



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

**STUDIUM UV SVĚTLEM GENEROVANÝCH
FLUORESCENČNÍCH KOMPLEXŮ ZINKU POMOCÍ
FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE**

STUDY OF UV-GENERATED FLUORESCENT ZINC COMPLEXES BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Havlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1268/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Martina Havlíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Studium UV světlem generovaných fluorescenčních komplexů zinku pomocí fluorescenční spektroskopie

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše na problematiku formování fluorescenčních komplexů z roztoků kovů a sirných sloučenin.
- 2) Navrhnout na základě rešerše vhodné redukční činidla na bázi síry pro generování fluorescenčních komplexů UV světlem.
- 3) Připravit fluorescenční komplexy z dostupných prekurzorů a charakterizovat spektrální a temporální vlastnosti takovýchto komplexů.
- 4) Zhodnotit vliv stabilizujících sirných sloučenin na doby života a spektrální vlastnosti výsledného komplexu.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Martina Havlíková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem UV světlem generovaných fluorescenčních komplexů zinku s kadmíem a organickými molekulami SAM, SAH, CYS, HCYS a GSSG, konkrétně při vlnové délce 375 nm. Dále je cílem práce prekurzory spektrálně a temporálně charakterizovat před a po ozáření v transiluminátoru při vlnové délce 250 nm. Studium geneze fluorescenčních komplexů bylo provedeno pomocí metody FLIM. Díky této metodě bylo zjištěno, že ke tvorbě zmiňovaných komplexů dochází jen u prekurzorů Zn:SAH, Zn:GSSG a Zn:Cd, a že na tuto tvorbu má značný vliv způsob přípravy. Spektrální charakteristika byla provedena na fluorimetru, kde byl očekáván nárůst intenzity fluorescence u ozářeného roztoku s prekurzory. Jednalo se o zakalené roztoky, kde byla pozorována sedimentace částic, se kterou docházelo ke změně intenzity fluorescence. U vzorku Zn:SAM a Zn:CYS docházelo se sedimentací ke zvýšení intenzity, naopak u Zn:SAH a Zn:HCYS docházelo k jejímu snížení. Roztok s prekurzory Zn:Cd byl čirý, a tak nedocházelo k žádné změně intenzit. Zn:Cd vykazoval nejlepší spektrální vlastnosti, naopak nejhůře se jevil vzorek se Zn:SAM, jehož excitační a emisní maxima se nacházejí velmi blízko sebe. Vzorek s prekurzory Zn:CYS a Zn:HCYS vykazoval téměř stejné výsledky spekter a příslušných maxim. Na základě charakteristiky dle dob života metodou TCSPC se nejlépe choval vzorek se Zn:CYS, Zn:HCYS a Zn:GSSG, které vykazovaly 3 doby života. U vzorku se SAM a SAH nebylo možné jednoznačně určit doby života. Zn:Cd vykazoval 4 doby života.

Klíčová slova: Kvantové tečky, UV záření, fluorescenční komplexy, FLIM, TCSPC, doby života.

ABSTRACT

This thesis focuses on the study of UV light-generated zinc complexes with cadmium and organic molecules SAM, SAH, CYS, HCYS and GSSG, specifically at 375 nm. Furthermore, the aim of the work is to characterize the precursors spectrally and temporally before and after irradiation in the transilluminator at 250 nm. Study of genesis these complexes was performed by FLIM. Thanks to this method, it was found that the formation of complexes occurs only with Zn:SAH, Zn:GSSG and Zn:Cd. The formation of complexes is influenced by the method of preparation. The spectral characteristic was performed on a fluorimeter where the increase in fluorescence intensity of the irradiated solution with the precursors was expected. These were turbid solutions where sedimentation of the particles was observed and the intensity of fluorescence was changed. In the Zn:SAM and Zn:CYS sample, the sedimentation increased in intensity, while in Zn:SAH and Zn:HCYS decreased. The Zn:Cd precursor solution was clear and there was no change in intensity. Zn:Cd showed the best spectral properties, while the Zn:SAM sample, whose excitation and emission maxima are very close to each other, appeared to be the worst. A sample with Zn:CYS and Zn:HCYS showed almost the same spectra and respective peak results. Based on lifetime characteristics by TCSPC, the sample with Zn:CYS, Zn:HCYS and Zn:GSSG, which showed 3 lifetimes, was best treated. Lifetime could not be unambiguously determined for SAM and SAH samples. Zn:Cd had 4 lifetimes

Key words: Quantum dots, UV radiation, fluorescence complexes, FLIM, TCSPC, lifetimes.

HAVLÍKOVÁ, Martina. *Studium UV světlem generovaných fluorescenčních komplexů zinku pomocí fluorescenční spektroskopie* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113577>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, za jeho čas a pomoc při měření a analýze dat. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lukáši Nejdlovi, Ph.D. za jeho ochotu a čas věnovaný přípravě potřebných vzorků, konzultacím a za jeho cenné rady. V neposlední řadě moc děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu.

OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 7 |
| 2 | Teoretická část | 8 |
| 2.1 | Kvantové tečky | 8 |
| 2.1.1 | Příprava kvantových teček | 9 |
| 2.1.2 | Vlastnosti a aplikace kvantových teček | 11 |
| 2.1.3 | Zvýšení biokompatibility | 12 |
| 2.2 | Fluorescence | 15 |
| 2.2.1 | Perrin-Jabłońskiho diagram | 15 |
| 2.2.2 | Fluorescenční spektra..... | 17 |
| 2.2.3 | Doba života | 18 |
| 2.3 | Fluorescenční spektroskopie | 19 |
| 2.3.1 | Time-correlated single-photon counting (TCSPC)..... | 20 |
| 2.4 | Fluorescenční konfokální mikroskopie..... | 22 |
| 2.4.1 | Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) | 24 |
| 3 | Současný stav řešené problematiky | 26 |
| 3.1 | Formování kvantových teček z roztoku kovů a siriých sloučenin | 26 |
| 3.2 | Interakce kvantových teček s organickými molekulami..... | 30 |
| 4 | Experimentální část | 31 |
| 4.1 | Použité chemikálie | 31 |
| 4.2 | Použité přístroje | 31 |
| 4.3 | Shrnutí cílů práce | 31 |
| 4.4 | Pracovní postupy..... | 32 |
| 4.4.1 | Příprava roztoku prekurzorů | 32 |
| 4.5 | Měření a vyhodnocení dat FLIM | 32 |
| 4.5.1 | Příprava vzorku na měření | 33 |
| 4.6 | Měření fluorescenčních spekter pomocí fluorimetru | 33 |
| 4.7 | Měření dob života pomocí TCSPC spektrofluorometru | 34 |
| 4.8 | Vyhodnocená doby života..... | 34 |
| 5 | Výsledky a diskuze | 36 |
| 5.1 | Tvorba fluorescenčních komplexů – metoda FLIM | 36 |
| 5.2 | Měření excitačních a emisních spekter | 51 |
| 5.2.1 | Vliv zakalených roztoků na spektrální charakteristiku | 51 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2.2 | Kompletní spektrální charakteristika | 55 |
| 5.3 | Měření dob života | 63 |
| 6 | Závěr..... | 73 |
| 7 | Použitá literatura..... | 76 |
| 8 | Seznam zkratk a symbolů | 81 |
| 8.1 | Seznam použitých zkratk | 81 |
| 8.2 | Seznam použitých symbolů | 82 |
| 9 | Přílohy | 83 |
| 9.1 | Tvorba fluorescenčních komplexů – metoda FLIM | 83 |
| 9.2 | Měření dob života | 90 |

