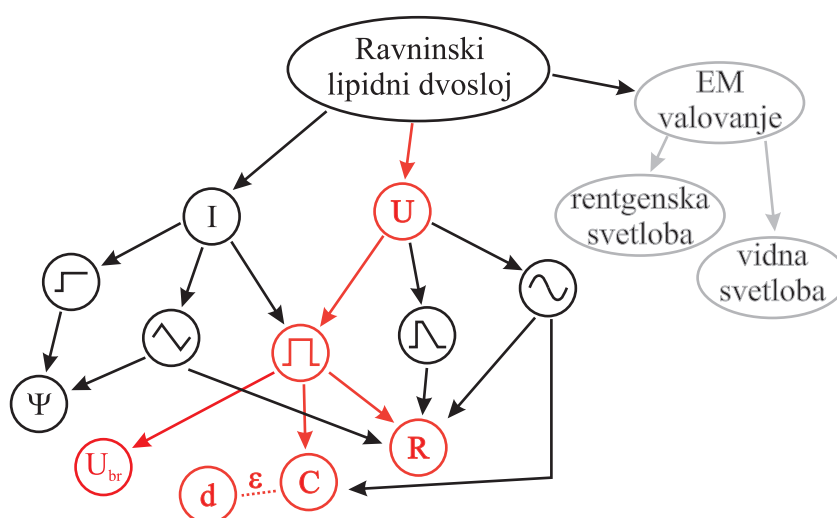
[11].

V nadaljevanju se bomo osredotočili na opazovanje ravninskih lipidnih dvoslojev in določanje njihovih lastnosti na podlagi meritev napetosti in toka. Ravninski lipidni dvosloj namreč lahko predstavimo s preprostim električnim vezjem (slika 5). Napetostno ali tokovno vzbujanje tega preprostega vezja je lahko osnova za izračun vrednosti njegovih elementov, ki določajo lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja.



Slika 5. Nadomestno vezje ravninskega lipidnega dvosloja.

Pri pregledovanju lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev smo se osredotočili na metode merjenja kapacitivnosti, upornosti, debeline in porušitvene napetosti. Za merjenje posamezne veličine namreč lahko uporabimo različne pristope, s katerimi se znanje o določenem ravninskem lipidnem dvosloju dopolnjuje. Natančneje smo se seznanili z napetostnim in tokovnim vzbujanjem ravninskih lipidnih dvoslojev. Zanimalo nas je, s kakšnimi oblikami signalov se srečujemo pri posameznem vzbujanju ter katere lastnosti lahko z njimi opazujemo (slika 6).



Slika 6. Pregled različnih načinov določanja lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. I predstavlja tokovno vzbujanje in U napetostno vzbujanje. Oblika signala vzbujanja je narisana v krožcu. S takimi vzbujanji lahko merimo veličine kot so pretok snovi (ψ), porušitveno napetost (U_{br}), debelina (d), kapacitivnost (C) in upornost (R). Z rdečo je obarvan signal vzbujanja ter vrsta meritev, ki jih lahko opravimo v Laboratoriju za biokibernetiko.

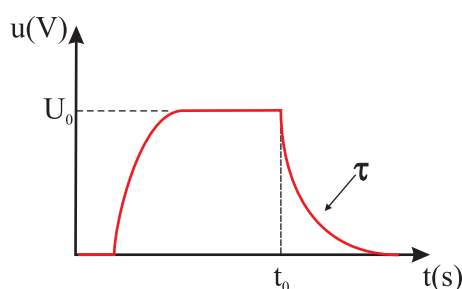
2 Merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Skozi zgodovino so sisteme za opazovanje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev spreminjali. Izboljševali so principe merjenja, napredovala je natančnost merilnih instrumentov. Poleg merilnih instrumentov so razvijali tudi komore, v katerih so tvorili ravninske lipidne dvosloje. Pregled sistemov sem pričel z letom 1971, deset let po prvi postavitvi ravninskega lipidnega dvosloja. V tem času je izzvenela doba pionirskih sistemov in poizkusov.

2.1 Kapacitivnost (C)

V literaturi zasledimo tri različne metode merjenja kapacitivnosti: merjenje časovne konstante razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja, z izmenično napetostjo sinusne oblike in s kapacitivnostno časovnim pretvornikom. Pri vseh treh metodah izmerjeno kapacitivnost normiramo na površino lipidnega dvosloja. Tako dobljeno specifično kapacitivnost namreč lahko primerjamo med različnimi avtorji.

Najpogosteje je kapacitivnost izmerjena na podlagi meritve časovne konstante razelektritve ravninskega lipidnega dvosloja [8, 9, 12–17]. Ravninskemu lipidnemu dvosloju vsilimo napetost izbrane velikosti. Naboj, ki se pri tem nabere na lipidnem dvosloju, je $Q(t) = CU(t)$. Ob času t_0 , ko je pulza konec, se naboj razelektri preko upora, katerega upornost poznamo. Razelektritev ravninskega lipidnega dvosloja lahko opazujemo z osciloskopom (slika 7).



Slika 7. Merjenje kapacitivnosti lipidnega dvosloja z razelektritvijo.

Napetost na ravninskem lipidnem dvosloju $u(t)$ se ob razelektritvi s časom spreminja kot:

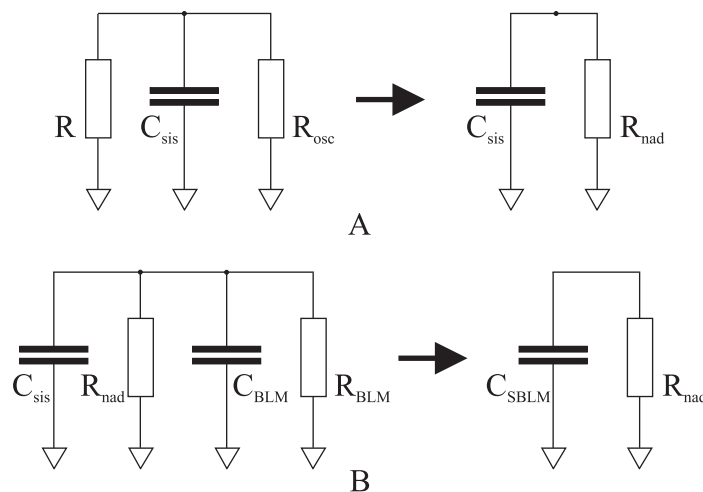
$$u(t) = U_0 e^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (1)$$

U_0 je velikost vsiljene napetosti; τ časovna konstanta, ki je odvisna od kapacitivnosti (C) in upornosti lipidnega dvosloja ter merilnega sistema (R),

$$\tau = R \cdot C. \quad (2)$$

Če poznamo upornost merilnega sistema in je ta mnogo manjša od upornosti ravninskega lipidnega dvosloja ($\sim 10^8 \Omega$), lahko kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja določimo z meritvijo, ki je sestavljena iz dveh delov. Najprej izmerimo kapacitivnost sistema (C_{sis}) brez ravninskega lipidnega dvosloja, v drugem delu pa kapacitivnost sistema z lipidnim dvoslojem (C_{SBLM}). Kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja C_{BLM} je razlika obeh izmerjenih kapacitivnosti (slika 8):

$$C_{BLM} = C_{sis} - C_{SBLM}. \quad (3)$$



Slika 8. Nadomestni vezji pri merjenju kapacitivnosti v dveh korakih. A) Nadomestno vezje sistema brez ravninskega lipidnega dvosloja. B) Nadomestno vezje sistema in ravninskega lipidnega dvosloja. Pri obeh vezjih upornost lipidnega dvosloja lahko zanemarimo, ker je mnogo večja od upornosti sonde osciloskopa in upora.

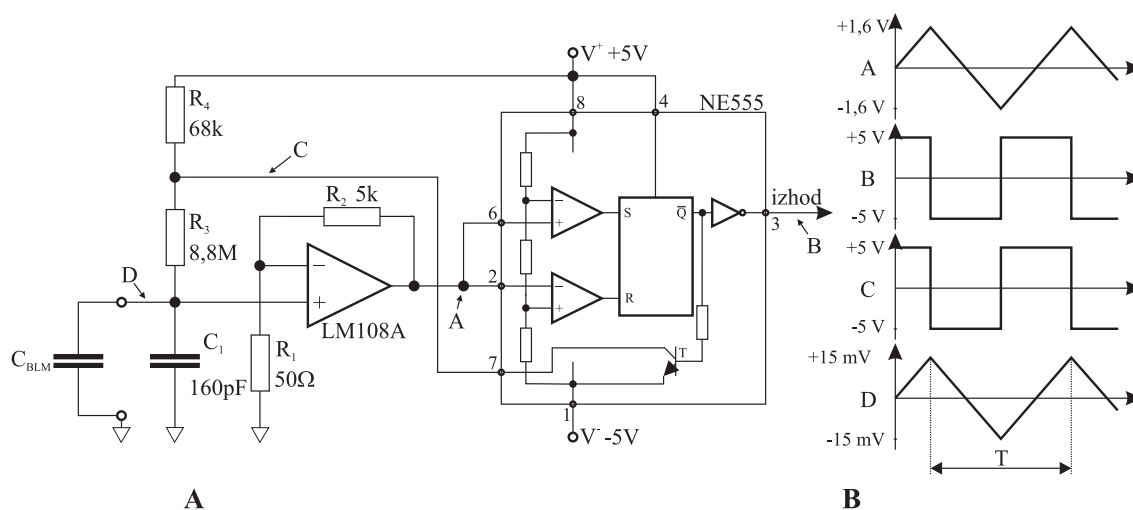
Metoda je najpogostejša zato, ker je njena izvedba preprosta; potrebujemo le napetostni vir, hitro stikalo in spominski osciloskop za opazovanje.

Kapacitivnost je mogoče meriti tudi z izmenično napetostjo [18–20]. Z uporabo sinu- snega signala amplitude 2 mV in frekvence 1 kHz se spremeni karakteristika nadomestnega vezja ravninskega lipidnega dvosloja (slika 5). Zaradi visoke frekvence teče celoten tok preko kondenzatorja; upornost je zanemarljiva. Usmerjena izhodna napetost se spreminja v odvisnosti od vrednosti kapacitivnosti lipidnega dvosloja. Kapacitivnost lahko napremo na parabolično funkcijo [18]:

$$C_{BLM} = a \cdot \frac{V_{1h}}{b - V_{1h}}, \quad (4)$$

pri čemer je V_{1h} izhodna usmerjena napetost, a in b pa sta parametra, ki ju določimo s predhodno meritvijo spektra znanih kapacitivnosti.

Kapacitivnost lahko merimo tudi tako, da vrednost kapacitivnosti pretvorimo v periodo [21]. S časovnim vezjem enakomerno nabijemo lipidni dvosloj do neke napetostne vrednosti, po tem ko jo dosežemo, pa ravninski lipidni dvosloj praznimo. Tak periodičen pojav nam na izhodu vezja da pravokotni signal s svojo periodo, ki je odvisna od kapacitivnosti lipidnega dvosloja (slika 9).



Slika 9. A) Vezje za transformacijo kapacitivnosti v periodo. B) Potek signalov na posamezni točki v vezju [21].

Kondenzator C_{BLM} predstavlja kapacitivnost lipidnega dvosloja. Na kondenzatorju merimo napetost v točki D in jo ojačimo z operacijskim ojačevalnikom. Le-ta ima ojačanje k določeno z uporoma R_1 in R_2 :

$$k = \frac{R_1 + R_2}{R_1}. \quad (5)$$

Izhod ojačevalnika je pripeljan v integrirano vezje NE555. V integriranem vezju imamo dva napetostna primerjalnika, ki imata na vhidih merjeno napetost v točki A, na drugem vhodu pa razdeljeno napetost, ki gre preko delilnika treh uporov. Glede na nivo napetosti se preklopi izhod na RS celici. Izhod iz celice invertiramo, rezultat pa je pravokotni signal, kateremu zlahka izmerimo periodo. Napetost na lipidnem dvosloju lahko izrazimo z enačbo

$$U_{BLM} = \frac{2}{3}V \frac{1}{k} = \frac{2 \cdot V \cdot R_1}{3(R_1 + R_2)}, \quad (6)$$

kjer je $V = V^+ = |V^-|$ simetrično napajanje vezja.

Merjenje kapacitivnosti razdelimo v dve fazi. Prva faza je polnjenje kondenzatorja, kjer teče tok iz napajalnika preko uporov R_4 in R_3 v kondenzator. Tranzistor T je zaprt. V drugi fazi se zaradi preklopa RS celice tranzistor T odpre in kondenzator se razelektri. Tok teče preko upora R_3 in tranzistorja T v negativni pol napajanja. Zaradi ohranjanja energije velja, da je produkt napetosti in časa v eni periodi enak:

$$T \cdot V = U_{BLM} (R_3 + R_4) C_{BLM} + U_{BLM} R_3 C_{BLM}. \quad (7)$$

Če v vezju izberemo vrednost upora $R_3 \gg R_4$, lahko v enačbi (7) zanemarimo upornost R_4 . Periodo polnenja in praznenja kondenzatorja lahko izrazimo kot:

$$T = \frac{2U_{BLM}R_3C_{BLM}}{V}. \quad (8)$$

2.2 Debelina lipidnega dvosloja (d)

Debelino lipidnega dvosloja (d) določimo neposredno iz kapacitivnosti. Iz literature je znano, da je dielektrična konstanta ϵ lipidnih molekul enaka 2,1 [14]. Iz enačbe za ploščat kondenzator izrazimo debelino lipidnega dvosloja

$$d = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{A}{C_{BLM}}, \quad (9)$$

kjer je ε dielektričnost ravninskega lipidnega dvosloja, ε_0 dielektrična konstanta, A površina in C_{BLM} kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja. Če se izmerjena debelina razlikuje od standardnih vrednosti, je zelo verjetno, da v postopku priprave ni nastal lipidni dvosloj temveč več slojev. Merjenje debeline je posebej pomembno, kadar tvorimo ravninske lipidne dvosloje z metodo barvanja.

2.3 Upornost (R) oziroma prevodnost (G)

Upornost (R) oziroma prevodnost (G) lipidnih dvoslojev ponavadi določimo iz razmerja toka in napetosti. Kadar vzbujamo lipidni dvosloj z napetostjo, lahko z opazovanjem toka neposredno opazujemo prevodnost. Obratno je pri tokovnem vzbujanju, ko opazujemo upornost ravninskega lipidnega dvosloja z merjenjem napetosti. Na podlagi meritev toka in napetosti izračunamo upornost, ki je pri lipidnem dvosloju izredno velika (reda $10^8 \Omega$).

Pri pregledu literature sem opazil zanimiv sistem, v katerem ravninski lipidni dvosloj vzbujajo s sinusnim signalom amplitude od 0,1 do 1,5 V in frekvence 1 Hz. Temu signalu je prištet še sinusni signal amplitude 2 mV in frekvence 1 kHz [18–20]. Z 1 kHz signalom merijo kapacitivnost, kot sem opisal v razdelku o merjenju kapacitivnosti z izmenično napetostjo. Nadomestno vezje za tak sistem vidimo na sliki 10. Za vezje lahko zapišemo napetostni enačbi za realni in imaginarni prispevek napetosti:

$$V_1 \cos(\varphi - \varphi_1) + V_{BLM} \cos(\varphi_{BLM} - \varphi) = V_S \quad (10)$$

$$V_1 \sin(\varphi - \varphi_1) = V_{BLM} \sin(\varphi_{BLM} - \varphi). \quad (11)$$

kjer je V_S napetost vzbujanja, V_{BLM} napetost na ravninskem dvosloju, V_1 napetost na uporu in kondenzatorju znane vrednosti, φ fazni kot med tokom in napetostjo vzbujanja, φ_{BLM} fazni kot med tokom in napetostjo na ravninskem lipidnem dvosloju in φ_1 fazni kot med tokom in napetostjo na uporu in kondenzatorju znane vrednosti.

