VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE V KOLOIDNÍCH SYSTÉMECH
FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY IN COLLOID SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Tomáš Janíček**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1044/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student:	**Tomáš Janíček**
Studijní program:	Chemie a chemické technologie
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce:	**Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok:	2016/17

Název bakalářské práce:

Fluorescenční korelační spektroskopie v koloidních systémech

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití fluorescenční korelační spektroskopie v koloidních systémech.
2. Seznámit se s měřením fluorescenční korelační spektroskopie v koloidních systémech.
3. Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci systémů polymer-tenzid pomocí fluorescenční korelační spektroskopie.
4. Zhodnotit výsledky interakcí polymeru a tenzidu ve vztahu ke změně difuzního koeficientu vzniklých agregátů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Tomáš Janíček student(ka)	Ing. Filip Mravec, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2017

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na pozorování stability a interakce koloidních systémů tvořených micelami povrchově aktivního CTAB v roztoku kyseliny hyaluronové a vody pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie. Jako Fluorescenční sonda byla použita Nilská červeň. Měření bylo provedeno pro různé koncentrace kyseliny hyaluronové. Byly použity tři různé velikosti kyseliny hyaluronové. Cílem práce bylo zjistit chování částic CTAB při tvorbě micel v závislosti různých velikostech a koncentracích hyaluronanu. Pro porovnání měření hyaluronanu byl použit polymer Poly(sodium-4-styrensulfonát).

ABSTRACT

This work is focused on studying of stability and interaction in colloidal systems created by micelles of surfactant CTAB in solution of hyaluronic acid and water. As method chose for this work was selected fluorescence correlation spectroscopy. As dye was used Nile red. Measurements were divided firstly by size of polymeric chain and secondly by concentration of hyaluronic acid. Purpose of this work was to find out how will CTAB particles react with different sizes and concentration of hyaluronic acid. For comparison to hyaluronic acid was used Poly(sodium-4-styrenesulfonate).

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescenční korelační spektroskopie, koloidní systémy, tenzidy, CTAB, kyselina hyaluronová, Nilská červeň

KEYWORDS

Fluorescence correlation spectroscopy, colloid systems, surfactant, CTAB, hyaluronic acid, Nile red

JANÍČEK, T. *Fluorescenční korelační spektroskopie v koloidních systémech.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně ocitoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování:
Mé osobní poděkování patří Ing. Filipu Mravcovi, PhD za ochotu, trpělivost a rady, které mi nesčetněkrát pomohli ve vypracování této práce.

1 ÚVOD 6
2 TEORETICKÁ ČÁST 7
2.1 Koloidní systémy 7
2.2 Tenzidy 7
2.2.1 Micely 8
2.2.2 CTAB 8
2.3 Kyselina hyaluronová 8
2.3.1 Struktura 8
2.3.2 Možnost využití 8
2.4 Fluorescence 9
2.5 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) 10
2.5.1 Základní principy FCS 10
2.5.2 Autokorelační funkce 11
2.5.3 Tripletní stav 13
2.6 Limity konfokální FCS 14
2.6.1 Foto-bleaching 14
2.6.2 Špatně zvolené pozadí 14
2.6.3 Statistická přesnost 14
2.7 Fluorescenční sondy 15
2.7.1 Nilská červeň 15
2.8 Experimentální uspořádání 15
2.8.1 Způsob měření 16
2.8.2 Zdroj záření: 16
2.8.3 Dichromatické zrcátko: 16
2.8.4 Optický filtr: 17
3 STAV SOUČASNÉ LITERATURY 18
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 20
4.1 Přístroje a vybavení 20
4.2 Použité programy 20
4.3 Použité chemikálie 20
4.4 Pracovní postupy 20
4.4.1 Příprava zásobního roztoku CTAB 20
4.4.2 Příprava polymeru 21
4.4.3 Příprava fluoroforu 21
4.4.4 Vlastní měření FCS pomocí konfokálního mikroskopu 21
4.5 Tabulky složení roztoku 22
4.6 Vyhodnocení a diskuze 23
5 ZÁVĚR 28
6 POUŽITÁ LITERATURA 29
6.1 Teoretická část 29
6.2 Rešerše 31
7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ 32
8 PŘÍLOHY 33

1 Úvod

Tato metoda byla představena Medgem, Elsonem a Webbem na počátku sedmdesátých let minulého století. Metoda však nebyla naplno využívána až do začátku devadesátých let, a to zejména z důvodu technologie potřebné pro získání dostatečně přesných výsledků.

Fluorescenční korelační spektroskopie je aplikace konfokální skenovací mikroskopie, která nám přináší informace o velikosti, pohyblivosti a koncentraci fluorescenční látky ve vzorku. Používá obdobného uspořádání jako konfokální fluorescenční mikroskopie s tím rozdílem, že se zaostřeným paprskem nepohybujeme, ale snímáme časově proměnný signál pouze z jednoho bodu. Princip této metody spočívá ve sledování vývoje intenzity fluorescenčního signálu pocházejícího z jednotkového množství molekul v čase.

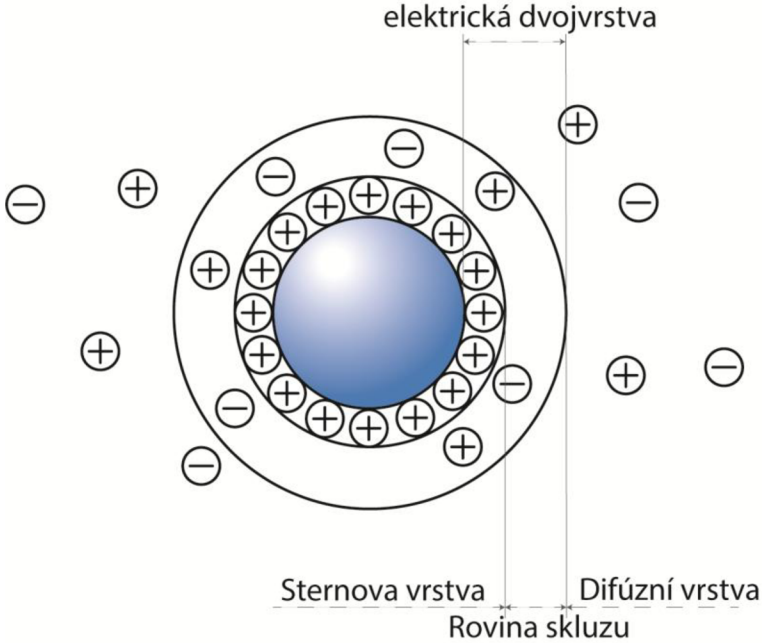
V poslední době se začal zvedat zájem o vlhké chemické postupy pro přípravu sférických nebo anizomerických kovových nanočástic. Nejúspěšnější metodou pro kontrolu velikosti a tvaru se prokázalo využití CTAB jako tvar-určující prostředek. Toto micelární prostředí zlepšuje stabilitu nanočástic v náročných podmínkách jako je centrifugace, prostředí o velké iontové síle atd. Stabilita je však ovlivněna micelární koncentrací CTAB [1]. Tato oblast stability je poměrně úzká a vyskytuje se těsně nad kritickou micelární koncentrací. Často se používá jako složka v systémech transportu léčiv do místa určení [2].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Koloidní systémy

Koloidní systémy jsou soustavy částic o velikosti on 1nm do 1000 nm můžeme je proto nazvat nanočásticemi. Vzhledem k jejich velikosti jsou obtížné měřit standardními způsoby. Koloidní systémy se dají rozložit do dvou fází. První fáze jsou samotné částic. Tuto fázi nazýváme disperzní. Druhá fáze je roztok, ve kterém se částice nacházejí a nazývá se kontinuální fáze. Koloidní částice vzhledem k jejich velikostech bývají nejvíce ovlivňovány jejich povrchem, jelikož v oblastech nanometrů převažuje vlastní povrch částic nad jejich objemem. Jejich vlastnosti jsou určovány pomocí fyzikálně-chemických a transportních (difuzních) vlastností. Dvě největší kategorie, do kterých můžeme tyto částice zařadit, jsou charakterizovány podle rozpustnosti v prostředí, ve kterém se nachází [3]. Tyto kategorie jsou označovány hydrofilní a hydrofobní koloidy. Existují dva hlavní postupy přípravy koloidních systémů. Jedním z nich je disperze velkých částic na menší částice, druhým naopak kondenzace menších částic na částice větší. Dalším velice podstatným faktorem je stabilita těchto částic. Ta se vyjadřuje pomocí zeta-potenciálu. Tento potenciál je měřen mezi hranou pohyblivé vrstvy okolo částic putujících v elektrickém poli a zbytkem roztoku. Tyto vrstvy můžeme vidět na Obrázek 1. Tento potenciál musí být větší nebo menší než ±30 mV jinak dochází k agregaci jednotlivých částic.

Koloidní částice jsou dnes velice významné především na poli chemie zejména pak pro medicínské využití, kde je velký potenciál vzhledem k využití jako indikátory, léčiva, transportní systémy a další.



Obrázek 1: Schéma koloidní částice

2.2 Tenzidy

Tenzidy je termín široce používaný pro látky povrchově aktivní. Termín povrchově aktivní znamená, že tenzidy redukují volnou energii povrchů a rozhraní mezi jednotlivými prostředí. Tenzidy jsou amfifilní molekuly, což znamená že mají jak hydrofilní, tak hydrofobní charakter, kde hydrofilní část tvoří takzvaná hlavička, která je polární a může být nabitá iontovým nábojem, nebo neutrální. Tato část tenzidu do značné míry určuje povahu daného tenzidu. Hydrofilní část je tvořena uhlíkovým řetězcem o rozsahu 8-18 atomů uhlíku. Větvení

a pozice polární hlavičky jsou parametry pro fyzikálně chemické vlastnosti této části tenzidu [4].

2.2.1 Micely

Micely můžeme definovat jako částice koloidních rozměrů, které existují v rovnováze s molekulami nebo ionty v roztoku kterými je formován [5]. Při určité koncentraci tenzidu v roztoku se začínají vytvářet micely. Tato hranice se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Průměrná velikost a tvar micely závisí na typu, velikosti a stereochemii tenzidu. Velikost micel můžeme popsat pomocí průměrné molekulární hmotnosti, hydrodynamického poloměru a agregačním číslem. Tvar micel je často zjednodušen na tvar dokonalé koule. Toto uspořádání je geometricky nemožné. Micely mají spíše nepravidelný tvar, který je do značné míry ovlivněn agregačním číslem [6].

2.2.2 CTAB

Cetyltrimethylamonium bromid patří do skupiny povrchově aktivních látek díky polární hlavičce tvořené kvarterní amonnou solí. Jedná se tedy o kationt-aktivní tenzid. Tento tenzid byl vybrán pro jeho uplatnění v moderní medicíně jako přenašeč léčivých látek nepolárního charakteru polárním prostředím [7].

2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová byla objevena v roce 1934 Karlem Meyerem [8]. Byla izolována ze sklivce oka jako polysacharid složený z kyseliny D-glukoronové a D-N-acetylglukosaminu [9]. Hyaluronan je biopolymer, který je se přirozeně vyskytuje u živočichů, bakterií, virů a hub. Patří do skupiny glykosaminogylkanů společně s dalšími látkami jako je chondroitin sulfát, keratansulfát, heparansulfát a dermatansulfát. Glykosaminoglykany jsou složeny z opakujících se disacharidových jednotek, které obsahují uronovou kyselinu společně s aminocukry typu hexosaminů. Jako součást tzv. Základní substance jsou sdruženy se strukturními elementy jako jsou kost, elastin a kolagen. Kyselina hyaluronová je součástí extracelulární matrix mnoha tkání, vyskytuje se především v kůži, očním sklivci, vlasech, kloubech a dásních [10].