1 ÚVOD

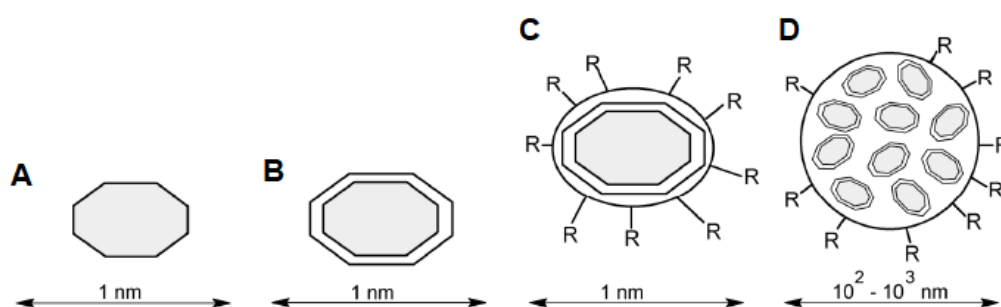
Kvantové tečky získávají stále větší zájem v oblasti využití v medicíně a biologii, kde by mohly být eventuální náhradou za klasické organické fluorofory. Kvantové tečky vykazují velmi jasnou fluorescenci, jsou fotostabilní, mají úzké emisní a excitační spektra a mají i vysoké kvantové výtěžky. Velkou výhodou těchto nanočástic je to, že všechny tyto zmiňované vlastnosti lze měnit změnou jejich chemického složení, ale také změnou jejich velikosti a tvaru. Na rozdíl od organických fluoroforů, jejichž fyzikální vlastnosti lze měnit jen změnou chemického složení. Díky všem těmto vlastnostem jsou kvantové tečky ideální volbou pro fluorescenční značení některých biomolekul. Při těchto aplikacích je ale důležitá otázka cytotoxicity. Kvantové tečky jsou anorganické polovodičové nanokrystaly, které nejčastěji zaujímají strukturu tzv. core/shell. Velmi používané jsou QDs složené z CdTe/CdS, CdSe/ZnS apod. Přítomnost kadmia velmi zlepšuje fyzikální vlastnosti těchto materiálů, a tím získávají větší aplikační potenciál. Ten je bohužel ve většině případů zase vyvrácen právě možnou cytotoxicitou iontů kadmia. Tento problém lze řešit funkcionalizací povrchu QDs některými organickými molekulami, které se běžně v organismu vyskytují, jako je např. cystein, homocystein, S-adenosylmethionin apod. Nebo tyto látky obsahující thiolovou skupinu použít jako stabilizační činidlo. Další problém je s přípravou těchto částic. Většinou je k jejich syntéze nutná přítomnost organických rozpouštědel, sírných stabilizačních látek a také velmi vysoké teploty. Tyto syntézy jsou energeticky náročné a zatěžují životní prostředí. Proto je diskutován nový způsob přípravy, a to tvorba těchto částic za použití UV záření, které v interakci s thiolovými skupinami stabilizačních látek a přítomnými polovodiči, zapříčiní genezi těchto fluoreskujících látek.

Cílem této práce je právě příprava fluorescenčních komplexů z prekurzorů, které byly vybrány na základě literární rešerše. Ke genezi těchto komplexů byly vybrány organické molekuly S-adenosylmethionin, S-adenosylhomocystein, cystein, homocystein a glutathion disulfid, které ve své struktuře obsahují síru, která vykazuje vysokou afinitu ke kovům, jako je např. zinek, a které figurují jako stabilizující sírné sloučeniny. Tyto látky byly právě kombinovány se zinkem a byl pozorován vliv UV záření na tvorbu fluorescenčních komplexů. K porovnání k těmto systémům byl vybrán zinek a kadmium, které byly stabilizovány použitím kyseliny merkaptotantarové, u kterých bylo potvrzeno, že vytvořené fluorescenční komplexy velikostně odpovídají kvantovým tečkám. V této práci byla sledována nejen samotná geneze fluorescenčních komplexů pomocí UV záření na fluorescenčním konfokálním mikroskopu metodou FLIM, ale vzniklé fluorescenční komplexy byly spektrálně charakterizovány pomocí excitačních a emisních spekter na fluorimetru a také charakterizovány pomocí doby života metodou TCSPC na spektrofluorometru. Na závěr této práce byl zhodnocen vliv stabilizujících sírných sloučenin na jejich zmiňované spektrální vlastnosti a doby života. Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s Mendelovou univerzitou v Brně, Ústavem chemie a biochemie, kde se touto problematikou zabývají.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvantové tečky

Kvantové tečky (QDs z anglického Quantum Dots) jsou anorganické polovodičové nanokrystaly o velikosti řádově několika nanometrů, typické velikosti se pohybují kolem 2 až 20 nm [1]. Jsou složeny z jádra, které tvoří jeden typ polovodiče (např. CdSe, CdTe), a z několika vrstev atomů druhého typu polovodiče, které kolem jádra vytváří obal (např. ZnS, CdS). Složení ze dvou polovodičů, tzv. core/shell struktura, je nejčastěji se vyskytující. Existují ale i QDs složeny jen z jednoho typu polovodiče nebo mohou být opatřeny dalším obalem, které nese reaktivní skupiny a zvyšuje tak jejich rozpustnost ve vodě [2]. Tento hydrofilní povlak je velmi častý u kvantových teček pro biologické aplikace ve fluorescenční mikroskopii [3]. Různé struktury kvantových teček jsou zobrazeny na Obr. 1.



Obr. 1: Na obrázku A je znázorněna QD složená pouze z jednoho typu polovodiče. Na obrázku B je pak QD složená ze dvou typů polovodičů, které tvoří jádro a obal. Na obrázku C je QD obalená vnějším obalem, který umožňuje lepší rozpustnost ve vodě a který nese reaktivní skupiny R (důležité pro biokonjugaci). Na posledním obrázku D je znázorněna polymerní částice, která obsahuje hned několik QDs a je opatřena obalem s reaktivními skupinami R [2].

U kvantových teček lze pozorovat jednu z unikátních vlastností, se změnou velikosti se mění i některé jejich fyzikální vlastnosti (optické, elektrické apod.). A to je důsledkem tzv. kvantování energie. Kvantové jevy pozorujeme u materiálů, které mají zakázaný pás energií, což je právě u polovodičů. Klasické kovy jsou vodivé díky tomu, že vlivem elektrického pole se jejich elektrony dají do pohybu a díky tomu, že je lze excitovat do nízko ležících excitovaných stavů. Elektrony lze považovat za částice v trojrozměrné potenciálové jámě, a jelikož ta má makroskopické rozměry, tak energetické hladiny tvoří kontinuum. Vliv kvantování energie na vlastnosti materiálu tak lze zanedbat. To ale u materiálů v nanorozměrech nebude platit, kdy kvantování energie bude významné a ovlivní vlastnosti těchto materiálů. U polovodičů jejich elektrická vodivost vzrůstá s teplotou nebo po ozáření. Vodivost se tedy zvyšuje přenosem energie do materiálu [4]. K tomu, aby částice mohly emitovat záření, musí mít ve svém energetickém spektru mezeru mezi valenčním a vodivostním pásem. Elektrony se za termodynamické rovnováhy nachází ve valenčním pásmu, excitací se elektron dostává do pásu vodivostního a ve valenčním vzniká díra (dvojice elektron-díra se také nazývá jako exciton). Vzhledem k velmi malé velikosti QDs jsou elektrony uzavřeny v malém prostoru a ke kvantování energetických hladin dojde jen tehdy, pokud poloměr QDs je menší než průměrná vzdálenost mezi elektronem ve vodivostním pásmu a dírou ve valenčním pásmu (menší než poloměr Bohrova excitonu) [5]. Obecně platí, že pokud velikost částic klesá, tak se

od sebe tyto energetické hladiny vzdalují. Důsledkem toho je pak to, že QDs ze stejného materiálu mohou emitovat jakoukoliv barvu světla, a to na základě toho, jakou velikost mají [6]. Na základě těchto poznatků tedy platí to, že se zmenšujícím se poloměrem částic se od sebe energetické hladiny vzdalují (v důsledku kvantování energie), vzniká vyšší rozdíl energií a excitační/emisní vlnová délka se snižuje. Měnění se rozměr kvantových teček vede ke změně barvy materiálu (roztoku QDs) [4].

2.1.1 Příprava kvantových teček

Kvantové tečky jsou obvykle sloučeniny prvků II. až VI. skupiny periodické tabulky. Jedná se nejčastěji o teluridy, selenidy, sulfidy iontů zinku a kadmia [7]. Velmi používané jsou QDs složené z CdTe/CdS, CdSe/ZnS apod. Přítomnost kadmia velmi zlepšuje fyzikální vlastnosti těchto materiálů a tím získávají QDs větší aplikační potenciál. Ten je bohužel ve většině případů zase vyvrácen možnou cytotoxicitou iontů kadmia a jiných těžkých kovů. Jsou tedy vyvíjeny QDs tvořené méně toxickými materiály, jako je např. ZnS nebo InP [8].

Obecně existují dvě možné cesty chemické syntézy kvantových teček. Jednou z nich je příprava bez použití vodných rozpouštědel. Tento typ syntézy je velmi vhodný pro přípravu kvalitních QDs, ale jedná se o poměrně náročný proces, který vyžaduje práci při velmi vysokých teplotách, navíc se obvykle používají nestabilní a toxické prekurzory. Proto se více prosazuje příprava za použití vodných rozpouštědel. Oba dva přístupy jsou ale založeny na vytvoření QDs v přítomnosti stabilizujících ligandů. Ty zajistí jejich solvataci v daném reakčním prostředí. Pokud se k přípravě používají organická rozpouštědla, tak pro stabilizaci se velmi často využívá směs trioktylfosfin/trioktylfosfinoxid (TOP/TOPO). Při použití vodných rozpouštědel se pak ke stabilizaci využívají různé thioly, jako je např. sulfanylethanová kyselina [2]. Velmi často se také používá kyselina thioglykolová (kys. merkaptooctová, MAA) nebo kyselina merkaptojantarová (MSA). Jejich -SH skupina se váže s polovodičem (např. CdSe) a tvoří tak obal kolem jádra [7]. Nejčastější typ syntézy je pak smíchání vhodných prekurzorů s rozpouštědly a stabilizačními ligandy a následné zahřívání na určitou teplotu. Při zahřívání dochází k přesunu atomů z menších krystalů na větší, a to pak vede k posunu emise k delším vlnovým délkám. Velikost a následné fyzikální vlastnosti (emise záření apod.) je dána nejen složením reakční směsi, ale také délkou zahřívání. Na povrch takto připravených nanočástic pak lze nanést obalovou vrstvu [2].

