



Politechnika Wrocławska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

## PRACA DYPLOMOWA

**Tytuł pracy dyplomowej:**

**Charakteryzacja populacji  
jednowarstwowych mikroliposomów**

**Autor: Joanna Doscocz**

**Opiekun: prof. dr hab. inż. Marek Langner**

słowa kluczowe: dwuwarstwy lipidowe, mechanika błony

Błona biologiczna jest niezwykle złożoną strukturą, dlatego bezpośrednie badanie jej właściwości jest bardzo skomplikowanym zadaniem. Z tego powodu do pomiarów wykorzystuje się sztuczne modele. Przykładem są liposomy stosowane do badania właściwości mechanicznych błony. Jednak dane literaturowe wskazują, że wartości otrzymanych współczynników mechanicznych różnią się w zależności od użytej techniki pomiarowej. W pracy zbadano rozkład parametrów mechanicznych populacji liposomów i zauważono, że różnica pomiędzy wartościami współczynnika mechanicznego wyznaczonego różnymi technikami może być wynikiem zastosowania nieodpowiedniej statystyki do charakteru rozkładu, z którego pochodzą badane wartości współczynnika mechanicznego.



## Spis treści

1. Błona biologiczna .....	4
1.1 Budowa błony komórkowej.....	4
1.2 Model płynnej mozaiki .....	5
1.3 Modele doświadczalne błony komórkowej .....	7
2. Liposomy .....	8
2.1. Formowanie .....	8
2.2. Mechanika błony komórkowej .....	10
3. Cel pracy .....	14
4. Materiały .....	14
5. Metody .....	14
5.1. Formowanie ogromnych jednowarstwowych liposomów .....	14
5.2. Pomiar parametrów mechanicznych liposomów .....	15
5.3. Test zgodności .....	15
6. Wyniki.....	16
6.1. Optymalizacja ustawień mikroskopu.....	16
6.2. Wybór sondy fluorescencyjnej .....	16
6.3. Pomiar statystycznych prób populacji liposomów .....	18
7. Wnioski .....	22
Literatura .....	23

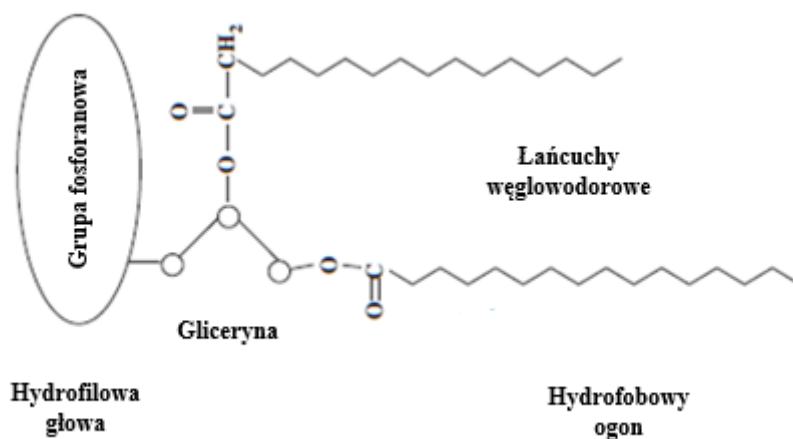
## 1. BŁONA BIOLOGICZNA

Każda komórka otoczona jest błoną biologiczną, która ma za zadanie zapewnić integralność poprzez odseparowanie komórki od zewnętrznego środowiska. Separacja nie jest całkowita, ponieważ komórka potrzebuje stale pozyskiwać substancje z otoczenia (np. składniki odżywcze) oraz jednocześnie pozbywać się toksycznych produktów przemiany materii ze swojego wnętrza. W konsekwencji błona biologiczna jest selektywnie przepuszczalna co pozwala na kontrolę ilości oraz typu transportowanych cząsteczek. W efekcie tworzy optymalne środowisko dla działania enzymów, receptorów czy pomp jonowych. Błona biologiczna zapewnia integralność, a ponadto przekazuje sygnały chemiczne, co pozwala na komunikację pomiędzy przedziałami. [1,2]

Błona biologiczna jest niezwykle złożoną strukturą. Mimo poznania jej ilościowego składu (obecność lipidów i białek) na przełomie XIX i XX, jeszcze długo nie rozumiano reguł przestrzennego rozmieszczenia składników w błonie. Dopiero w latach 70. XX wieku Singer i Nicolson zaproponowali model płynnej mozaiki, który w jednoznaczny sposób pozwolił połączyć wyniki wszystkich ówczesnych badań dotyczących błony biologicznej z jej budową. Płynna mozaika jest nadal obowiązującym modelem, chociaż, wraz z kolejnymi informacjami dotyczącymi właściwości błony pojawiającymi się na podstawie późniejszych badań, jest ona stale modyfikowana.

### 1.1 BUDOWA BŁONY KOMÓRKOWEJ

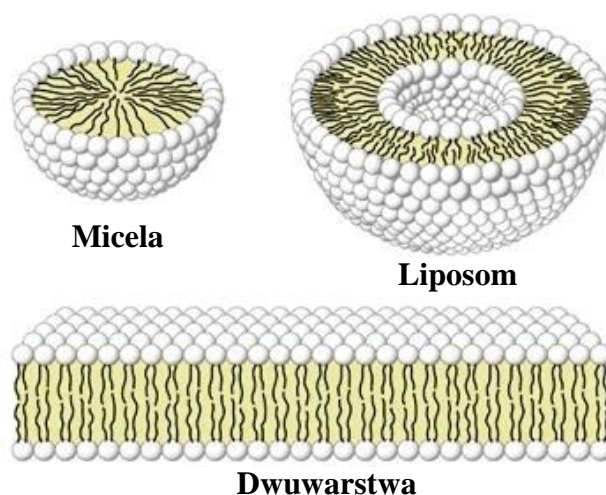
Błona biologiczna składa się głównie z białek i lipidów. Procentowa zawartość poszczególnych komponentów zależy głównie od funkcji i typu komórki. Przykładowo, w błonach mielinowych komórki nerwowej, białka stanowią zaledwie 25% suchej masy, a w błonie chloroplastów - aż 75%. [3]



Rysunek 1 Lecytyna jako przykład budowy cząsteczki fosfolipidu [1]

Lipidy to szeroka grupa związków chemicznych charakteryzujących się wysoką rozpuszczalnością w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. W. Christie zaproponował, żeby „terminem lipidy określać kwasy tłuszczowe, ich pochodne oraz substancje związane z nimi bądź biochemicznie bądź poprzez funkcje w organizmie” [4]. Główne klasy lipidów to: fosfolipidy, glikolipidy oraz sterole. W błonach, najszerszej występującymi lipidami są fosfolipidy, czyli pochodne glicerolu, gdzie dwie z grup wodorotlenowych zostały zastąpione łańcuchami reszt kwasów tłuszczowych, a trzecia - grupą

fosforanową. Na rysunku 1 pokazano schemat budowy fosfolipidu na przykładzie lecytyny. Cząsteczki lipidowe wykazują amfifilową naturę, ponieważ są zbudowane zarówno z hydrofilowych głów fosforanowych oraz długich łańcuchów węglowodorowych. Głowy fosforanowe posiadają niezerowy elektryczny moment dipolowy. Z kolei łańcuchy węglowodorowe mają charakter hydrofobowy, ponieważ są pozbawione momentu dipolowego. Powoduje to, że w rozpuszczalnikach polarnych cząsteczki grupują się i organizują w taki sposób, by tylko hydrofilowa część oddziaływała z molekułami wody, a hydrofobowa nie. Jest to związane z efektem hydrofobowym, który wynika z maksymalizacji entropii układu. Ze względu na to, że o entropii decyduje liczebność molekuł, to w przypadku środowiska biologicznego, o entropii przesądza woda, ponieważ jest jej znacząco więcej niż jakichkolwiek innych cząsteczek. Maksymalizacja entropii cząsteczek wody powoduje powstawanie takiej organizacji innych molekuł, że minimalizowana jest ilość cząsteczek wody o ograniczonej swobodzie, czyli na przykład na granicy faz. Ostatecznie efekt hydrofobowy, powoduje agregacje cząsteczek hydrofobowych i amfifilowych. [5] W przypadku związków lipidowych przykładem struktur powstałych w wyniku efektu hydrofobowego są mono- i dwuwarstwy lipidowe, micelle oraz liposomy, których schematy przedstawiono na rysunku 2. Warstwy monomolekularne powstają na powierzchni, dwuwarstwy i micelle – w objętości wody. [3]



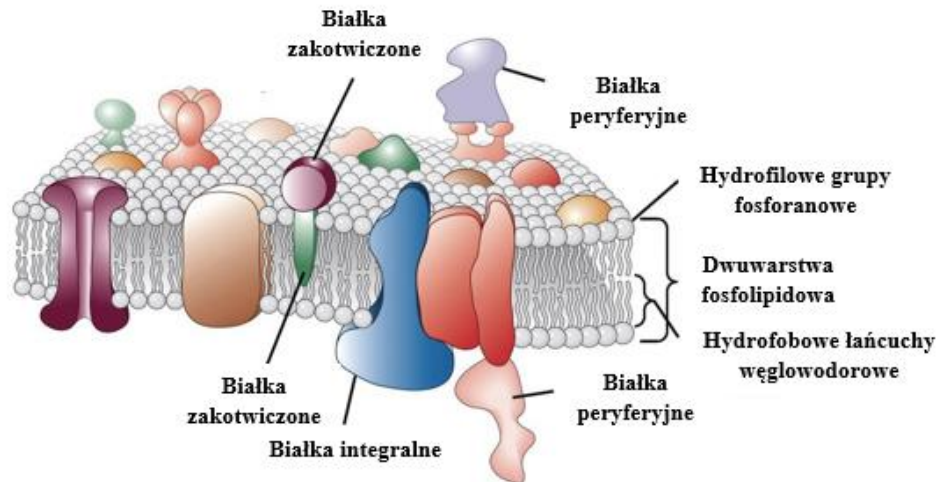
Rysunek 2 Przykładowe struktury tworzone przez cząsteczki lipidowe w środowisku wodnym [6]