Iz dobljene kapacitivnosti lipidnega dvosloja in znanega toka izračunamo fazni kot

φ_{BLM} na lipidnem dvosloju z enačbo:

$$\omega C_{BLM} V_{BLM} = I \sin \varphi_{BLM}, \quad (12)$$

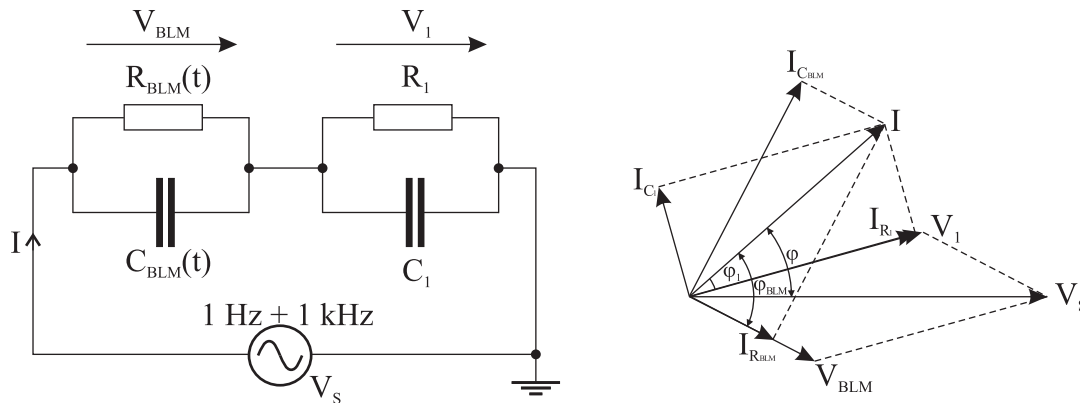
pri čemer znani tok I izrazimo z uporabo R_1 in kondenzatorjem C_1 :

$$I = V_1 \sqrt{(\omega C_1)^2 + \left(\frac{1}{R_1}\right)^2}. \quad (13)$$

Z vsemi tremi enačbami lahko izračunamo še napetost na lipidnem dvosloju V_{BLM} in fazni kot φ celotnega sistema. Prevodnost na lipidnem dvosloju dobimo z enačbo:

$$V_{BLM} = I R_{BLM} \cos \varphi. \quad (14)$$

Ta metoda merjenja nam omogoča sočasno spremljanje kapacitivnosti in upornosti skozi celoten čas meritve, tudi med spreminjanjem lastnosti lipidnega dvosloja.



Slika 10. Nadomestno vezje sistema ter kazalni diagram [18–20].

2.4 Merjenje nastanka por in pretok snovi (Ψ)

V literaturi zasledimo opis meritev pretoka snovi skozi sam ravninski lipidni dvosloj ali ob vgradnji različnih dodatkov, kot so kalcijevi kanalčki ali drugi proteini. Tako na primer vgradimo v lipidni dvosloj kalcijev kanalček. Ravninski lipidni dvosloj vzbujamo z električnim tokom in merimo napetost, na njem. Kadar je kalcijev kanalček odprt napetost na dvosloju pade; če je kanalček zaprt, pa se njena napetost na njem poveča. Na enak

način lahko opazujemo, ali so v ravninskem lipidnem dvosloju nastale pore ter ocenjujemo njihovo število in velikost [12, 18, 22–29].

2.5 Porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja (U_{br})

Z meritvijo porušitvene napetosti dobimo podatek o mehanski trdnosti in stabilnosti lipidnega dvosloja v električnem polju ali ob vsiljeni transmembranski napetosti. Porušitveno napetost običajno merimo tako, da opazujemo tok ob napetostnih pulzih, ki jih dovedemo na ravninski lipidni dvosloj. Velikost napetostnih pulzov povečujemo vse dotlej, ko zaznamo povečanje električnega toka. Električni tok je znak, da je ravninski lipidni dvosloj podrt. Amplitudo napetostnega pulza, s katerim smo ravninski lipidni dvosloj porušili, imenujemo porušitvena napetost [8]. Na tak način določena porušitvena napetost je odvisna od časa trajanja pulza ter predhodne izpostavitve ravninskega lipidnega dvosloja električnemu polju [30].

2.6 Analiza merjenj lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Ravninskim lipidnim dvoslojem lahko določamo kapacitivnost, debelino, upornost oziroma prevodnost ter porušitveno napetost. Vse lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev merimo posredno z opazovanjem toka, napetosti ali spremembe optičnih lastnosti. Za opazovanje lastnosti moramo ravninski lipidni dvosloj vzbujati z napetostjo ali tokom. Izбира napetosti ali toka pogojuje opazovanje sprememb na ravninskem lipidnem dvosloju. Z napetostjo ravninski lipidni dvosloj običajno hitro porušimo vendar pa z napetostnim vzbujanjem merimo kapacitivnost. Tokovno vzbujanje ravninski lipidni dvosloj ne poruši tako hitro zato je primeren za opazovanje dinamičnih sprememb na ravninskem lipidnem dvosloju.

Najpomembnejša lastnost, ki jo na ravninskem lipidnem dvosloju merimo je kapacitivnost. V literaturi smo zasledili tri različne metode opazovanja kapacitivnosti. Največkrat uporabljena metoda je metoda razelektritve, saj je najbolj preprosta ter dovolj natančna. Dobra stran metode je tudi to, da je napetost na ravninskem lipidnem dvosloju prisotna samo med pulzom, ki običajno traja le od 10 do 100 μs . Pri obeh drugih metodah, je ravninski lipidni dvosloj izpostavljen izmenični napetosti celoten čas meritve, ki je obi-

čajno daljši. Prednost metode z izmenično napetostjo je v tem, da lahko sočasno merimo upornost in kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja. Kapacitivnost je povezana s kvaliteto ravninskega lipidnega dvosloja; primerjava vrednosti kapacitivnosti z vrednostjo navedeno v literaturi nam pove ali imamo lipidni dvosloj ali večsloj. Meritev kapacitivnosti je obvezna pred vsakim eksperimentom, metodo pa izberemo glede na nadaljne poizkuse in zanimanja.

Debelino ravninskega lipidnega dvosloja ponavadi izračunamo iz podatka o kapacitivnosti in dielektrične konstante.

Upornost oziroma prevodnost običajno preračunamo iz izmerjenega toka oziroma napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju. Kadar dovedemo na ravninski lipidni dvosloj napetost in opazujemo tok, se na ravninskem lipidnem dvosloju zaradi napetosti zgodijo hitre spremembe. Tako ponavadi lahko samo opazimo le stanje, ko tok prične teči skozi ravninski lipidni dvosloj oziroma ko se upornost ravninskega lipidnega dvosloja zmanjša. Natančen podatek o upornosti dobimo z metodo, pri kateri vzbujamo ravninski lipidni dvosloj z dvema izmeničnima napetostima in na predpostavki električnega modela dobimo sočasno podatka o upornosti in kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja.

Za pretok snovi se ponavadi uporablja enak princip merjenja kot za upornost, saj opazujemo, kolikšen tok prodira skozi ravninski lipidni dvosloj. Običajno pri opazovanju pretoka skozi ravninski lipidni dvosloj dovedemo tok, ter opazujemo napetost, ki se na njem postavi. Dovajanje toka nam zagotavlja večjo verjetnost, da se ravninski lipidni dvosloj med meritvijo ne bo porušil. Krivulja napetosti nam posredno govori o upornosti ravninskega lipidnega dvosloja in je obratno sorazmerna s prevodnostjo in s tem s pretokom snovi.

Porušitvena napetost je napetost pri kateri se ravninski lipidni dvosloj poruši zaradi napetostnega stresa. Najpogostejši princip določanja porušitvene napetosti je s pravokotnim napetostnim signalom. Meritev začnemo z nizko napetostjo, ki jo v korakih povečujemo do vrednosti, s katero ravninski lipidni dvosloj porušimo. Iz literature je znano, da pred-izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja napetosti vpliva na njegovo porušitveno napetost.

V svojem magistrskem delu sem želel poiskati metodo, s katero bi omejil vlogo pred-

izpostavitve ter naključnosti življenjskega časa ravninskega lipidnega dvosloja in mu določiti „pravo“ porušitveno napetost.

3 Sistemi za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

V tem poglavju sem zbral osnovne merilne principe različnih sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev, ki so opisani v literaturi. V splošnem velja, da je vsak novejši sistem vsaj deloma izpeljanka starejšega, že obstoječega sistema. Sisteme sem poimenoval po prvih avtorjih znanstvene publikacije. Kadar je idejno isto zasnovano sistema objavilo več prvih avtorjev, sem tudi ime sistema sestavil.

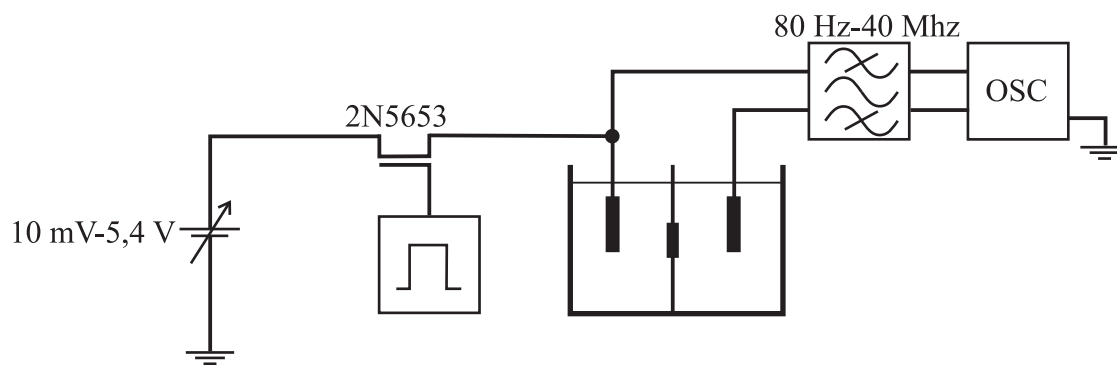
Sisteme sem glede na vzbujanje ravninskega lipidnega dvosloja razdelil na napetostno in tokovno. Sisteme z napetostnim vzbujanjem sem dodatno razdelil še glede na obliko vzbujalnega signala. Opisal sem zgradbo vsakega sistema, uporabljeno metodo merjenja ter navedel poizkuse, ki so jih avtorji opravili. Za lažjo primerjavo sem podatke o sistemih zbral v tabeli, ki se nahaja v dodatku A. Tabela vsebuje ime sistema, oznako navedene publikacije, tip vzbujalnega signala in podatke o poizkusih, ki so jih avtorji izvedli, kot: uporabljene lipidne molekule, vodne raztopine, volumni lipida, volumen komore, število in vrsta elektrod, premer ali površina luknjice ter temperatura med poizkusi. Za primerjavo izmerjenih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev zgrajenih iz različnih lipidnih molekul ali njihovih mešanic, sem sestavil tabelo v dodatku C. Tabela vsebuje podatke o lipidnih molekulah, koncentracijah vodnih raztopin, oblikah vzbujalnega signala in trajanju pravokotnega signala (če je le-ta podan), izmerjeni porušitveni napetosti, specifični kapacitivnosti normirani na površino, specifični upornosti normirani na površino, debelini ravninskega lipidnega dvosloja ter oznako navedene publikacije.

3.1 Napetostno vzbujanje

3.1.1 Pravokotna oblika signalov

Sistem Benz

Sistem je bil objavljen leta 1976 [14, 17]. To je eden najpreprostejših sistemov za opazovanje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. Sestavljen je iz generatorja enosmerne napetosti v območju 10 mV do 5,4 V, stikala in baterijskega pulznega generatorja. Stikalo je realizirano s hitrim FET tranzistorjem 2N5653. Napetostni odziv lipidnega dvosloja so merili s spominskim osciloskopom Tektronix 7633, pasovno širino odziva pa so omejili s pasovnim ojačevalnikom v pasu od 80 Hz do 40 MHz. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.



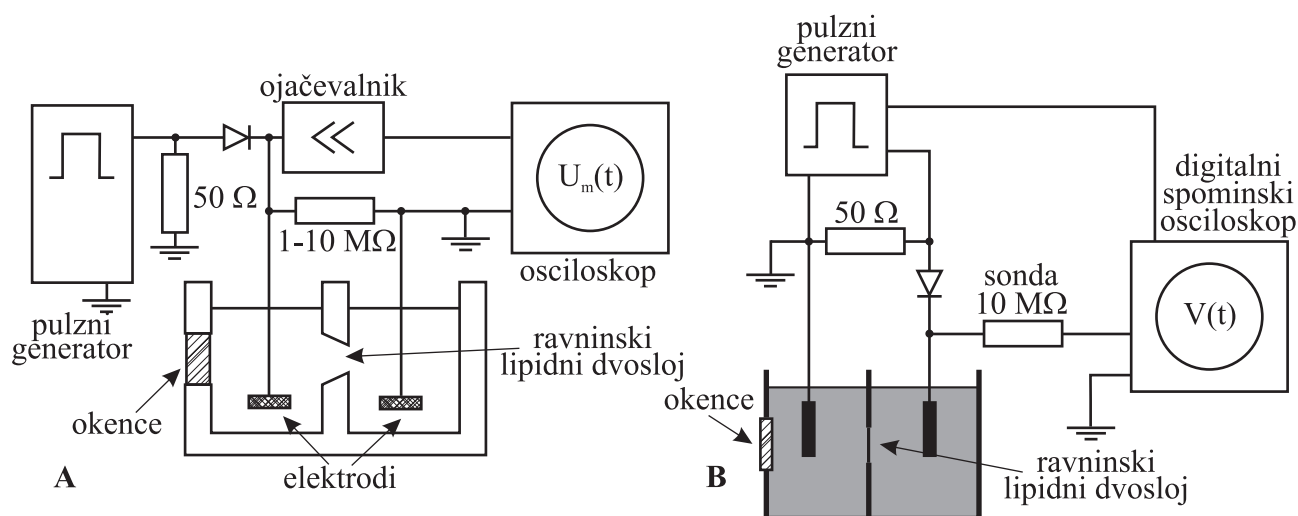
Slika 11. Sistem Benz. Shemo sem narisal po opisu iz literature [14, 17].

V svojih zaključkih so podali kapacitivnosti in porušitvene napetosti različnih ravninskih lipidnih dvoslojev, kot tudi vpliv različnih koncentracij solne raztopine na njihovo kapacitivnost in porušitveno napetost.

Benz-Zimmermann-Winterhalter

Sistem je bil prvič opisan leta 1979 [17]. Je eden najbolj pogosto uporabljenih sistemov, pri katerem uporabljamo napetostno vzbujanje s pravokotnimi signali. Dioda, ki je med izhodom generatorja in elektrodo, pomaga, da se naboj na lipidnem dvosloju izprazni samo preko osciloscopa; tako dioda služi kot stikalo. Sistem je izredno preprost, zato je tudi tako široko uporabljen. Skozi zgodovino so se spreminjali signalni generatorji ter osciloskopi. Sistem sem nazadnje zasledil v članku leta 2001 [24]. Natančni podatki so

zbrani v dodatkih A in C.