2.3.1 Struktura

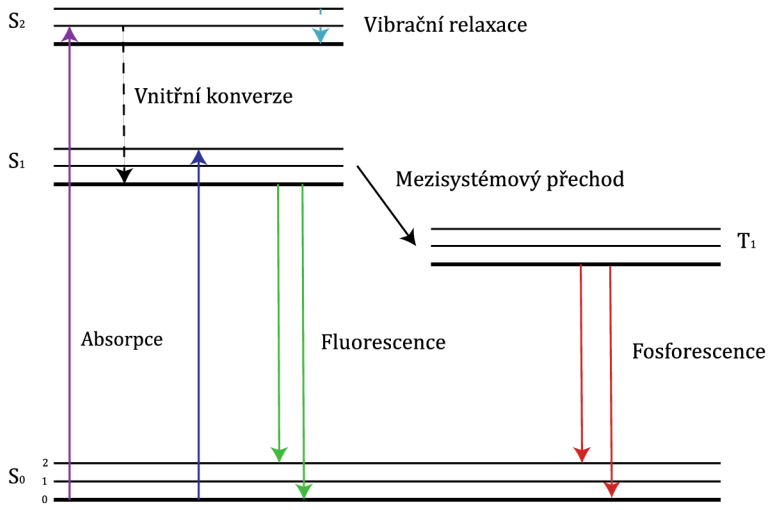
Kyselina hyaluronová je tvořena disacharidovými jednotkami složenými z N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukoronové kyseliny, které jsou rovněž vázány střídavě ß-1,3 a ß-1,4 glykosidickými vazbami [10]. Hyaluronan se vyskytuje ve velikostech od 100 kDa až po 8 000 kDa [11]. Lineární řetězce jsou syntetizovány střídavým připojováním aktivované kyseliny UDP-glukoronové a UDP-N-acetylglukosaminu za pomoci specifického enzymu hyalurosynthasy [10]. V neutrálním pH a fyziologické iontové síle se hyaluronan chová náhodná ztuhlá spirála. Tento je v zapříčiněn tvorbou vodíkových můstků mezi hydroxidovými skupinami na obou základních jednotkách polysacharidu a vodíků z vodného prostředí a vzájemným elektrostatickým odpuzováním mezi karboxylovými skupinami. Jednotlivé řetězce polysacharidu spolu mohou interagovat pomocí hydrofobních míst, která se v polymeru vyskytují na vazbách uhlík-vodík v opačné konformaci k hydrofilním hydroxidovým skupinám. Díky existenci těchto míst je možné na hyaluronan navázat jak polární, tak nepolární molekuly a také umožňuje interakci mezi jednotlivými vlákny, které je značně ovlivněno koncentrací hyaluronanu [9].

2.3.2 Možnost využití

Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti polymer hyaluronanu dávají předpoklad širokého využití jako v medicíně tak i v průmyslu. Především díky svým hydratačním a viskoelastickým vlastnostem je využívána v kosmetickém průmyslu, ale široké využití má i ve speciálních oblastech medicíny jako je dermatologie, oftalomologie, revmatologie, plastická chirurgie, při hojení ran apod. [10].

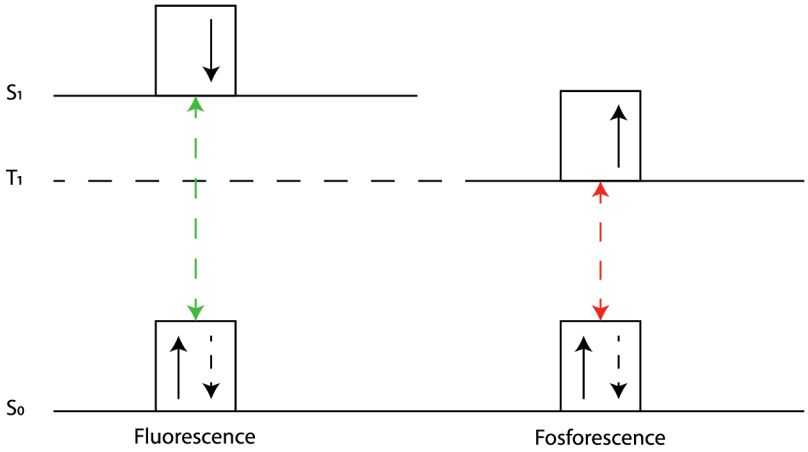
2.4 Fluorescence

Fluorescence je jeden z procesů spadající do větší skupiny nazývané fotoluminiscence, do které dále spadá například fosforescence nebo opožděná fluorescence. Tyto děje jsou charakteristické schopností látek emitovat světlo o určité vlnové délce charakteristické pro danou látku. Fluorescence tak jak ji známe dnes byla formulována Alexandrem Jablonskim, kterému se přezdívá otec fluorescenční spektroskopie z důvodu jeho výsledků v oblastech jako popisu koncentrační depolarizace a definování termínu anizotropie pro popis polarizovaného emisního záření produkované sloučeninami [13]. Jablonski je nejvíce známý pro svůj diagram popisující excitaci a následnou depolarizaci.



Obrázek 2: Jablonskiho diagram

Singletový základní, první a druhý elektronový stav jsou znázorněny pod označením S_0, S_1 a S_2. V každém jednom z těchto stavů se může elektron vyskytovat na různých vibračních vrstvách 0, 1 nebo 2. Přechody mezi jednotlivými elektronovými stavy jsou vyjádřeny vertikálními čarami. Čas absorpce se pohybuje v hodnotách 10^{-15} s. Rychlost tohoto děje způsobuje energetickou nerovnováhu. Jádro atomu, z jehož obalu excitovaný elektron pochází nedokáže kvůli své hmotnosti včas zaujmout požadovaný tvar odpovídající příslušné rovnováze. Ke stabilizaci dochází pomocí vibrační relaxace, při které dochází k uvolnění tepelné energie. K těmto konverzím dochází v časovém okně kolem 10^{-12} s. Před přechodem elektronů z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 se tyto elektrony nacházejí v základní vibrační vrstvě elektronového stavu S_1. K fluorescenci dochází v řádech 10^{-8} s. Při návratu na základní energetickou hladinu se elektrony často vrací do vyšších vibračních vrstev. Dále může dojít k mezi systémovému přechodu mezi singletovým stavem S_1 a tripletovým stavem T_1, při kterém dochází ke změně spinu elektronu, který způsobuje problém při zpětném přechodu do základního energetického stavu, viz Obrázek 3. Tento problém spočívá v dodržení Paulieho principu při zpětném obsazení původního orbitalu, ze kterého byl elektron excitován. Proto je tento přechod považován za zakázaný a trvá několikanásobně déle než fluorescence a může trvat až několik hodin nebo dní.



Obrázek 3: Elektronové orbitaly

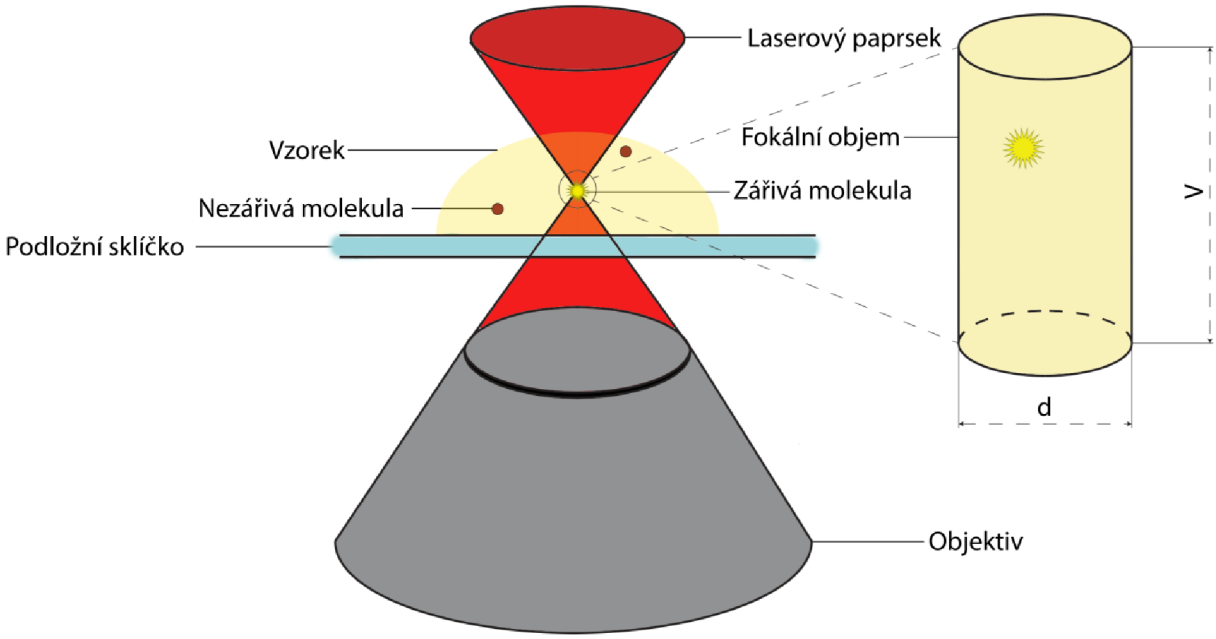
Fluorescence podléhá několika pravidlům. Jedním z těchto pravidel je Stokesovo pravidlo neboli Stokesuv posun. Toto pravidlo pojednává o tom, že emitované fluorescenční světlo má delší vlnovou délku než světlo absorbované. Tento rozdíl je způsobený vnitřními konverzemi elektronů, které se pomocí relaxačních vibrací přesouvají na základní hladinu excitovaného stavu a z této hladiny se elektron přesouvá do základního energetického stavu.

2.5 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Metoda poprvé představena Medgem, Elsonem a Webbem v roce 1972 pro aplikaci měření difuzních a chemických dynamik interakce DNA-léčivá látka. Nová metoda byla rychle adaptována například pro výzkum buněčného prostředí. Nicméně první výsledky této metody byly zatíženy velkou chybou pocházející z poměru signál-šum. Na vině byla nízká efektivita detektorů, nedostatečné potlačení šumu z pozadí a nárok na zpracování velkého množství dat. Značnějšího využití se dostavilo v devadesátých letech, kdy byla tato technika přepracována Thompsonem [15].

2.5.1 Základní principy FCS

Metoda je založená na pozorování jedné, nebo více molekul. Na rozdíl od jiných metod nevyžaduje pro své měření imobilizaci molekul u povrchu a může být aplikována na molekuly v roztoku. Jedna ze značných výhod této metody spočívá v rozlišení, při kterém jsme schopni měřit fluorescenci na úrovni jednotlivých molekul. Fokální objem se pohybuje v jednotkách femtolitrů (10^{-15} l). Excitace se většinou provádí pomocí laserového paprsku. K odrazu signálu z míst za měřící oblastí bývá použita konfokální jáma. Použitím těchto optických prostředků nabývá zkoumaný objem elipsoidního tvaru. K představě objemu můžeme použít válec o poloměru podstavy 0,4 mikrometrů a výšce 2 mikrometry.



Obrázek 4: zjednodušený model fokálního objemu

Pozorované molekuly se mohou tedy konstantně doplňovat díky difuzi v oblasti pozorování, a tak dosahuje tato metoda možnosti delšího pozorování a nevyžaduje výběr určitých molekul pro pozorování. FCS je měření intenzity fluktuace v čase. Když fluorofor difunduje do oblasti měření zaostřeným světelným paprskem, tak emituje výbuch fotonů skrz vícenásobné excitačně emisní cykly jednoho fluoroforu. Pokud fluorofor opustí prostor měření rychle, vzniklé fotony mají krátkou životnost. Pokud se fluorofor pohybuje pomaleji, životnost fotonů se zvětší. [14] Pohyb jednotlivých molekul z fokáního objemu je vyjádřen jako difuzní koeficient D. Časové fluktuace intenzity jsou zaznamenávány a analyzovány pomocí autokorelační funkce $G(\tau)$. Autokorelační funkce je vytvořena pomocí záznamů fotonů vyzářených fluorofory, které se pomocí Brownova pohybu dostávají do míst se zaostřeným laserovým paprskem [14].

2.5.2 Autokorelační funkce

Informace o pohybu jednotlivých molekul lze získat statickou analýzou fluktuací fluorescenčního signálu F. Teto děj můžeme zapsat jako autokorelační funkci $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle \delta F(t) \rangle^2}, \tag{1}$$

kde $F(t)$ vyjadřuje intenzitu fluorescence v čase t, $\langle\ \rangle$ vyjadřují průměrnou hodnotu v čase a δ okamžitou odchylku.

Fluktuace ve fluorescenčním signálu je vyčíslena autokorelací zaznamenané intenzity signálu v čase. V principu autokorelace je měření založené na opakování. Měří se ve stále stejných časových úsecích. poskytuje hodnoty měření pro časově shodná luminiscenční maxima [17]. Na rozdíl od ostatních měření založených na principu jedné molekuly FCS není závislá na intenzitě jednotlivých vyzářených kvant, ale spíše na odchylkách od průměrného kvanta vyzářeného molekulou. Autokorelace by se tedy dala považovat za měření podobnosti jednotlivých záblesků [16].