## 1.2 MODEL PŁYNNEJ MOZAIKI

Model płynnej mozaiki, którego poglądowy schemat przedstawiono na rysunku 3, po kilku modyfikacjach, jest nadal funkcjonującym modelem błony komórkowej. Zgodnie z tym modelem, główną jednostką strukturalną błony komórkowej jest dwuwarstwa lipidowa rozdzielająca dwa roztwory wodne. Błona zapewnia integralność wnętrza komórki, ponieważ stanowi barierę dyfuzyjną. Można ją potraktować, jako dwuwymiarową ciecz, ponieważ ruch cząsteczek w płaszczyźnie błony jest ograniczony tylko lepkością, co pozwala na przemieszczanie lipidów i białek wzdłuż powierzchni wody. Jedynie sterole mają zdolność przemieszczania się w poprzek błony. [7] Nazwa modelu wskazuje przede wszystkim na to, że jest to struktura wysoce dynamiczna. Badania pokazały, że w temperaturze pokojowej łańcuchy węglowodorowe nie są rozciągnięte i posiadają znaczną swobodę rotacji. [8]

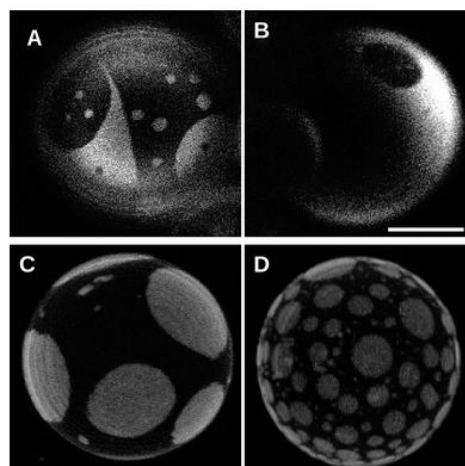
Do uformowania dwuwarstwy niezbędne są lipidy (fosfolipidy i sfingolipidy) o długich łańcuchach węglowodorowych i polarnych głowach, a stabilność struktury zapewnia efekt hydrofobowy. Sterole nie tworzą samodzielnie dwuwarstwy, ale nadają jej specyficznych

właściwości. Przykładem jest cholesterol występujący w błonach komórek eukariotycznych, ponieważ ogranicza ruchliwość łańcuchów węglowodorowych (dzięki czemu błona biologiczna, w pewnym zakresie temperatur, nie posiada przejść fazowych), usztywnia oraz zmniejsza jej przepuszczalność dla małych cząstek [9].



Rysunek 3 Model płynnej mozaiki [11]

Dwuwarstwa lipidowa pełni również rolę rozpuszczalnika dla białek błonowych, które są zanurzone w niej w różnym stopniu. Dzieli się je na peryferyjne oraz integralne. Pierwsze z nich są związane z dwuwarstwą lipidową oddziaływaniami elektrostatycznymi, drugie – hydrofobowymi. Białka błonowe uczestniczą w kluczowych procesach komórkowych: pozwalają na selektywny transport poszczególnych substancji przez błonę również, jak w przypadku pompy sodowo-potasowej, wbrew bodźcom termodynamicznym oraz tworzą system receptorów antygenów i neuroprzekazników. [10]



Rysunek 4 Przykłady domen lipidowych zarejestrowanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (skala 15 mikronów) [14]

Od czasu wprowadzenia modelu płynnej mozaiki przez Singera i Nicolsona, przeprowadzono wiele badań i pojawiły się nowe informacje dotyczące błony komórkowej. Model jest, więc stale udoskonalany. Przykładem wprowadzonej modyfikacji było

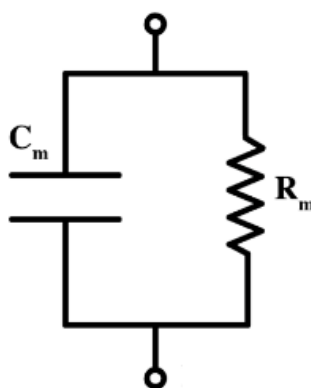
uwzględnienie asymetrii składu lipidowego - zauważono, że rozkład lipidów różni się pomiędzy warstwami błony. Przykładem jest błona erytrocytów, ponieważ w tym przypadku monowarstwa zewnętrzna zawiera wszystkie glikolipidy, a wewnętrzna – praktycznie jest ich pozbawiona. Z kolei zupełnie przeciwna sytuacja jest w przypadku fosfodiloseryny – jej obecność w warstwie zewnętrznej jest jedną z pierwszych wskaźników śmierci komórki. [12]

Jednak, jak się okazało na podstawie kolejnych badań, błona biologiczna wykazuje niejednorodności składu lipidowego również na powierzchni. Innym przykładem modyfikacji modelu płynnej mozaiki jest wprowadzenie mikrodomen lipidowych - niejednorodności błony w płaszczyźnie, których przykłady przedstawiono na rysunku 4. Najpowszechniejszym przykładem są domeny cholesterolowe, czyli obszary na błonie o zwiększonej zawartości cholesterolu. [13]

### 1.3 MODELE DOŚWIADCZALNE BŁONY KOMÓRKOWEJ

Błona komórkowa jest niezwykle złożoną strukturą uczestniczącą w niemalże wszystkich procesach zachodzących w komórce. Dlatego też bardzo trudno zrozumieć i badać jej właściwości takie jak topologia, zdolność do fuzji czy przepuszczalność. Z tego powodu, do badania poszczególnych właściwości błony, wykorzystuje się różne modele doświadczalne. [15]

Modele doświadczalne można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich, należą takie modele, które nie przypominają błony komórkowej ani pod względem składu chemicznego, ani pod względem wymiarów, jednak wykazują podobne właściwości. Przykładem jest syntetyczna błona jonowymienna, która jest wykorzystywana w badaniach procesów wymiany jonów na błonie. W przypadku takich modeli, nie jest jednak możliwe wnioskowanie o zależności pomiędzy właściwościami, a strukturą błony biologicznej. [16] Innym przykładem takiego typu modelu jest schemat elektryczny błony komórkowej. Zakłada on, że błona biologiczna jest izolatorem oddzielającym dwa przewodzące elektrycznie przedziały. Obwód elektryczny, opisujący błonę komórkową, składa się z kondensatora połączonego równolegle z opornikiem (Rysunek 5). Model jest wykorzystywany do wyznaczenia grubości dwuwarstwy lipidowej poprzez pomiar pojemności elektrycznej. [17]



Rysunek 5 Schemat elektryczny dwuwarstwy lipidowej: równolegle połączony kondensator o pojemności  $C_m$  z rezystorem o oporności  $R_m$

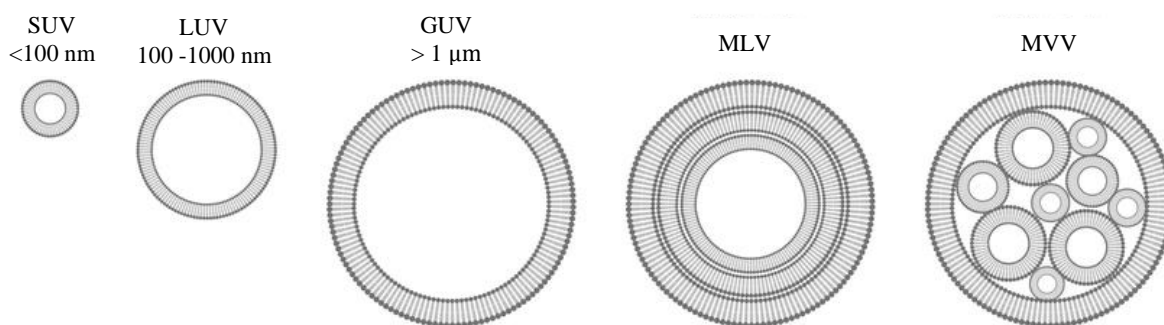
Do drugiej grupy zalicza się modele, których struktury są podobne do błony komórkowej pod względem składu chemicznego; innymi słowy są zbudowane z komponentów, które również budują błonę. Najprostszym tego typu modelem jest monowarstwa lipidowa, która tworzy się na powierzchni wody. Najczęściej jest wykorzystywana do badania oddziaływania



lipidów z innymi związkami [18]. Kolejne modele są oparte na dwuwarstwie lipidowej. Pierwszy z nich to SLBs (ang. Supported Lipid Bilayers), w której jedna lub kilka warstw lipidowych jest nałożona na stałe podłoże (np. gładkie szkło). Niektóre z właściwości tego modelu, takie jak grubość, pojemność elektryczna czy współczynnik przenikania dla większości substancji, są podobne do właściwości błony. Kolejnym modelem są sferyczne pęcherzyki, czyli liposomy, które pozwalają na pomiary strumieni dyfuzyjnych. [15]

## 2. LIPOSOMY

Liposomy to sferyczne, samoorganizujące się koloidalne powłoki o rozmiarach średnicy od 20 nm do 100  $\mu\text{m}$ . Ich nazwa pochodzi od greckich słów: *lipos* – tłuszcz i *soma* – ciało. [19] Kwalifikuje się je ze względu na ich typ powłoki (jedno lub wielowarstwowe), a także sposób formowania. Liposomy jednowarstwowe (ULV – ang. *Unilamellar Vesicle*) zbudowane są tylko z jednej dwuwarstwy lipidowej. Dzieli się ze względu na wielkość średnicy: małe (SUV – ang. *Small Unilamellar Vesicle*) o średnicy mniejszej niż 100 nm, duże (LUV – ang. *Large Unilamellar Vesicle*) o średnicy większej niż 100 nm, ale mniejszej niż 1  $\mu\text{m}$  oraz ogromne (GUV – ang. *Giant Unilamellar Vesicle*) – powyżej 1  $\mu\text{m}$ . Z kolei liposomy wielowarstwowe (MLV – ang. *Multilamellar Vesicle*) zawierają kilka koncentrycznych dwuwarstw lipidowych w układzie „skórki cebuli”, a liposomy wielopęcherzykowe (MVV – ang. *Multivesicular Vesicle*) zamykają w swoim wnętrzu mniejsze pęcherzyki lipidowe [20].