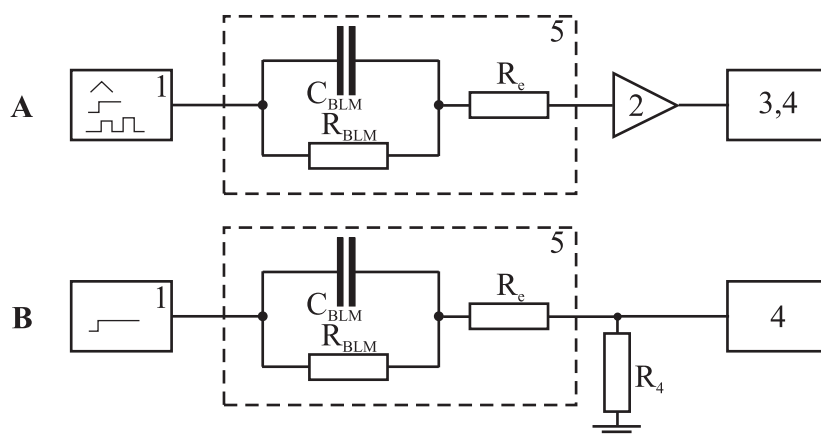
Slika 12. Sistem Benz-Zimmermann-Winterhalter. A) Starejša izvedba sistema [16, 17, 26, 31]. B) Novejši sistem [12, 13, 24].

S sistemom Benz-Zimmermann-Winterhalter so preučevali vpliv koncentracije soli v vodni raztopini ter temperature na porušitveno napetost [17]. Opazovali so tok skozi ravninski lipidni dvosloj in s tem ugotavljali, kako velika je koncentracija por v njem [24, 26, 31]. Naredili so tudi model, ki predpostavlja eno poro v ravninskem lipidnem dvosloju in glede na spremembo toka izračunali hitrost, s katero se pora odpira [12, 13, 16].

Sistem Abidor-Chernomordik-Chizmadzev-Pastushenko

Sistem je bil prvič omenjen leta 1979 [30]. Sestavljajo ga signalni generator, komora, ojačevalnik in spominski osciloskop. Ima dva načina delovanja: prvi je namenjen opazovanju ravninskega lipidnega dvosloja (slika 13A), drugi pa merjenju porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja (slika 13B). Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

V svojih rezultatih so avtorji podali odziv ravninskega lipidnega dvosloja na stopničast signal. Opazovali so pretok snovi z merjenjem majhnega toka (10^{-11} A). Opazovali so tudi življenjsko dobo ravninskega lipidnega dvosloja. Ravninski lipidni dvosloj so najprej izpostavili manjšim napetostim od 0 do 300 mV po 200 ms, za tem pa stopnici z amplitudo 500 mV. Pri slednjem so merili čas porušitve. Ugotovili so, da imajo ravninski lipidni

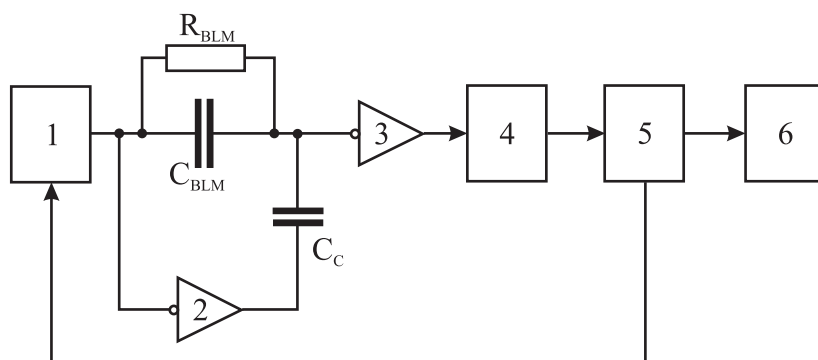


Slika 13. Sistem Abidor-Chernomordik-Chizmadzev-Pastushenko [30]. Sistem ima dva načina delovanja. A) za opazovanje ravninskega lipidnega dvosloja. B) za merjenje porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja. 1. pulzni generator, 2. operacijski tokovni ojačevalnik, 3. zapisovalnik, 4. spominski osciloskop, 5. komora z ravninskim lipidnim dvoslojem.

dvosloji, ki so bili izpostavljeni višjim predhodnim napetostim, pri 500 mV stopnici krajšo življenjsko dobo.

Sistem Chanturya

Sistem je bil prvič omenjen leta 1990 [32]. Sestavljen je iz signalnega generatorja, komore z lipidnim dvoslojem, operacijskega ojačevalnika ter analogno-digitalnega pretvornika, ki podatke shrani v računalnik. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

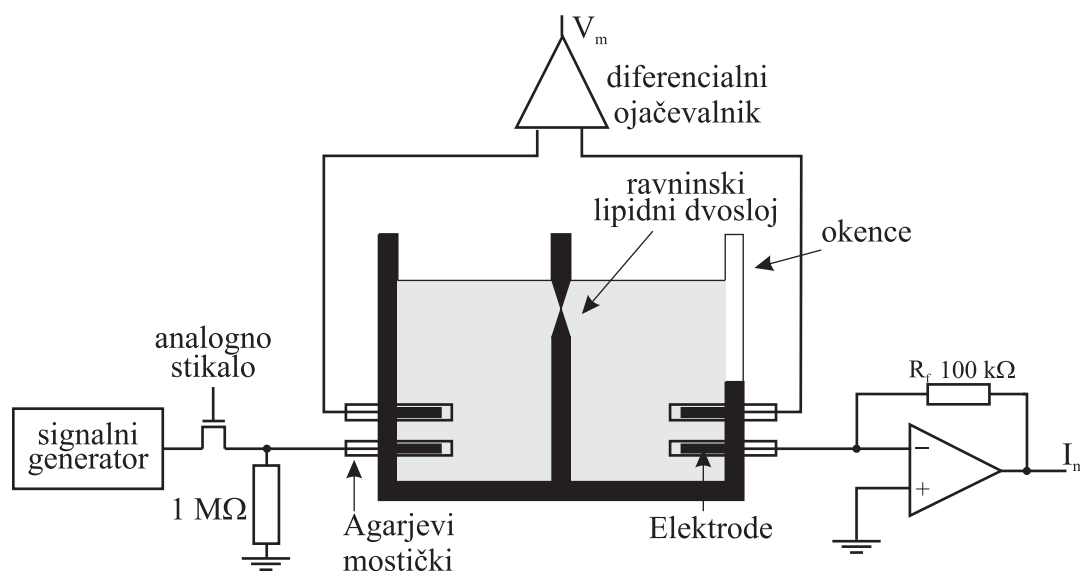


Slika 14. Sistem Chanturya [32]. 1. signalni generator, 2. invertor, 3. operacijski ojačevalnik, 4. analogno-digitalni pretvornik, 5. računalnik, 6. tiskalnik. R_M in C_M sta nadomestno vezje za ravninski lipidni dvosloj, C_C pa je kompenzacijski kondenzator.

V rezultatih so opisali spremembe kapacitivnosti in prevodnosti ravninskega lipidnega dvosloja ob dodajanju toksinov (α - in β - latrotoksin).

Sistem Sharma-Stebe-Tung

Sistem je nadgradnja Benzovega sistema in je bil prvič omenjen leta 1996 [8, 9]. Stikalo v obliki FET tranzistorja so zamenjali z dvopoložajnim analognim stikalom. Na en vhod je bil priključen signalni generator, na drugega pa visokoohmski upor ($1\text{ M}\Omega$). Sistem sta sestavljala še komora in spominski osciloskop. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

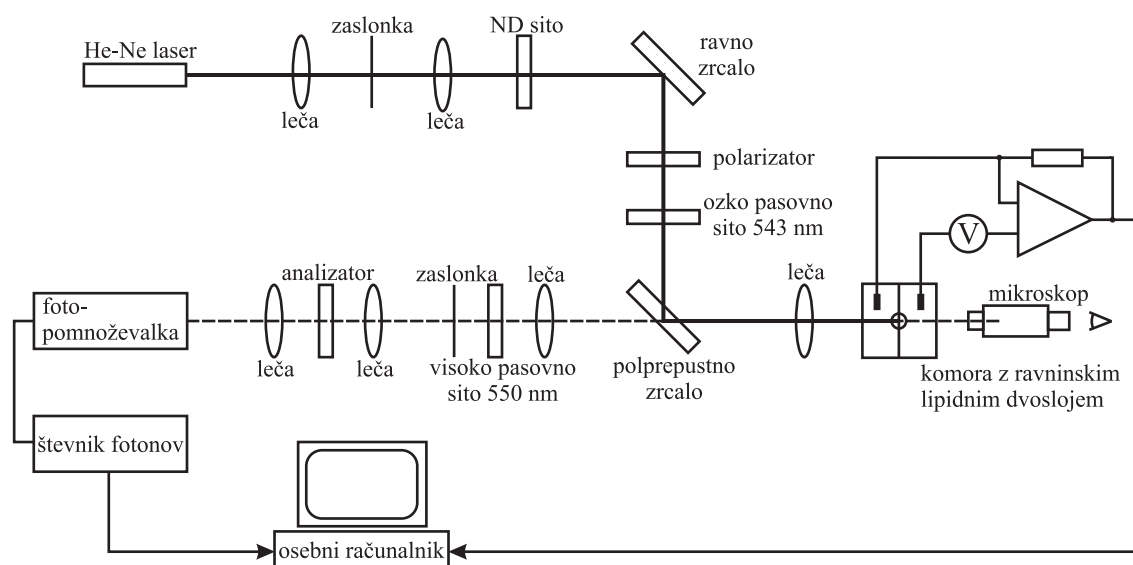


Slika 15. Sistem Sharma-Stebe-Tung [8, 9].

S tem sistemom so avtorji preučevali so kapacitivnost in prevodnost azolecitina ter razlike, ki se pojavijo z dodajanjem poloxaomera. Pri tem so vzbujaali ravninski lipidni dvosloj z dvema signaloma. Prvi je bil pravokotni signal velikosti 100 mV in trajanja $10\ \mu\text{s}$, drugi pa „Voltage clamp”. S prvim signalom so merili kapacitivnost ter porušitveno napetost. Posebnost drugega signala je, da je sestavljen iz pravokotnega signala, ki se konča z linearno padajočim signalom. Z linearno padajočim signalom opazujemo prevodnost ravninskega lipidnega dvosloja med porušitvijo [9]. Z enakim sistemom so preučevali tudi vpliv surfaktanta $C_{12}E_8$ na porušitveno napetost. Uporabljali so signale širin od $10\ \mu\text{s}$ do 10 s [8].

Sistem Hanyu-Yamada-Matsumoto

Pri tem sistemu so ravninski lipidni dvosloj sočasno vzbujali pravokotnim napetostnim signalom amplitud od 0,1 do 1 V ter s He-Ne laserjem. Opazovali so spremembo električne napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju ob vgrajevanju peptidov. Sistem je bil sestavljen iz optičnega ter električnega dela [33, 34]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.



Slika 16. Sistem Hanyu-Yamada-Matsumoto [33, 34].

V rezultatih so opazovali premike fluorescentnih peptidov, ki so bili vgrajeni v ravninski lipidni dvosloj, ter pretok snovi skozi ravninski lipidni dvosloj.

Sistem Vargas-Alorcon-Rojas

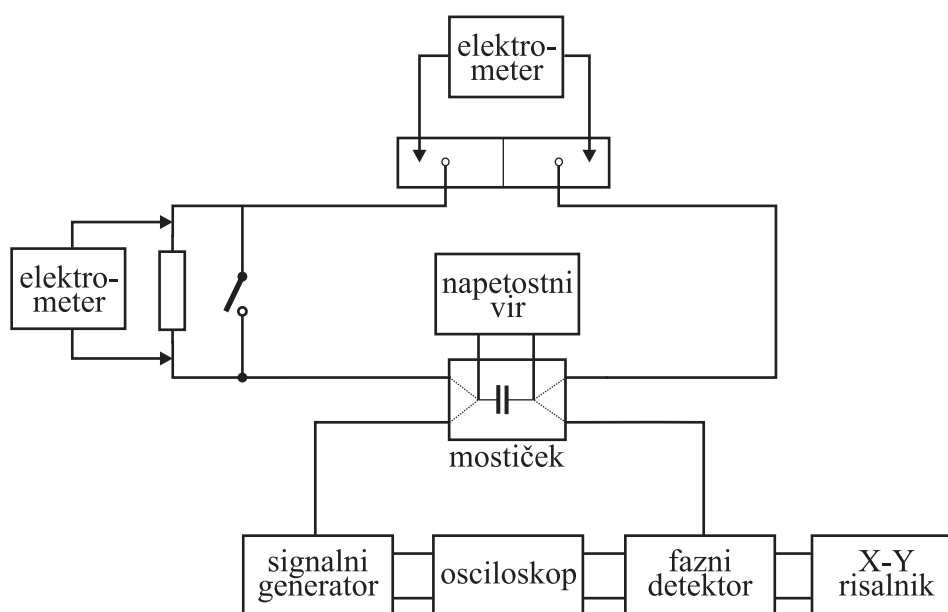
Sistem je sestavljen iz EPC-7 ojačevalnika, Besslovega pasovnega filtra ter 12-bitnih analogno-digitalnih in digitalno-analognih pretvornikov. Shema vezja v literaturi ni bila podana [15]. Ostali podatki so zbrani v dodatkih A in C.

Avtorji so opazovali, pod kakšnimi pogoji se v ravninski lipidni dvosloj vgradijo amiloidni β -peptidi. Te peptide uvrščajo med vzroke za živčno degenerativne bolezni. Poznavanje medsebojnega vpliva med peptidom in celično membrano je pomembno predvsem pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo.

3.1.2 Sinusna oblika signalov

Sistem Rosen-Sutton

Sistem je prvič opisan leta 1968. Ravninski lipidni dvosloj so vzbujali tako z enosmernimi kot z izmeničnimi signali. Pri enosmernih signalih uporabljajo konstantno napetost ± 200 mV. Izmenični signal uporabljajo amplitudo 5 mV in frekvenco 500 Hz. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.



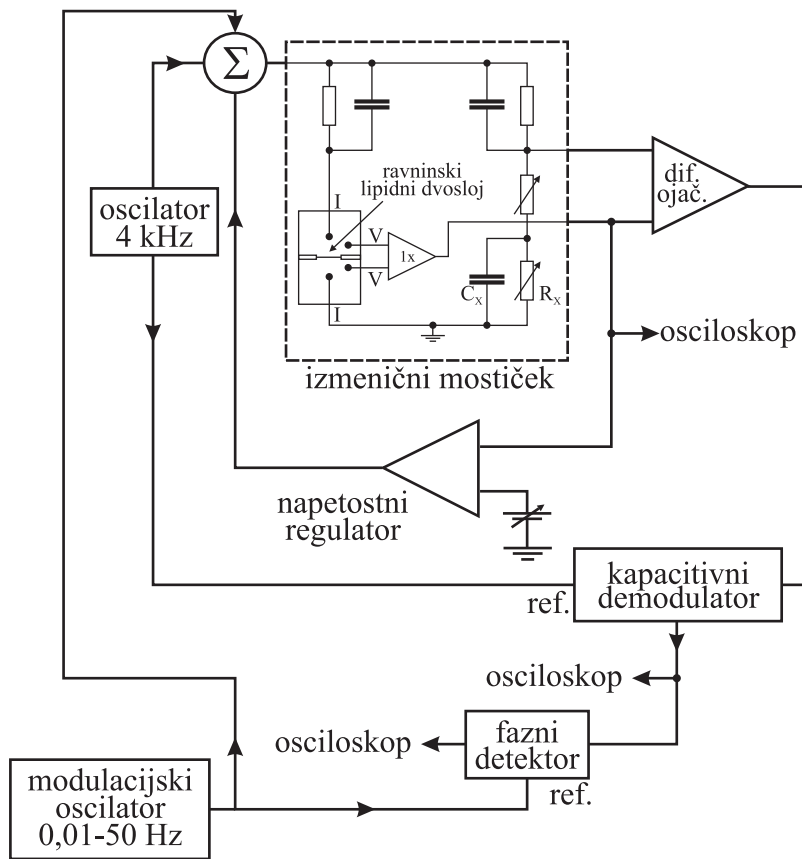
Slika 17. Sistem Rosen-Sutton [35].