Pro využití QDs ve vodném prostředí je nutné na jejich povrchu vytvořit vnější obal, který zajistí lepší rozpustnost jinak hydrofobních částic ve vodném prostředí. Současně tento obal nese funkční skupiny vhodné pro konjugační reakce s nějakou cílenou molekulou. Proces biokonjugace má obvykle dva kroky. V prvním jsou reaktivní skupiny na povrchu aktivovány vhodným konjugačním činidlem, jehož nadbytek se následně odděluje dialýzou nebo gelovou permeační chromatografií. V druhém kroku je do roztoku přidána cílová biomolekula, která s aktivovanou QD vytváří biokonjugát, který z reakční směsi může být oddělen taktéž gelovou permeační chromatografií. Existuje několik možných způsobů, jak provést biokonjugaci. První metodou je navázání záporně nabitého obalu na jádro, které lze poté pokrýt např. kladně nabitým avidinem. Takto připravená QD může reagovat s biotinylovanými molekulami. Nebo lze na povrch QDs navázat sacharidové jednotky, které se aktivují oxidací NaIO_4 a vznikají aldehydové skupiny. Ty pak mohou reagovat s cílovou molekulou přes jejich aminoskupiny.

Další možností je navázat na povrch thiolovou skupinu, která se nemusí nijak aktivovat a lze ji tak přímo spojit s další thiolovou skupinou na cílové molekule přes disulfidický můstek atd. [2]. V současnosti jsou nejběžnější komerčně dostupné kvantové tečky CdSe/ZnS, dostupné jako sekundární protilátkové konjugáty. Jsou složeny z jádra selenidu kadmia, kdy celkem obsahují 100 až 100 000 atomů. Velikost tohoto jádra, jak bylo už zmíněno, udává fluorescenční emisní spektra. Na tomto jádře se pak nachází tenká pasivační vrstva sulfidu zinečnatého, která zlepšuje fluorescenci a stabilitu QDs. Dál také obsahují povlak z organického polymeru ke zlepšení rozpustnosti a biokonjugace [5].

Kvantové tečky mohou být připraveny i fyzikálními metodami, jako je laserová fyzikální depozice par a laserové ozařování velkých částic. Tento způsob přípravy je poměrně rychlý, a hlavně šetrný k životnímu prostředí. Výsledné částice ale velmi často vykazují povrchové defekty, špatnou stabilitu a horší optické vlastnosti. Jednou z dalších diskutovaných metod přípravy biokompatibilních QDs je syntéza v různých biologických organismech. Tato syntéza má hned několik výhod, např. že samotná buňka obsahuje různé metalo-sloučeniny (aminokyseliny, proteiny, chelatační peptidy), které mají schopnost redukovat kovové ionty, akumulovat je apod. Další výhodou je, že u jednodušších organismů lze pomocí genetického inženýrství upravit regulaci růstu QDs, jejich velikost a tím i optické vlastnosti. A velkou výhodou jsou mírné reakční podmínky bez zapojení vysokých teplot, toxických organických rozpouštědel atd. Důležitou roli při této syntéze hrají hned dva mechanismy organismu. Prvním je biodetoxifikace, přirozený obranný mechanismus mnoha organismů na přítomnost iontů těžkých kovů (jako je např. kadmium). Tento proces umožňuje přeměnu těchto kovů např. na komplexy kov-protein (fytochelatininy aj.). Druhým procesem jsou obecně enzymatické reakce, které hrají roli zejména při růstu QDs. Např. acetylcholinesteráza hydrolyzuje acetylcholin na thiocholin, který urychluje rozklad thiosíranu sodného za vzniku sirovodíku. Ten následně reaguje s ionty kadmia a vzniká CdSe, důležitý k tvorbě QDs. Během enzymatických reakcí se také mohou produkovat některé menší biomolekuly (fosfát, glutathion aj.), které mohou fungovat jako povrchové ligandy podporující stabilitu. Takto připravené QDs by měly být rozpustné ve vodě, stabilní ve fyziologickém prostředí, netoxické pro organismus a schopné fluorescenčně značit cílové molekuly. Doposud byly připraveny QDs v různých organismech, stručný přehled je uveden v Tab. 1 [9].

Tab. 1: Stručný přehled připravených kvantových teček pomocí živých organismů. V tabulce je uveden materiál, ze kterého jsou QDs složeny, organismy, ve kterých syntéza probíhala. Dále je zde uvedeno, o jaký produkt se jedná, zda extracelulární nebo intracelulární, a nakonec přibližná velikost těchto částic [9].

| Materiál | Organismus | Intra/Extracelulární | Velikost [nm] |
|----------|------------------------------------|----------------------|---------------|
| CdS | <i>E. coli</i> | intracelulární | 2-6 |
| | <i>Rhodospseudomonas palustris</i> | intracelulární | 8 |
| ZnS | <i>E. coli</i> | extracelulární | 5 |
| | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | intracelulární | 30-40 |
| CdTe | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | extracelulární | 2-4 |
| CdSe | <i>Staphylococcus aureus</i> | intracelulární | 2 |

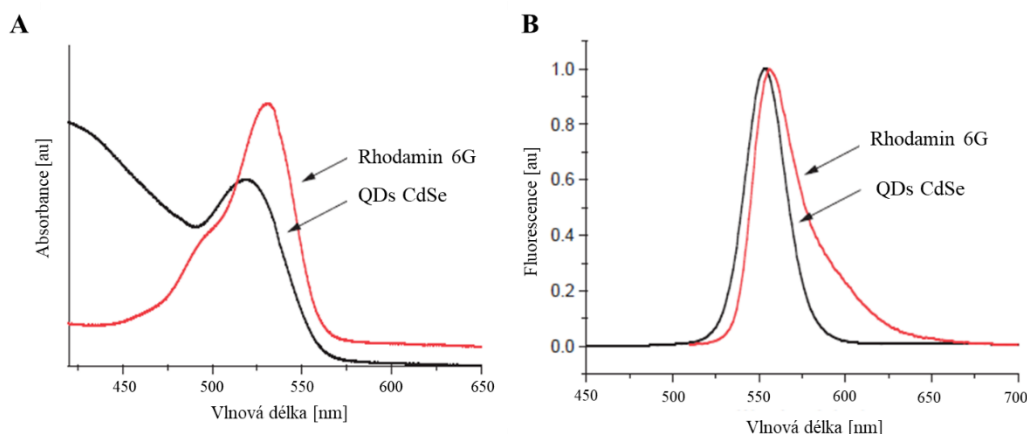
2.1.2 Vlastnosti a aplikace kvantových teček

Kvantové tečky jsou stabilní, vykazují jasnou fluorescenci a za ideálních podmínek mohou dosáhnout vysokých kvantových výtěžků. Mají velmi úzké emisní a excitační spektra, která jsou dána, jak chemickým složením, tak zároveň i jejich velikostí (jak bylo popsáno v kapitole 2.1), na rozdíl od klasických fluoroforů, jejichž spektra jsou závislá jen na chemickém složení [10]. Takže menší jádra (cca 2 nm) emitují záření v modré oblasti vlnových délek a větší jádra (cca 5 až 7 nm) emitují záření v oblasti žlutých až červených vlnových délek (Obr. 2) [3].



Obr. 2: Na tomto obrázku je znázorněn rozdíl barev mezi deseti roztoky kvantových teček, které byly připravovány za různé teploty. Podle toho, jaká byla zvolená teplota, vznikala na CdSe jádře ZnS obal o různé tloušťce. Nejmenší částice se nacházejí vlevo, v modré oblasti vlnových délek, naopak největší se nacházejí vpravo v červené oblasti vlnových délek [11].