Vzhledem k tomu, že relativní fluktuace klesají se zvyšujícím se počtem měřených částic, je důležité minimalizovat počet molekul ve fokálním objemu. Nicméně fluorescenční signál

musí být stále vyšší než interference z pozadí měření. Pokud by ve fokálním objemu bylo příliš málo molekul, mohlo by se stát, že při určitých měřeních se ve fokálním objemu nebude vyskytovat žádná částice, která by poskytovala fluorescenční signál. Počet částic by tedy měl být mezi 0,1-1 000. Fokální objem se pohybuje okolo femtolitru, což koresponduje s koncentracemi pohybujícími se mezi sub-nanomolárními a mikromolárními roztoky. Počet molekul obsažených uvnitř fokálního objemu v libovolném čase je zastoupen Poissonovou distribucí:

$$\frac{\sqrt{\left\langle (\delta N)^2 \right\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\left\langle \left(N - \langle N \rangle\right)^2 \right\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}. \tag{2}$$

Fluorescenční záření emitováno molekulami ve fokálním objemu je zaznamenávána foton po fotonu. Za předpokladu konstantní excitační síly jsou fluktuace fluorescenčního signálu definovány jako odchylky od časově odpovídajícího průměru signálu [15].

Autokorelační funkce ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě τ. Z fluktuujícího fluorescenčního signálu určíme $G(\tau)$ pro určité intervaly τ. Pro $\tau = 0$ dává funkce podle autokorelační rovnice druhou mocninu průměrné relativní odchylky. Autokorelační funkce má své maximu pro malé τ, pro delší časy τ funkce klesá k nule. Do detekčního objemu přicházejí difuzním pohybem jednotlivé molekuly označené fluorescenčním barvivem a zase z něj odcházejí. Ve zjednodušeném příkladu můžeme předpokládat, že v oblasti konfokálního objemu se nachází jedna nebo žádná molekula. V okamžiku, kdy se molekula v detekčním objemu nachází, je odchylka od průměrné hodnoty fluorescence δF kladná, pokud se molekula v detekčním objemu nenachází, hodnota odchylky je záporná. Pokud je časový interval τ natolik malý, že je pravděpodobné, že pokud na jeho začátku byla v detekčním objemu fluorescenční molekula, tak na jeho konci tam tatáž molekula stále je. Případně, pokud se molekula na začátku intervalu ve fokálním objemu nenacházela, tak tam na konci stále není. Při součinu intenzity signálu na začátku a na konci je výsledná odchylka většinou kladná a jeho vystřeďováním přes celé měření dostaneme kladné číslo. Pokud zvolíme dlouhý časový interval τ, v detekčním objemu se během něj vystřídá několik různých molekul. Intenzita na začátku a na konci tohoto intervalu spolu nesouvisí a při vynásobení počáteční a konečné hodnoty odchylky intenzity je tedy náhodná. Při vystřeďování přes celé měření dostaneme nulu.

Časový interval τ_D, pro který má autokorelační funkce poloviční hodnotu, než má ve svém maximu, pak můžeme považovat za průměrnou dobu, po kterou se jedna molekula zdržuje v detekčním objemu.

Pro vyjádření okamžité odchylky od průměrné fluorescence můžeme vyjádřit pomocí rovnice:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle = \int W(\mathrm{r}) \delta(\eta C(\mathrm{r}, t)) \mathrm{dr}, \tag{3}$$

kde integrujeme přes detekční objem. C je lokální koncentrace částic, η parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, který určuje počet fotonů detekovaný z jedné částice za jednu sekundu (závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence). $W(\mathrm{r})$ udává prostorové rozložení emitovaného světla. Často se aproximuje třídimensionální Gaussovou funkcí:

$$W(\mathrm{r}) = e^{-2 \cdot \frac{x^2 + y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}}, \tag{4}$$

kde z_0 udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu a r_0 rozměr v ohniskové rovině. Pokud budeme předpokládat, že u částic, které sledujeme, se

parametr η nemění v čase a částice se pohybují volnou difuzí ve třech dimensích, je možné odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(\tau)=\frac{1}{V_{\text{eff}}\cdot\langle C\rangle}\cdot\frac{1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{\text{D}}}\right)}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2\cdot\frac{\tau}{\tau_D}}}, \tag{5}$$

kde V_{eff} je efektivní detekční objem:

$$V_{\text{eff}}=\pi^{\frac{3}{2}}\cdot r_0^2\cdot z_0, \tag{6}$$

kde τ_{D} je takzvaný difuzní čas, parametr udávající, jak dlouho je částice v detekčním objemu. Difuzní čas úzce souvisí s difuzním koeficientem D fluoreskující molekuly vztahem:

$$\tau_{\text{D}}=\frac{r_0^2}{4D}. \tag{7}$$

Pokud tedy naměříme fluktuující fluorescenční signál, spočítáme autokorelační funkci podle vztahu (1) a proložíme ji teoretickou závislostí (5), můžeme získat důležité informace o sledovaném systému: difuzní čas τ_{D}, který charakterizuje rychlost pohybu molekul ve vzorku, průměrný počet částic („particle number“-PN) v detekčním objemu:

$$PN=\frac{1}{G(0)}=V_{\text{eff}}\cdot\langle C\rangle=\langle N\rangle \tag{8}$$

a pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme určit difuzní koeficient a koncentrací dané látky [17].

2.5.3 Tripletní stav

Až doposud bylo považováno, že vlastnosti jednobarevné fluorescence se nemění během průchodu zaostřeným laserem $\delta\eta = 0$. Bohužel tato odhad neodpovídá realitě reálných barviv a vyšších excitačních sil. Nejčastější příčinou pro takzvaného blikání ve fluorescenční intenzitě je přesun barviva do prvního excitovaného tripletového stavu. Tento přesun je zakázán kvantovou mechanikou. Chromofor potřebuje podstatně delší dobu pro vrácení se na původní energetickou hladinu. Během těchto intervalů barvivo nemůže emitovat žádné fluorescenční fotony a jeví se jako tmavý. Můžeme si tedy představit vnitřní systém přecházející ze série tmavých intervalů do intervalů ve kterých vyzařuje fluorescenční záření. Místo přepočtu správné autokorelační funkce pro tyto mírně změněné podmínky, může být použita mnohem jednodušší a více obecná úprava. Pokud intra nebo intermolekulární oblast zapříčiní zvýšení fluorescenční fluktuací na časové ose mnohem rychleji než ty způsobené pouhým pohybem částic, je možná separace těchto dynamik:

$$G_{\text{total}}(\tau)=G_{\text{motion}}(\tau)\cdot X_{\text{kinetics}}(\tau). \tag{9}$$

Samozřejmě tato myšlenka odpovídá pouze situacím, ve kterých je difuzní koeficient neovlivněn reakcí. Blikání tripletu zmíněného výše může být popsáno jednoduchým exponenciálním rozkladem $X_{\text{triplet}}(\tau)$, který poukazuje na přidaná ramena v měřených křivkách v krátkém časovém rozmezí [14]:

$$X_{\text{triplet}}(\tau)=\frac{1-T+T\cdot e^{\frac{-\tau}{\tau_{\text{triplet}}}}}{1-T}, \tag{10}$$

kde τ_{triplet} je relaxační čas tripletního stavu a T je podíl částic, které se nacházejí v tripletním stavu. Naměřené autokorelační funkci pak můžeme proložit křivku.

$$G(\tau)=\left(\frac{1-T+T\cdot e^{\frac{-\tau}{\tau_{\text{triplet}}}}}{1-T}\right)\cdot\frac{1}{V_{\text{eff}}\cdot\langle C\rangle}\cdot\frac{1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{\text{D}}}\right)}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2\cdot\frac{\tau}{\tau_D}}}\cdot \tag{11}$$

Analogicky jako přechod do tripletního stavu můžeme do analýzy autokorelační křivky zahrnout další rychlé jevy, které způsobují přechody mezi stavem, kdy molekula fluoreskuje, a mezi stavem, kdy nesvítí, a zároveň neovlivňují difuzní koeficient molekuly [17].

2.6 Limity konfokální FCS

V tomto oddílu se zaměříme na hlavní problémy při využití FCS jsou zejména statistická přesnost, foto-bleaching a pozice detekčního objemu.

Konfokální FCS je dnes dobře ustanovenou technikou. K nepřesnostem měření dochází nejčastěji při pomalé difuzi a koncentraci v detekčním objemu. Koncentrační rozmezí pro FCS je $c_{\max}\approx 1000\,\mu\text{M}$ a $c_{\min}\approx 1\,\mu\text{M}$ [14].

2.6.1 Foto-bleaching

K tomuto jevu dochází zejména při nejčastěji při použití vysokého množství fotoexcitační energie. při nastání této situace dochází ke dvěma hlavním jevům:
pokud se značné množství detekovaného objemu podlehne foto-bleachingu v detekčním objemu, dojde k redukci koncentrací zkoumaného fluoroforu a difuzního času. K celkovému poklesu může také dojít, když systém má omezené množství fluoroforu nebo jej nestačí dodávat v požadovaném časovém rozpětí. V tomto okamžiku se začne koncentrace díky foto-bleachingu zmenšovat.
Pokud flourofor projde foro-bleachingem při difúzním průchodu detekčním objemem tak dojde k přeměně ze zářivého do temného stavu a tím znehodnotí korelační křivku.
Pokud začne docházet k poklesu v soustavě z příčiny foto-bleachingu a soustava není schopná fluorofory včas nebo vůbec doplnit začne tento jev ovlivňovat korelační křivku zejména jako pokles fluorescenční intenzity [14].

2.6.2 Špatně zvolené pozadí

V mnoha experimentech je detekce světla, která je emitována soustavou nepochází ze samotného fluoroforu. Pro nízké koncentrace může vznikat problém při špatně zvoleném filtru, spatně zaostřeným paprskem světla nebo jeho tříštění může být hlavním viníkem pozadí, na kterém se pokus provádí. Dalším zdrojem záření, které nepochází ze zkoumaných fluoroforů může být auto-fluorescence jiných molekul než zkoumaného fluoroforu, speciálně pokud se jedná o organické systémy.

Pokud si špatně vybereme pozadí může dojít k samotnému foro-bleachingu tohoto prostředí. tento děj nasává opět nejčastěji při měření organických vzorků. Při tomto jevu dochází k imobilizaci fluoroforu. Na vyhodnocení se tato nepřesnost projeví jako pozdržení samotné fluorescenční křivky [14]

2.6.3 Statistická přesnost

Existují hlavní dva zdroje statistického šumu v korelačních křivkách První, fotonový šum, je způsoben náhodnou přirozenou emisí fotonů, kdy malé množství fotonů se uvolní z každého fluoroforu za jednotku času (nízkomolekulární svítivost $\eta_{\text{eff}}=\frac{\langle F\rangle}{N}$), vede k šumu s nízkým zpožděním. Proto se musí pohlídat maximalizace detekční efektivita nastavení.

Nízkomolekulární svítivost η_{eff} může být zvětšena zvýšením výkonu excitačního paprsku, které zároveň způsobuje foto-bleaching. Tento šum je hlavním zdrojem šumu při měření FCS. Druhý zdroj šumu vzniká při náhodném pohybu flouroforů skrz detekční objem. Zvýšením molekulární svítivosti v tomto případě téměř nepomáhá při zajišťování přesnosti měření korelační křivky. Pro minimalizování foto-bleachingu, laserový výkon musí být zvolen tak nízký, aby hlavní zdroj šumu pocházel z vyzařování fotonů a minimalizování částicového šumu [14].