Opazovali so spremembe kapacitivnosti zaradi indukcije enosmernege potenciala. Spremljali so tudi odvisnost kapacitivnosti od koncentracije soli v vodni raztopini in prevodnost ravninskega lipidnega dvosloja [35].

Sistem Wobschall

Sistem je bil objavljen leta 1971 [36]. Vsebuje modulacijski oscilator z območjem od 1 do 50 Hz ter oscilator s konstantno frekvenco 4 kHz. Vhodni signal v mostič je sestavljen iz nizko frekvenčnega signala, visoko frekvenčnega signala, ter referenčne napetosti, ki je pogojena z izhodno napetostjo mostičnega vezja. Z detektorjem faze merijo kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

Avtorji so merili odvisnost kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja od napetosti



Slika 18. Sistem Wobschall [36].

ter frekvence. V komori so imeli možnost napihovati ravninski lipidni dvosloj v obliko leče, pri čemer so opazovali spremembo kapacitivnosti od površine ukrivljenega ravninskega dvosloja [36].

Sistem White-Thompson

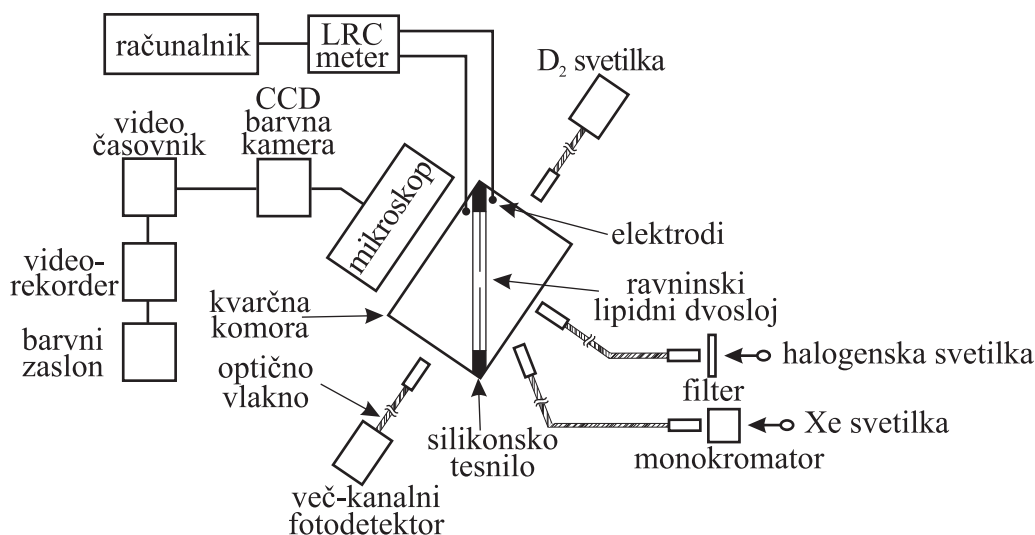
Je eden od najstarejših sistemov, ki so se uporabljali za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev [37]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

V rezultatih navajajo odvisnost kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja od napetosti. Merijo tudi debelino ravninskega lipidnega dvosloja.

Sistem Yamaguchi-Nakanishi

Sistem uporablja kombinacijo električnega in optičnega merjenja. Ravninski lipidni dvosloj vzbujajo s sinusnim signalom $7 \text{ mV}_{RMS} / 1 \text{ kHz}$. Odziv merijo z LCR metrom, ki

podatke zapisuje v računalnik. Istočasno lahko osvetljujejo ravninski lipidni dvosloj s halogensko ali ksenonsko lučjo. Svetlobni odboj spremljajo z barvno kamero [38]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

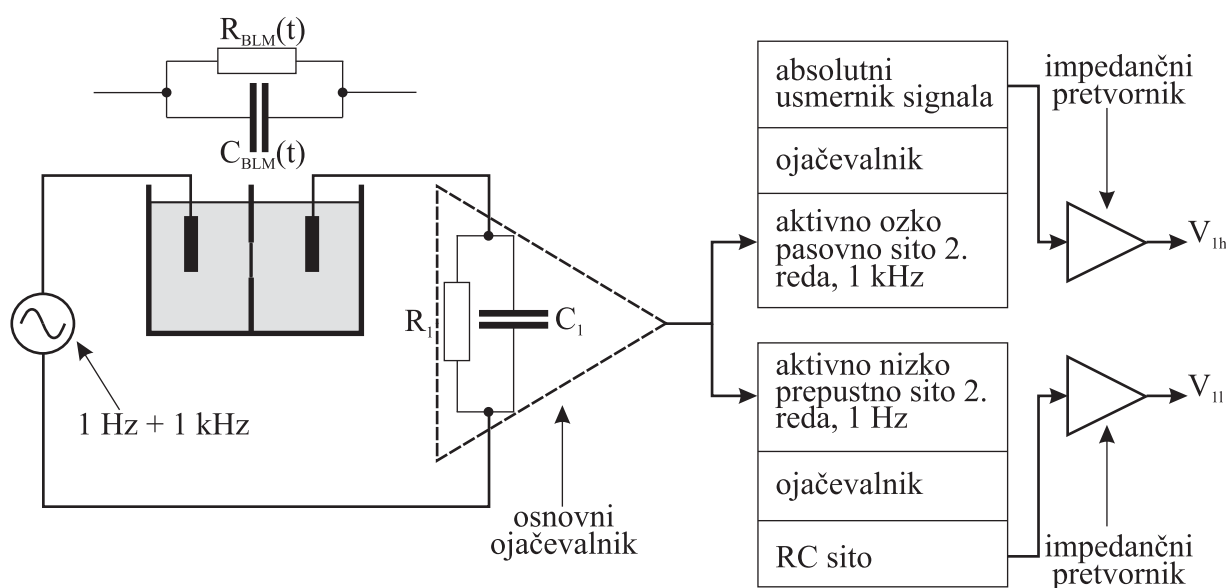


Slika 19. Sistem Yamaguchi-Nakanishi [38].

Avtorji so opazovali absorpcijo svetlobe v ravninskem lipidnem dvosloju glede na valovno dolžino. Spremljali so tudi spremembo kapacitivnosti pri osvetljevanju ravninskega lipidnega dvosloja z različnimi valovnimi dolžinami (250-500 nm).

Sistem Gallucci-Micelli

Sistem je edinstven, ker z njim lahko sočasno merimo prevodnost in kapacitivnost. Podatka izračunamo iz izmerjenega tok ter faznega kota med tokom in napetostjo. Vsebuje signalni generator, ki tvori sinusni signal 1 Hz amplitude od 0,1 do 1,5 V, nanj pa priščeje sinusni signal 2 mV/1 kHz. Signal so preko platinastih elektrod dovedli na ravninski lipidni dvosloj, iz komore pa v ojačevalnik. Ojačan signal so razdeli na dva dela. V prvem delu imamo dvostopenjski pasovni filter 1 kHz, ojačevalnik, ter usmernik. Meritev visokofrekvenčnega dela nam podaja kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja, kot je bilo opisano v metodah za merjenje kapacitivnosti. Drugi del signala gre preko nizkopasovnega filtra, ojačevalnika in RC filtra. S tem delom izmerimo upornost ravninskega lipidnega dvosloja, kot je opisano v metodah za merjenje upornosti in prevodnosti [18–20]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.



Slika 20. Sistem Gallucci-Micelli [18–20].

V svojih poizkusih so izmerili kapacitivnost in prevodnost uporabljenih lipidov. Opazovali so tudi spremembo prevodnosti pri nastanku por.

Sistem Maheswari-Ramachandran-Rajaji

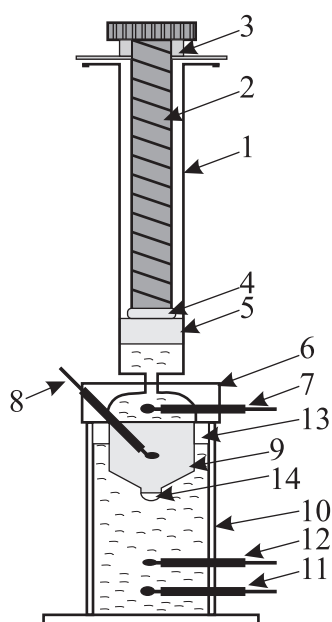
Enosmerne električne karakteristike, kot sta upornost in kapacitivnost, so izmerili z elektrometrom, izmenične pa z digitalnim LCZ metrom. Uporabili so sinusno napetost amplitude od 0,01 do 1,0 V, ki so jo povečevali v korakih po 10 mV. Frekvenco so spreminjali od 40 Hz do 200 kHz v tridesetih korakih [39]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

S sistemom so merili specifično kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja. Opazovali so spremembo specifične kapacitivnosti ter napetosti na membrani zaradi dodatkov cisplatina [39].

Sistem Naumowicz-Petelska-Figaszewski

Je eden izmed novejših sistemov, saj je bil prvič omenjen leta 2002 [40]. Merjenje kapacitivnosti je realizirano z impedančno spektroskopijo. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

Opisali so merjenje impedance ravninskega lipidnega dvosloja. Prikazali so spremembo



Slika 21. Sistem Naumowicz-Petelska-Figaszewski [40]. 1. brizgalka, 2. zunanji vijak, 3. zunanji vijak z ročajem, 4. jeklena cev, 5. tesen teflonski bat, 6. priključek iz organskega stekla, 7. tokovna platinasta elektroda, 8. Ag-AgCl merilna elektroda, ki je pritrjena na stožec brizgalka, 9. teflonsko tesnilo, 10. posoda iz organskega stekla, 11. druga tokovna elektroda, 12. druga Ag-AgCl merilna elektroda, 13. nivo vodne raztopine, 14. območje tvorbe ravninskega lipidnega dvosloja.

impedance pri različnih vodnih raztopinah. Kot zanimivost so grafe impedance prikazali s polarnim diagramom.

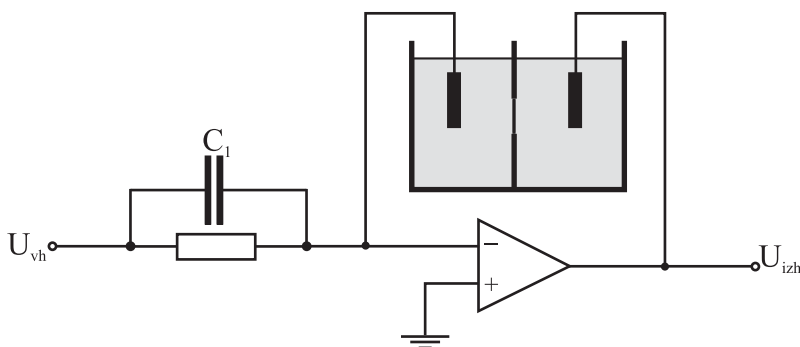
3.2 Tokovno vzbujanje

Sistem Robello-Gliozzi

Sistem ima napetostni signalni generator. Napetost se preko upora pretvori v tok, ki steče preko ravninskega lipidnega dvosloja. Ravninski lipidni dvosloj je vezan v negativno povratno vezavo operacijskega ojačevalnika. Izhod operacijskega ojačevalnika kaže spremembo napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju. Pri poizkusih so uporabljali pravokotne signale, stopnice ter trapezne stopnice. Merili so tudi histerezno zanko ravninskega lipidnega dvosloja z izmenično trikotno napetostjo (2,5 mHz) [23, 27–29, 41–43]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

V rezultatih opisujejo meritve notranjega šuma ravninskega lipidnega dvosloja. Spremljajo napetost na ravninskem lipidnem dvosloju ob elektroporaciji, pri čemer ravninski

lipidni dvosloj vzbujajo s tokom.

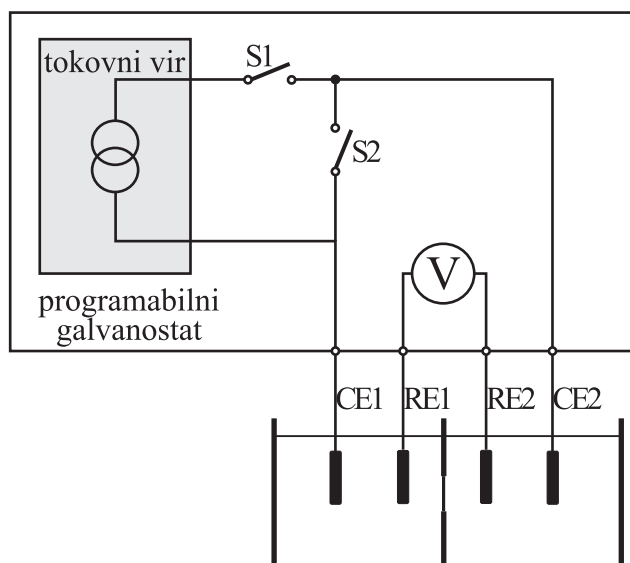


Slika 22. Sistem Robello-Gliozzi [23, 27–29, 41–43].

Sistem Kalinowski-Figazewski

Sistem je sestavljen iz tokovnega vira, dveh stikal, preko katerih lahko izbiramo režim merjenja, merilnika napetosti ter komore. V komori so 4 elektrode, 2 aktivni in 2 merilni. Stikalo S1 uporabljajo za priklop tokovnega vira, stikalo S2 pa zato, da elektrodi CE1 in CE2 veže v kratek stik. To povzroči, da sta napetosti v obeh prekatih enaki in se naboj na ravninskem lipidnem dvosloju razelektri preko merilnika napetosti. V zadnjem primeru pa so prav tako kot v sistemu Robello-Glozzi uporabili žagasto napetost za merjenje histereze ravninskega lipidnega dvosloja [21, 22, 25, 44, 45]. Natančni podatki so zbrani v dodatkih A in C.

V člankih so natančno opisali sistem za merjenje kapacitivnosti, vendar številskih rezultatov o izmerjeni kapacitivnosti niso navedli. Opazovali so predvsem obnašanje spremembe napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju ob različnem toku. Uporabljali so stopničasto, pravokotno ter trikotno obliko signala. Ob tako izvedeni meritvi lahko ravninski lipidni dvosloj opazujemo daljši čas, saj ga ne preobremenimo z napetostjo. Spremembe na ravninskem lipidnem dvosloju opazujemo preko spremembe napetosti.



Slika 23. Sistem Kalinowski-Figazewski [21, 22, 25, 44, 45].