Výhoda oproti klasickým organickým fluoroforům je jejich stabilita vůči fotovybělování, kdy mohou procházet opakovanými cykly excitace a fluorescence po dobu i několika hodin. Ukázalo se, že QDs jsou fotostabilnější než organické barvivo Alexa488, které je údajně jedno z nejstabilnějších organických barviv [12]. Další výhodou je to, že dokáží budít několik různých emisních barev s použitím jedné excitační vlnové délky. Díky tomu by QDs mohly být vhodné k detekci více ligandů najednou. Díky všem těmto vlastnostem mají QDs velký potenciál v oblasti fluorescenčního značení biomolekul [10]. Kvantové tečky mají široká absorpční spektra, ale poměrně úzká spektra emisní (Obr. 3), která jsou navíc symetrická, a vykazují poměrně velký Stokesův posun. Kromě toho mají QDs dostatečně velkou elektronovou hustotu a mohou tak být pozorována elektronovou mikroskopií bez jakéhokoliv speciálního kontrastního ošetření [5].

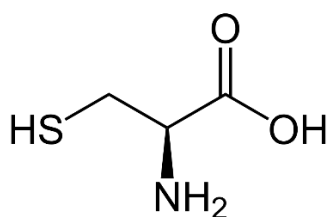


Obr. 3: Na obrázku jsou znázorněny rozdílné excitační (A) a emisní (B) spektra klasického organického fluoroforu Rhodaminu 6G a kvantových teček tvořených CdSe. U QDs je emisní spektrum téměř symetrické a mnohem užší. Naopak excitační spektrum je široké a kontinuální, což znamená, že QDs mohou být účinně excitovány při jakékoliv vlnové délce kratší než 530 nm. Rhodamin 6G má naopak úzké excitační spektrum a široké spektrum emisní [12].

QDs emitující při různých vlnových délkách se dají použít k imunochemickému stanovení několika analytů v jednom kroku [2]. Např. konjugáty QD-protein mohou být použity jako sondy vůči specifickým biologickým mechanismům při imunoanalýzách a k zobrazování živých buněk [13]. Dále se dají využít k fluorescenčnímu značení mikroskopických preparátů, kdy takto lze oddělit různé buněčné struktury. QDs emitující v blízké infračervené oblasti (NIR) byly použity pro specifické značení tkání organismu, protože NIR záření má schopnost procházet živočišnými tkáněmi a umožňuje tak neinvazivně nahlédnout do těl živočichů [2]. Využití kvantových teček v medicíně limituje jejich složení. Zejména ionty kadmia byly určeny jako primární příčina cytotoxicity, jelikož jsou schopny se vázat na thiolové skupiny mitochondriálních enzymů, čímž se stávají neaktivní, a to může způsobit až buněčnou smrt [1]. Díky jejich vysoké fotostabilitě jsou vhodné k dlouhodobému monitorování značených látek [12]. QDs mají i laditelné elektrické vlastnosti, proto mají mnohá využití při výrobě tranzistorů [4].

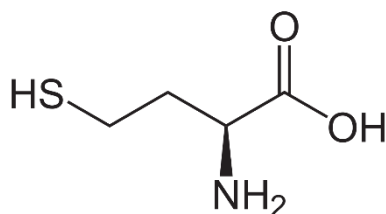
2.1.3 Zvýšení biokompatibility

Ve spojení se zvýšením biokompatibility se čím dál více diskutuje o interakci kvantových teček s organickými molekulami, které ve struktuře figurují, jako nejsvrchnější obal QDs. Jednou z možných organických molekul může být cystein (CYS, Obr. 4). Jedná se o biogenní sirnou aminokyselinu, která je biosyntetizována ze dvou aminokyselin, methioninu a serinu. Jeho jedinečnou vlastností je tvorba disulfidických můstků, která dává cysteinu důležitou roli ve struktuře bílkovin a při skládání bílkovin do složitějších struktur. Cystein je pro organismus neesenciální aminokyselinou [14]. Díky thiolové skupině vykazuje cystein vysokou afinitu k těžkým kovům, jako je např. kadmium, rtuť nebo olovo [15]. Thiolové skupiny mohou podléhat oxidačním i redukčním reakcím. Pokud je cystein oxidován, může tvořit tzv. cystin. Jedná se o dva cysteinové zbytky spojené disulfidovou vazbou a tato reakce je reverzibilní. Thiolová skupina se chová také jako nukleofil a může se podílet na adičních a substitučních reakcích. Cystein je také součástí antioxidantu glutathion [16].



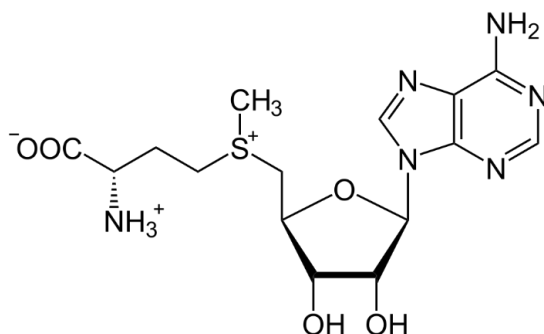
Obr. 4: Chemický vzorec cysteinu [17].

Další možnou organickou molekulou je neesenciální aminokyselina homocystein (HCYS, Obr. 5), který na rozdíl od cysteinu není součástí bílkovin. Za mírných podmínek a pod vlivem různých oxidačních činidel přechází na disulfid homocysteinu. Za přítomnosti vitamínu B₆ dochází k jeho degradaci za vzniku cysteinu [18]. Metabolismus HCYS stojí na pomezí dvou cest. Jedna z nich je remethylace na methionin, která vyžaduje folát a vitamín B₁₂. Druhou reakcí je trans-sulfurace na cystathionin. Obě reakce jsou koordinovány S-adenosylmethioninem, který figuruje jako alosterický inhibitor v první reakci a aktivátor v reakci druhé. Nadbytek homocysteinu se velmi často udává jako důsledek některých vaskulárních onemocnění, kdy je narušen jeho metabolismus [19].



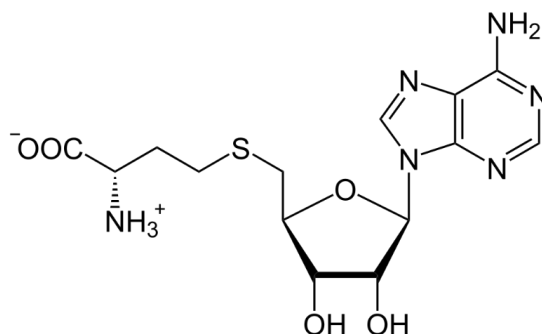
Obr. 5: Chemický vzorec homocysteinu [17].

Možnou variantou je i S-adenosylmethionin (SAM, Obr. 6), který je přítomen v každé buňce a v buňkách tkání se z něj uvolňuje homocystein. Jedná se o univerzální zdroj methylové skupiny, který vzniká enzymovou reakcí methioninu s ATP. Jako donor methylové skupiny je SAM důležitou součástí transmethylačních reakcí [18]. V játrech je SAM prekurzorem pro vznik glutathionu, a to jeho přeměnou přes cystein. Tato organická molekula má účinky na buněčný růst a jeho nedostatek se projevuje např. onemocněním jater [20].



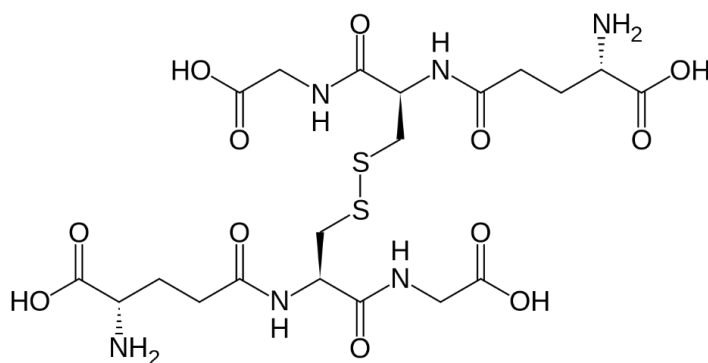
Obr. 6: Chemický vzorec S-adenosylmethioninu [21].

Demethylací SAM vzniká S-adenosylhomocystein (SAH, Obr. 7), který může být další organickou molekulou sloužící ke zvýšení biokompatibility kvantových teček. Vyskytuje se v buňkách a je silným kompetitivním inhibítorem transmethylačních reakcí. Je tedy důležité udržovat poměr SAM:SAH v buňce. SAH je také bezprostředním prekurzorem veškerého homocysteinu produkovaného v těle [20].



Obr. 7: Chemický vzorec S-adenosylhomocysteinu [17].

Další možnou molekulou je glutathion disulfid (GSSG, Obr. 8), který vzniká v buňkách oxidací tripeptidu glutathionu (GSH). Běžně se vyskytuje v buňkách, ale většinou v nižších koncentracích než GSH [22]. Glutathion působí jako antioxidant a podílí se na několika metabolických regulacích. Je také součástí CNS, kde se nachází v milimolárních koncentracích. Redukce GSSG zpět na GSH vyžaduje přítomnost NADPH. Poměr GSH/GSSG je velmi důležitý, během stárnutí se snižuje a k extrémnímu snížení může dojít u některých neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba [23]. Všechny tyto molekuly mají společně přítomnost síry ve své struktuře, díky které mají vyšší afinitu k interakci s kovy jako je např. zinek.