Rysunek 6 Klasyfikacja liposomów ze względu na wielkość i budowę [21]

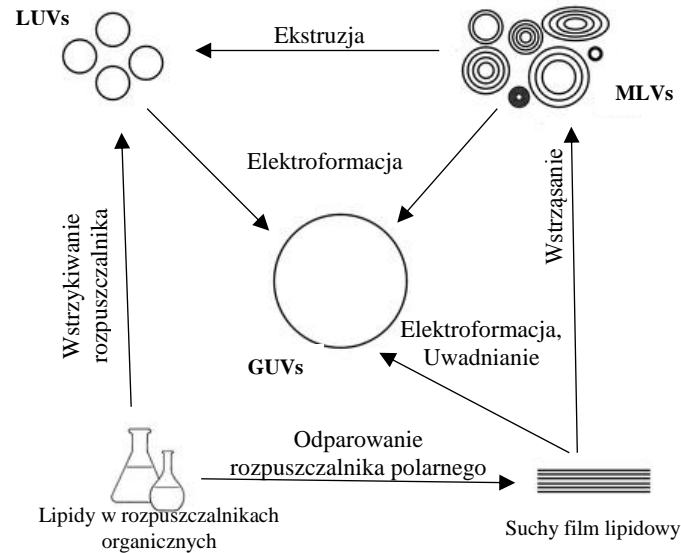
Rozmiar liposomów decyduje o ich zastosowaniu. Liposomy o mniejszych średnicach wykorzystuje się głównie jako nośniki leków ze względu na ich stabilność i korzystny stosunek powierzchni dwuwarstwy do objętości rozpuszczalnika zamkniętego w pęcherzyku. Z kolei liposomy o większej średnicy (GUV) używane są zarówno jako sztuczny model błony komórkowej jak i model do wyznaczania parametrów mechanicznych i topologicznych błon lipidowych.

### 2.1. FORMOWANIE

Amfifilowa natura lipidów sprawia, że w rozpuszczalnikach polarnych, spontanicznie tworzone są struktury liposomów wielowarstwowych. Zastosowanie dedykowanych metod, przedstawionych na rysunku 7, pozwala na uzyskanie z liposomów wielowarstwowych, struktury jednowarstwowej, które są zarówno korzystniejsze w przypadku mniejszych liposomów podczas wykorzystywania ich jako nośniki leków, jak i w przypadku większych, które pełnią rolę modeli błony komórkowej. Istnieje wiele metod formowania ogromnych jednowarstwowych liposomów, jednak żadna nie jest uniwersalnym protokołem, ponieważ sam mechanizm powstawania GUV nie jest do końca poznany. Większość sposobów bazuje na dwóch metodach: elektroformacji przedstawionej przez Angelova [22] lub delikatnego

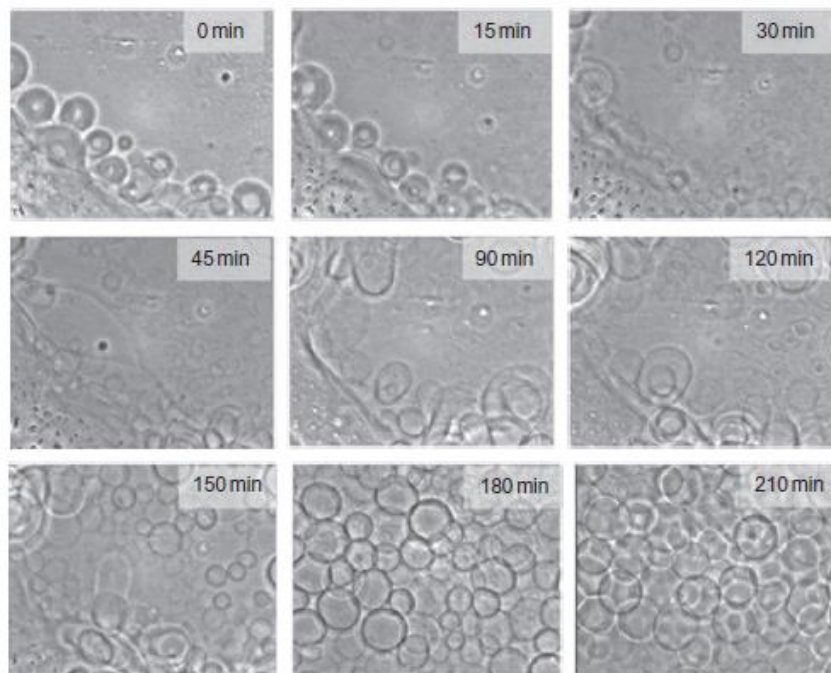


uwadniania opisanej przez Dowbena [23]. Elektroformacja pozwala na uzyskanie bardziej jednnorodnej zawiesiny liposomów, precyzyjną kontrolę środowiska oraz jest bardziej ekonomiczna czasowo w porównaniu do formowania metodą delikatnego uwadniania [14].



Rysunek 7 Schemat przedstawiający różne metody formowania GUV [14]

Elektroformacja polega na równomiernym nałożeniu roztworu lipidów na powierzchni elektrod. Rozpuszczalnikiem w roztworze lipidu powinna być łatwa do odparowania ciecz, np. chloroform, ponieważ kolejnym krokiem jest zupełne odparowanie rozpuszczalnika w próżni. W wyniku tego otrzymywana jest cienka warstwa lipidowa na powierzchni elektrod, które kolejno są zanurzane w komorach wypełnionych roztworem wodnym. Następnie do elektrod przykładane jest zmienne pole elektryczne. Wartości przyłożonego napięcia, kształt, częstotliwość impulsu czy czas procesu formowania różni się w zależności od protokołu. [24]

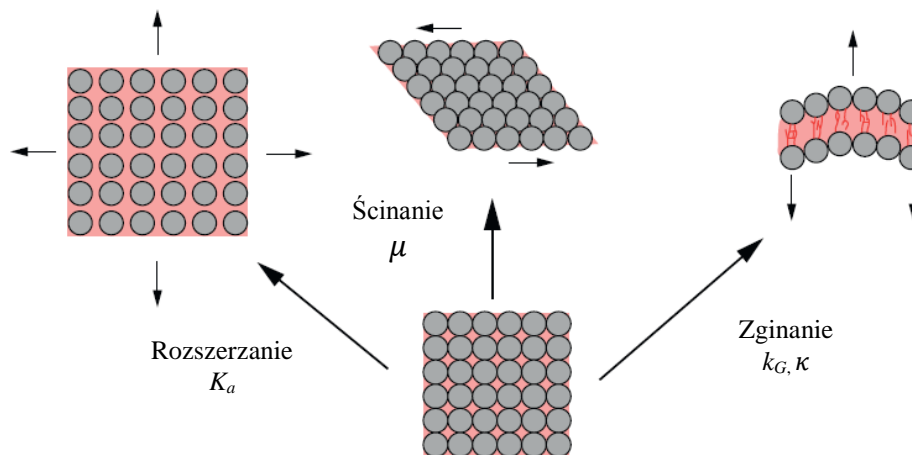


Rysunek 8 Przebieg procesu elektroformacji w czasie [24]

## 2.2. MECHANIKA BŁONY KOMÓRKOWEJ

Właściwości mechaniczne błony biologicznej są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, ponieważ to błona utrzymuje jej integralność oraz chroni przed czynnikami fizycznymi z zewnątrz. Jednak badanie właściwości mechanicznych błony i ich zmian, jak np. wpływu różnych czynników chemicznych na jej wytrzymałość, jest bardzo trudne ze względu na jej złożoną budowę. Z tego powodu wykorzystuje się sztuczne modele. Najczęściej są to ogromne jednowarstwowe liposomy, ze względu na ich rozmiar, ponieważ jest podobny do wielkości komórki. Ponadto średnica liposomów, większa niż limit rozdzielczości optycznej (zdefiniowanej przy kryterium Rayleigha), pozwala w prosty sposób na obserwację uformowanych liposomów za pomocą mikroskopu świetlnego. Inną zaletą przemawiającą na korzyść liposomów, jest dowolność doboru ich składu, a więc formowanie z jednego lipidu lub mieszaniny lipidów, także tych występujących naturalnie w błonie. [25]

W skali makroskopowej, błona może być traktowana jako struktura ciągła o nieskończenie cienkiej powierzchni oraz charakterystycznych właściwościach materiałowych, takich jak sztywność zginania czy lepkość. Wymienione parametry są ściśle związane z mikroskopową strukturą błony, która zależy głównie od składu i stanu termodynamicznego. Właściwości mechaniczne błony biologicznej są ilościowo opisywane przez odpowiedź błony na deformacje rozszerzające, ścinające i zginające, co schematycznie zaprezentowano na rysunku 9. Ilościowa odpowiedź na wymienione deformacje jest odpowiednio opisana przez moduł sprężystości ścinania  $\mu$ , moduł ściśliwości powierzchni  $K_a$ , współczynnik sztywności zginania  $\kappa$  oraz moduł krzywizny Gaussa  $k_G$ .



Rysunek 9 Trzy składowe deformacji błony [15]

Ze względu na to, że w warunkach fizjologicznych błona biologiczna jest w stanie ciekło-kryształicznym, nie jest poddawana siłą ścinającym ( $\mu = 0$ ). W efekcie energia wypadkowego ruchu błony, zwana sprężystą wolną energią  $\mathcal{H}$  (3), jest sumą tylko energii rozciągającej (1) oraz zginającej opisaną przez równanie Helfricha (2).

$$E_{exp} = \frac{1}{2} K_a \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (1)$$

gdzie:

$E_{exp}$  – energia rozciągania sprężystego na jednostkę powierzchni,

$K_a$  – moduł sprężystości powierzchni,

$\Delta A = A - A_0$ ,

$A$  – pole powierzchni pęcherzyka zdeformowanego,

$A_0$  – pole powierzchni pęcherzyka w równowadze.

$$E_{bend} = \frac{1}{2} \kappa (C_1 + C_2 - C_0)^2 + k_G \cdot C_1 C_2 \quad (2)$$

gdzie:

$E_{bend}$  - energia deformacji zginającej na jednostkę powierzchni,

$\kappa$  - współczynnik sztywności zginania,

$k_G$  - moduł sprężystości Gaussa,

$C_0$  - spontaniczna krzywizna błony wywołana np. asymetrycznym składem lipidowym,

$C_1, C_2$  – główne osie krzywizny membrany określone przez lokalne deformacje błony.

$$\mathcal{H} = \frac{A_0}{2} K_a \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 + \frac{1}{2} \kappa \int_A dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 + k_G \int_A dA C_1 C_2 \quad (3)$$

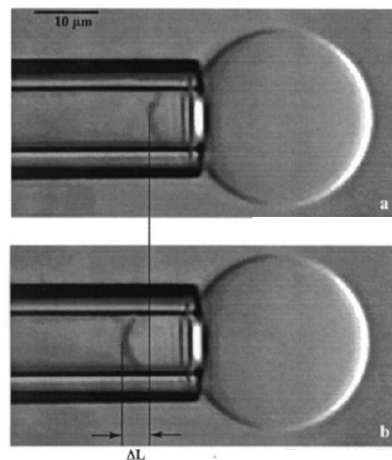
Jednak, jeśli pęcherzyki nie są poddawane mechanicznemu rozciąganiu, a zmiany deformacyjne są wywołane tylko energią termiczną, w równaniu (3) można pominąć pierwszy człon. Trzeciego członu również się nie uwzględnia, ponieważ wkład zmian krzywizny Gaussa nie podlega zmianom podczas fluktuacji termicznej. [15] W efekcie energię związaną z fluktuacją kształtu błony biologicznej, kiedy nie występują zewnętrzne siły, opisuje się za pomocą Hamiltonianu Canhama-Helfricha:

$$\mathcal{H} = \sigma A + \frac{1}{2} \kappa \int_A dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 \quad (4)$$

gdzie:

$\sigma$  – skuteczne napięcie powierzchniowe.