3.3 Pregled sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Opisani sistemi se med seboj precej razlikujejo. Vzrok za to so različna področja raziskovanja in različne lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev, ki so jih raziskovalci z opisanimi sistemi opazovali. Za merjenje posamezne lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja je namreč ustrezen svojevrsten pristop. Kar lahko opazujemo z enim merilnim sistemom, še ni nujno da lahko tudi z drugim. Do nedavnega na tržišču še ni bilo sistema za opazovanje in delo z ravninskimi lipidni dvosloji. Leta 2005 pa se je na spletu pojavil proizvajalec, ki ponuja merilni sistem za opazovanje ravninskih lipidnih dvoslojev [46]. Sistem je zasnovan modularno in ga lahko sestavimo na različne načine; tako lahko merimo (praktično) vse lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev.

V literaturi opisane sisteme v osnovi lahko razdelimo na napetostne in tokovne. Napetostni merilni sistemi so nepogrešljivi za merjenje kapacitivnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. Merilni sistemi s tokovnim vzbujanjem pa omogočajo opazovanje majhnih sprememb na ravninskem lipidnem dvosloju, ne da bi le-tega porušili. To je posebej primerno takrat, ko želimo opazovati majhen tok, ki je posledica vgrajenih proteinov v ravninski lipidni dvosloj. Z napetostnim vzbujanjem bi ravninski lipidni dvosloj porušili, še

preden bi sploh opazili majhno spremembo toka.

Znotraj obeh skupin razdelimo sisteme še po obliki vzbujačnih signalov. Najpogostejši med njimi je pravokotni pulz. Za merjenje kapacitivnosti in prevodnosti hkrati se uporablja izmenične signale.

Vse nas, ki opazujemo pojav elektroporacije na nivoju ravninskega lipidnega dvosloja, zanima porušitvena napetost. Najpogosteje uporabljen protokol za merjenje porušitvene napetosti je vzbujanje ravninskega lipidnega dvosloja s pravokotnim napetostnim pulzom. Napetost prvega pulza je nizka, tako da še ne poruši ravninskega lipidnega dvosloja. Vsak naslednji pulz, ko ravninski lipidni dvosloj še ni porušen, povečamo za izbran napetostni korak. Amplitudi pulza, pri katerem se ravninski lipidni dvosloj poruši, pravimo porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja. Pri uporabi takšnega protokola število pulzov, ki jih dovedemo na ravninski lipidni dvosloj, ni vnaprej znano. Ravno tako ni znano, kolikšen bo vpliv seštevka vseh signalov, ki ga definiramo kot pred-izpostavitve ravninskega lipidnega dvosloja.

V svojem magistrskem delu sem želel poiskati metodo, s katero bi omejil vlogo pred-izpostavitve ter naključnosti življenjskega časa ravninskega lipidnega dvosloja in mu določiti „pravo“ porušitveno napetost.

4 Merjenje porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja z linearno naraščajočim signalom

Lipidni dvosloji so edinstvene strukture, sestavljene iz dveh plasti lipidnih molekul. Njihove fizikalne lastnosti so osnova za razumevanje obnašanja celične membrane. Pod vplivom mehanskega stresa (pričvrstitev pipete) ali električnega polja (elektroporacija) lahko v membrani nastanejo pore. S tvorjenjem por je omogočen pasivni transport protonov in hidrofilnih delcev skozi ravninski lipidni dvosloj. Prav tako je tvorjenje por pomembno pri elektrofuziji celic ter sprostitvi učinkovin iz liposomov. Točen mehanizem tvorjenja por, njihova velikost, struktura in stabilnost so še zelo slabo poznani [47]. V zadnjem času se v literaturi pojavljajo molekularni modeli, ki opisujejo dinamično nastajanje por in s tem delno pojasnjujejo tudi mehanizme nastajanja [48, 49].

Stabilnost membrane v električnem polju določimo s porušitveno napetostjo. Znano je, da je porušitvena napetost odvisna od narave membrane, sestave in koncentracije okoliškega elektrolita ter od trajanja izpostavitve električnemu polju. [20]. Znano je tudi, da je stabilnost membrane odvisna od trajanja izpostavitve električnemu polju [8, 30]. V teoriji elektromehanike je ravninski lipidni dvosloj predstavljen kot homogen elastični medij, s končno vrednostjo prožnostnega modula. Ko sila električne kompresije preseže silo elastičnosti, se membrana poruši. Rezultate dobimo ob predpostavki, da za omejene deformacije velja Hookov zakon [30].

V literaturi zasledimo, da so porušitveno napetost ravninskih lipidnih dvoslojev določali na različne načine [8, 9, 12, 13, 23, 27, 28, 41]. V večini primerov so za določitev te porušitvene napetosti uporabili pravokotne pulze širine $10 \mu\text{s}$ [9, 12, 13, 23, 27, 28, 41]. Zasledimo tudi uporabo sestavljenega signala iz pravokotnega pulza ter linearno padajočega signala, kjer je le-ta služila za počasnejše spreminjanje strukture ravninskega lipidnega dvosloja in s tem lažje opazovanje spreminjanja njegove prevodnosti [9]. Opisan pa je bil tudi primer določanja porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja s trikotno obliko signala [27]. Za vzbujanje ravninskih lipidnih dvoslojev so različni avtorji uporabljali tako napetostno [8, 9, 12, 13] kot tokovno [23, 27, 28, 41] vzbujanje.

Napetostno vzbujanje ravninskih lipidnih dvoslojev se je zgodovinsko pojavilo pred

tokovnim vzbujanjem. Predstavlja neposredno vzpostavitev električnega polja na ravninskem lipidnem dvosloju. Uporaba napetostnega vzbujanja je najverjetneje hotela posnemati mirovalno napetost, ki je prisotna na membrani živih celic. Kasneje se je uveljavila tudi metoda s tokovnim vzbujanjem. Tokovno vzbujanje vzpostavi napetost na lipidnem dvosloju in jo lahko kontrolira, tako da ne preseže tako hitro pragovne vrednosti, česar pri napetostnem vzbujanju ne moremo. Ko vsilimo napetost, je ravninski lipidni dvosloj le-tej izpostavljen v hipu.

Najpogosteje uporabljen protokol za merjenje porušitvene napetosti je vzbujanje ravninskega lipidnega dvosloja s pravokotnimi napetostnimi signali. Napetost prvega pulza je nizka, tako da še ne poruši ravninskega lipidnega dvosloja. Vsak naslednji pulz, ko ravninski lipidni dvosloj še ni porušen, povečamo za izbrani napetostni korak. Amplituda pulza, pri katerem se ravninski lipidni dvosloj poruši, je definirana kot porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja [8].

Pri uporabi takšnega protokola število pulzov, ki jih pritisnemo na ravninski lipidni dvosloj, ni vnaprej znano. Ravno tako ni znano, koliko bo znašal seštevek časov vseh pritisnjenih signalov, ki ga definiramo kot pred-izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja. Čas znotraj pulza, v katerem porušimo ravninski lipidni dvosloj, definiramo kot življenjsko dobo. Abidor s sodelavci opisuje, da je življenjska doba ravninskega lipidnega dvosloja znotraj pravokotnega napetostnega pulza naključno porazdeljena [30]. Na višino porušitvene napetosti vplivata pred-izpostavitev in napetostni stres, ki se pojavi ob začetku pulza. Daljša pred-izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja napetostnemu signalu povzroči nižjo porušitveno napetost [30]. Prav tako se zaradi napetostnega stresa, katerega povzročijo zaporedne izpostavitve večim napetostnim pulzom, ravninski lipidni dvosloj poruši pri nižji napetosti [8]. Če je čas med dvema izpostavitvama zadosti dolg, napetostni stres na ravninskem lipidnem dvosloju izzveni in ga obravnavamo, kot da ravninskega lipidnega dvosloja ne bi izpostavili električnemu stresu, vendar pa nikoli ne vemo koliko časa je za to potrebno [50].

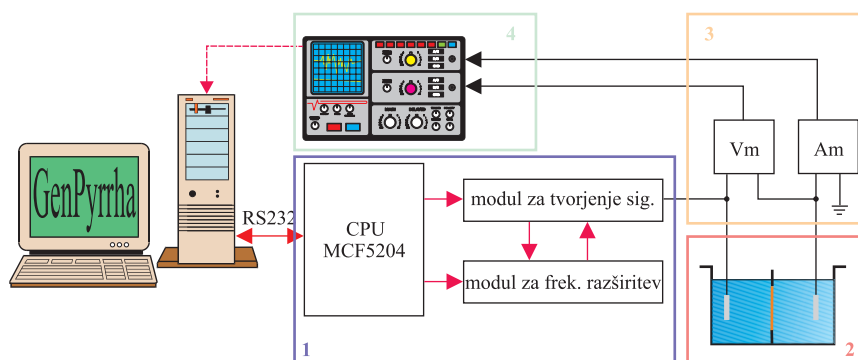
Leontiadou s sodelavci je s simulacijami struktur ravninskih lipidnih dvoslojev pokazal, da je za porušitveno napetost potrebno preseči napetostni prag, ki sproži proces porušitve ravninskega lipinega dvosloja [48].

V svojem magistrskem delu sem želel poiskati metodo, s katero bi omejil vlogo predizpostavitve ter naključnosti življenjskega časa ravninskega lipidnega dvosloja in mu določiti „pravo“ porušitveno napetost.

4.1 Materiali in metode

4.1.1 Sistem za elektroporacijo lipidnih dvoslojev

Sistem za elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev je sestavljen iz signalnega generatorja, teflonske komore z elektrodama, merilnikov toka in napetosti ter osciloskopa za zajem podatkov [51]. Podatke kasneje analiziramo z osebnim računalnikom (slika 24).



Slika 24. Sistem za elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev. (1) Signalni generator sestavljen iz krmilnika s mikroprocesorjem MCF5204 in moduloma za tvorjenje signalov ter frekvenčno razširitev. (2) Teflonska komora za tvorjenje ravninskih lipidnih dvoslojev z dvema Ag-AgCl elektrodama. (3) Merilnik toka in napetosti. (4) Digitalni osciloskop, kjer shranjujemo meritve za nadaljnjo obdelavo.

Signalni generator (slika 24-1) omogoča tvorjenje napetostnih signalov poljubnih oblik. Sestavljen je iz krmilnika z mikroprocesorjem MCF5204, modula za tvorjenje signalov ter modula za frekvenčno razširitev. Mikroprocesorski krmilnik upravljamo z osebnim računalnikom preko RS-232 komunikacije. Preko te komunikacije se prenese oblika signala ter ukazi prednastavitve izhodnega ojačanja in frekvence. Modul za tvorjenje signalov spremeni digitalni vektorski zapis signala v analognega in ga primerno ojači. Modul za frekvenčno razširitev pa omogoča spreminjanje izhodne frekvence signala.

Komora (slika 24-2) je sestavljena iz dveh teflonskih delov. Teflon omogoča preprosto čiščenje, saj lahko komoro, kadar je ne uporabljamo, spravimo kar v žvepleno kislino

(H₂SO₄.) Med teflonska dela komore vstavimo posebno teflonsko folijo, ki ima majhno luknjico premera $105(1\pm 0,01)$ μm . V vsakem delu komore imamo vdolbino velikosti $(17,8\times 15,1\times 19,75)$ mm oziroma $5,3$ cm³. V oba prostora sta speljana dodatna kanala premera 0,8 mm, skozi katera vbrizgamo slano raztopino.

Merilni sistem (slika 24-3,4) je sestavljen iz merilnika toka, diferenčnega merilnika napetosti ter osciloskopa za shranjevanje časovnih potekov obeh količin. Merilnik toka deluje po principu tokovno napetostnega pretvornika. Napetost na lipidnem dvosloju merimo po načelu razlike potenciala med obema prekatoma komore. Za to smo uporabili diferenčni ojačevalnik LeCroy Instruments 1822. Nastavitve ojačevalnika lahko v celoti krmilimo z osciloskopom. Njegova dodatna dobra lastnost je, da lahko razliko dveh signalov ojači tudi za faktor 1000. Časovne poteke toka in napetosti smo shranili z osciloskopom LeCroy Waverunner-2 LT354M. Na prvem kanalu smo merili signal iz signalnega generatorja. Drugi kanal je bil namenjen opazovanju napetosti diferencialnega ojačevalnika, s četrtem kanalom pa smo merili tok oziroma izhodno napetost tokovnega merilnika. Osciloskop je bil nastavljen na normalno proženje na pozitivno fronto. Nastavili smo nekaj deset mikrosekund predproženja. Merjene signale smo shranili v ANSI tabelo vzorčnih točk signala, ki nam je omogočila kasnejšo obdelavo signalov s programskim orodjem Matlab.

4.1.2 Priprava raztopin

Prevodno raztopino smo pripravili iz 0,1 molarne KCl (MERCK, Nemčija) in 0,01 molarne raztopine Hepes (MERCK, Nemčija). Zmešali smo ju v enakem razmerju in dodali nekaj kapljic enomolarne NaOH (MERCK, Nemčija), tako da smo dobili kislost raztopine pH 7,4. Na injekciji smo pritrdili prilagojeni injekcijski igli, ki smo ju priključili na posebni cevki. Pred tem smo iz injekcijskih igel in cevk odstranili vse zračne mehurčke. Raztopino smo skozi kanala v komori vbrizgali v oba prekata komore.

Za pripravo lipidnega dvosloja smo uporabili POPC (1-pamitoil 2-oleoil 3-fosfatidiholin), ki smo ga kupili v prahu (Avanti Polar-Lipids, inc., ZDA). POPC smo raztopili v mešanici heksana (Riedel-de Haën, Nemčija) in etanola (Riedel-de Haën, Nemčija) v razmerju 9:1. Mešanica heksadekana (MERCK, Nemčija) in etanola v razmerju 3:7 je služila za podporni torus. Tega smo nanесли na teflonsko folijo na komori, da smo lažje zgradili lipidni

dvosloj.

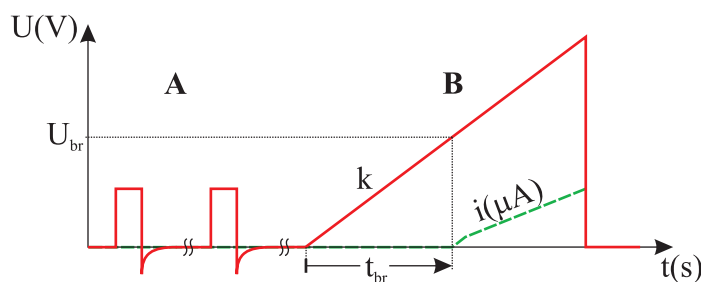
Teflonsko komoro smo med poizkusi hranili v žvepleni kislini (H_2SO_4) (MERCK, Nemčija), ki odstrani vse ostanke lipidov v komori. Tik pred poizkusom smo vzeli oba dela komore iz kisline in ju sprali z deionizirano vodo. Med dela komore smo položili tanko folijo, ki je bila pred tem spravljena v kloroformu (Riedel-de Haën, Nemčija). Pazili smo, da je bila majhna luknjica čim bolj na sredini luknje v komori. Če je bila luknjica preveč pri robu odprtine komore, se je zaradi razlike v omočevanju folije in komore lipidni dvosloj težje tvoril. Komoro smo stisnili in jo privili z vijakoma. Prepričali smo se, kje je bila luknjica, in če ni bila dovolj dobro postavljena, smo postopek nameščanja ponovili. Na vsako stran folije smo dodali $1 \mu\text{l}$ raztopine lipida. Počakali smo, da se je topilo posušilo, nato pa smo dodali $1,5 \mu\text{l}$ heksadekana in etanola ter počakali, da se je tudi ta mešanica posušila. Komoro smo pritrdili na palično stojalo in jo postavili pred stereolupo. Skozi stranska kanala smo vstavili cevki s slano raztopino KCl. Na komoro smo položili poseben pokrovček, na katerega so bile pritrjene elektrode iz Ag-AgCl (IVM, ZDA).