2.7 Fluorescenční sondy

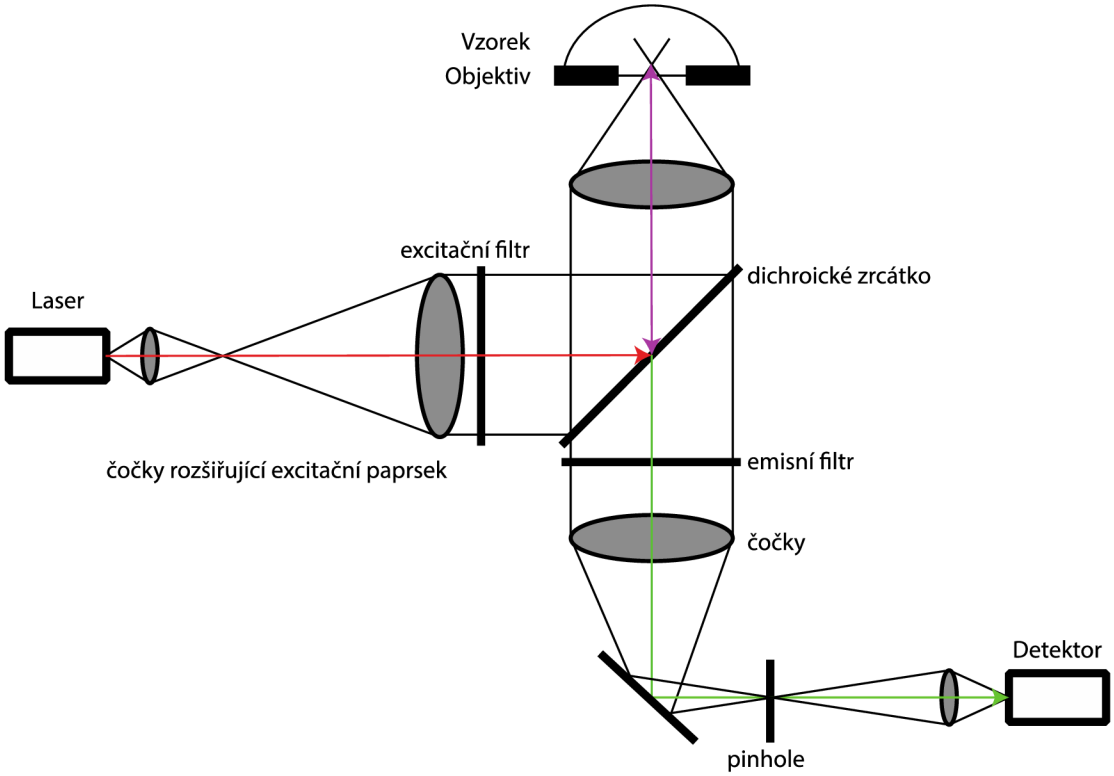
Pouze malé množství látek vyskytující se v přírodě má schopnost fluorescence. Pokud zvážíme nároky na moderní metody využívající fluorescenčního měření, tak se počet vyhovujících fluoroforů ještě sníží. Základními kritériem kladeným na fluorescenční barviva je absorpční spektrum. Toto spektrum by mělo být úzké s vysokým extinkčním koeficientem, aby umožňovalo selektivní a exkluzivní excitaci barviva. Absorpční pásy barviv se většinou pohybují v rozmezí viditelného světla, která umožnuje snadné použití zdrojů jako například lasery. Vysoký kvantový výtěžek je dalším podstatným kritériem pro fluorescenční barviva a je naprosto nezbytný pro přesnou a jemnou detekci značeného materiálu v přítomnosti šumu z pozadí a autofluoroscence vzorku. Předpokladem pro vysoký kvantový výtěžek je malý počet intersystémového křížení a konverzí. Přesto však nemůžeme s úplností vyloučit formaci tripletových stavů. Nízká životnost těchto tripletových stavů a rychlá de-excitace do základních energetických hladin je nezbytná. Poslední důležitou vlastností je fotostabilita. Tato vlastnost vyjadřuje schopnost molekuly se excitovat a de-excitovat v co možná největším počtu, než podlehne fotochemické degradaci [12].

2.7.1 Nilská červeň

Nilská červeň, 9-diethylamino-5H-benzo{α}phenoxazin-5-on, je intenzivní fluorescenční barvivo, které vykazuje unikátní vlastnosti, které z něj dělají ideálního kandidáta jako barvivo pro histochemickou detekci lipidů. Nilská červeň je částice bez elektrického náboje heterocyklického charakteru a je tedy velice dobře rozpustná v organických látkách a tucích, ale relativně málo rozpustné ve vodě. Nilská červeň je tedy vhodná jako hydrofobická sonda. Fluorescenční maxima jsou závislé na relativním hydrofobním charakteru rozpouštědla. Značení pomocí Nilské červeni má několik výhod oproti ostatním barvivům jako například Súdánské černi a to možnost použití ve vodném prostředí což znamená, že nemusíme použít organická rozpouštědla. Další výhoda spočívá v chování tohoto barviva ve vodném prostředí, kde tento fluorofor fosfroreskuje pouze za přítomnosti hydrofobického prostředí. Ve vodě je fluorescence potlačena [18]. Excitační a emisní spektra jsou závislé na prostředí. Ve vodném prostředí se excitační maximum Nilské červeni odpovídá vlnové délce 591 nm a emisní maximum odpovídá vlnové délce 657 nm [19].

2.8 Experimentální uspořádání

Fluorofotometr má spoustu komponent. Patři sem: Zdroj světla, dichromatické zrcátko, objektiv mikroskopu, clona, optický filtr, pin-hole a detektor viz Obrázek 5.



Obrázek 5: Schéma fluorescenčního mikroskopu

2.8.1 Způsob měření

Excitující paprsek poskytovaný laserovým zdrojem, který je namířen přímo do mikroskopového objektivu skrz dichromatické zrcátko je soustředěn na jedno místo ve vzorku. Jelikož vzorek měřených částic je většinou rozpuštěn ve vodném prostředí používají se většinou objektivy přizpůsobené pro vodní prostředí. To znamená že na vrchol objektivu se umisťuje kapka vody, která následně přiléhá k podložnímu sklíčku, na kterém je umístěn vzorek. Vzniká tedy rozhraní voda-podložní sklíčko, které je uspořádané do soustředných kružnic. Druhý přechod mezi optickými rozhraními je podložní sklíčko-vzorek ve vodném prostředí. Tento přechod se ukazuje jako kříž. Fluorescenční signál ze vzorku prochází stejným objektivem jako laserový paprsek a prochází skrz dichromatické zrcátko, emisní filtr a pin-hole. Tato takzvaná pin-hole blokuje jakákoliv nežádoucí světelný signál, který nepochází z fokálního objemu vzorku. Následně je světlo vedeno na detektory [14].

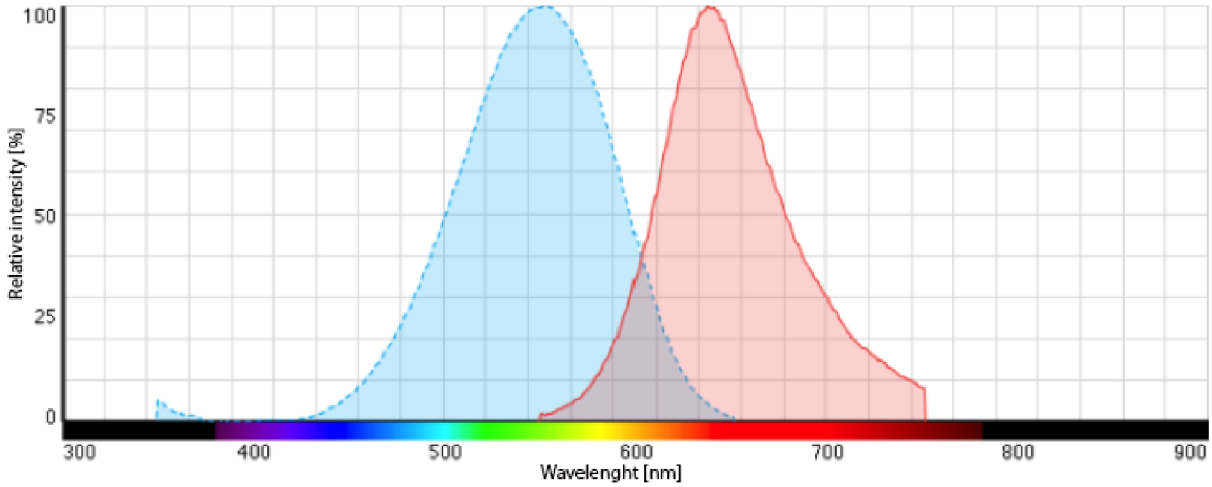
2.8.2 Zdroj záření:

Dnes se jako nejvíce versatilní světelný zdroj pro měření FCS využívá laserového záření, které výhodné z hlediska dostatečné excitační síly a možnosti volby vlnové délky vhodné pro daný fluorofor. Nevýhoda laserových zdrojů záření je nutnost použití clon, které brání zničení fluoroforu přílišnou intenzitou laserového zářní.

2.8.3 Dichromatické zrcátko:

Slouží pro rozdělení excitačního a emisního světla. Při správné volbě zrcátka se excitační záření odráží směrem do čočky a do vzorku. Avšak světlo pocházející z fluorescence prochází

tímto zrcátkem bez problému. Toto je možné díky posunu vlnové délky emisního světla oproti zdroji excitace. Tento posun se nazývá Stokesův posun.



Obrázek 6: Excitační a emisní spektra pro nilskou červeň [20]

2.8.4 Optický filtr:

Optický filtr slouží v přístroji pro zamezení nežádoucích vlnových délek z prostředí, laseru použitého pro excitaci nebo samotného vzorku ve skreslení signálu přicházejícího na detektory. Je tedy nutné znát vlnovou délku emisního spektra a vhodně zvolit optický filtr. Dá se použít i pro odrazení laserových paprsků, které se nepodařilo usměrnit na dichromatickém zrcátku. Při nastavení rozmezí průchodu emitovaného světla na 20-30 nm umožňuje potlačení jak rozptýleného laseru, tak i Ramanův rozptyl, který je stejně jako emisní spektrum posunut k červenému spektru od základní vlnové délky [14].

3 STAV SOUČASNÉ LITERATURY

Sarkar Pabak a spol. zkoumali multimerizaci CaMKII pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a homo-FRET analýzy. CaMKII je zkratka používaná pro kalcium-kalmodulin závislý protein kináza II, který je složený z 8-14 podjednotek uspořádaných v párech kolem centrálního jádra. Dosud nebylo objasněno, jestli se holoenzymatický CaMKII sestavuje z jednotlivých nezávislých párů, katalytických párů nebo jako celek. Jednou strategií bylo vytvořit monomer a dimer CaMKII a porovnat jeho chování s originálním enzymem. monomerem. Fluorescenční korelační spektroskopie v kobinaci s homo-FRET analýzou byla použita pro charakterizaci seskupení dimeru CaMKII značeného fluorescenčním barvivem. Pomocí spektroskopie byla zkoumány změny ve struktuře a funkci tohoto holoenzymu v prostředí kalcium-kalmodulinu, které způsobilo zvětšení hydrodynamického objemu jak dimeru, tak původního enzymu. Jinak však nedošlo ke změnám v struktuře nebo stechiometrii podjednotek enzymu [1].

Staaf spol. pomocí fluorescenční korelační spektroskopie zkoumali molekulární difuzi v plasmatických membránách primárních lymfocytů, kde je tato technika velice vhodná vzhledem k možnosti studovat difuzi molekul skrz biologickou membránu s vysokým časovým a prostorovým rozlišením. FCS je schopná kvantifikovat molekulární koncentraci, difuzní koeficient fluorescenčně značených molekul v buněčné membráně. Tato technika má schopnost zkoumat difuzní charakteristiky molekul v plasmatické membráně imunitních buněk bez ovlivnění jejich funkce. FCS je vhodná pro studium difuze proteinů, které jsou, exprimovány na úrovních typických pro endogenní proteiny. Byla zde zkoumána rychlost difuze buněk membránových proteinů primárních lymfocytů. Efektivní způsob pro výzkum na protilátkách označených fluorescenčním barvivem. Byl vytvořen protokol, který může být nápomocný například pro imunology, kteří dokáží využít data konfokální mikroskopie, ale nemají zkušenost s technikami měřícími dynamické parametry, jako rychlost molekulární difuze [2].

Jarzebski Maciej a spol. zkoumali aplikace konfokální mikroskopii a fluorescenční korelační spektroskopie pro Core-shell fluorované methakrylátové nanočástice s použitým barvivem Rhodamin-B. Cílem bylo vyvinout nové fluorescenční částice s velikostí odpovídajícím nanometrům a sub-mikronům, které mají vhodné vlastnosti pro měření konfokální mikroskopie a fluorescenční korelační mikroskopie a jsou vhodné pro studování dynamik a interakcí v komplexních koloidních systémech a živých buňkách. Fluorescenční jádro a průhledný obal fluorovaného polymeru nanočástic vykazují nízký refrakční index, blízký vodě, s vysokou fluorescenční efektivitou, vysokou stabilitou a bez cytotoxicity. Tyto parametry jsou důležité pro vytvoření sond, které můžou být dále použity například pro měření ve vodném prostředí nebo živých systémech. Rhodamin-B byl použit jako fluoreskující jádro. 1H,1H-heptofloro-n-butyl methakrylát byl použit jako monomer pro vytvoření průhledného obalu. Sférický tvar částic byl potvrzen pomocí skenu elektronovým mikroskopem. Velikost částic v suspenzi byla charakterizována pomocí techniky dynamického rozptylu světla (DLS) a fluorescenční korelační spektroskopií (FCS). Vliv různých reakčních parametrů, jako koncentrace iniciátoru, polymerizační čas, velikost částic, hustotu náboje i toxicitu, byl testován. Nejmenší nanočástice, které byly naměřeny, měli průměr jádra 240 nm a byly naměřeny na DLS za použití vyšší koncentrací iniciátoru. Opakované konfokální, DLS a FCS měření po dobu dvou měsíců až dvou let potvrdili vysokou fluorescenční efektivitu, stabilitu a užitečnost připravených částic jako versatilní systémy pro studie používající konfokální mikroskopii a fluorescenční korelační spektroskopii pro koloidní systémy ve vodném prostředí. Test cytotoxicity také povolil použití těchto částic na živé buňky [3].