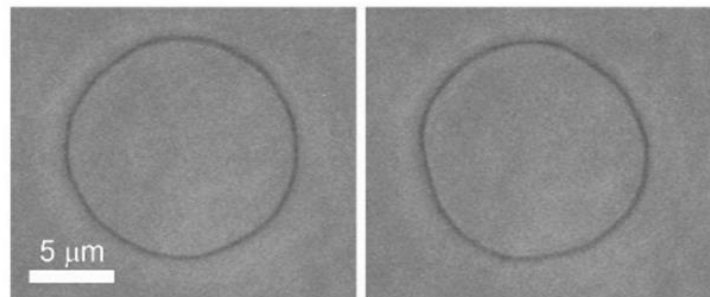
Istnieje kilka metod pomiaru właściwości mechanicznych. Jednak w przypadku dwuwarstwy lipidowej jest to bardziej skomplikowane zadanie, ponieważ jest to delikatna nanostruktura (jej grubość to w przybliżeniu długość dwóch cząsteczek lipidowych), więc wartości parametrów mechanicznych są bardzo małe i trudne do badania doświadczalnego. Istniejące techniki, pozwalające na wyznaczenie właściwości mechanicznych błony, można podzielić na metody bazujące na rozpraszaniu, odpowiedzi układu na mechaniczne deformacje oraz analizie obrazu.



Rysunek 10 Wpływ aspiracji za pomocą mikropipety na rozszerzanie pęcherzyka przy naprężeniu: a) 0,2 mN/m, b) 6,2 mN/m [26]

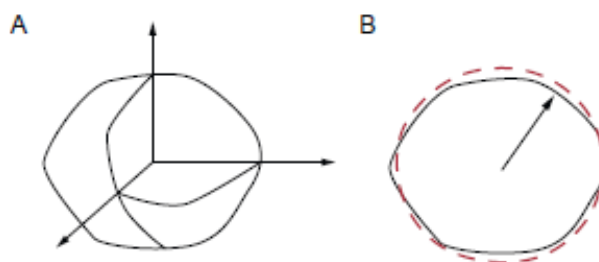
Do pierwszej grupy zalicza się techniki, które bazują na właściwościach rozpraszających struktury, które są związane z parametrami mechanicznymi. Jest to np. analiza dyfuzyjnego rozpraszania promieni rentgenowskich na dwuwarstwie lipidowej. Druga grupa zawiera techniki, które wyznaczają właściwości wytrzymałościowe na podstawie odpowiedzi układu na czynniki fizyczne. Przykładem takiej techniki jest aspiracja za pomocą mikropipety, której poglądowa zasada pomiaru została przedstawiona na rysunku 10. Właściwości mechaniczne są wyznaczane na podstawie odkształcenia pola powierzchni pęcherzyka pod wpływem zadanego naprężenia. [15]

Do trzeciej grupy zalicza się techniki bazujące na analizie obrazu pęcherzyków, które wykorzystują zależność pomiędzy termicznymi fluktuacjami (Rysunek 11) a sztywnością zginania dwuwarstwy lipidowej opisaną przez równanie (4). Daną metodę pomiarową określa się mianem spektroskopii drgań termicznych (*ang. flicker spectroscopy*).



Rysunek 11 Zdjęcia otrzymane za pomocą mikroskopu kontrastu fazowego przedstawiające fluktuacje GUV w różnym czasie [27]

Technika drgań termicznych polega na rejestracji serii konturów pęcherzyka, którego centrum znajduje się w płaszczyźnie ogniskowej mikroskopu optycznego (kontrastu fazowego lub fluorescencyjnego), dając dwuwymiarowy obraz błony lipidowej o największej średnicy. Pierwszym etapem analizy jest uzyskanie wartości numerycznej (położenie konturu) z informacji w postaci obrazu przy jak najmniejszej utracie informacji (w skutek niezbędnej obróbki obrazowej). Następnym etapem jest pomiar amplitudy fluktuacji i powiązanie ich amplitud z odpowiednimi parametrami mechanicznymi dwuwarstwy lipidowej, co schematycznie pokazano na rysunku 12.

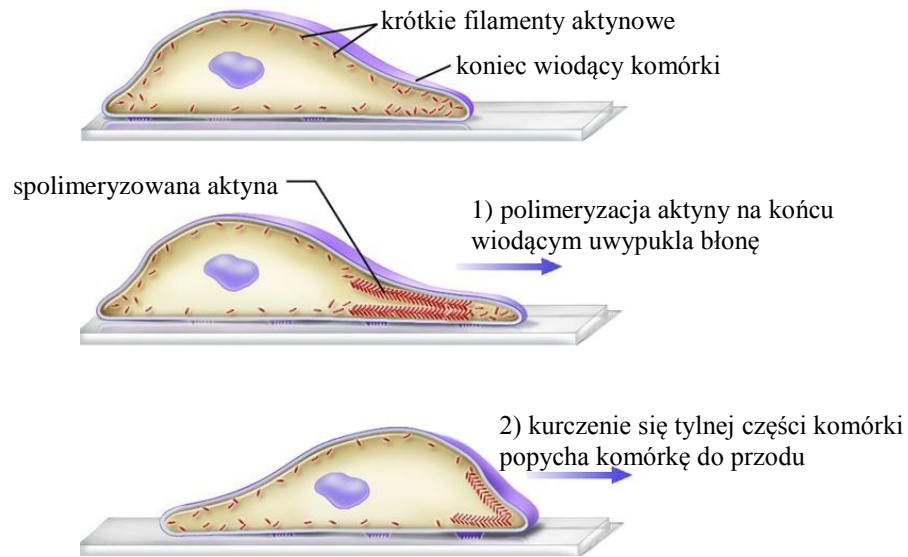


Rysunek 12 Schematyczna reprezentacja deformacji błony: A – trójwymiarowy widok obiektu, B – przekrój obiektu w płaszczyźnie o największej średnicy (rzeczywisty kształt zaznaczony jest linią ciągłą, średni promień – czerwona i kreskową) [15]

W związku z tym, że analiza fluktuacji termicznych dwuwarstwy lipidowej jest oparta na deformacjach zginających, wynikiem analizy jest współczynnik sztywności zginania  $\kappa$ , który ilościowo opisuje odpowiedź błony na deformacje zginające. W przypadku dwuwarstwy lipidowej jest on zdefiniowany jako ilość energii potrzebna do zmiany deformacji błony z jej własnej krzywizny do innej postaci. Energia deformacji zginającej w przypadku dwuwarstwy

lipidowej jest związana ze sztywnością i długością łańcuchów lipidowych oraz oddziaływaniem pomiędzy grupami polarnymi [15].

Otrzymany w wyniku analizy współczynnik sztywności zginania jest szczególnie ważny w przypadku błony biologicznej, ponieważ odgrywa istotną rolę w wielu procesach komórkowych, w których krytyczne jest odpowiednie odkształcenie błony. Przykładem jest np. ruch pełzakowaty komórek migrujących takich jak makrofagi, ponieważ w tym przypadku odpowiednie uwypuklenie błony na skutek polimeryzacji aktyny jest konieczne do przesunięcia komórki na przód (Rysunek 13). [28] Powstawanie siły potrzebnej do ruchu komórki wyjaśnia model Elastycznej Zapadki Brownowskiej, który rozpatruje zależność pomiędzy termicznymi fluktuacjami błony komórkowej oraz polimeryzacją filamentów aktynowych. [29]



Rysunek 13 Ruch pełzakowaty [30]

Dane literaturowe wskazują, że wartości otrzymanego współczynnika sztywności zginania  $\kappa$  różnią się w zależności od użytej techniki, również w przypadku bardzo podobnych warunków eksperymentalnych czy nawet - dla tej samej błony. [31] W literaturze zauważa się tendencję do wyższej wartości współczynnika mechanicznego wyznaczonego metodą spektroskopii drgań termicznych niż w przypadku aspiracji za pomocą mikropipety (Tabela 1).

Tabela 1 Współczynnik sztywności zginania  $\kappa$  dwuwarstwy zbudowanej z SOPC w zależności od użytej techniki (kolejność zgodna z rokiem publikacji)

Technika	$\kappa$ [ $10^{-19}$ J]	Źródło
Aspiracja mikropipetą	0,9	[32]
Aspiracja mikropipetą	1,2	[33]
Aspiracja mikropipetą	1,17	[34]
Spektroskopia drgań termicznych	1,44	[35]
Spektroskopia drgań termicznych	1,27	[36]
Aspiracja mikropipetą	0,9	[26]
Spektroskopia drgań termicznych	1,44	[37]
Spektroskopia drgań termicznych	1,26	[38]



### 3. CEL PRACY

Odtworzenie metody spektroskopii drgań termicznych błon lipidowych z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego oraz zmierzenie statystyki parametrów mechanicznych populacji liposomów.

Zadania:

- 1) optymalizacja ustawień mikroskopu pod kątem zadowalającej rozdzielczości i prędkości zbieranych obrazów,
- 2) optymalizacja doboru sondy fluorescencyjnej pod kątem wyłonienia grupy sond o najlepszych parametrach do danych pomiarów,
- 3) pomiar statystycznych prób (powyżej 100) populacji liposomów w celu określenia charakteru populacji parametrów mechanicznych,
- 4) wykonanie dwóch powtórzeń w celu obserwacji, czy materiałowo te same populacje różnią się między sobą.