Pri postavitvi elektrod je treba paziti, da ne prekrivajo luknjice in da je ta še vedno vidna skozi stereolupo. Vedno moramo elektrode vstaviti v komoro, ko v njej še nimamo lipidov, da ne „zmotimo“ lipidne plasti. V prekata komore vbrizgamo toliko raztopine, da gladina seže tik pod rob luknje v komori. V vsak prekat kanemo po $2 \mu\text{l}$ lipida, raztopljenega v mešanici heksana in etanola. Gladine se dotaknemo samo s kapljico, da omogočimo čim lažje raztezanje lipidne plasti po gladini raztopine KCl. Po dvajsetih minutah se lipidi razporedijo po gladini in imamo pripravljen sistem za postavljanje lipidnih dvoslojev. Lipidni dvosloj postavimo z metodo dviganja gladine, ki je opisana v uvodu (slika 3).

4.1.3 Merilni protokol

Merilni protokol je sestavljen iz dveh delov: merjenja kapacitivnosti lipidnega dvosloja ter merjenja porušitvene napetosti lipidnega dvosloja (slika 25). Kapacitivnost in porušitvena napetost sta bili določeni za vsak lipidni dvosloj posebej.

Z meritvijo kapacitivnosti preverimo, ali imamo postavljen dovolj dober ravninski lipidni dvosloj. Včasih se nam lahko tvori večsloj, ki ga prepoznamo z meritvijo kapacitivnosti. Izmerjeno kapacitivnost smo primerjali z vrednostmi, podanimi v literaturi



Slika 25. Merilni protokol. A) Meritev kapacitivnosti. Kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja je razlika med kapacitivnostjo sistema brez ravninskega lipidnega dvosloja (C_{sis}) ter kapacitivnostjo sistema z ravninskim lipidnim dvoslojem (C_{SBLM}). B) Merjenje porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja z linearno naraščajočim signalom. Porušitvena napetost (U_{br}) je definirana kot napetost ob času t_{br} , ko prične teči transmembranski tok. Čas t_{br} je definiran kot življenjska doba ravninskega lipidnega dvosloja pri izbranem naklonu (k) linearno naraščajočega signala.

za ravninske lipidne dvosloje, sestavljene iz POPC lipidnih molekul [8]. Kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja je merjena z metodo merjenja časovne razelektritve, ki je opisana v poglavju 2.1. Meritev vsebuje dva koraka. V prvem koraku smo izmerili kapacitivnost sistema brez ravninskega lipidnega dvosloja (C_{sis}), v drugem pa kapacitivnost sistema z ravninskim lipidnim dvoslojem (C_{SBLM}). Kapacitivnosti smo nato med seboj odšteli, kot je to prikazano v enačbi 3, in dobili pravo kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja (C_{BLM}) (slika 8). Specifično kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja c smo določili z normiranjem kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja C_{BLM} na njegovo površino A :

$$c = \frac{C_{BLM}}{A}. \quad (15)$$

V našem primeru je površina ravninskega lipidnega dvosloja znašala $8,66 \times 10^{-9} \text{ m}^2$.

Porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja (U_{br}) določimo z linearno naraščajočim signalom. Naklon (k) ter končno napetost linearno naraščajočega signala je potrebno predhodno izbrati. Izbira končne napetosti mora zagotavljati, da se bo ravninski lipidni dvosloj zagotovo porušil. Za določitev porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja smo uporabili štiri različne naklone. Najvišja in najnižja strmina naklona je omejena z ločljivostjo sistema. Vse naklone linearno naraščajočih signalov smo

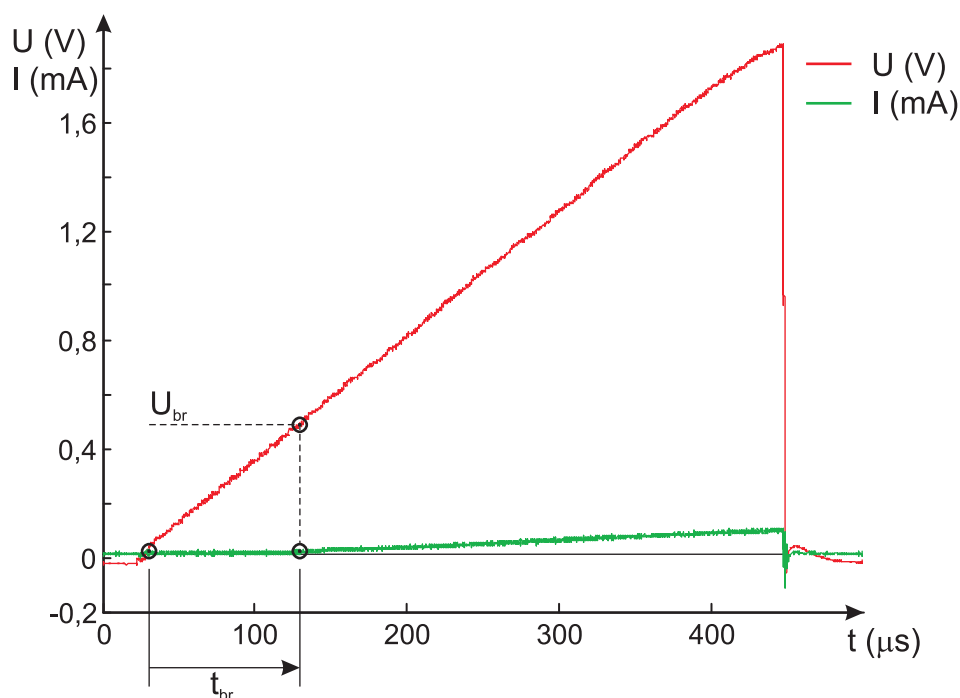
želeli opraviti pri enaki ločljivosti tvorjenega signala [51]. Zato smo se omejili na naklone k med 4 in 22 V/ms. V tem območju smo se odločili za štiri različne naklone linearno naraščajočega signala. Porušitvena napetost je definirana kot napetost ob času t_{br} , ko prične preko ravninskega lipidnega dvosloja teči tok. Čas t_{br} je definiran kot življenjska doba ravninskega lipidnega dvosloja pri izbranem naklonu linearno naraščajočega signala (k) (slika 25).

Z novim protokolom smo dosegli, da imamo vedno enak postopek merjenja porušitvene napetosti, torej imamo vedno enako pred-izpostavitev ravninskega lipidnega dvosloja. Linearno naraščajoč signal nam zagotavlja, da se bo ravninski lipidni dvosloj porušil ob enkratni izpostavitvi. Hkrati ob začetku signala ravninski lipidni dvosloj ni izpostavljen napetostnemu stresu.

4.1.4 Določitev življenjske dobe ravninskega lipidnega dvosloja

Ob pritisku linearno naraščajočega signala smo opazovali napetost in tok. Dokler se ravninski lipidni dvosloj ni pričel rušiti, toka ni bilo. Ko se je pojavil, je po začetnem prehodnem pojavu sledil pritisnjeni napetosti linearno naraščajočega signala (slika 26). Čas od začetka dvigovanja vsiljenega napetostnega signala do naraščanja tokovnega signala zaradi procesa porušitve ravninskega lipidnega dvosloja imenujemo življenjska doba.

Meritev toka in napetosti smo shranili na trdi disk osciloskopa v formatu Matlab. Po končanih poizkusih smo signala obdelali tako, da smo izmerili čas začetka naraščanja napetosti in toka. Napisali smo program v Matlab-u, ki je iz vektorjev izmerjenih signalov toka in napetosti poiskal koleno, točko, ko prične tok naraščati. Algoritem je za iskanje kolena potreboval dve točki. Prvo točko je postavil na začetek vektorja, kjer je bila vrednost vektorja 0 V. Druga točka se je postopoma premikala po signalu. Izračun naklona daljice med začetno točko ter premikajočo se točko je podal, ali je točka že pri kolenu signala. Ko je bil naklon večji od neke določene vrednosti, ki je preprečevala definicijo točke zaradi šuma smo definirali koleno signala. Ker algoritem ni bil dovolj optimiziran, smo omogočili ročno premikanje točke po krivulji ter s tem določanje kolena signala. Za vsak izmerjen ravninski lipidni dvosloj sta se časa kolena toka in napetosti shranila v tabelo, ki smo jo izvozili v MS Excel, datoteko pa smo uporabili pri statistični obdelavi.



Slika 26. Določitev življenjske dobe ter porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja. Rdeča krivulja predstavlja pritisnjeno napetost, zelena krivulja pa tok skozi ravninski lipidni dvosloj. Čas med začetkom naraščanja pritisnjene napetosti ter začetkom naraščanja toka definiramo kot življenjsko dobo ravninskega lipidnega dvosloja t_{br} . Ob času ko začne naraščati tok iz napetostnega signala odčitamo porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja U_{br} .

4.1.5 Statistika

Za primerjavo izmerjenih porušitvenih napetosti ter specifičnih kapacitivnosti ravninskih lipidnih dvoslojev, vzbujanih z linearno naraščajočim signalom z različnim naklonom, smo uporabili neparametričen Kruskal-Wallis-ov enosmerni test. Le-ta je namenjen obdelavi podatkov več kot treh skupin z majhnim in različnim številom izmerjenih vzorcev. Deskriptivna statistika je vključevala povprečno vrednost ter standardno deviacijo.

Povezava med vzbujanjem in časom tvorjenja vzbujanja je poznana iz nevrologije kot intenzivnostno časovna krivulja. Opisuje, da je za sprožitev akcijskega potenciala potrebno membrano živčnega vlakna depolarizirati do pragovne vrednosti [52]. Tudi na nivoju ravninskih lipidnih dvoslojev na podlagi simulacij vemo, da je za porušitev potrebno preseči prag [48].

Na izmerjene rezultate o porušitveni napetosti za posamezen naklon linearno narašča-

jočega signala smo napeli dvoparametersko krivuljo:

$$U = \frac{a}{1 - e^{-t/b}}, \quad (16)$$

pri čemer je U enak porušitveni napetosti U_{br} , ki je bila merjena pri različnih naklonih; t ustreza življenjski dobi ravninskega lipidnega dvosloja t_{br} ; a in b pa sta prosta parametra. Parameter a podaja asimptoto krivulje, ki ustreza minimalni porušitveni napetosti U_{brMIN} za specifičen ravninski lipidni dvosloj. Parameter b vpliva na naklon krivulje.

4.2 Rezultati

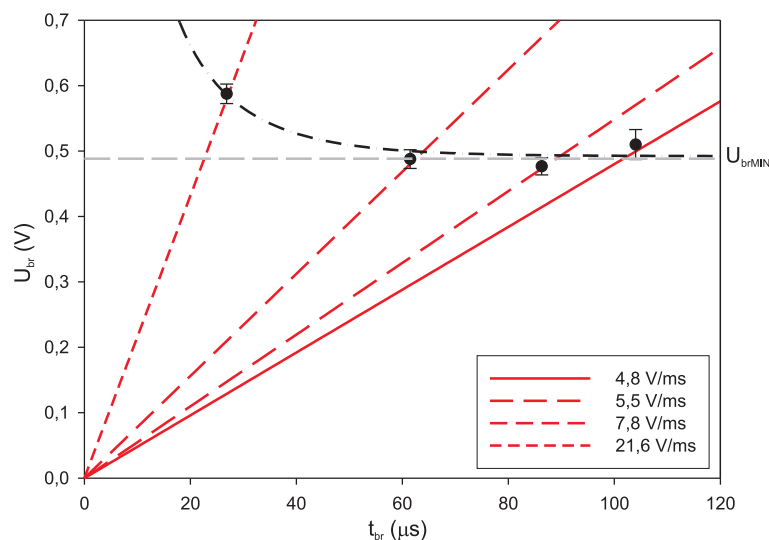
Število opravljenih in veljavnih meritev je 33. Od tega smo 18 ravninskih lipidnih dvoslojev izpostavili naklonu 4,8 V/ms, 6 ravninskih lipidnih dvoslojev naklonu 5,5 V/ms, 4 ravninske lipidne dvosloje naklonu 7,8 V/ms ter 5 ravninskih lipidnih dvoslojev naklonu 21,6 V/ms. V tabeli 3 smo zbrali c , U_{br} , in t_{br} za vse štiri izbrane naklone k linearno naraščajočega signala. Specifična kapacitivnost c ravninskega lipidnega dvosloja je bila pri vseh eksperimentalnih skupinah enaka, tudi Kruskal-Wallis-ova analiza ni pokazala statistično značilnih razlik. Povprečna vrednost specifične kapacitivnosti vseh ravninskih lipidnih dvoslojev, ki so bili vključeni v analizo, je znašala $0,5 \pm 0,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Tabela 3. Povprečne vrednosti specifične kapacitivnosti (c), porušitvene napetosti (U_{br}) ter življenjske dobe (t_{br}) ravninskih lipidnih dvoslojev, ki so bili izpostavljeni linearno naraščajočim signalom z različnimi nakloni (k). Podane so povprečne vrednosti ter standardne deviacije.

k (V/ms)	c ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	U_{br} (V)	t_{br} (μs)
4,8	$0,5 \pm 0,1$	$0,51 \pm 0,02$	104 ± 4
5,5	$0,5 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,01$	86 ± 3
7,8	$0,6 \pm 0,1$	$0,49 \pm 0,01$	61 ± 2
21,6	$0,4 \pm 0,1$	$0,59 \pm 0,02$	27 ± 1

Porušitvena napetost U_{br} narašča z naraščanjem naklona linearno naraščajočega signala. Za naklon 21,6 V/ms je porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja enaka 0,59 V. Vrednost je statistično značilno različna od izmerjenih vrednosti porušitvene napetosti pri ostalih naklonih. Izmerjeni podatki so prikazani grafično (slika 26). Parametra

krivulje, ki je napeta na izmerjene podatke, ustrežata vrednostima $a=0,49$ V in $b=14,77$ μs . To pomeni, da je „prava“ porušitvena napetost ravninskega lipidnega dvosloja U_{brMIN} , zgrajenega iz POPC lipidnih molekul, enaka 0,49 V.



Slika 27. Porušitvena napetost (U_{br}) v odvisnosti od življenjske dobe (t_{br}) ravninskih lipidnih dvoslojev. Rdeče črte predstavljajo različno izbrane naklone (k) linearno naraščajočega signala. Črna črtasta krivulja predstavlja napeto krivuljo na izmerjene podatke po enačbi (16). Parameter a oziroma asimptota enačbe (16) predstavlja „pravo“ porušitveno napetost U_{brMIN} .

4.3 Razprava

Kadar raziskujemo metodo elektroporacije v biomedicini in biotehnologiji, je porušitvena napetost ena izmed pomembnejših lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Vrednost porušitvene napetosti je odvisna od trdnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Ravninski lipidni dvosloj je sicer le preprost model celične membrane, a predvidevamo, da so osnovni principi pojava elektroporacije enaki. Cilj te raziskave je bil poiskati merilni protokol za določitev porušitvene napetosti, s katerim bi se izognili večkratni izpostavitvi ravninskega lipidnega dvosloja električnim pulzom in napetostnemu stresu, ki se pri tem ustvari. Ker je iz literature znano, da prihaja pri izpostavitvah električnim pulzom do velike razpršenosti meritev, si želimo večjo ponovljivost pri določanju življenjske dobe ravninskih lipidnih dvoslojev.