Maffre Pauline a spol. se zabývali vlivem na funkci při adsorpci lidského séra albuminu na nanočástice. Za použití fluorescenční korelační spektroskopie byla studována absorpce lidského séra albuminu (HSA) na Fe-Pt nanočástice s poloměrem 6 nm, CdSe/ZnS kvantové tečky o poloměru 5 nm a nanoclustery tvořené zlatem a stříbrem o poloměru 1-4 nm. Tyto částice byly dále obklopeny různými vodou rozpustnými povrchovými vrstvami s rozlišnými funkčními skupinami přístupnými pro chemické reakce (karboxyl, amino a obojí). Tento postup měl pomoci vytvořit nanočástice s různými povrchovými náboji. Dalším měřeným kritériem byl efekt modifikovaného povrchu na protein sukcinylací a aminací. Byl pozorován postupný růst v hydrodynamickém poloměru s přísně monitorovanou koncentrací proteinu odhalující formaci proteinové mono vrstvy obalující nanočástice nezávisle na jejich povrchovém náboji. Rozdíly v tloušťce proteinové vrstvy byly vysvětleny z hlediska různé orientace, ve které HSA adsorbuje na povrch nanočástic. Střední body vázajícího procesu, které kvantifikují afinitu HSA k nanočásticím se lišili skoro o čtyřnásobek řádů příslušné jednotky. Tyto variace můžeme chápat ve smyslu specifických Columbických interakcí mezi proteinem a nanočásticemi [4].

Ghosh Shirsendu zkoumali strukturu a dynamiku lysozomů v směsi DMSO a vody. Strukturní stabilita proteinů a jejich aktivita ve směsích vody a organických rozpouštědel je fascinující téma výzkumu v biochemii. Působení dimethylsulfoxidu (DMSO) na strukturu a dynamiku konformace lysozomu (značeného pomocí alexa 488) bylo studováno pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Kruhový dichroismus a emise tryptofanu indikují, že DMSO molekuly se akumulují kolem tryptofanového residua pocházejícího z lysozomů. Podle dat získaných pomocí FCS hydrodynamický poloměr proteinu ostře roste z 18 angstormů při nulové zastoupení DMSO ve směsi na 33 angstormů při podílu 5 % DMSO z celkového složení směsi. Toto naznačuje rozplétání proteinu způsobené přidáním DMSO. Při zvýšení zastoupení DMSO ve směsi nad 5 % způsobuje postupné zmenšení lysozomu. Tento trend trvá do 30 % podílu DMSO ve směsi a poté se lysozom začíná opět zvětšovat. Rychlost konstanty k(+) a k(-) stálého dynamického skládání a rozkládání ukazuje křivku připomínající ševron při zvyšování koncentrace DMSO, což poukazuje na dvou stavovou cestu dynamiky skládání lysozomů [5].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a vybavení

Měření bylo provedeno na měření MicroTime 200. Tento přístroj se sestává z inverzního mikroskopu Olympus IX 71, excitačních zdrojů a elektroniky firmy PicoQuant (PicoQuant GmbH) a skeneru se sub-nanometrovým rozlišením firmy Physik instrument (Physik instrumentace GmbH). Systém dále obsahuje excitační zdroje, pulsní laserové diody o frekvenci 90, 64, 50 MHz a vlnových délkách 375, 470, 510 a 640 nm. Měřící soustava obsahuje čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z nich jsou zastoupeny detektory typu τ-SPAD se šumem nepřekračujícím 100 $\mathrm{cnts} \cdot \mathrm{s}^{-1}$ a dva zbylé představují detektory MPD-SPAD se šumem pod 250 $\mathrm{cnts} \cdot \mathrm{s}^{-1}$. Dále je přístroj vybaven externím spektrografem s CCD kamerou Newton (Andor), který umožní snímání stacionárních fluorescenčních spekter současně s probíhajícím konfokálním experimentem [21].

Pro experiment bylo použito toto nastavení přístroje:

Tabulka 1: typ/označení komponent použitých pro měření FCS

Konponenty	Typ/označení
Objektiv	Olympus UPlanSApo 60x/1,20 W
Dichromatické zrcátko	zt 514/640 RPC
Emisní filtr	FF01 - 550/49
Excitační filtr	OD 3
detektor	τ-SPAD2
laser	510 H

4.2 Použité programy

SymPho Time 64 - software pro sběr a vyhodnocování dat z časově rozlišené fluorescence
Excel – software pro zpracování a vyhodnocení dat

4.3 Použité chemikálie

Tabulka 2: tabulka použitých chemikálií

Název	Výrobce	CAS
CTAB	Serva	57-09-0
Kyselina hyaluronová	Contipro Biotech s.r.o.	
Mili Q voda	Milipore academic	
Nilská červeň	Sigma Aldrich	7385-67-3
Poly(sodium-4-styrenesulfonát)	Sigma Aldrich	25704-18-1

4.4 Pracovní postupy

4.4.1 Příprava zásobního roztoku CTAB

Tenzid se navážil a kvantitativně spláchl do odměrné baňky 100 ml. Na magnetické míchačce s ohřevem se rozpustil a promíchal. Maximální koncentrace tenzidu byla určena na 0,03 mol/dm^3. Výpočet pro navážku je:

$c = 0{,}03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$V = 0{,}1 \text{ dm}^3$

$M = 365{,}45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$n = c \cdot V$

$n = 0{,}03 \cdot 0{,}1$

$n = 0{,}003 \text{ mol}$

$m = n \cdot M$

$m = 0{,}003 \cdot 364{,}45$

$m = 1{,}093\,35 \text{ g}$

Pro další měření byla použita pouze koncentrace 0,02 mol/dm^3. Tato hodnota se nachází nad hodnotou kritické micelární koncentrace.

4.4.2 Příprava polymeru

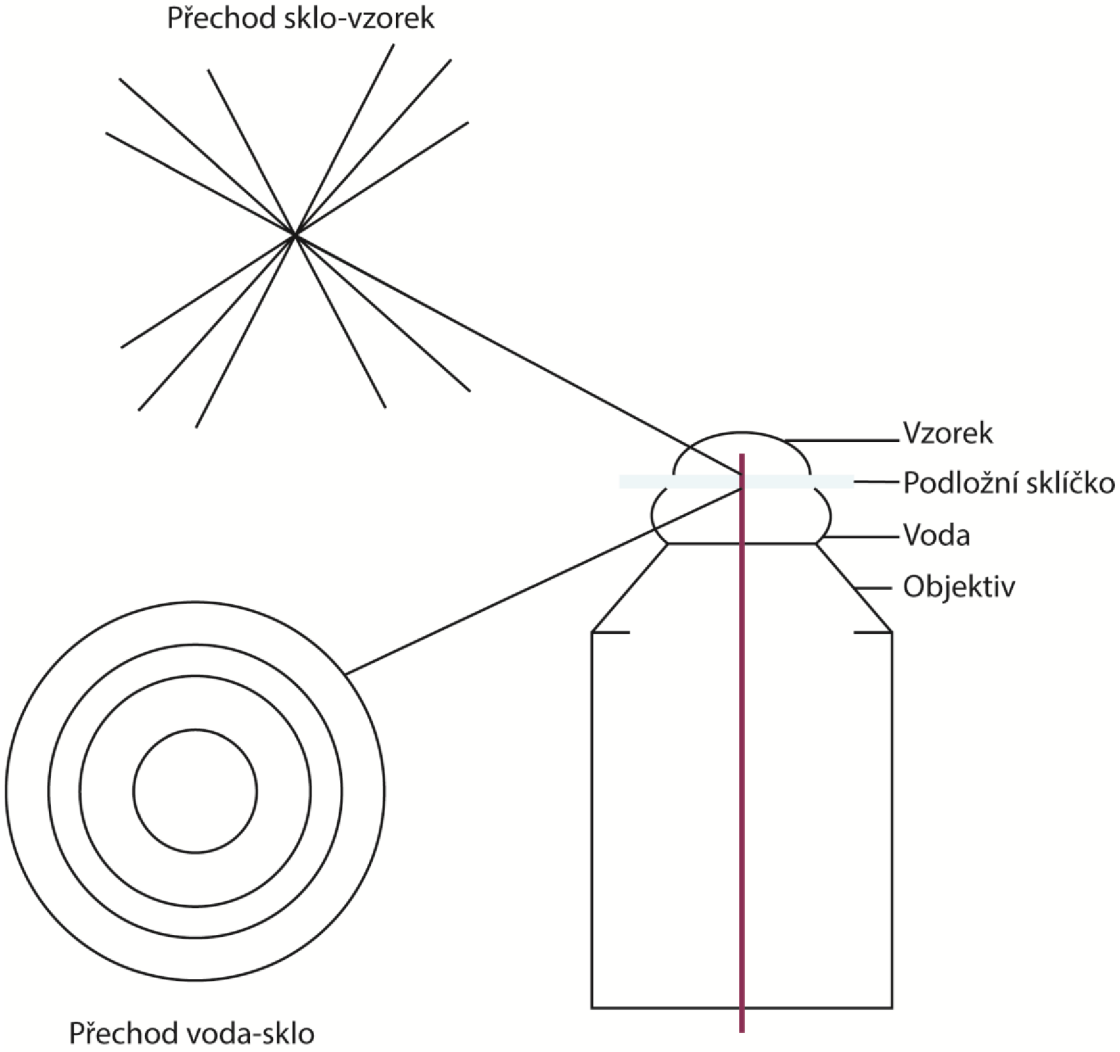
Připravil jsem tři řady kyseliny hyaluronové podle velikosti polymeru (150-300 kDa, 750-1 000 kDa a 1 500-1 750 kDa) a jednu řadu polystyrern-sulfonátu o velikosti 1 MDa. Pro každou velikost jsem připravil zásobní roztok o koncentraci 7,7 g/l. Pro zásobní roztok jsem si zvolil objem na 50 ml. Pro tento objem jsem vypočítal navážku polymeru 0,385 2 g.

4.4.3 Příprava fluoroforu

Fluorofor nilská červeň byl připravený na koncentraci $5 \cdot 10^{-9}$. Nilská červeň byla rozpuštěna v acetonu. Fluorofor se pipetuje do vialek a nechá se odpařit aceton v digestoři. Zásobní roztok se musí uchovávat v lednici, aby nedocházelo k odpařování acetonu ze směsi.

4.4.4 Vlastní měření FCS pomocí konfokálního mikroskopu

Prvním a nejdůležitějším krokem pro správné měření je zvolení správné vlnové délky excitujícího světelného zdroje. Dalším krokem je správné zvolení excitačních a emisních filtrů. Excitační filtry v kombinaci s nastavením intenzity laseru zajišťuje, že molekuly vzorku nebudou vystaveny extrémní excitační síle, která by mohla působit spíše utlumení fluorescence z důvodu foto-bleachingu. Vhodně zvolíme emisní filtr a dichromatické zrcátko. Pro tento krok musíme znát charakter námi vybraného fluoroforu, jeho excitační a emisní maxima. Zvolíme objektiv vhodný pro měření námi požadovaného vzorku. Pomocí mikro-šroubu zaostříme 30 μm za rozhraní mezi podložním sklíčkem a vzorkem. Toto rozhraní poznáme pomocí tvarů, které zaujímá světlo na hraně tohoto prostředí. První přechod se vykytuje mezi vodou na objektivu a podložním sklíčkem. Světlo na tomto rozhraní zaujímá tvar kruhu a můžeme pozorovat několik soustředných kruhů. Na druhém přechodu světlo zaujímá tvar kříže. Za tímto prostředím měříme fluorescenční signál vzorku. Pro zlepšení kvality měření se snažíme omezit přístup světla na měřený vzorek. Měření je tedy ideální provádět v tmavé místnosti nebo vzorek přikryjeme, tak abychom omezili světlo přicházející na vzorek.