### 4. MATERIAŁY

W doświadczeniu wykorzystano liposomy zbudowane z lipidu 1-palitylo-2-oleinofosfasfadydocholiny (POPC) oznakowane sondą fluorescencyjną: NBD-PC, Rodaminą-PE,  $\beta$ Bodipy FL DHPE, Atto 488 DOPE, Fluoresceiną-PE lub Laurdan. Lipid POPC oraz sondy Rhodamina-PE, Laurdan i Fluoresceina-PE zostały zakupione z firmy Avanti Polar Lipid (USA). Sonda fluorescencyjna  $\beta$ Bodipy została zakupiona z firmy Molecular Probes (USA). Sonda fluorescencyjna Atto 488 DOPE została zakupiona z firmy Atto-Tech (Niemcy).

### 5. METODY

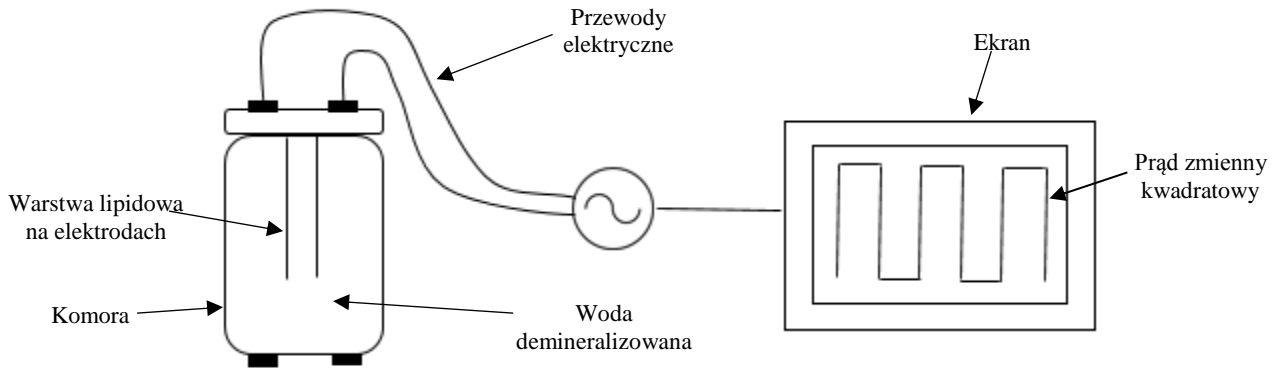
#### 5.1. FORMOWANIE OGROMNYCH JEDNOWARSTWOWYCH LIPOSOMÓW

Ogromne jednowarstwowe liposomy zostały uformowane za pomocą metody elektroformacji. Na każdą z elektrod naniesiono równomiernie 30  $\mu$ l 1mM roztworu lipidu POPC rozpuszczonego w chloroformie oznakowanego sondą fluorescencyjną w ilości 1mol% do lipidu. Następnie odparowano resztki rozpuszczalnika organicznego w niskim ciśnieniu. Powstałą warstwę cząsteczek lipidów na elektrodach zanurzono w komorze wypełnionej 1,5 ml demineralizowanej wody (o przewodności poniżej 0,1  $\mu$ S). Woda została uprzednio oczyszczona przez filtr celulozowy o porach 0,2  $\mu$ m. Do komór z zawiesiną liposomów przyłożono zmienne pole elektryczne i przeprowadzono 24 godziną elektroformację wg schematu w Tabeli 2. Schematyczne stanowisko do formowania ogromnych liposomów przedstawiono na Rysunku 14.

Tabela 2 Parametry prądu wykorzystanego do uformowania ogromnych liposomów metodą elektroformacji

Czas [h]	Amplituda napięcia [V]	Częstotliwość [Hz]
1	1	1
1	2	
1	3	
21	4	





Rysunek 14 Schemat formowania ogromnych liposomów metodą elektroformacji

## 5.2. POMIAR PARAMETRÓW MECHANICZNYCH LIPOSOMÓW

Serie obrazów fluktuacji liposomów zostały zarejestrowane z wykorzystaniem mikroskopu Leica TCS SPE wyposażonego w obiektyw 63x/1,30 ACS APO z immersją olejową. Za pomocą kamery Leica DFC310 FX zarejestrowano serię obrazów monitorujących fluktuację pęcherzyków. Emisję fluorescencji próbek wzbudzano oświetlaczem fluorescencyjnym EL6000 i mierzono z wykorzystaniem flirtów: N2.1 (Rodamina-PE) oraz I3 (Atto 488,  $\beta$ BODIPY, Fluoresceina-PE, NBD-PC, Laurdan).

Współczynnik zginania został wyznaczony za pomocą algorytmu i programu opisanego w publikacji [39]. W skrócie obrazy są poddawane analizie w celu określenia położenia błony lipidowej pod danym kątem we współrzędnych biegunowych. Tak otrzymane położenia są następnie analizowane z wykorzystaniem funkcji autokorelacji kątowej – narzędzia matematycznego do analizy powtarzalności. Otrzymane krzywe autokorelacyjne są następnie analizowane podejściem statystycznym, co oznacza, że krzywe są rozkładane transformatą Fouriera, następnie amplitudy danych funkcji cosinusowych są histogramowane i nachylenie funkcji wykładniczych histogramów jest zestawiane w funkcji modu. To z kolei jest dopasowywane modelem pozwalającym wyliczyć współczynnik zginania.

## 5.3. TEST ZGODNOŚCI

Zgodność rozkładu współczynnika sztywności zginania  $\kappa$  w badanej populacji z rozkładem teoretycznym zbadano za pomocą testu Kołmogorowa – Smirnowa. Użyty test służy do weryfikowania hipotezy czy badana populacja ma jednakowy rozkład z wybranym rozkładem statystycznym. Opiera się na porównaniu dystrybuanty kumulowanej ze stabilizowaną dystrybuantą wybranego rozkładu teoretycznego.

Pierwszym krokiem zweryfikowania zgodności jest postawienie hipotezy zerowej, która w tym przypadku oznacza, że dystrybuanta rozkładu empirycznego i teoretycznego są sobie równe (5). Hipoteza alternatywna wskazuje z kolei na sytuację odwrotną, czyli że dystrybuanty są różne (6).

$$H_0: F(a'_i) = K(a'_i), \quad (5)$$

$$H_1: F(a'_i) \neq K(a'_i), \quad (6)$$

gdzie:

$F(a'_i)$  – dystrybuanta rozkładu teoretycznego,

$K(a'_i)$  – dystrybuanta zestandaryzowanego rozkładu empirycznego,





$a'_i$  – zestandaryzowane górne granice przedziałów wykorzystanych w dystrybucji.

Miarą zgodności dwóch rozkładów jest wartość  $d$ , a do ostatecznego zweryfikowania hipotezy zerowej stosuje się statystykę  $\lambda$ :

$$d = \sup |F(a'_i) - K(a'_i)|, \quad (7)$$

$$\lambda = \sqrt{n} \cdot d. \quad (8)$$

Test Kołmogorowa - Smirnowa służy do testowania hipotezy zerowej prób liczylnych, co oznacza, że liczba prób  $n$  musi być większa niż 30. Otrzymaną wartość współczynnika  $\lambda$  porównuje się z wartością krytyczną  $\lambda_\alpha$  odczytaną z tablicy rozkładu  $\lambda$  Kołmogorowa dla założonego przedziału ufności  $Q(\lambda) = 1 - \alpha$ . Jeżeli  $\lambda < \lambda_\alpha$ , to zgodnie z testem K-S nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej. W przeciwnym wypadku, jeżeli  $\lambda \geq \lambda_\alpha$ , hipoteza zerowa zostaje odrzucona, a hipoteza alternatywna przyjęta. [40, 41]

## 6. WYNIKI

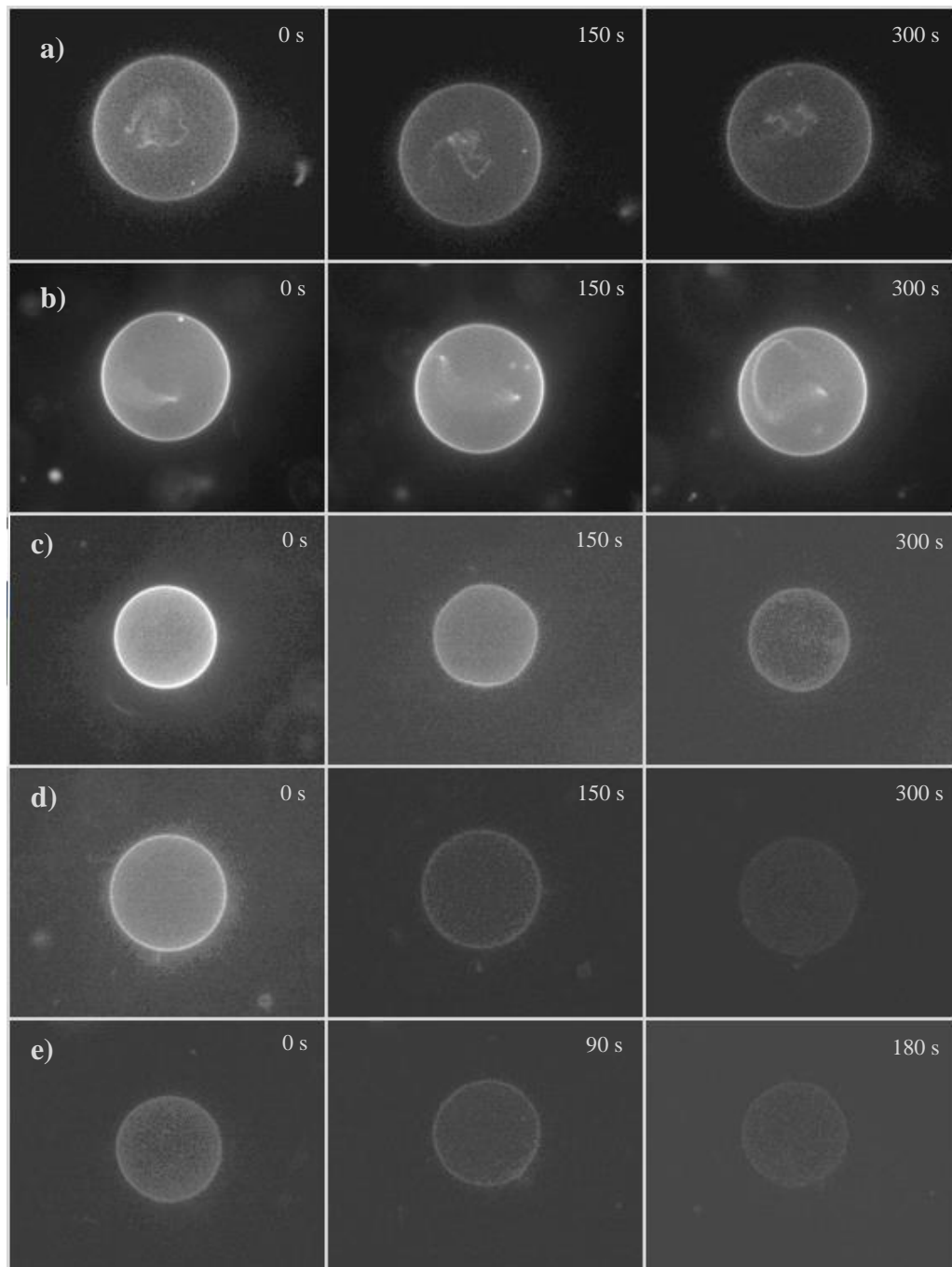
### 6.1. OPTYMALIZACJA USTAWIEŃ MIKROSKOPU