V svojem magistrskem delu sem želel poiskati metodo, s katero bi omejil vlogo pred-izpostavitve ter naključnosti življenjske dobe ravninskega lipidnega dvosloja in mu določiti „pravo“ porušitveno napetost.

Z novim merilnim protokolom je ravninski lipidni dvosloj izpostavljen električnemu stresu le dvakrat. Prvič je izpostavljen električnemu pulzu amplitude 300 mV med merjenjem kapacitivnosti. Z meritvijo kapacitivnosti najlažje kontroliramo kvaliteto ravninskega lipidnega dvosloja. V naslednjem koraku uporabimo linearno naraščajoč signal ter porušimo ravninski lipidni dvosloj. Trenutek, ko začne skozi ravninski lipidni dvosloj teči tok, določa porušitveno napetost ter življenjsko dobo ravninskega lipidnega dvosloja.

Pri poizkusih smo uporabili štiri različne naklone linearno naraščajočega signala. Za izbiro različnih naklonov smo se odločili na podlagi člankov, ki opisujejo določanje porušitvene napetosti ravninskih lipidnih dvoslojev ter njihovo življenjsko dobo glede na amplitudo pulza [8, 50] in vpliva pred-izpostavitve ravninskih lipidnih dvoslojev na življenjsko dobo [30]. Naši rezultati kažejo, da sta porušitvena napetost ter življenjska doba ravninskega lipidnega dvosloja funkciji naklona linearno naraščajočega napetostnega signala. Linearno naraščajoča napetost z manjšim naklonom izpostavlja ravninski lipidni dvosloj napetosti dlje časa (daljša pred-izpostavitve), zato je porušitvena napetost nižja kot pri signalih z bolj strmim naklonom. Joshi s sodelavci je predstavil teoretični model, v katerem je preučeval nastajanje pore v celični membrani v odvisnosti od membranske napetosti ter časa izpostavitve [53]. S simulacijami so pokazali, da visokonapetostni pulzi ne povzročijo irreverzibilne poracije na celici, če so le ti dovolj kratki. V našem primeru imamo pri strmem naklonu linearno naraščajočega signala krajšo pred-izpostavitve ravninskega lipidnega dvosloja napetosti. Zaradi krajše pred-izpostavitve ima ravninski lipidni dvosloj višjo porušitveno napetost. Asimptota dvo-parametrne krivulje (enačba 16) ustreza porušitveni napetosti specifičnega lipidnega dvosloja, kar pomeni, da bi za ravninske lipidne dvosloje, tvorjene iz različnih lipidnih molekul, dobili različne porušitvene napetosti.

Evans s sodelavci je namesto ravninskega lipidnega dvosloja uporabil strukturo lipidnih veziklov, vzbujanje z električnim poljem pa je zamenjal s tlakom [54]. Tlak so ustvarjali s pipeto, ki je srkala membrano vezikla v svojo notranjost. Tlak srkanja so nadzorovali in ga linearno povečevali. Pri počasnem naraščanju tlaka se je membrana vezikla porušila pri

nižjem tlaku, kot če so tlak povečevali hitro. Opazimo analogijo rezultatov, le vzbujanje je v opisanem primeru „mehansko” v našem pa „električno”. Pri položnem linearno naraščajočem signalu je porušitvena napetost nižja. Pri strmem naklonu linearno naraščajočega signala pa je porušitvena napetost višja.

Poizkuse z enakimi molekulami lipidov (POPC) najdemo še v delu Troiana s sodelavci [8]. Iz njihovih rezultatov je razvidno, da je ob dolgih pravokotnih pulzih (10 s) porušitvena napetost komaj 167 mV. Vzrok tako nizki porušitveni napetosti je izpostavitve ravninskih lipidnih dvoslojev večjemu številu pulzov, ki je od ravninskega lipidnega dvosloja do ravninskega lipidnega dvosloja različno in ni vnaprej znano. Z našim novim protokolom ravninski lipidni dvosloj postavimo samo enkrat. Ko je defekt prisoten, z linearno naraščajočim signalom prisilimo membrano, da se podre.

Abidor s sodelavci je v svojem delu opisal veliko naključnost v življenjskem času ravninskega lipidnega dvosloja znotraj pulza [30]. Z novim protokolom smo omejili relativno napako na povprečno 3,5%, kar je ponovljivo pri vseh k . To predstavlja dovolj kontrolirano opazovanje porušitve ravninskega lipidnega dvosloja, da lahko v določeni meri zaupamo podatku o njegovi stabilnosti. Rezultati so v skladu z modelom Joshija s sodelavci, ki trdijo, da se bo membrana porušila, če je pri določeni velikosti pore na membrani še vedno prisotna napetost [53].

Asimptota krivulje enačbe (16) nas v svoji limiti vodi proti vrednosti, ki ustreza „pravi” porušitveni napetosti ravninskega lipidnega dvosloja U_{brMIN} . V našem primeru, za POPC, smo na ta način določili porušitveno napetost $U_{brMIN}=0,49$ V (slika 27).

5 Zaključek

Ravninski lipidni dvosloj je izredno preprost model celične membrane. Njegova preprostost in dostopnost nam omogoča enostavno merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. Ker principi elektroporacije še niso povsem znani, je tako preprost model, kot je ravninski lipidni dvosloj, izredno primeren za študij osnovnih principov. V zgodovini je bilo narejenih veliko poizkusov na ravninskih lipidnih dvoslojih. Raziskovalci so sestavljali različno zahtevne strukture membran, v različnih okoljih in različne sisteme za merjenje njihovih lastnosti. Ker so posamezne raziskovalne skupine zanimale različne lastnosti, so se tudi sistemi med seboj zelo razlikovali.

V Laboratoriju za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, smo se glede na našo raziskovalno usmeritev odločili spremljati elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev. Glavna lastnost, ki jo želelimo opazovati, je porušitvena napetost. Kapacitivnost, ki jo prav tako merimo, potrjuje pravilno strukturo ravninskega lipidnega dvosloja.

Predlagamo novo metodo opazovanja porušitvene napetosti, ki bi bila predvsem bolj enostavna in učinkovita od tistih, ki so jih uporabljali do sedaj. Pregled sistemov, podanih v literaturi, nam je omogočil narediti oceno, kaj je že bilo narejenega, do kakšnih zaključkov so raziskovalci prišli ter kako se ujema z našimi rezultati z novo metodo.

Porušitveno napetost ravninskega lipidnega dvosloja določimo z linearno naraščajočim signalom. Naklon ter končno napetost linearno naraščajočega signala je potrebno predhodno izbrati. Izbira končne napetosti mora zagotavljati, da se bo ravninski lipidni dvosloj zagotovo porušil.

Izkazalo se je, da je metoda dobra, saj lahko s pomočjo različnih naklonov linearno naraščajočih signalov pridemo do krivulje, katere parameter podaja prag poracije za opazovni ravninski lipidni dvosloj. Porušitvena napetost ravninskih lipidnih dvoslojev, sestavljene iz molekul POPC, je enaka 0,49 V. Prav tako lahko zaupamo vrednostim porušitvene napetosti zato, ker je ravninski lipidni dvosloj porušen z enkratno izpostavitvijo napetostnemu signalu. Pokazali pa smo tudi, da je meritev porušitvene napetosti in živiljske dobe znotraj enega naklona linearno naraščajočega signala ponovljiva.

V prihodnosti bomo predlagano metodo preizkusili na ravninskih lipidnih dvoslojih,

zgrajenih iz različnih lipidnih molekul. Prav tako bomo lahko izmerili porušitveno napetost na ravninskem lipidnem dvosloju sestavljenem iz dveh ali več različnih vrst lipidnih molekul ali mešanice lipidnih molekul ter površinsko aktivnih molekul.

Literatura

- [1] H.T.Tien, A.Ottova, *The lipid bilayer concept: Experimental realization and current applications*, In Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications, (Ed. H.T.Tien, A.Ottova-Leitmannova) pp. 1-74, Elsevier, New York 2003.
- [2] A.L.Ottova, H.T.Tien, *The 40th anniversary of bilayer lipid membrane research*, Bioelectrochemistry 56, 171-173 (2001).
- [3] H.T.Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM)*, Marcel Dekker, inc., New York 1974.
- [4] H.T.Tien, S.H.Wurster, A.L.Ottova, *Electrochemistry of supported bilayer lipid membranes: background and techniques for biosensor development*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics 42, 77-49 (1997).
- [5] Avanti polar lipids inc. *www.avantilipids.com*, 2005.
- [6] M.Smeyers, M.Leonetti, E.Goormaghtigh, F.Homble, *Structure and function of plant membrane ion channels reconstituted in planar lipid bilayers*, In Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications. (Ed. H.T.Tien, A.Ottova-Leitmannova) pp. 449-478, Elsevier, New York 2003.
- [7] B.E.Ehrlich, *Incorporation of Ion Channels in Planar Lipid Bilayers: How to Make Bilayers Work for You*, In The Heart and Cardiovascular System, (Ed. H.A.Fozzard et al.) pp. 551-560, Raven Press, New York 1992.
- [8] G.C.Troiano, L.Tung, V.Sharma, K.J.Stebe, *The Reduction in Electroporation Voltages by the Addition of Surfactant to Planar Lipid Bilayer*, Biophysical Journal 75, 880-888 (1998).
- [9] V.Sharma, K.Uma Maheswari, J.C.Murphy, L.Tung, *Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation*, Biophysical Journal 71, 3229-3241 (1996).
- [10] T.F.Eibert, M.Alaydrus, F.Wilczewski, V.W.Hansen, *Electromagnetic and Thermal*

- Analysis for Lipid Bilayer Membranes Exposed to RF Fields*, IEEE transactions on biomedical engineering 46, 1013-1021 (1999).
- [11] A.Iglič, V.Kralj-Iglič, *Effect of anisotropic properties of membrane constituents on stable shapes of membrane bilayer structure*, In Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications, (Ed. H.T.Tien, A.Ottova-Leitmannova) pp. 143-172, Elsevier, New York 2003.
- [12] W.Meier, A.Graff, A.Diederich, M.Winterhalter, *Stabilization of planar lipid membranes: A stratified layer approach*, Biochimica et Biophysica Acta 2000, 4559-4562 (2000).
- [13] A.Diederich, G.Bahr, M.Winterhalter, *Influence of surface charges on the rapture of black lipid membranes*, Physical Review E 58, 4883-4889 (1998).
- [14] R.Benz, K.Janko, *Voltage-induced capacitance relaxation of lipid bilayer membranes; effects on membrane composition*, Biochimica et Biophysica Acta 455, 721-738 (1976).
- [15] J.Vargas, J.M.Alarcon, E.Rojas, *Displacement Currents Associated with the insertion of Alzheimer Disease Amyloid (Beta)-Peptide into Planar Bilayer Membranes*, Biophysical Journal 79, 934-944 (2000).
- [16] C.Wilhelm, M.Winterhalter, U.Zimmermann, R.Benz, *Kinetics of pore size during irreversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes*, Biophysical Journal 64, 121-128 (1993).
- [17] R.Benz, F.Beckers, U.Zimmermann, *Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membranes: A Charge-Pulse Relaxation Study*, Journal of Membrane Biology 48, 181-204 (1979).
- [18] S.Micelli, E.Gallucci, D.Meleleo, V.Stipani, V.Picciarelli, *Mitochondrial porin incorporation into black lipid membranes: ionic and gating contribution to the total current*, Bioelectrochemistry 75, 97-106 (2002).

- [19] S.Micelli, E.Gallucci, V.Picciarelli, *Studies of mitochondrial porin incorporation parameters and voltage-gated mechanism with different black lipid membranes*, *Bioelectrochemistry* 52, 63-75 (2000).
- [20] E.Gallucci, S.Micelli, G.Monticelli, *Pore Formation in Lipid Bilayer Membranes Made of Phosphatidylinositol and Oxidized Cholesterol Followed by Means of Alternating Current*, *Biophysical Journal* 71, 824-831 (1996).
- [21] S.Kalinowski, Z.Figaszewski, *A new system for bilayer lipid membrane capacitance measurements: method, apparatus and applications*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1112, 57-66 (1992).
- [22] S.Koronkiewicz, S.Kalinowski, K.Bryl, *Programmable chronopotentiometry as a tool for the study of electroporation and resealing of pores in bilayer lipid membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1561, 222-229 (2004).
- [23] A.Ridi, E.Scalas, M.Robello, A.Gliozzi, *Linear response of a fluctuating lipid bilayer*, *Thin Solid Films* 327-329, 796-799 (1998).
- [24] K.C.Melikov, V.A.Frolov, A.Shcherbakov, A.V.Samsonov, Y.A.Chizmadzhev, L.V.Chernomordik, *Voltage-Induced Nonconductive Pre-Pores and Metastable Single Pores in Unmodified Planar Lipid Bilayer*, *Biophysical Journal* 80, 1829-1836 (2001).
- [25] S.Kalinowski, G.Ibron, K.Bryl, Z.Figaszewski, *Chronopotentiometric studies of electroporation of bilayer lipid membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1396, 204-212 (1998).
- [26] R.W.Glaser, S.L.Leikin, L.V.Chernomordik, V.F.Pastushenko, A.I.Sokirko, *Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores*, *Biochimica et Biophysica Acta* 940, 275-287 (1988).
- [27] M.Robello, A.Gliozzi, *Conductance transition induced by an electric field in lipid bilayers*, *Biochimica et Biophysica Acta* 982, 173-176 (1989).
- [28] A.Ridi, E.Scalas, A.Gliozzi, *Noise measurements in bilayer lipid membranes during electroporation*, *The European Physical Journal E* 2, 161-168 (2000).


- [29] E.Scalas, A.Ridi, M.Robello, A.Gliozzi, *Flicker noise in bilayer lipid membranes*, Europhysical Letters 43, 101-105 (1998).
- [30] I.G.Abidor, V.B.Arakelyan, L.V.Chernomordik, Y.A.Chizmadzhev, V.F.Pastushenko, M.R.Tarasevich, *246 - Electric Breakdown of Bilayer Lipid Membranes I. The Main Experimental Facts and Their Qualitative Discussion*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics 6, 37-52 (1979).
- [31] L.V.Chernomordik, S.I.Sukharev, S.V.Popov, V.F.Pastushenko, A.V.Sokirko, I.G.Abidor, Y.A.Chizmadzhev, *The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies*, Biochimica et Biophysica Acta 902, 360-373 (1987).
- [32] A.N.Chanturiya, *Detection of transient capacitance increase associated with channel formation in lipid bilayers*, Biochimica et Biophysica Acta 1026, 248-250 (1990).
- [33] Y.Hanyu, T.Yamada, G.Matsumoto, *Simultaneous Measurement of Spectroscopic and Physiological Signals from a Planar Bilayer System: Detecting Voltage-Dependent Movement of a Membrane-Incorporated Peptide*, Biochemistry 1998, 15376-15382 (1998).
- [34] Y. Hanyu, *Simultaneous Measurement of Spectroscopic and Physiological Signals from a Planar Bilayer System*, In Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications, (Ed. H.T.Tien, A.Ottova-Leitmannova) pp. 1017-1029, Elsevier, New York 2003.
- [35] D.Rosen, A.M.Sutton, *The effects of a direct current potential bias on the electrical properties of bimolecular lipid membranes*, Biochimica et Biophysica Acta 163, 226-233 (1968).
- [36] D.Wobschall, *Voltage Dependence of Bilayer Membrane Capacitance*, Journal of Colloid and Interface Science 40, 417-423 (1972).
- [37] S.H.White, T.E.Thompson, *Capacitance, Area, and Thickness Variations in thin Lipid Films*, Biochimica et Biophysica Acta 323, 7-22 (1973).