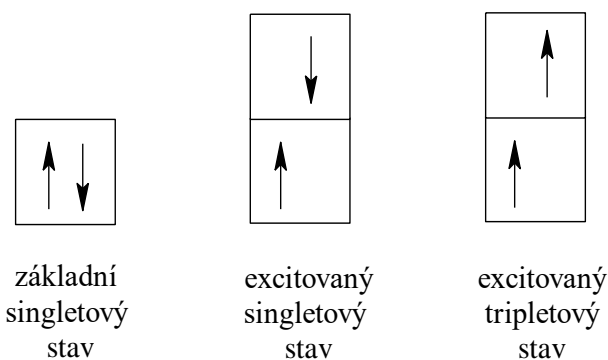


Obr. 8: Chemický vzorec glutathion disulfidu [24].

2.2 Fluorescence

Fluorescence je zvláštní případ luminiscence, kdy dochází k emisi světelného záření. Při tomto ději dochází k interakci světla v podobě elektromagnetického záření s látkou, jejíž elektrony byly excitovány ze základní energetické hladiny S_0 do vyšší energeticky excitované hladiny S_1^* . Podle způsobu excitace elektronů dané látky pak rozlišujeme různé typy luminiscence. Např. radioluminiscence, kdy dochází k excitaci radioaktivním zářením (γ -záření apod.), při termoluminiscenci dochází k excitaci teplem, k sonoluminiscenci dojde k excitaci zvukem. K excitaci může dojít také díky probíhajícím chemickým reakcím (oxidace, redukce apod.), a pak mluvíme o chemiluminiscenci. Nejčastějším případem je tzv. fotoluminiscence, kdy dochází k excitaci elektromagnetickým zářením. Do této kategorie právě patří zmiňovaná fluorescence a dále také fosforescence [25].

Látka, která interaguje se zářením, se nazývá fluorofor. Elektromagnetické záření se chová současně jako vlnění a jako proud částic s nulovou klidovou hmotností, tzv. fotonů, které mají určitou část energie [26]. Při interakci fluoroforu s fotony dojde k absorpci energie fotonů, tu fluorofor využije na excitaci ze svého základního stavu S_0 do vyššího energetického excitovaného stavu, který může být singletový S_1^* nebo tripletový T_1^* . U excitovaného singletového stavu se elektron v excitovaném orbitalu spáruje s dalším elektronem, který se nachází v základním stavu a který má opačný spin. Díky tomu je návrat do základního stavu povolen a dochází k rychlé emisi fotonu a mluvíme o fluorescenci. U excitovaného tripletového stavu má elektron v excitovaném orbitalu stejný spin jako elektron v základním stavu. Přejít do základního stavu je pak tzv. zakázaný, emise fotonu je pomalejší a mluvíme o fosforescenci. Rozdíl mezi excitovaným singletovým a tripletovým stavem je uveden na Obr. 9 [27].

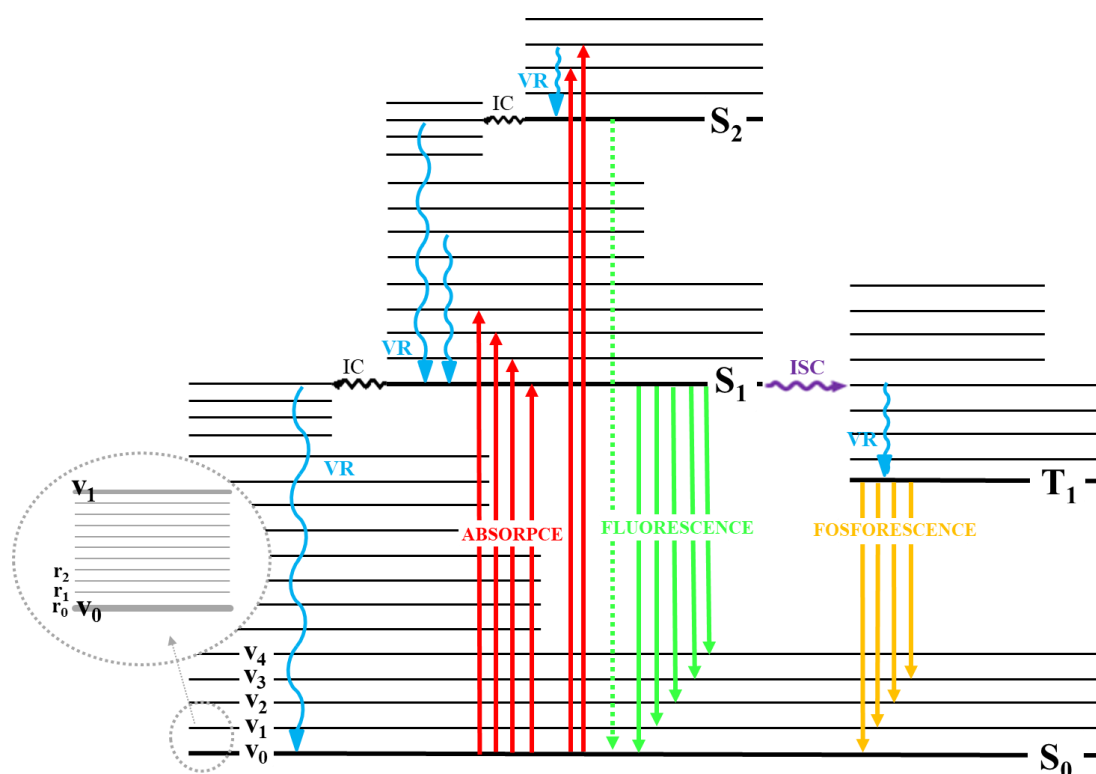


Obr. 9: Znárodnění rozdílů mezi excitovaným singletovým stavem, kdy má dvojice elektronů opačný spin, a excitovaným tripletovým stavem, kdy má dvojice elektronů spin stejný [26].

2.2.1 Perrin-Jabloňského diagram

Procesy vyskytující se mezi absorpcí a emisí záření jsou znázorněny v Perrin-Jabloňském diagramu na Obr. 10. V typickém Perrin-Jabloňském diagramu je znázorněna základní singletová hladina (S_0), dvě excitované singletové hladiny (S_1 a S_2) a jedna excitovaná tripletová hladina (T_1). Na každé z těchto elektronických hladin mohou fluorofory existovat v několika hladinách vibračních. Absorpce a emise se většinou týká molekul s nejnižší vibrační energií. Energetický rozdíl mezi hladinou S_0 a S_1 je poměrně velký, proto se k excitaci využívá záření, které má vyšší energii než např. teplo [27].

Po absorpci záření dochází k několika možným procesům kromě fluorescence, tyto procesy se nazývají deexcitační (nezářivé). [25]. Fluorofor je excitován na vyšší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 nebo S_2 . Ve většině případů se elektrony vrátí na nejnižší vibrační hladinu S_1 , a to procesem vnitřní konverze. Vnitřní konverze může nastat jen tehdy, pokud se vibrační podhladiny excitovaného stavu S_1 překrývají s vibračními podhladinami základního stavu S_0 [27]. Pokud je molekula excitována na energetickou hladinu vyšší, než je nejnižší úroveň vibrační hladiny excitovaného stavu, dochází k procesu vibrační relaxace. Ten vede k návratu molekuly směrem k nejnižší vibrační úrovni excitovaného stavu [28]. Molekuly ve stavu S_1 mohou také projít spinovou konverzí do tripletového stavu T_1 . Emise z této hladiny se pak nazývá fosforescence. Vzdálenost mezi hladinou S_0 a T_1 je o něco menší, tím pádem je mezi nimi nižší energetický rozdíl a emisní spektra jsou pak posunuta k delším vlnovým délkám. Tento přechod $S_1 \rightarrow T_1$ se nazývá tzv. mezisystémový přechod, při kterém dochází ke změně spinu elektronu [27]. Všechny tyto přechody jsou velmi rychlé. Samotná absorpce je nejrychlejší a probíhá v řádech femtosekund. Vibrační relaxace pak trvá jednotky až stovky pikosekund, stejně tak trvá i vnitřní konverze. Fluorescence je pomalejší děj a čas přechodu jsou desítky nanosekund až desítky mikrosekund. Mezisystémový přechod má přibližně stejnou dobu přechodu jako fluorescence. Fosforescence je děj nejpomalejší, který může trvat v řádech milisekund až sekund [25].