Sprawdzenie różnych kombinacji ustawień mikroskopu pozwoliło wybrać optymalne parametry obrazów przy jednoczesnej maksymalizacji ich jakości oraz zebranej ilości podczas pomiarów. Rejestrowano obrazy o wymiarach 1392x1040 pixela. Każdy pixel odpowiadał 0,102  $\mu\text{m}$  w rzeczywistości. Zdjęcia zbierano w skali szarości. W efekcie wybrane ustawienia pozwoliły rejestrować serię obrazów z prędkością 11,2 klatek na sekundę z wystarczającą jakością do analizy fluktuacji dwuwarstwy lipidowej za pomocą metody spektroskopii drgań termicznych. Zaplanowano dla każdego pęcherzyka 5 minutowe pomiary, co pozwalało na zebranie 3360 obrazów reprezentujących fluktuacje termiczne każdego pęcherzyka.

### 6.2. WYBÓR SONDY FLUORESCENCYJNEJ

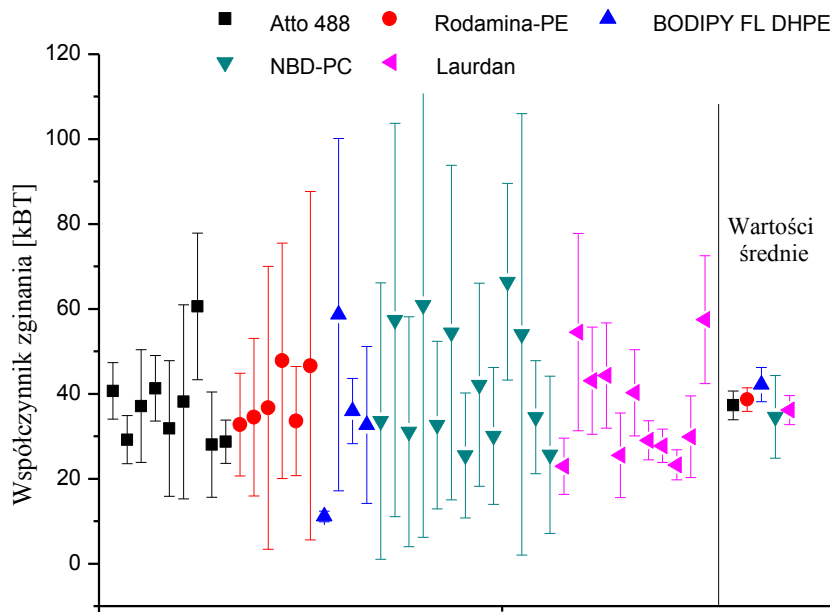
Kolejne zadanie polegało na wyłonieniu sondy fluorescencyjnej o najlepszych właściwościach do pomiarów za pomocą spektroskopii drgań termicznych: wystarczającej wytrzymałości na fotobłaknięcie w czasie pomiaru oraz predyspozycji do detekcji konturu liposomu na podstawie rozkładu sondy w dwuwarstwie. Ze względu na wykorzystanie w doświadczeniu mikroskopu fluorescencyjnego właściwa detekcja konturu zależała od kontrastu dwuwarstwy lipidowej, czyli stosunku intensywności emisji fluorescencyjnej sondy ułożonej na pęcherzyku i w otoczeniu. Istotną rolę w detekcji konturu odgrywał współczynnik podziału sondy fluorescencyjnej względem agregatu lipidowego i wody. Ostatnią cechą barwnika decydującą o przydatności do tego typu pomiaru jest brak wpływu na mechanikę błony po wbudowaniu się w strukturę.

Pierwszą cechą, czyli podatność na fotobłaknięcie, sprawdzono na podstawie zmian intensywności emisji fluorescencji każdej sondy pod wpływem ekspozycji na światło oświetlacza mikroskopowego użytego w pomiarach. Proces fotobłaknięcia poszczególnych barwników pokazano na Rysunku 15. Zauważono, że tylko trzy z sześciu testowanych sond zachowują zdolność emisji po planowanych 5 minutach pomiarów (Atto 488, Rodamina-PE oraz  $\beta$ BODIPY). Ze względu na to, że emisja fluorescencji Laurdanu po 3 minutach była niezauważalna, przerwano pomiar. Mimo to ilość uzyskanych klatek była wystarczająca do dalszej analizy. Z kolei Fluoresceina-PE w wyniku fotobłaknięcia zupełnie traciła zdolność emisji po 10 sekundach, więc nie była możliwa rejestracja pęcherzyków oznaczonych tą sondą.



Rysunek 15 Wpływ efektu fotobłaknięcia na sondy fluorescencyjne: a) Atto 488 DOPE, b) Rodaminą-PE, c)  $\beta$ BODIPY FL DHPE, d) NBD-PC, e) Laurdanu

W drugim etapie sprawdzono jednocześnie wpływ współczynnika podziału oraz zmiany właściwości mechanicznych po wbudowaniu się sondy w błonę. W tym celu porównano wartości współczynnika zginania otrzymane przy użyciu różnych sond fluorescencyjnych. Odrzucono znacznie odbiegające wartości metodą rozstępu międzykwartyłowego [40] oraz pomiary, w których rejestrowany pęcherzyk nie odzwierciedlał dobrze modelu matematycznego (o niepewności większej niż wartość samego współczynnika). Otrzymane wartości oraz ich średnie pokazano na Rysunku 16.



Rysunek 16 Współczynnik zginania dwuwarstwy lipidowej w zależności od użytej sondy

Ze względu na dużą wytrzymałość na fotobłaknięcie oraz najbardziej precyzyjne wartości (najmniejsze odchylenie standardowe) wybrano barwnik Rodaminę-PE do oznakowania liposomów poddanych pomiarom statystycznym w kolejnym etapie.

### 6.3. POMIAR STATYSTYCZNYCH PRÓB POPULACJI LIPOSOMÓW

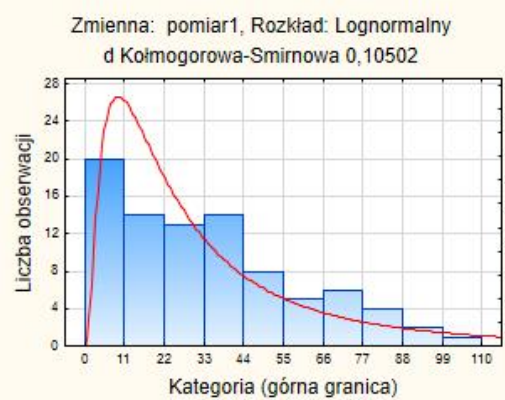
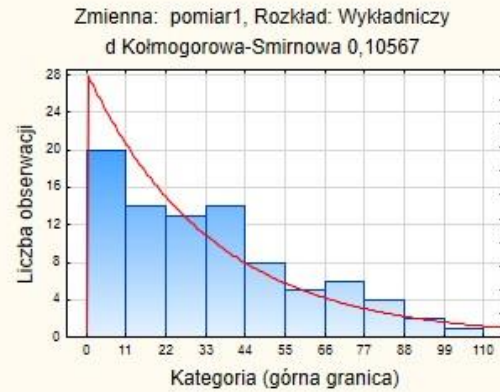
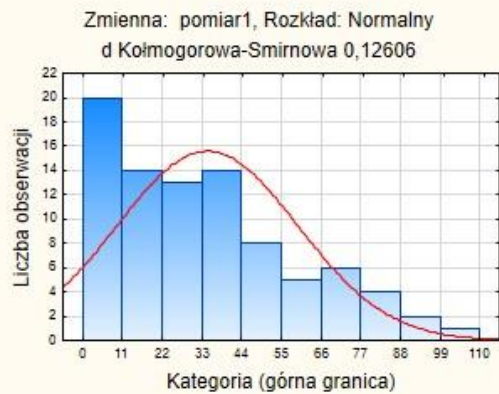
W każdej próbie statystycznej zmierzono ponad 100 liposomów. W pierwszym etapie odrzucono znacznie odbiegające wartość metodą rozstępu międzykwartylowego. Test statystyczny przeprowadzono z 95% przedziałem ufności. Zgodność rozkładu współczynnika zginania  $\kappa$  uzyskanego empirycznie z rozkładem teoretycznym przetestowano za pomocą programu *Statistica*. Podobieństwo danych doświadczalnych sprawdzono z rozkładem normalnym, wykładniczym, gamma oraz logarytmiczno-normalnym.