- [38] H.Yamaguchi, H.Nakanishi, *Characterization of the preparation process and the photochemical control of electrical properties of bilayer lipid membranes containing azobenzene chromophores*, Biochimica et Biophysica Acta 1148, 179-184 (1993).
- [39] K.Uma Maheswari, T.Ramachandran, D.Rajaji, *Interaction of cisplatin with planar model membranes - dose dependent change in electrical characteristics*, Biochimica et Biophysica Acta 1463, 230-240 (2004).
- [40] M.Naumowicz, A.D.Petelska, Z.A.Figaszewski, *Capacitance and resistance of the bilayer lipid membrane formed of Phosphatidylcholine and cholesterol*, Cellular & Molecular Biology Letters 8, 5-18 (2003).
- [41] I.Genco, A.Gliozzi, A.Relini, M.Robello, E.Scalas, *Electroporation in symmetric and asymmetric membranes*, Biochimica et Biophysica Acta 1149, 10-18 (1993).
- [42] E.Pescio, A.Ridi, A.Gliozzi, *A picoampere current generator for membrane electroporation*, Review of scientific instruments 71, 1740-1744 (2000).
- [43] M.Robello, M.Fresia, L.Maga, A.Grasso, S.Ciani, *Permeation of Divalent Cations Through (alpha)-Latrotoxin Channels in Lipid Bilayers: Steady-State Current-Voltage Relationship*, Journal of Membrane Biology 95, 55-62 (1987).
- [44] S.Kalinowski, Z.Figaszewski, *A four-electrode system for measurement of bilayer lipid membrane capacitance*, Meas Sci Technol 6, 1034-1049 (1995).
- [45] S.Kalinowski, Z.Figaszewski, *A four-electrode potentiostat-galvanostat for studies of bilayer lipid membranes*, Meas Sci Technol 6, 1050-1055 (1995).
- [46] Warner Instruments www.warneronline.com, 2005.
- [47] D.P.Tieleman, H.Leontiadou, A.E.Mark, S.J.Marrink, *Simulation of Pore Formation in Lipid Bilayers by Mechanical Stress and Electric Fields*, JACS Communications, objavljeno na spletu (2003).
- [48] H.Leontiadou, A.E.Mark, S.J.Marrink, *Molecular Dynamics Simulations of Hydrophilic Pores in Lipid Bilayers*, Biophysical Journal 86, 2156-2164 (2004).

- [49] M.Tarek, *Membrane electroporation: A Molecular Dynamics Simulation*, Biophysical Journal 88, 4045-4053, 2005.
- [50] A.Maček Lebar, G.C.Troiano, L.Tung, D.Miklavčič, *Inter-pulse interval between rectangular voltage pulses affects electroporation threshold of artificial lipid bilayers*, IEEE Transactions on Nanobioscience 3, 116-120 (2002).
- [51] P.Kramar *Sistem za elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev*, Fakulteta za Elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Diplomsko delo univerzitetnega študija, (2003).
- [52] L.Vodovnik *Nevrokibernetika*, Fakulteta za Elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, (1991).
- [53] R.P.Joshi, K.H.Schoenbach, *Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulses: A numerical simulation study*, Physical Review E 1025-1033 (2000).
- [54] E.Evans, V.Heinrich, F.Ludwig, W. Rawicz, *Dynamic Tension Spectroscopy and Strength of Biomembranes*, Biophysical Journal 85, 2342-2350 (2003).

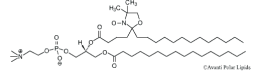
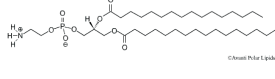
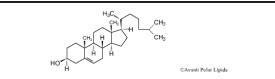
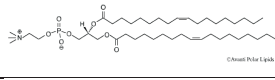
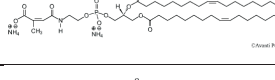
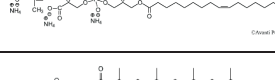
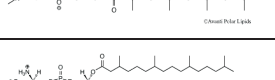
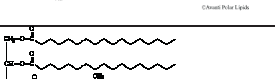
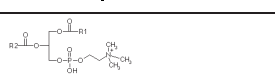
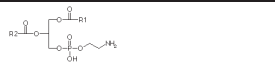
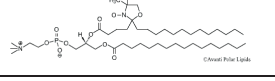
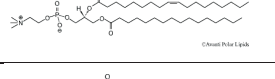
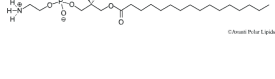
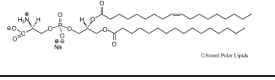
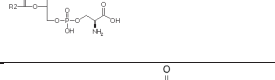
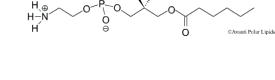
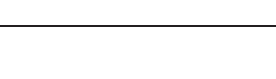
A Tabela pregleda sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Tabela vsebuje ime merilnega sistema z oznako navedene publikacije, tip vzbujalnega signala, vrsto lipidne molekule, koncentracijo soli v vodni raztopini, volumen lipida glede na vodno raztopino, volumen komore, število in vrsto elektrod, premer d ali površino A luknjice ter temperaturo okolice T med poizkusi.

Sistem	Signal	Lipid	Vodna raztopina	Volumen lipida	Volumen komore	elektrode	A/d	T
<i>Napetostno vzbujanje -> pravokotna oblika signalov</i>								
Benz [14, 17]	10 mV - 2 V / 500 μ s - 500 ms	PC, DPhPC, DOPC, POPC, PE, Ox Ch	1 M KCl, 0,1 M NaCl	2% (w:v)	3 cm ³ / prekat	2-Ag-AgCl	2 mm ²	25°C
Benz - Zimmermann - Winterhalter [12, 13, 16, 17, 24, 26, 31]	10 mV - 2 V / 500 μ s - 500 ms	Ox Ch (+ DOPC ali + PE), azolecitin, DPHPC, PS, DOPC, DOPE pH=6,7	10 mM, 100 mM, 1 M, 2 M, 3 M KCl	1 μ l, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 40 mg/ml	5 ml / prekat, 15 ml / prekat	2-Ag-AgCl	100 - 200 μ m, 0,3 - 3 mm, 1 mm ² , 2 mm ²	20°C, 22°C, 25°C, 30°C
Abidor - Chernomordik - Chizmadzhev - Pastushenko [30]	100 mV / 1 μ s, 400 mV / 1 μ s	Ch:lecitin 3:1, sint. lecitin	0,1 M NaCl + 10 M Tris HCl	40 mg/cm ³	-	-	-	27°C, (62°C za sint. lecitin)
Chanturya [32]	10 mV - 1 V / 10 - 100 μ s	PC:Ch 2:1	10 mM Tris, pH=7,4	20 mg/ml	9 ml	- Ag-AgCl	0,6 mm	-
Sharma - Stebe - Tung [8, 9]	100 mV / 10 μ s, 510 μ s: 	POPC, azolecitin	100 mM KCl, pH=7,4	10 mg/ml, 20 mg/ml	3 ml / prekat	4-Ag-AgCl	75-100 μ m, 105 μ m	22°C - 24°C
Hanyu - Yamada - Matsumoto [33, 34]	0,1 - 1 V	TRITC DHPE	-	5 mg/ml	-	4-Ag-AgCl	120 μ m	-
Vargas - Alorcon - Rojas [15]	-300 mV, 300 mV, 30 s	POPE, PS	50 mM KCl	50 mg/ml	1 cm ³ / prekat	- Ag-AgCl	50 μ m	-
<i>Napetostno vzbujanje -> sinusna oblika signala</i>								
Rosen - Sutton [35]	AC 5 mV / 500 Hz, DC \pm 200 mV	Lecitin	1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M KCl ali NaCl	-	-	Pt	1 mm	22°C
Wobshall [36]	5-15 mV _{RMS} / 4 kHz + DC pulz 0,1 - 0,2 Hz	Ch + HDTAC	150 μ M HDTAC + 40 mM KCl, pH=6,7	12 mg/ml	-	4 Ag-AgCl	-	30°C
White - Tompson [37]	20 mV / 100 Hz	Lecitin	0,1 M KCl, pH=5,6-5,8	1 μ l	-	-	1 mm	20°C
Yamaguchi - Nakanishi [38]	7 mV _{RMS} / 1 kHz + optič	GMO	0,1 M KCl	-	-	2-Pt	0,7 mm	25°C
Gallucci - Micelli [18-20]	poljubna napetost / 1 Hz + 2 mV / 1 kHz	PI, Ox Ch	0,1, 0,5, 1 M KCl	1% (w:v)	4 ml / prekat	2-Pt	1,3 mm	22-24 \pm 1°C
Maheswari - Ramachandran - Rajaji [39]	40 mV _{RMS} / 40 Hz - 200 kHz (30 korakov)	PC + PE	0,01, 0,1, 1 M NaCl, pH=6,0 in 7,0	5 mg/ml	-	4-Ag-AgCl	120 μ m	-
Naumowicz - Petelska - Figaszewski [40]	4 mV / 0,01-10 kHz	Lecitin:Ch 1:1	0,1 M KCl	20 mg	-	2-Ag-AgCl, 1 Pt	-	-
<i>Tokovno vzbujanje</i>								
Robello - Gliozzi [23, 27-29, 41-43]	Žaga 2,5 10 ⁻³ Hz C-meritev z U (10 mV _{p-p}), stopnica	Lecitin:Ch 1:1, PC:Ch 4:1, PC, Ch, DPhPC, PS	10 mM TrisCl, pH=7,5, 0,1 M, 1 M KCl	10 mg/ml	2 ml / prekat	2-Ag-AgCl	100-150 μ m, 160 μ m, 200 μ m	-
Kalinovski - Figaszewski [21, 22, 25, 44, 45]	Tok=konst.: 0,005, 0,2, 0,3, 2 nA; stopnica 0,2 nA / 10 s. Pravokot. 8x 0,2 nA / 10 s	PC:Ch, Lecitin, PS, memb. človešk. eritrocita	0,1 M KCl	20 mg/ml	10 cm ³	4-Ag-AgCl (0,5x80) mm	1 mm	23-25 \pm 1°C



























B Tabela lipidnih molekul

Tabela lipidnih molekul je sestavljena iz oznake, polnega imena in strukturne formule. Navedene so vse lipidne molekule, ki sem jih zasledil med pregledom sistemov za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev. Polno ime je zapisano v angleški nomenklaturi, ker ga je tako lažje najti v strokovni literaturi ali na spletu.

oznaka	polno ime	strukturna formula
5-SLPC	1-palmitoyl-2-stearoyl(5-DOXYL)-3-phosphocholine	
B-X-DPPE	N-((6-biotinyl) amino)hexanoyl)-1, 2-dihexadecanoyl-3-phosphoethanolamine	
Ch	holesterol	
DOPC	dioleoyl phosphatidylcholine	
DOPE	dioleoyl phosphatidylethanolamine	
DOPS	dioleoyl phosphatidylserine	
DPhPC	diphytanoyl phosphatidylcholine	
DPhPS	diphytanoyl phosphatidylserine	
Lecitin	lecitin	
PC	phosphatidylcholine	
PE	phosphatidylethanolamine	
PI	phosphatidylinosital	
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-3-phosphocholine	
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylethanolamine	
POPS	1-palmitoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylserine	
PS	phosphatidylserine	
TRITC DHPE	N-6(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)1, 2-dihexadecanoyl-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt	

C Pregled izmerjenih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Tabela vsebuje podatke o lipidnih molekulah, koncentracij soli v vodni raztopini, času pravokotnega pulza T , če je le-ta podan, obliki vzbujalnega signala, izmerjeni porušitveni napetost ravninskega lipidnega dvosloja U_{br} , kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja c normirani na površino, upornosti ravninskega lipidnega dvosloja r normirani na površino, debelini ravninskega lipidnega dvosloja d ter oznako navedene publikacije.

Lipid	Vodna raztopina	T [μ s]	Signal	U_{br} [mV]	c [μ F/cm ²]	r [M Ω cm ²]	d [nm]	Ref.
Azolecitin	0,1 M KCl	10		423,4±29,4	0,59±0,21	-	-	[9]
		510		441,6±23,2				
DOPC	0,1 M NaCl	-		-	0,37±0,01	0,40	4,97±0,17	[14]
DOPE	0,1 M NaCl	-		-	0,37±0,01	0,40	5,00±0,16	[14]
DPhPC	0,1 M KCl	-		390±20	0,6-0,75	7,85-17,76	-	[23, 27, 28, 41]
	1 M KCl	-		-	0,74-1,13	24,3-54,9	-	[23, 29]
	0,1 M KCl	10		546±15	-	-	-	[12, 13]
	0,1 M NaCl	-		-	0,36±0,02	0,40	5,08±0,21	[14]
	0,1 M KCl	-		-	0,9-1	-	-	[24]
DPhPS	0,1 M KCl	10		530±15	-	-	-	[12, 13]
Lecitin	10 ³ -1 M NaCl ali KCl	-		-	0,32-0,64	1-10	-	[35]
Ox Ch	1 M KCl	-		-	0,40	0,25	-	[18]
	0,1 M KCl	-		-	0,45±0,01	0,21±0,01	-	[20]
	0,5 M KCl				0,47±0,04	0,23±0,01		
	1 M KCl				0,40±0,01	0,20±0,03		
	1 M KCl	10		-	0,56	-	3,3	[17]
PC	0,1 M KCl	-		280±30	0,75	-	-	[27, 41]
	0,1 M NaCl	-		-	0,34±0,01	0,40	5,48±0,17	[14]
PE	0,1 M NaCl	-		-	0,33±0,01	0,40	5,67±0,22	[14]
PI	1 M KCl	-		-	0,25	0,4	-	[18]
	0,1 M KCl	-		-	0,30±0,01	0,37±0,01	-	[20]
	0,5 M KCl				0,27±0,01	0,34±0,01		
	1 M KCl				0,25±0,01	0,38±0,06		
POPC	0,1 M KCl	10		400±6	-	-	-	[12, 13]
	0,1 M KCl	10		450±24	0,59±0,15	-	-	[8]
		100		398±19				
		10 ³		331±20				
		10 ⁴		282±26				
		10 ⁵		258±9				
		10 ⁶		213±18				
		10 ⁷		167±6				
POPS	0,1 M KCl	10						
PS	0,1 M KCl	-		500±50	-	-	-	[41]
Kombinacije lipidov								
PC+Ch	0,1 M KCl	-		270±20	-	-	-	[41]
PC+PE	0,1 M NaCl	-		-	0,1	-	-	[32]
Lecitin + Ch 1:1	0,1 M KCl	-		-	0,38-0,61	0,014-2,12	-	[36]
	10 mM TrisCl	-		-	-	-	-	[39]

Meritev porušitvene napetosti ravninskega lipidnega dvosloja

Izjavljam, da sem magistersko delo izdelal samostojno pod vodstvom mentorice doc. dr. Alenke Maček Lebar, univ. dipl. inž. el. Izkazano pomoč drugih sodelavcev sem v celoti navedel v zahvali.

Peter Kramar, univ. dipl. inž. el.