Obrázek 7: Zjednodušené schéma rozhraní prostředí při měření na konfokálním mikroskopu

4.5 Tabulky složení roztoku

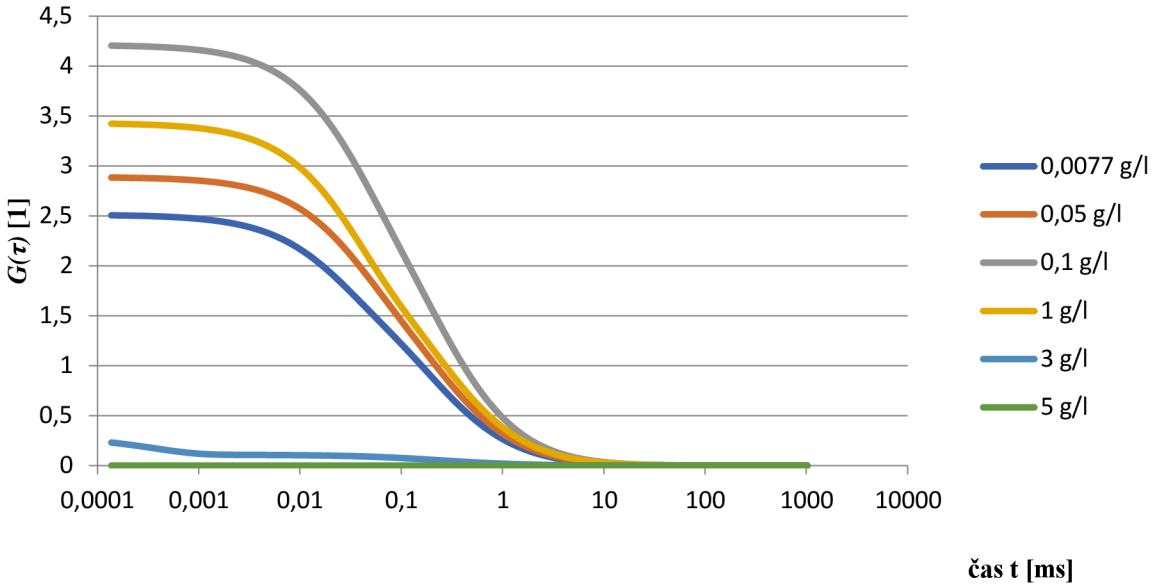
Pro každé měření jsem připravil vialky o celkovém objemu 2 ml.

Tabulka 3: vypočtené objemy jednotlivých látek pro přípravu roztoku o objemu 2 ml

Hyaluronan [g/l]	Hyaluronan [µl]	CTAB [mol/dm^3]	CTAB [µl]	H2O [µl]
5	1298,701	0,02	571,428	129,871
3	779,22	0,02	571,428	649,352
1	259,74	0,02	571,428	1168,832
0,1	25,974	0,02	571,428	1402,598
0,05	12,987	0,02	571,428	1415,585
0,0077	2	0,02	571,428	1426,572

4.6 Vyhodnocení a diskuze

První série měření byla provedena pro kyselinu hyaluronanovou o velikosti od 130-300 kDa. Pomocí autokorelační funkce $G(\tau)$ viz Graf 1 můžeme zjistit, jak se jednotlivé micely chovají v roztoku kyseliny hyaluronové. Můžeme předpokládat, že viskozita roztoku bude hrát velkou roli na pohyb jednotlivých micel skrz efektivní objem vzorku. Mělo by platit, že pokud zvýšíme koncentraci hyaluronanu, snížíme tak rychlost pohybu částic v roztoku a tím i počet částic procházejících skrz efektivní objem. Toto však neodpovídá výsledkům experimentu, kde maximum $G(\tau)$ odpovídá koncentrace 0,1 g/l hyaluronanu. Toto abnormální chování mohlo být způsobeno interakcí CTAB nebo Nilské červení s kyselinou hyaluronovou.

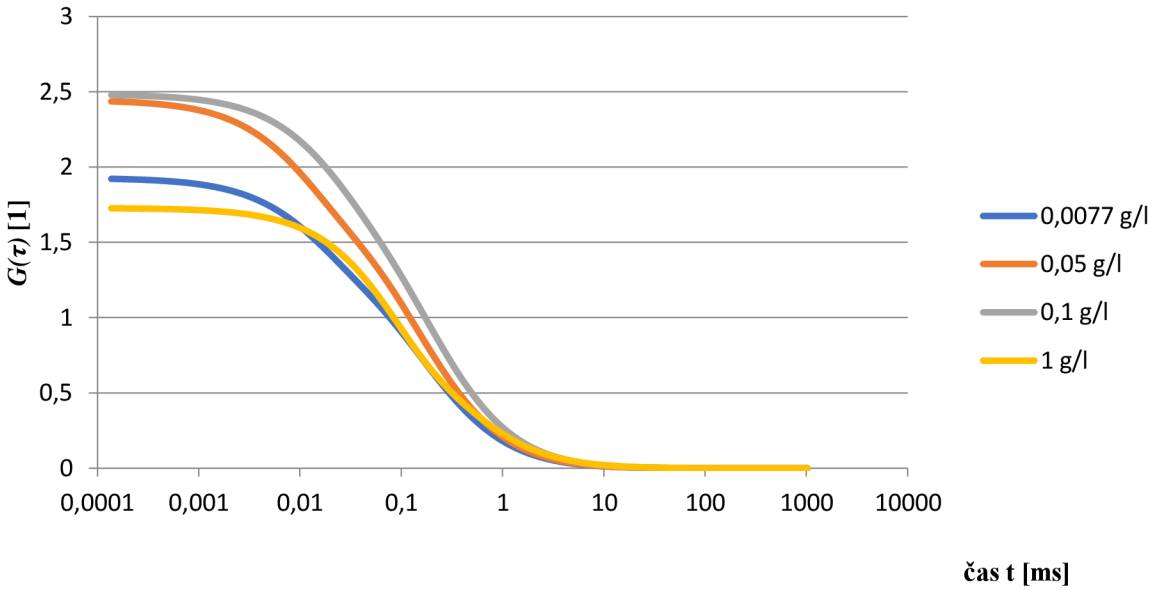


Graf 1: výsledky autokorelační funkce $G(\tau)$ pro velikost 130-300 kDa kyseliny hyaluronové

Pokud by CTAB reagovalo s hyaluronanem tak by to znamenalo, že hyaluronan má vliv na velikost micel, které se při zvyšující koncentrací kyseliny jeví menší, než by měli být. Změnu velikosti micel předpokládáme z důvodu zvýšení hodnot $G(\tau)$ se zvyšující se koncentraci polymeru. Interakce mezi tenzidem a polymerem mohla být způsobena nábojem na hlavičce tenzidu, kde se nachází aminový kation a bromidový anion. Je tedy možné, že částice CTAB reagovali z funkčními skupinami na polymerovém řetězci kyseliny hyaluronové. Toto chování by mohlo vysvětlovat srážení polymeru, ke kterému docházelo ve vzorcích a bylo zdokumentováno viz. Obrázek 8. Tento model by částečně odpovídal měření pro velikosti hyaluronanu 750-1 000 kDa a 1 500-1 750 kDa. Problém představuje fakt, že zvyšující koncentrace hyaluronanu automaticky neodpovídá zvýšení hodnoty $G(\tau)$ a to zejména pro hodnoty koncentrací mezi 0,007 7 g/l a 1 g/l. Ani toto koncentrační rozmezí se nechovalo konstantně napříč velikostmi polymeru kyseliny hyaluronové. Toto chování by také mohlo vypovídat interakci Nilské červeni s hyaluranonem. S největší pravděpodobností se jedná o kombinaci interakcí mezi CTAB, nilskou červení a kyselinou hyaluronovou. Při koncentracích od 0,007 7 g/l do 1 g/l s největší pravděpodobností došlo k částečenému navázání CTAB na polymer a zároveň zabudování fluoroforu do organické části řetězce kyseliny hyaluronové. Pro velikost hyaluronanu od 130-300 kDa platí, že řetězec hyaluronanu není dostatečně velký. Z tohoto důvodu vykazují koncentrace 3 g/l a 5 g/l malou fluorescenční aktivitu. Hyaluronan na sebe váže částice CTAB a tím zmenšuje koncentraci tenzidu v roztoku. Toto snížení se může projevit vytvořením micel o menším poloměru. Tento trend přetrvává až do koncentrace 0,1 g/l. Při koncentraci 1 g/l hodnota autokorelační funkce

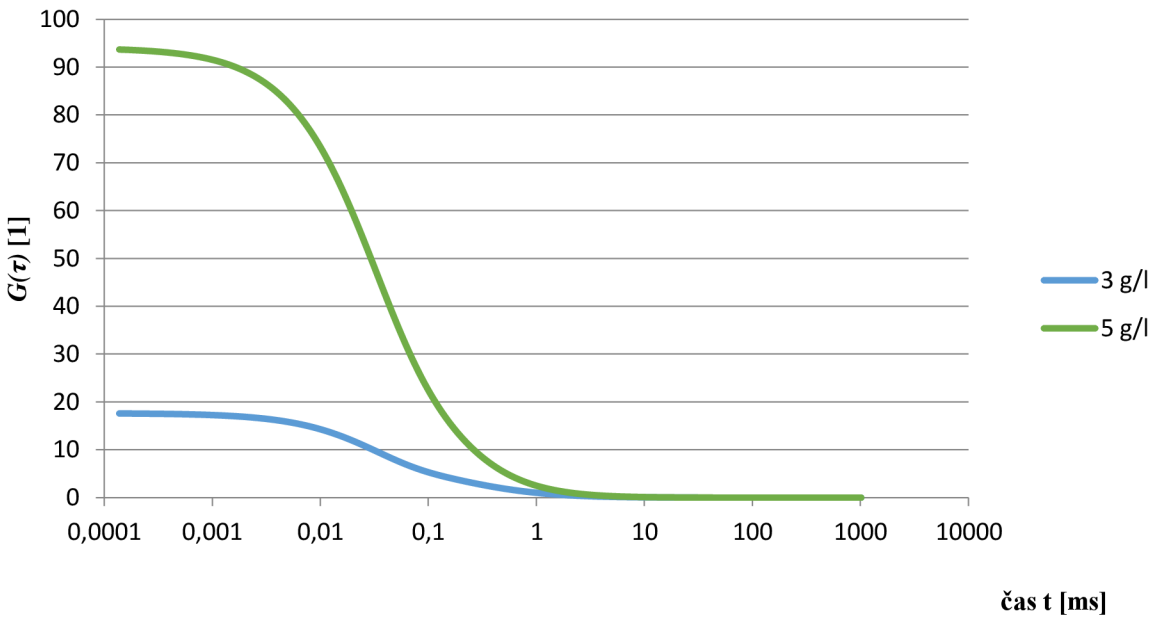
začíná klesat. Tento pokles byl pravděpodobně zapříčiněn snížením počtu micel. Pro vyšší koncentrace jsou hodnoty fluorescence značně omezené.

Při velikost polymeru 750-1 000 kDa a výše hraje při fluorescenčním měřením řetězec kyseliny značnou roli. Jeho velikost se stává dostatečnou pro fluorofor, který je pravděpodobně schopen fungovat v oblastech organické části polymerního řetězce. Pohyb micel CTAB je ve vzorcích od 0,007 7 g/l do 1 g/l ovlivněn řetězcem hyaluronanu. Znovu dochází k reakci polymeru a tenzidu. Oproti předchozí velikosti polymerního řetězce je pokles při koncentraci 1 g/l znatelnější. Tento pokles by mohl být způsoben malou koncentrací molekul CTAB, které nejsou navázány na řetězec hyaluronanu a tedy schopny tvořit micely.



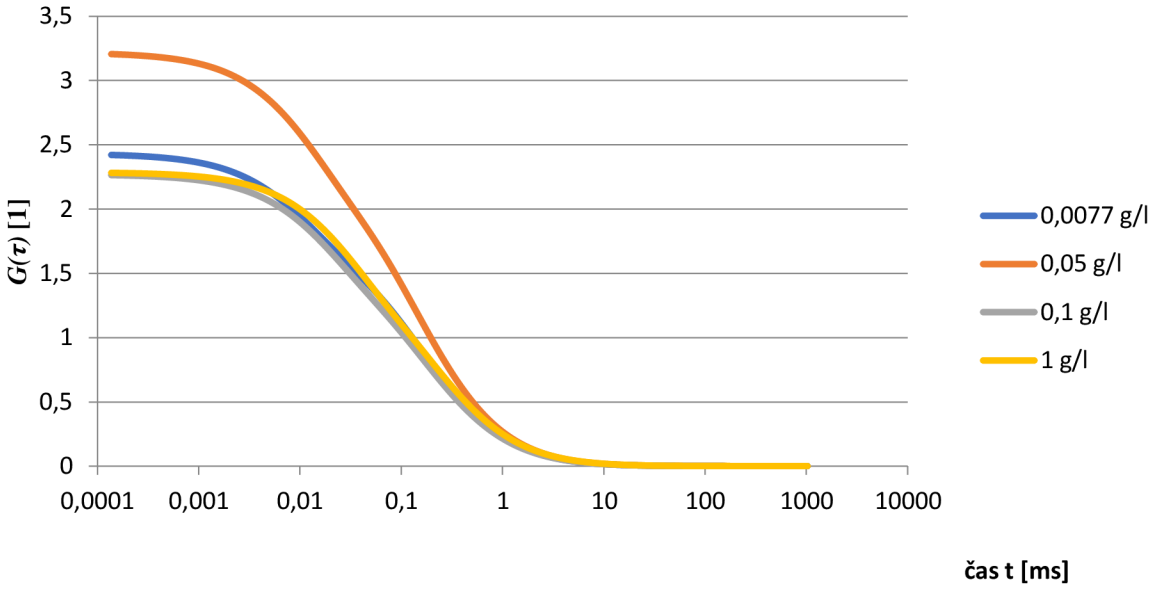
Graf 2: výsledky autokorelační funkce $G(_\tau)$ pro velikost 750-1 000 kDa kyseliny hyaluronové

K velké změně však dochází pro koncentrace hyaluronanu od 3 do 5 g/l. Zde dochází k výraznému navýšení hodnot autokorelační funkce. Toto skokové navýšení pohybu molekul je v rozporu s trendem, který jsme mohli pozorovat v předchozím měření hyaluronanu při velikosti 130-300 kDa, tak i s trendem, který vykazovalo měření ve stejné velikosti polymeru. Je však možné, že kyselina hyaluronová zaujmula ve vodném prostředí tvar klubka, kde organické části hyaluronanového řetězce se navzájem přitahují a funkční polární skupiny jsou orientovány směrem do prostředí vody. Toto uspořádání by umožňovalo fluoroforu dostat se do prostředí funkčně připomínající micelu. Tyto prostorová uskupení polymeru jsou však pravděpodobně značně objemná, což by znamenalo, že dochází k několikanásobné excitaci a de-excitaci na stejné skupině molekul fluoroforu. Toto uspořádání by mohlo odpovídat výraznému navýšení hodnot $G(_\tau)$. Hodnoty z těchto řad jsou tedy pravděpodobně chybné. Můžou nám však poukázat na nastavení intenzity laserového signálu, které bylo nastaveno natolik šetrně, že nezpůsobovalo foto-bleaching na molekulách fluoroforu.