Otrzymane wartości współczynnika zginania  $\kappa$  podzielono na klasy w celu stworzenia wykresu licznosci danych eksperymentalnych. Ilość klas  $k$  obliczono na podstawie liczebności próby  $n$  ze wzoru (9). Rozpiętość przedziałów  $c$  wyznaczono jako różnicę pomiędzy największą  $x_{max}$ , a najmniejszą  $x_{min}$  wartością otrzymaną w danej próbie podzieloną przez liczbę klas (10). [40]

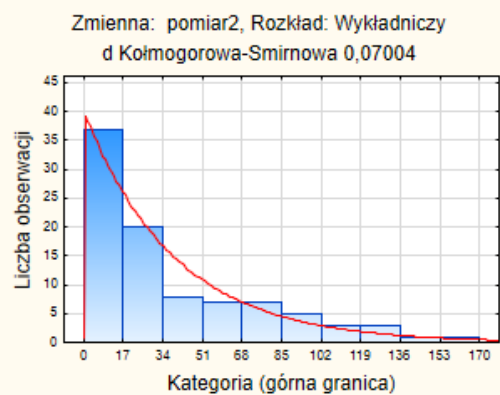
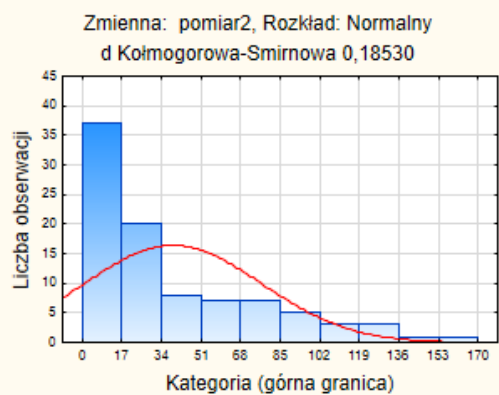
$$[k] = \sqrt{n} \quad (9)$$

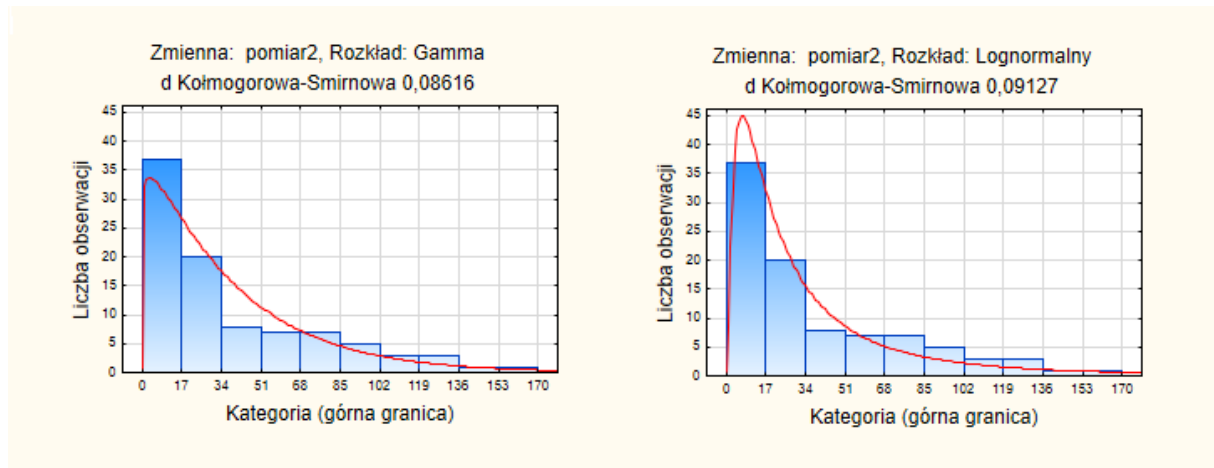
$$c = \frac{x_{max} - x_{min}}{k} \quad (10)$$

Do otrzymanego wykresu licznosci wartości empirycznych dopasowano rozkłady teoretyczne (Rysunek 17-19). Zgodność pomiędzy rozkładami zweryfikowano za pomocą testu statystycznego Kołmogorowa – Smirnowa.

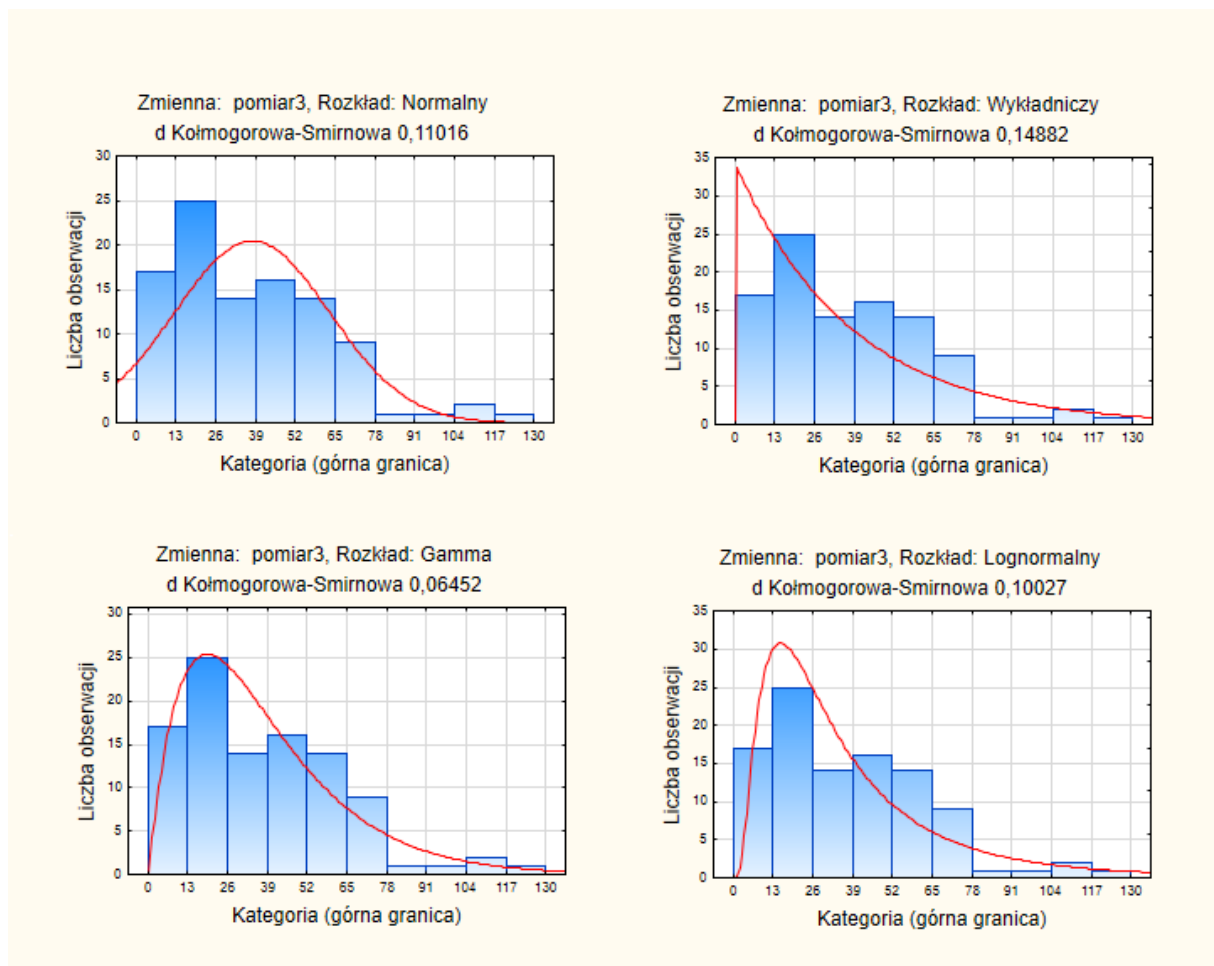


Rysunek 17 Wykres licznosci danych empirycznych oraz oczekiwanych rozkladu teoretycznego (pomiar 1)





Rysunek 18 Wykres licznosci danych empirycznych oraz oczekiwanych rozkladu teoretycznego (pomiar 2)



Rysunek 19 Wykres licznosci danych empirycznych oraz oczekiwanych rozkladu teoretycznego (pomiar 3)

Otrzymana wartość  $d$  statystyki K-S pozwoliła zweryfikować hipotezę zerową o zgodności rozkładu empirycznego i teoretycznego. Wartości statystyki otrzymane w procesie weryfikacji zgodności zebrano w Tabeli 3.

Tabela 3 Statystyka zgodności rozkładu danych empirycznych i teoretycznych

Rozkład	Pomiar	$n$	$d$	$\lambda$	$\bar{\lambda}$	$\lambda_{\alpha}$	Przyjęta hipoteza			
Normalny	1	87	0,13	1,22	1,38	1,36	$H_1$			
	2	92	0,19	1,82						
	3	100	0,11	1,11						
Wykładniczy	1	87	0,11	1,02	1,06		1,36	$H_0$		
	2	92	0,07	0,67						
	3	100	0,15	1,49						
Gamma	1	87	0,07	0,65	0,72			1,36	$H_0$	
	2	92	0,09	0,86						
	3	100	0,07	0,65						
Logarytmiczno - normalny	1	87	0,11	1,03	0,97				1,36	$H_0$
	2	92	0,09	0,86						
	3	100	0,10	1,01						

Na podstawie danych w Tabeli 3 oraz mocy testu Kołmogorowa – Smirnowa stwierdzono, że rozkład empiryczny współczynnika sztywności i oczekiwany rozkład normalny nie są zgodne. W przypadku rozkładu wykładniczego, gamma oraz logarytmiczno-normalnego nie ma podstaw do uznania, że rozkłady nie są zgodne. Na podstawie wykresów z Rysunku 17-19 i danych w Tabeli 3 widać, że wyniki doświadczalne wykazują największą tendencję do zgodności z rozkładem gamma (najlepsze dopasowanie danych na wykresie oraz najmniejsza średnia wartość statystyki  $\lambda$ ).