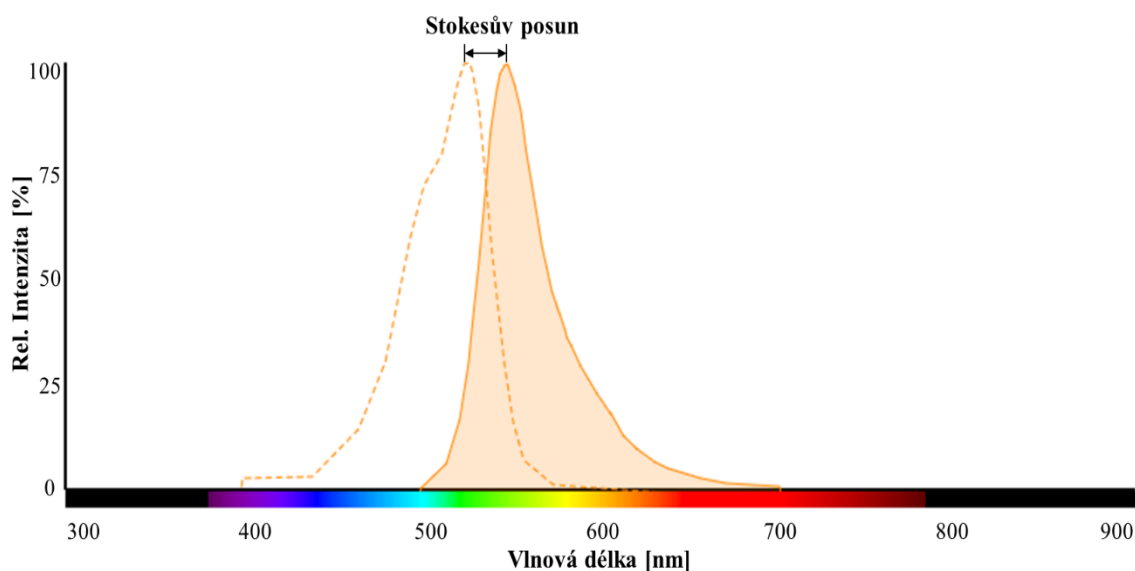


Obr. 10: Perrin-Jabloňského diagram znázorňující excitaci a emisi. V diagramu jsou vlnovkou znázorněny nezářivé přechody, a to vnitřní konverze (IC – internal conversion), vibrační relaxace (VR – vibrational relaxation) a mezisystémový přechod (ISC – inter-system crossing) [27].

2.2.2 Fluorescenční spektra

Rozlišujeme fluorescenční spektra emisní a excitační. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření a značně se liší v závislosti na chemické struktuře fluoroforu a rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěn. Excitační spektrum je tatáž závislost, ale při konstantní vlnové délce emisního záření. Obě spektra se zaznamenávají pomocí spektrofluorimetru [29]. Z Perrin-Jabłoňského diagramu je patrné, že energie emise je nižší než energie absorpce, proto se fluorescenční emisní spektrum typicky vyskytuje při delších vlnových délkách [27]. S tím souvisí tzv. Stokesovo pravidlo, které říká, že vlnová délka emitovaného záření by měla být vždy vyšší, než je vlnová délka absorpce. Ve většině případů však absorpční spektrum částečně překrývá spektrum emisní, což znamená, že část záření je emitována při kratších vlnových délkách [25].

U excitačních a emisních spekter lze pozorovat tzv. Stokesův posun (Obr. 11). Jedná se o rozdíl maxim mezi excitačním a emisním pásmem. Jednou z příčin Stokesova posunu je rychlý pokles na nejnižší vibrační hladinu stavu S_1 , navíc fluorofor obecně klesá i na vyšší vibrační hladiny stavu S_0 , což má za následek další ztrátu excitační energie, a to ve formě tepla. Kromě toho mohou být Stokesovy posuny způsobené účinky rozpouštědla, tvorbou komplexů nebo přenosem energie. Návrat elektronu ze základní hladiny stavu S_1 probíhá na nějakou vyšší excitovanou vibrační hladinu stavu S_0 . Tento návrat je pak důvodem vibrační struktury v některých emisních spektrech (např. perylenu) a zajímavým důsledkem je i to, že absorpční a emisní spektrum jsou svým zrcadlovým obrazem. Podobnost spekter nastává z toho důvodu, že excitace elektronů nemění jejich jadernou geometrii [27].



Obr. 11: Na obrázku je znázorněno excitační spektrum (přerušovaná křivka) a emisní spektrum Rhodaminu 6G, kde osa x představuje vlnovou délku a osa y relativní intenzitu. Mezi spektry je patrný [30].

U fluorescence dále platí, že bez ohledu na vlnovou délku excitace (budícího záření) je pozorováno stejné fluorescenční emisní spektrum. To říká tzv. Vavilovo pravidlo, které vychází z Kashova pravidla. Podle něj dochází před emisí fluorescence k vnitřní konverzi, čímž dojde k relaxaci vibrační energie. To má za následek, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší

vibrační hladiny stavu S_1 . Je to z toho důvodu, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem S_1 je velmi malý a nezářivá přeměna z těchto stavů do stavu základního je velmi rychlá. Jsou ale i výjimky, kdy některé fluorofory emitují z hladiny S_2 , ale takové emise jsou poměrně vzácné a nejsou pozorovány v biologických molekulách [27].

2.2.3 Doba života

Doba života patří mezi nejdůležitější vlastnosti fluoroforu. Určuje dobu, po kterou je fluorofor schopný interagovat nebo difundovat ve svém prostředí. To se následně projeví na jeho emisi. Doba života je tedy definována jako průměrná doba, kterou fluorofor stráví v excitovaném stavu před návratem do základního stavu [27]. Uvažujme zředěný roztok fluoroforu A o koncentraci $[A]$ v mol/dm^3 , který bude excitován krátkým pulzem světla. V čase 0 pulz způsobí, že určitý počet molekul A přejde do excitovaného stavu A^* . Tyto excitované molekuly se pak vrací zpět do základního stavu, a to buď zářivými nebo nezářivými přechody nebo oběma typy přechodů. Rychlost vyhasínání excitovaných molekul pak lze vyjádřit následující rovnicí:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr}) \cdot [A^*] \quad (1)$$

kde $[A^*]$ je koncentrace molekul fluoroforu v excitovaném stavu, t je čas, k_r je rychlostní konstanta zářivého přechodu a k_{nr} je rychlostní konstanta nezářivého přechodu. Integrací pak dostaneme rovnici:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right), \quad (2)$$

kde $[A^*]_0$ je koncentrace molekul fluoroforu v excitovaném stavu v čase 0 a τ_S je doba života excitovaného stavu, která je dána rovnicí [25]:

$$\tau_S = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \quad (3)$$

Doba života fluoroforu v nepřítomnosti nezářivých přechodů, tedy pokud se vyskytuje pouze přechod $S_1 \rightarrow S_0$, se nazývá přirozená nebo vnitřní doba života a je dána vztahem:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}, \quad (4)$$

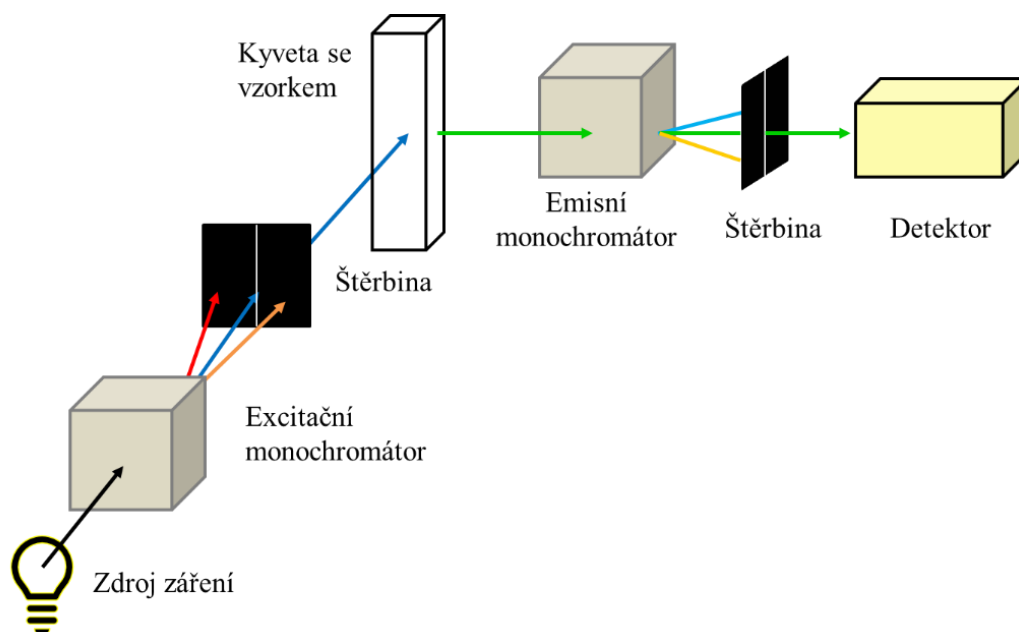
kde Γ je rychlost emise fluoroforu. Teoreticky lze přirozenou dobu života vypočítat z absorpčního spektra, extinčního koeficientu a emisního spektra fluoroforu. Také lze k výpočtu použít vztah, který bere v úvahu naměřenou dobu života τ a kvantový výtěžek Q [27]:

$$\tau_n = \frac{\tau}{Q}. \quad (5)$$

U organických molekul se doba života molekul v singletovém stavu pohybuje od desítek pikosekund do stovek nanosekund, v tripletovém stavu je pak doba života delší a pohybuje se řádově v mikrosekundách až sekundách. Nelze ale takto rozlišovat, zda se jedná o fluorescenci nebo fosforescenci, protože některé anorganické sloučeniny mohou mít dlouhé doby života [25].