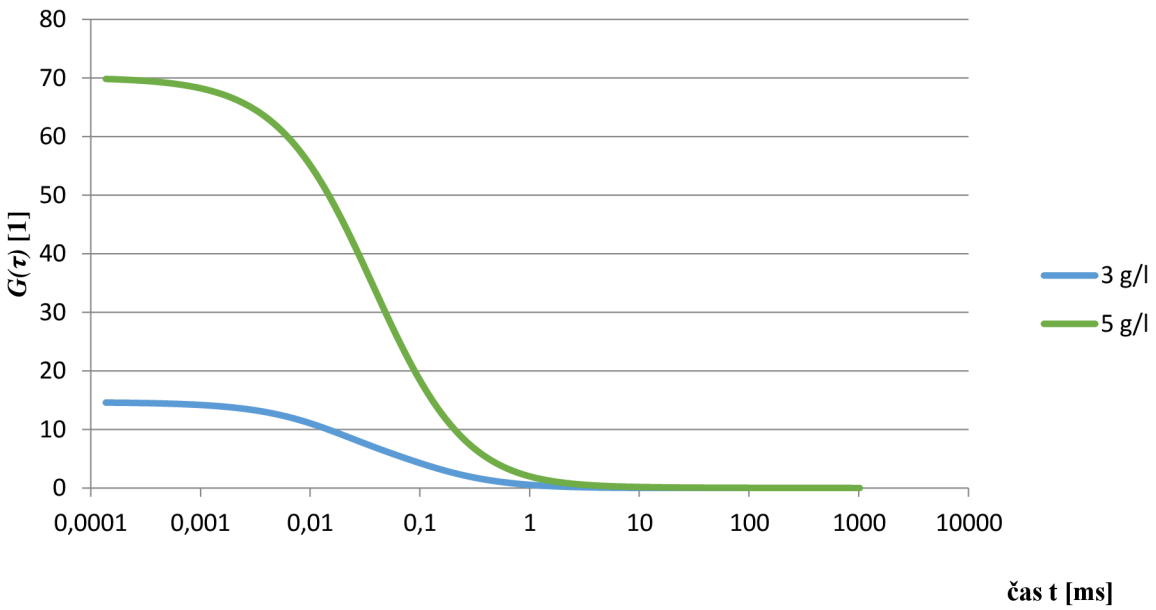
Graf 3: výsledky autokorelační funkce $G(\tau)$ pro velikost 750-1 000 kDa kyseliny hyaluronové

Hyaluronan o velikosti řetězce 1 500-1 750 kDa se do značné míry podobá předchozí velikostní řadě. K poklesu hodnot $G(\tau)$ dochází už při koncentraci 0,1 g/l, která se chová v tomto měření téměř identicky jako koncentrace 1 g/l. Delší řetězec bude mít vliv na schopnost navázání CTAB. Jednodušší navázání tenzidu na polymer je pravděpodobně způsobeno rychlejším seskupením polymeru do klubka ve vodném prostředí.



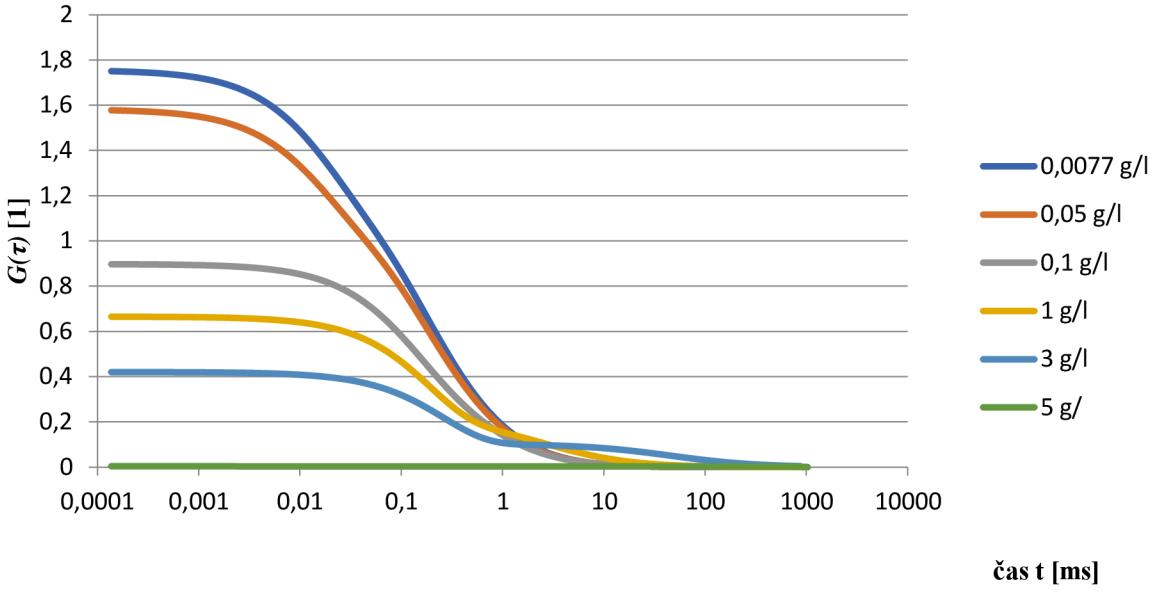
Graf 4: výsledky autokorelační funkce $G(\tau)$ pro velikost 1 500-1 750 kDa kyseliny hyaluronové

Koncentrace hyaluronanu nad 3 g/l se chová identicky s předchozí velikostí polymeru. Hodnoty autokorelační funkce jsou sice mírně snížené oproti měření 750-1 000 kDa, což mohlo být způsobeno rozlišným nastavením přístroje pro toto měření. Pokles hodnot by mohl být projevem větší intenzity laserového signálu přicházející do efektivního objemu a způsobovat inhibici fluorescenčního signálu skrz foto-bleaching molekul fluoroforu.



Graf 5: výsledky autokorelační funkce $G(\tau)$ pro velikost 1 500-1 750 kDa kyseliny hyaluronové

Při porovnání s Poly(sodium-4-styrensulfonátem) můžeme pozorovat, že při měření stejné koncentrační řady se CTAB a Nilská červeň chová dle předpokládané teorie. Autokorelační funkce nabývá nejvyšších hodnot při koncentraci 0,007 7 g/l a nejmenší hodnotu při 5 g/l. Toto měření nám poskytuje představu, jak se micely CTAB pohybují v roztoku polymeru, bez interakcí mezi těmito dvěma složkami.



Graf 6: výsledky autokorelační funkce $G(\tau)$ pro velikost 1MDa Poly(sodium-4-styrensulfonát)

Pro porovnání aspektů odpovědných za hodnoty autokorelační funkce $G(\tau)$ jsem vytvořil tabulku hodnot, která nám může pomoci porozumět jak se roztok polymer-tenzid chová v jednotlivých měřeních.

Tabulka 4: hodnoty difuzního koeficientu, koncentrace v efektivním objemu, počet částic a souřadnice efektivního objemu

koncentrace [g/l]	**difuzní koef. [μm²/s]**	**koncentrace V_{eff} [fl]**	**počet částic []**	**Ω-x, y [μm]**	**z_0-z [μm]**
130-300 kDa	difuzní koef.	koncentrace V_{eff}	počet částic	**Ω**-x, y	z_0-z
0,0077	149 ±5,8	0,874 ±0,031	0,526 ±0,018	0,33	1,65
0,05	142,1 ±7,3	0,756 ±0,035	0,456 ±0,021	0,33	1,65
0,1	140,1 ±7,4	0,511 ±0,025	0,308 ±0,015	0,33	1,65
1	122 ±14	0,730 ±0,098	0,440 ±0,059	0,33	1,65
3	89 ±2,6	0,700 ±0,022	9,2±0,09	0,33	1,65
5	241 ±136	0,45 ±0,29	0,27 ±0,17	0,33	1,65
750-1000 kDa	difuzní koef.	koncentrace V_{eff}	počet částic	**Ω**-x, y	z_0-z
0,0077	174,2 ±3,3	1,103 ±0,012	0,664 ±0,0074	0,33	1,65
0,05	190 ±2	0,8819 ±0,0038	0,5311 ±0,0038	0,33	1,65
0,1	156,4 ±4,3	0,817 ±0,018	0,492 ±0,011	0,33	1,65
1	85 ±11	1,66 ±0,17	1 ±0,1	0,33	1,65
3	169 ±27	0,201 ±0,018	0,121 ±0,011	0,33	1,65
5	497 ±50	0,0261 ±0,0024	0,0157 ±0,0015	0,33	1,65
1500-1750 kDa	difuzní koef.	koncentrace V_{eff}	počet částic	**Ω**-x, y	z_0-z
0,0077	172,5 ±2,6	0,9004 ±0,0091	0,5422 ±0,0055	0,33	1,65
0,05	193,3 ±3,4	0,6766 ±0,0088	0,4074 ±0,0053	0,33	1,65
0,1	165,3 ±6,3	0,982 ±0,034	0,591 ±0,021	0,33	1,65
1	138,1 ±9,9	0,997 ±0,055	0,600 ±0,033	0,33	1,65
3	389,0 ±6,1	0,1555 ±0,0022	0,0937 ±0,0013	0,33	1,65
5	724 ±12	neměřilo	neměřilo	0,33	1,65
srovnání					
1 MDa	difuzní koef.	koncentrace V_{eff}	počet částic	**Ω**-x, y	z_0-z
0,0077	155 ±6,4	1,21 ±0,033	0,73 ±0,02	0,33	1,65
0,05	148,6 ±1,7	1,3429 ±0,0099	0,809 ±0,006	0,33	1,65
0,1	94,2 ±3,8	2,465 ±0,092	1,484 ±0,056	0,33	1,65
1	10,4 ±1,5	7,81 ±0,67	4,7 ±0,4	0,33	1,65
3	0,593 ±0,072	16,27 ±0,47	9,80 ±0,28	0,33	1,65
5	0,026 ±0,011	495 ±63	298 ±38	0,33	1,65

5 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na pozorování stability a interakce koloidních systémů tvořených micelami povrchově aktivního CTAB v roztoku kyseliny hyaluronové a vody pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie. Jako Fluorescenční sonda byla použita Nilská červeň. Metoda vybraná pro zjištění interakcí mezi tenzidem a polymerem byla fluorescenční korelační spektroskopie. Tato metoda je vhodná pro sledování pohybu, koncentrace a velikosti částic.

Koncentrace CTAB byla zvolena bezpečně nad kritickou micelární koncentrací, která zajišťuje vytvoření micel, které jsou nutné pro poskytnutí prostředí, ve kterém je fluorofor Nilská červeň schopna foto-luminiscene.

Nilská červeň byla zvolena z důvodu intenzivní fluorescenčního signálu, který je schopna poskytovat v organickém prostředí. Toto barvivo je zhášeno vodou, proto je vhodné pro měření micel ve vodném prostředí.

Hlavním polymerem pro experiment byla kyselina hyaluronaová. Byly vybrány tři velikosti polymerního řetězce, u kterých byla pozorován vliv koncentrace hyaluronanu na molekuly CTAB a jejich schopnost tvořit micely. Pro porovnání byl vybrán polymer Poly(sodium-4-styrensulfonát).