Każdy rozkład teoretyczny zgodny z wartościami doświadczalnymi jest rozkładem niesymetrycznym. W celu sprawdzenia czy rozkład wartości współczynnika sztywności jest również rozkładem niesymetrycznym obliczono dla każdej próby współczynnik asymetrii  $As$  wg wzoru (11), gdzie  $Q_1$ ,  $Q_2$  i  $Q_3$  oznaczają odpowiednio kwartył pierwszy, drugi (medianę) i trzeci. [40] Otrzymane wartości  $As$  zebrano w Tabeli 4.

$$As = \frac{Q_3 + Q_1 - 2Q_2}{2(Q_3 - Q_1)} \quad (11)$$

Tabela 4 Współczynnik asymetrii rozkładu populacji z kolejnych trzech prób

próba	$Q_1$	$Q_2$	$Q_3$	$As$
1	12,41	29,99	49,73	0,03
2	9,29	24,80	61,63	0,21
3	16,69	34,58	55,97	0,05

Otrzymany współczynnik asymetrii  $As$  w każdej populacji jest niezerowy ( $As \neq 0$ ), co oznacza, że rozkład wartości doświadczalnych zawsze wykazuje asymetrię. Dodatkowo, dodatnia wartość współczynnika ( $As > 0$ ) wskazuje na asymetrię prawostronną. [40]



## 7. WNIOSKI

Błona biologiczna uczestniczy w praktycznie wszystkich procesach komórkowych, więc jej prawidłowe funkcjonowanie jest konieczne do poprawnego funkcjonowania całej komórki. Odpowiednie właściwości mechaniczne błony są nie tylko ważne ze względu na utrzymywanie integralności komórki czy odbieranie czynników zewnętrznych, ale również są niezbędne do poruszania się komórek migrujących, takich jak makrofagi. Jednak bezpośrednie badanie właściwości mechanicznych błony jest niezwykle trudne ze względu na jej skomplikowaną budowę i interakcję z innymi organellami. Z tego powodu do badania mechaniki błony wykorzystywane są sztuczne modele, np. liposomy, czyli sferyczne, koloidalne dwuwarstwowe lipidowe. Parametry mechaniczne błony, takie jak współczynnik sztywności, otrzymuje się na podstawie odkształcenia błony pod wpływem zadanego naprężenia wykorzystując technikę aspiracji za pomocą mikropipety lub analizując obrazy fluktuacji pęcherzyka lipidowego za pomocą mikroskopu optycznego z wykorzystaniem spektroskopii drgań termicznych. Jednak zauważono, że wyznaczone wartości współczynnika sztywności różnią się w zależności od użytej techniki, nawet przy zachowaniu tych samych warunków eksperymentalnych i dla tej samej błony. W literaturze zauważa się tendencję do wyższych wartości współczynnika mechanicznego wyznaczonego metodą spektroskopii drgań termicznych niż aspiracji za pomocą mikropipety.

W pracy zmierzono statystyczną próbę populacji liposomów w celu określenia charakteru populacji parametrów mechanicznych wyznaczonych metodą spektroskopii drgań termicznych. Podobieństwo rozkładu otrzymanych wartości sprawdzono z wybranymi rozkładami teoretycznymi za pomocą testu zgodności Kołmogorowa - Smirnowa. Na mocy wybranego testu stwierdzono, że rozkład współczynnika sztywności populacji nie jest rozkładem normalnym, a dodatkowe obliczenia wskazały, że jest to rozkład o asymetrii prawostronnej.

Najczęściej podczas wyznaczania właściwości mechanicznych błony za pomocą techniki spektroskopii drgań termicznych rejestruje się serię obrazów przedstawiających fluktuację termiczną około 15 pęcherzyków lipidowych. W kolejnym kroku wyznacza się średnią wartość z otrzymanych pomiarów. Jednak miara średniej jest przeznaczona dla wartości pochodzących z jednorodnych zbiorowości o niewielkim stopniu zróżnicowania, ponieważ na wartość średniej silny wpływ mają wartości skrajne, dlatego nie powinno się jej stosować w przypadku asymetrycznych rozkładów, dla których dedykowane są miary statystyczne takie jak mediana czy dominanta.

W pracy zauważono, że badany rozkład współczynnika charakteryzuje asymetria prawostronna, co oznacza, że wartość mediany tego rozkładu jest mniejsza niż wartość średniej. W przypadku spektroskopii drgań termicznych zastąpienie statystyki średniej medianą spowodowałoby obniżenie otrzymanych wartości. Literaturowe wartości współczynnika zginania są wyższe w przypadku zastosowania techniki spektroskopii drgań termicznych niż aspiracji za pomocą mikropipety. Powodem tej różnicy może być wykorzystanie nieprawidłowej statystyki w przypadku spektroskopii drgań termicznych, a więc zastąpienie średniej, medianą lub dominantą, wyeliminuje różnice wyznaczanego współczynnika sztywności w zależności od użytej techniki.



## LITERATURA

- [1] Stillwell W., *Lipid Membrane Properties, An Introduction to Biological Membranes, From Bilayers to Rafts*, Elsevier, Londyn 2013, s. 175-214
- [2] Jóźwak Z., *Biofizyka błon, Biofizyka wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008, s. 395-422
- [3] Jaroszyk F., *Wstęp do biofizyki komórki, Biofizyka*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, s.338-349
- [4] <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371> (dostęp 23.10.2016)
- [5] Kronberg B., *et al.*, The hydrophobic effect, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Kwiecień 2016, rozdział 22, s. 14-22
- [6] [http://www.facm.ucl.ac.be/drug\\_membranes.html](http://www.facm.ucl.ac.be/drug_membranes.html) (dostęp 19.07.2016)
- [7] Morange M., *et al.*, What history tells us XXX. The emergence of the fluid mosaic model of membranes, *Journal of Biosciences*, Marzec 2013, rozdział 38, s. 3-7
- [8] Goñi F., *et al.*, Review: The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model, *Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Czerwiec 2014, rozdział 1838, s.1467-1476
- [9] Pitman M., *et al.*, Role of Cholesterol and Polyunsaturated Chains in Lipid-Protein Interactions: Molecular Dynamics Simulation of Rhodopsin in a Realistic Membrane Environment, *Journal of the American Chemical Society*, Czerwiec 2005, rozdział 127, s. 4576-4577
- [10] Nicolson G., *et al.*, The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Czerwiec 2014, rozdział 1838, s. 1451–1466
- [11] Lodish H., *et al.*, *Molecular Cell Biology*, Sixth Edition, New York, 2007
- [12] Langa E., *et al.*, Storage of Erythrocytes Induces Suicidal Erythrocyte Death, *Cellular Physiology & Biochemistry*, Czerwiec 2016, rozdział 39, s. 668-676
- [13] Róg T., *et al.*, Review: Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: What do we know about their role in raft-like membranes?, *Chemistry and Physics of Lipids*, Grudzień 2014, rozdział 184, s. 82-104
- [14] Bagatolli L., *et al.*, Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques, *Soft Matter*, 2009, s. 3234-3248
- [15] Bouvris H., *et al.*, Bending rigidities of lipid bilayers: their determination and main input in biophysical studies, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, rozdział 15, Elsevier Inc., 2012
- [16] Leyko W., *et al.*, Wpływ amfifilowych detergentów na błony lipidowe, *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1983, s. 53-101
- [17] Mosgaard L., *et al.*, The Effect of the Nonlinearity of the Response of Lipid Membranes to Voltage Perturbations on the Interpretation of Their Electrical Properties. A New Theoretical Description, *Membranes*, Wrzesień 2015, rozdział 5, s. 495-512
- [18] Fragneto G., *et al.*, Competition for space between a protein and lipid monolayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Marzec 2013, rozdział 103, s. 416-421
- [19] Patidar A., *et al.*, Liposome: New strategy in drug delivery, *International Journal of Pharmacy & Life Science*, Czerwiec 2015, rozdział 6, s.4615-4619
- [20] Immordino M., *et al.*, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int J Nanomedicine*, Wrzesień 2006, rozdział 1, s. 297–315
- [21] Swaay D., *et al.*, Microfluidic methods for forming liposomes, *Lab Chip* 2013, rozdział 13, s. 52-767
- [22] Angelova M., *et al.*, Liposome electroformation, *Faraday Discuss, Chem. Soc.* 1968, rozdział 81, s. 303-311
- [23] Dowben R., *et al.*, Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicle, *J. Cell. Physiol.* 1969, rozdział 73, s. 49-61
- [24] Genova J., *et al.*, Marin Mitov Lectures: Measuring the Bending Elasticity of Lipid Bilayers, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 2013, rozdział 18, s. 2-270
- [25] Walde P., *et al.*, Giant vesicle: preparations and applications, *Chembiochem* 2010, rozdział 11, s. 834
- [26] Rawicz W., *et al.*, Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J* 2000, rozdział 79, s.328–339
- [27] Genova J., *et al.*, Bending elasticity modulus of giant vesicles composed of aeropyrum pernix k1 archaeal lipid, *Life* 2015, rozdział 5, s. 1101–1110
- [28] Alberts B., *et al.*, *Cytoskielet, Podstawy biologii komórki*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, s. 592-599
- [29] Ananthakrishnan R., *et al.*, The Forces Behind Cell Movement, *International Journal of Biological Science*, Marzec 2007, rozdział 5, s. 303-317
- [30] <http://byjus.com/biology/types-of-movement/> (dostęp 15.12.2016)



- [31] Boicchio D, *et al.*, The membrane bending modulus in experiments and simulations: a puzzling picture, *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, Elsevier, Kwiecień 2016, rozdział 5, s. 117-143
- [32] Evans E., *et al.*, Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed fluid membranes, *Physical Review Letters* 1990, rozdział 17, s. 2094–2097
- [33] Song J., *et al.*, Bending rigidity of SOPS membranes containing cholesterol, *Biophys. J.* Czerwiec 1993, rozdział 64, s.1967–1970.
- [34] Heinrich V., *et al.*, A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes, *Ann. Biomed. Eng.*, Maj 1996, rozdział 24, s. 595–605
- [35] Hackl W., *et al.*, Effects of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependence of the effective tension of giant vesicles, *J. Phys. II* 1997, rozdział 7, s. 1141–1157.
- [36] Meleard P., *et al.*, Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles, *Biochimie* 1998, rozdział 80, s. 401–413
- [37] Dobereiner H., *et al.*, Advanced flicker spectroscopy of fluid membranes, *Phys. Rev. Lett.* 2003, rozdział 91(4), s. 48301.
- [38] Pecreaux J., *et al.*, Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles, *Eur. Phys.*, Marzec 2004, rozdział 13, s 277–290
- [39] Drabik D., *et al.*, The modified fluorescent based vesicle fluctuation spectroscopy technique for determination of lipid bilayers bending properties, *Biochemica et Biophysica Acta*, Luty 2016, rozdział 1858, s. 244-252
- [40] Sobczyk M., *Statystyka*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006, s. 127-146
- [41] Stanisław A., *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny*, Tom 1. Statystyki Podstawowe, StatSoft, Kraków 2006, s. 407-424