2.3 Fluorescenční spektroskopie

Spektrofluorimetry jsou přístroje, které měří fluorescenční signál vzorku umístěného nejčastěji v kyvetě. Zdroj budícího záření se pohybuje v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Liší se podle toho, jaký mód měření se použije. Pro ustálenou fluorescenci se běžně využívají vysokotlaké výbojky (např. xenonová výbojka, která má vysokou intenzitu záření v širokém rozsahu vlnových délek), pro časově rozlišenou fluorescenci se pak používají pulzní lasery. Budící záření prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek, který se nachází v kyvetě o dané optické dráze. Emise se měří v kolmém směru vůči budícímu záření, kdy emitované fluorescenční záření nejdříve prochází emisním monochromátorem a následně dopadá na detektor, čímž nejčastěji bývá fotonásobič. Monochromátor slouží k volbě excitační a emisní vlnové délky podle toho, zda měříme excitační nebo emisní spektrum. U monochromátoru se nastavuje velikost štěrbin, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení. Schéma klasického fluorimetru je znázorněno na Obr. 12 [32]:



Obr. 12: Obecné schéma instrumentace fluorimetru [27].

Fluorimetrii lze využít, jako analytickou metodu ke stanovení koncentrace látek za předpokladu, že pro každou látku jsou charakteristické dvě vlnové délky, excitační a emisní. Díky tomu je tato metoda oproti absorpční spektroskopii mnohem selektivnější a využívá se k analýze komplexních směsí. Nejběžněji se fluorimetrie využívá ke stanovení nízkých koncentrací fluoroforů. Pomocí fluorimetrie lze také sledovat vazbu některých ligandů na biopolymery, kdy se vychází z toho, že ligand, nekovalentně vázaný na biopolymer, má jiné fluorescenční charakteristiky, než když vázaný není a je volně v roztoku. V důsledku vazby se mění vlnové délky emisního nebo excitačního maxima a mění se i kvantové výtěžky [29].

Parametry fluorescence lze měřit ve dvou stavech, a to buď ve stavu ustáleném (steady-state) nebo časově rozlišeném (time-resolved). Ustálená fluorescence se měří při buzení kontinuálním zářením a výsledkem je pak časová střední hodnota intenzity nebo polarizace fluorescence [32].

Zdrojem záření je tedy lampa, která emituje konstantní množství fotonů za jednotku času, bez ohledu na jejich energii. Za těchto podmínek zůstává koncentrace $[A^*]$ konstantní [25].

U časově rozlišené fluorescence rozlišujeme dvě techniky. První je tzv. pulzní fluorimetrie, která využívá k excitaci krátký pulz světla, který bývá kratší než doba dohasínání vzorku. Druhým případem je fázově modulovaná fluorimetrie, která k excitaci využívá fázově modulované záření s proměnnou frekvencí a pak vytváří harmonickou odezvu vzorku, což je Fourierovou transformací odezvy pulzu. První technika pracuje v časové doméně a druhá ve frekvenční doméně. Jedná se v podstatě o stejné techniky, které se akorát liší v instrumentaci přístrojů [25]. V obou případech je výsledkem časová závislost měřených parametrů a používají se pro měření intenzitních a anizotropních křivek [32]. Pomocí časově rozlišené fluorescence lze získat informace o dynamice excitovaného stavu, což má pak zásadní vliv pro pochopení fotofyzikálních, fotochemických a fotobiologických procesů [25].

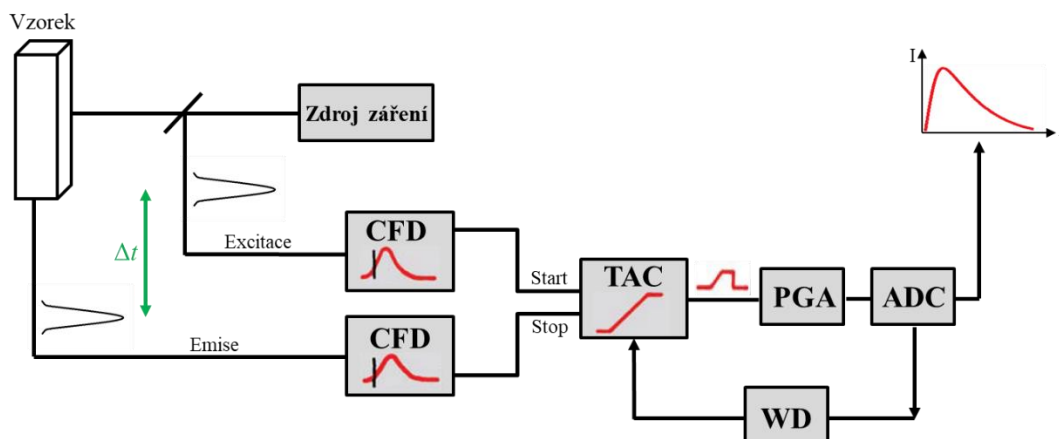
U pulzní fluorimetrie po excitaci vzorku je měřena závislost intenzity fluorescence na čase, která má tvar poklesu. V nejjednodušším případě se jedná o monoexponenciální pokles, jehož časová konstanta je doba života excitovaného stavu. Nejčastěji se však jedná o součet různých exponenciál. V ideálním případě je excitační pulz nekonečně krátký a elektronika nekonečně rychlá, což ale není reálně možné. Závislost intenzity fluorescence je pak produktem konvoluce s funkcí odezvy přístroje, která je složena z funkce profilu excitačního pulzu a odezvy elektroniky [25].

2.3.1 Time-correlated single-photon counting (TCSPC)

Metoda TCSPC neboli „časově korelované sčítání fotonů“ se řadí k časově rozlišené fluorescence. Metoda je založena na sčítání jednotlivých fotonů, které dopadají na detektory od začátku signálu, což je světelný impulz. Základní princip spočívá tedy v tom, že pravděpodobnost detekce jediného fotonu v čase t po budícím impulzu je úměrná intenzitě fluorescence v daném čase. Tato metoda má hned několik výhod, jako je vysoká citlivost, vynikající dynamický rozsah a linearita a dobře definovaná statistika (Poissonova distribuce) umožňující správné vážení každého bodu v analýze dat a mnoho dalších [25].

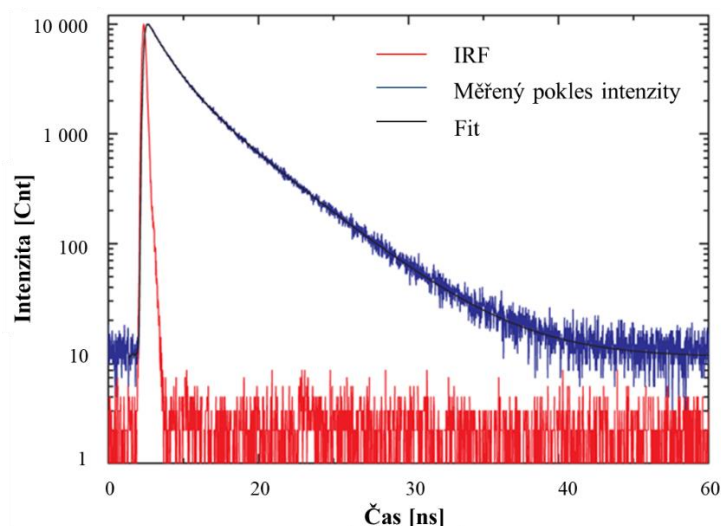
Jako zdroj záření se využívají různé zábleskové lampy nebo lasery. Zábleskové lampy nejsou drahé, ale rozsah vlnových délek je jen od 200 do 400 nm. Generuje se elektrický pulz spojený s optickým pulzem. Elektrický pulz je směřován přes diskriminátor (constant function discriminator – CFD), který přesně měří čas příchodu pulzu, do startovacího vstupu převodníku času na amplitudu (time-to-amplitude convertor – TAC). Mezitím je vzorek excitován optickým pulzem a následně na to emituje fluorescence. Optika musí být správně vyladěna tak, že jsou zde neutrální filtry a štěrby, které se využijí, pokud je intenzita záření velmi vysoká. Dál musí být vyladěna tak, aby na detektor, čímž nejčastěji bývá fotonásobič, nedopadlo víc jak jeden foton na jeden excitační pulz. Elektrický impulz, který odpovídá emisi fotonu, je směřován přes diskriminátor do stop vstupu převodníku TAC, kde se mezitím generoval schodek napětí. To odpovídá napětí, které lineárně roste s časem. V momentě, kdy obdrží tento stop signál, převede schodek napětí na elektrický pulz, jehož amplituda je přímo úměrná zpoždění mezi start a stop pulzem. Dle potřeby je napětí zesíleno v zesilovači (programmable gain amplifier – PGA) a převedeno na číselnou hodnotu pomocí analogově digitálního převodníku (analog-to-digital

converter – ADC). Pro minimalizaci chyb je signál omezen na daný rozsah napětí, a pokud signál v tomto rozsahu není, je událost potlačena v diskriminátoru (window discriminator – WD). Napětí je převedeno na digitální hodnotu. Obecné schéma instrumentace je znázorněno na Obr. 13 [27].