Při měření bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová má značný vliv na formování micel z molekul CTAB. Molekuly tenzidu interagují s hyaluronanem. Tato interakce ovlivňuje koncentraci molekul CTAB, které jsou schopny tvořit micely. Tenzid se navazuje na řetězec a tím klesá koncentrace volných částic až pod kritickou micelární koncentraci. Se zvětšující se koncentrací hyaluronanu klesá velikost těchto částic. Pokles velikosti má vliv na schopnost pohybu micel prostou difuzí. Difuze je jedním z parametrů ovlivňující hodnoty autokorelační funkce.

Dalším důležitým faktrorem v interakci polymer-tenzid byla velikost řetězců hyaluronanu. Se zvětšující se velikostí polymerního řetězce klesala koncentrace haluronanu, při které byla naměřena nejvyšší hodnoty autokorelační funkce. Toto chování bylo pravděpodobně způsobeno interakcí mezi nepolárními částmi řetězce hyaluronanu, pro které bylo energeticky výhodnější vytvořit struktury ve kterých se tyto části navzájem přitahovaly. Molekuly CTAB měli tedy jednoduší přístup k polárním funkčním skupinám na řetězci hyaluronanu a snáze se na tento řetězec mohli navázat.

Při porovnání s polymerem Poly(sodium-4-styrensulfonát) můžeme pozorovat, jaký vliv má koncentrace polymeru na difuzní koeficient micel CTAB, které s tímto polymerem nereagují. Při zvyšování koncentrace polymeru dochází k vytváření viskóznějších roztoků, kterými se micely pohybují pomaleji.

Cíle bakalářské práce byly splněny. Při měření systému kyselina hyaluronová a CTAB došlo k zajímavým interakcím, které poskytují zajímavý pohled na vzájemné chování dvou látek, které jsou velice zajímavé z hlediska medicíny a schopnosti aplikace léčiv. Metoda fluorescenční korelační spektroskopie se projevila jako vhodná metoda pro zkoumání těchto systémů a jejich interakcí mezi sebou. Pro další práci by mohlo být zajímavé například přesné měření velikosti micel CTAB v závislosti na koncentraci hyaluronanu. Určení těchto parametrů by mohlo být zajímavé z hlediska stability těchto systémů a schopnosti efektivně doručit léčiva do místa potřeby v nejkratším možném čase.

6 POUŽITÁ LITERATURA

6.1 Teoretická část

[1] PASTORIZA-SANTOS, Isabel, Jorge PÉREZ-JUSTE a Luis M. LIZ-MARZÁN. Silica-Coating and Hydrophobation of CTAB-Stabilized Gold Nanorods. Chemistry of Materials. 2006, **18**(10), 2465-2467. DOI: 10.1021/cm060293g. ISSN 0897-4756. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm060293g

[2] ITO, E., K. W. YIP, D. KATZ, et al. Potential Use of Cetrimonium Bromide as an Apoptosis-Promoting Anticancer Agent for Head and Neck Cancer. Molecular Pharmacology [online]. 2009, **76**(5), 969-983 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1124/mol.109.055277. ISSN 0026-895x. Dostupné z: http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.109.055277

[3] LEVINE, Ira N. Physical Chemistry. 5th Ed. Boston: McGraw-Hill, 2002, 986 s. ISBN 00-723-1808-2.

[4] KRONBERG, Bengt, Krister HOLMBERG a Björn LINDMAN. Surface chemistry of surfactants and polymers. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-119-96124-6.

[5] SLOMKOWSKI, Stanislaw, José V. ALEMÁN, Robert G. GILBERT, et al. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). Pure and Applied Chemistry. 2011, **83**(12), -. DOI: 10.1351/PAC-REC-10-06-03. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: http://www.degruyter.com/view/j/pac.2011.83.issue-12/pac-rec-10-06-03/pac-rec-10-06-03.xml

[6] GARAVITO, R. M. a S. FERGUSON-MILLER. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. Journal of Biological Chemistry. 2001, **276**(35), 32403-32406. DOI: 10.1074/jbc.R100031200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R100031200

[7] YOON, KYUNG AE a DIANE J. BURGESS. Effect of Cationic Surfactant on Transport of Model Drugs in Emulsion Systems. The Journal of pharmacy and pharmacology. 1997, **49**(5), 478-484. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06827.x. ISBN 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06827.x. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06827.x

[8]Meyer, K. and Palmer, J.W. (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. Journal of Biological Chemistry, 107, 629-634

[9] GARG, Hari G. a Charles A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan. Boston: Elsevier, c2004. ISBN 0 08 044382 6.

[10] Vybrané kapitoly z biochemie potravin. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, s. 171-175. ISBN 978-80-7305-677-3.

[11] PRESTWICH, Glenn D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. Journal of Controlled Release. 2011, **155**(2), 193-

199. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.007. ISSN 01683659. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911002227

[12] WALLA, Peter Jomo. Modern biophysical chemistry: detection and analysis of biomolecules. 2nd, updated and expanded ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2014. ISBN 978-3-527-33773-6.

[13] VALEUR, Bernard a Mário N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. Journal of Chemical Education [online]. 2011, **88**(6), 731-738 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1021/ed100182h. ISSN 00219584. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed100182h

[14] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.

[15] Schwille, P., and E. Haustein. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy: an introduction to its concepts and applications, p. 1–33. In E. L. Elson and R. Rigler (ed.), Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applica- tions. Springer, Berlin, Germany

[16] TIAN, Yu, Michelle M. MARTINEZ a Dimitri PAPPAS. Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review of Biochemical and Microfluidic Applications. Applied Spectroscopy. 2011, **65**(4), 115-124. DOI: 10.1366/10-06224. ISSN 00037028. Dostupné také z: http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/10-06224

[17] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf

[18] FOWLER, S D a P GREENSPAN. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. Journal of Histochemistry. 1985, **33**(8), 833-836. DOI: 10.1177/33.8.4020099. ISSN 0022-1554. Dostupné také z: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/33.8.4020099

[19] GREENSPAN, P a S D FOWLER. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. JOURNAL OF LIPID RESEARCH. 1985, **7**(26), 781-789.

[20] Excitační a emistní spektra pro nilskou červeň. In: Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2017-05-18]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N1142

[21] RÝCOVÁ, E. Fluorescenční korelační spektroskopie v hydrofilních koloidech.Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová, Ph.D..

6.2 Rešerše

[1] SARKAR, Pabak, Kaitlin A. DAVIS, Henry L. PUHL, Jithesh V. VEETIL, Tuan A. NGUYEN a Steven S. VOGEL. Deciphering CaMKII Multimerization Using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Homo-FRET Analysis. *Biophysical Journal*. 2017, **112**(6), 1270-1281. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.02.005. ISSN 00063495. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349517301613

[2] STAAF, Elina, Sunitha BAGAWATH-SINGH a Sofia JOHANSSON. Molecular Diffusion in Plasma Membranes of Primary Lymphocytes Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, (120), -. DOI: 10.3791/54756. ISSN 1940-087x. Dostupné také z: http://www.jove.com/video/54756/molecular-diffusion-plasma-membranes-primary-lymphocytes-measured

[3] JARZEBSKI, Maciej, Yingze ZHANG, Tomasz SLIWA, et al. Core–shell fluorinated methacrylate nanoparticles with Rhodamine-B for confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy applications. *Journal of Fluorine Chemistry*. 2016, **183**, 92-99. DOI: 10.1016/j.jfluchem.2016.01.014. ISSN 00221139. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113916300148

[4] MAFFRE, Pauline, Stefan BRANDHOLT, Karin NIENHAUS, Li SHANG, Wolfgang J PARAK a G Ulrich NIENHAUS. Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles – a fluorescence correlation spectroscopy study. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2014, **5**, 2036-2047. DOI: 10.3762/bjnano.5.212. ISSN 2190-4286. Dostupné také z: http://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/5/1/212

[5] GHOSH, Shirsendu, Shyamtanu CHATTORAJ, Rajdeep CHOWDHURY a Kankan BHATTACHARYYA. Structure and dynamics of lysozyme in DMSO–water binary mixture: fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Advances*. 2014, **4**(28), 14378-. DOI: 10.1039/c4ra00719k. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c4ra00719k

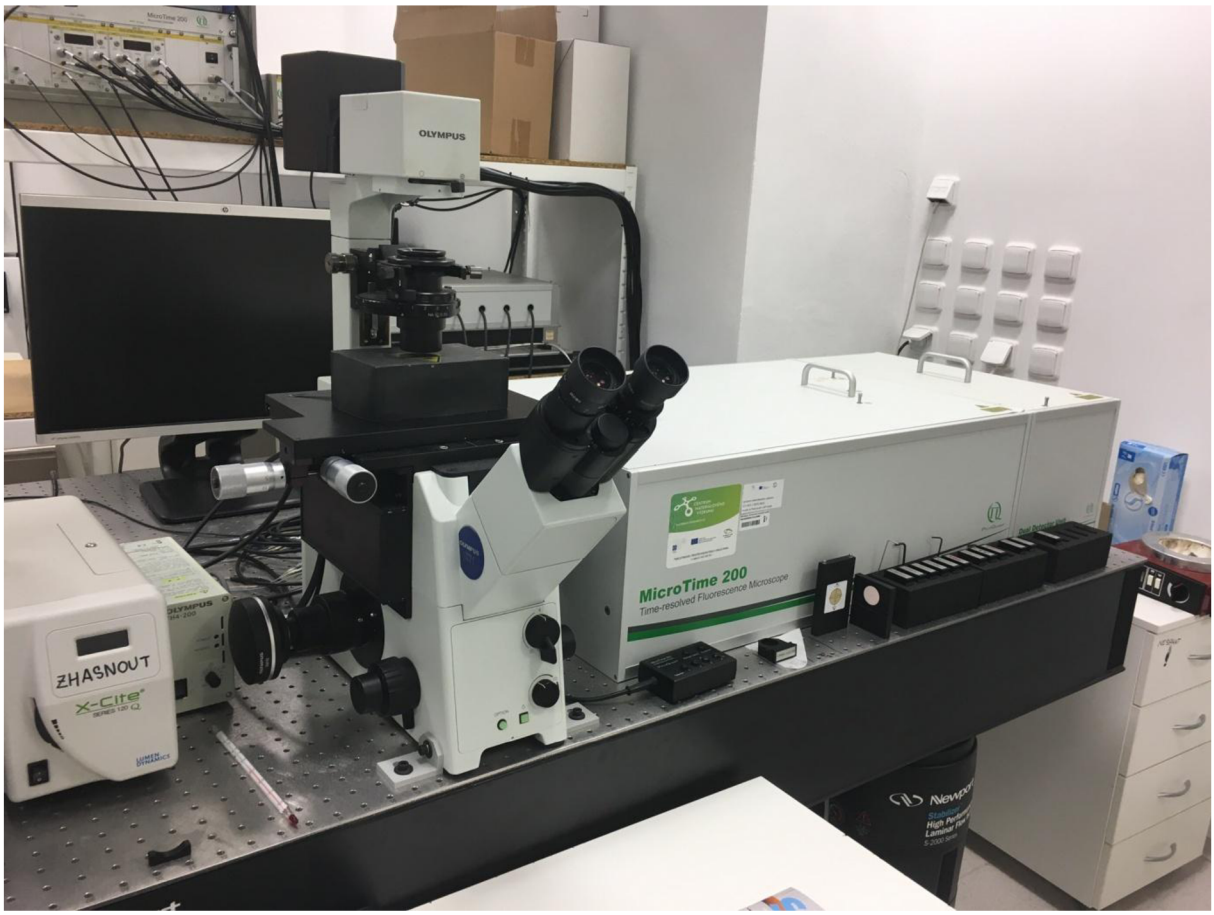
7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

CTAB-Cetyltrimethylamonium bromid
FCS-fluorescenční korelační spektroskopie
PN-particle number (počet částic)
CMC-kritická micelární koncentrace

$G(\tau)$-autokorealční funkce
D-difuzní koeficient
$W(r)$-prostorové rozložení emitovaného světla
V_{eff}-efektivní (konfokální) objem
$F(t)$-intenzita fluorescenčního signálu
C-koncentrace částic v efektivním objemu
η-počet fotonů detekovaný z jedné částice za jednu sekundu
η_{eff}-nízkomolekulární svítivost
τ_D-difuzní čas
$\tau_{triplet}$- relaxační čas tripletního stavu
T-počet částic nacházejících se v tripletním stavu
$X_{triplet}(\tau)$- přidaná ramena v měřených křivkách v krátkém časovém rozmezí

8 PŘÍLOHY

Obrázek 8: vialky s kyselinou hyaluronovou o velikosti 130-300 kDa



Obrázek 9: Přístroj MicroTime 200 pro měření FCS