Obr. 13: Obecné schéma instrumentace metody TCSPC [27].

Po velkém počtu excitací a detekcí je získán histogram počtu událostí, který představuje pokles intenzity fluorescence. Čím vyšší je počet událostí, tím vyšší je přesnost křivky poklesu [25]. Detekční rychlost je obvykle 1 foton na 100 excitačních pulzů. Čas se měří mezi excitačním pulzem a pozorovaným fotonem. Tohle se tedy ukládá do histogramu, kdy osa x představuje časový rozdíl (v kanálech) a osa y představuje počet fotonů detekovaných s daným časovým rozdílem [27]. Pro získání parametrů daného poklesu je nutné provést dekonvoluci křivky, kdy je změřen časový profil excitačního pulzu, tedy odezva přístroje, a to za stejných podmínek, jako byl změřen vzorek. Místo vzorku je použit roztok rozptylující záření, nejčastěji roztok koloidního křemíku (Ludox) [25]. Tato křivka je v podstatě funkce odezvy přístroj, kdy v ideálním případě (velmi přesná elektronika a detektory) by tato křivka měla mít velmi úzký budící impuls. Jakákoliv odchylka od tohoto ideálního případu vede k rozšíření píku. Typickým výsledkem časově rozlišených fluorescenčních experimentů je histogram s exponenciálním poklesem směrem k delším časům (Obr. 14) [33].



Obr. 14: Vyhasinací křivka fluoroforu. Červená křivka je funkce odezvy přístroje (Instrument Response Function – IRF), modrá křivka je měřený pokles pro daný vzorek a černá křivka je proložení dat funkcí (Fit) [33].

Časové rozlišení přístrojů je ovlivněno nejen šířkou impulzů, ale také elektronikou a detektorem. K získání přesných fluorescenčních spekter je velmi důležitá lineární odezva TAC, která je více lineární, pokud se minimalizuje tzv. mrtvý čas. Jedná se o čas, kdy je TAC v provozu, ale je neschopný reagovat na další signál [34]. Zabraňují detekci dalšího fotonu, který je výsledkem excitačního pulzu. Mrtvé časy se pohybují od 10 μ s (straší systémy) po 120 ns (moderní elektronika). K eliminaci těchto časů se data shromažďují v tzv. reverzním módu, kdy se emisní pulz (fluorescence) stává startovacím pulzem pro TAC, a naopak excitační pulz se stává stop pulzem. Tímto způsobem bude získaná statistika mnohem přesnější [27].

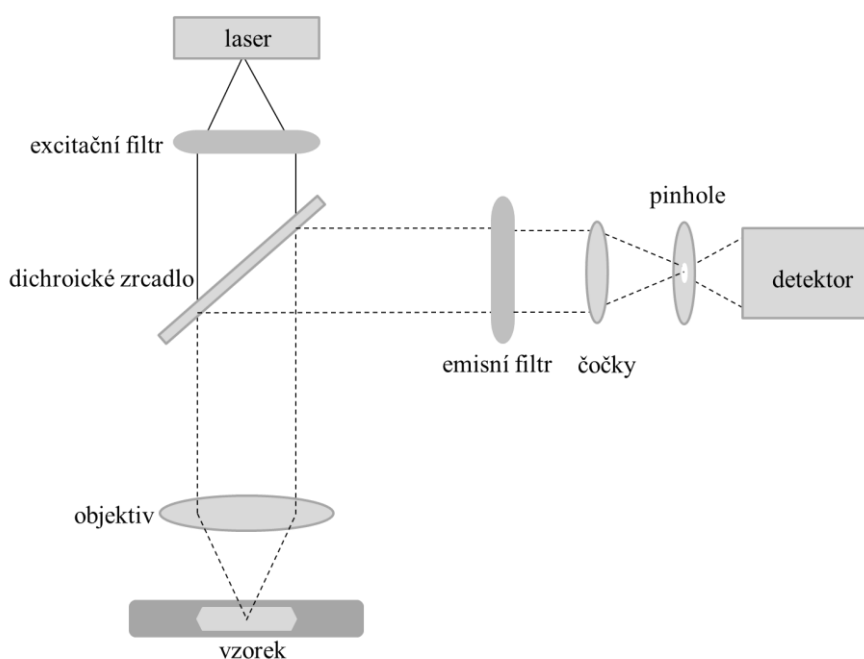
2.4 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se využívá nejen ke studiu živých buněk a biologických tkání, ale také slouží ke studiu koloidních roztoků, polymerů, fotodegradace přirozeně se vyskytujících polymerů apod. Klasický fluorescenční mikroskop je velmi podobný optickému mikroskopu, jen je jako zdroj záření použita většinou xenonová lampa, která produkuje záření v ultrafialové až viditelné oblasti. Fluorescence je pozorována okem, fotografickým filmem nebo kamerou CCD (charge coupled device). Hloubka pozorování se pohybuje okolo 2 až 3 mm a maximální rozlišení je přibližně polovina vlnové délky použitého záření (0,2 až 0,3 mm pro viditelné záření). U silnějších vzorků mohou být snímky rozmazány i přes možné korekce, které přístroj nabízí. Proto jsou preferovány jiné přesnější techniky, jako je např. fluorescenční konfokální mikroskopie [25].

U fluorescenční konfokální mikroskopie je fluorescence oddělena od dopadajícího záření dichroickým zrcadlem a je zaostřena skrz konfokální šterbinu, tzv. pinhole, na detektor. Takže fluorescence nad a pod rovinou vzorku dopadá na stěny pinhole. Excitační energie musí být vyšší než u běžné fluorescenční mikroskopie, protože konfokální mikroskopie sbírá jen zlomek celkové fluorescence. Velmi často se používají lasery, jako zdroj záření [25]. U těchto zdrojů se ale velmi často vyskytuje problém s fotovybělováním, což se eliminuje použitím stabilních fluoroforů, detektorů s vysokou citlivostí, použitím neutrálních filtrů, které zeslabí laserový

paprsek apod. [35]. Jedná se o tzv. konfokální laserovou skenovací mikroskopii (KLSM), která poskytuje trojrozměrné zobrazování, díky skenování pixel po pixelu přes vzorek se zaostřeným laserovým paprskem [36].

V konfokální optice je excitační laserový paprsek zaostřen na clonku a následně na dichroické zrcadlo, kde se odráží k objektivu a ke vzorku. Zde je paprsek fokusován do určitého bodu. Emitovaná fluorescence ze vzorku pak jde zpátky přes objektiv k dichroickému zrcadlu, to fluorescenci propouští k malému otvoru pinhole (clonka), která může mít různý průměr (30 až 50 μm). Přes pinhole projde jen fluorescence z části vzorku, kde je laser zaostřen. K měření dob života ale tahle instrumentace nestačí a je zapotřebí metody TCSPC, jejíž princip je popsán v kapitole 2.3.1 [37]. Obecné schéma instrumentace fluorescenční konfokální mikroskopie je znázorněna na Obr. 15. Oblast, ze které snímáme fluorescenci, se nazývá tzv. konfokální objem, který se pohybuje v rozmezí 0,3 až 1 fl v závislosti na teplotě [38].



Obr. 15: Schéma konfokálního fluorescenčního mikroskopu s laserem, jako budícím zářením [31].

Fluorescenční konfokální mikroskopie se hojně využívá k zobrazování v buněčné biologii, kdy touto technikou mohou být pozorovány i jednotlivé buňky. Lze takto vizualizovat i jednotlivé organely [39]. Výhoda oproti klasické světelné mikroskopii je možnost zobrazování trojrozměrných obrazů, vysoké rozlišení a vzorky není potřeba speciálně upravovat [31].

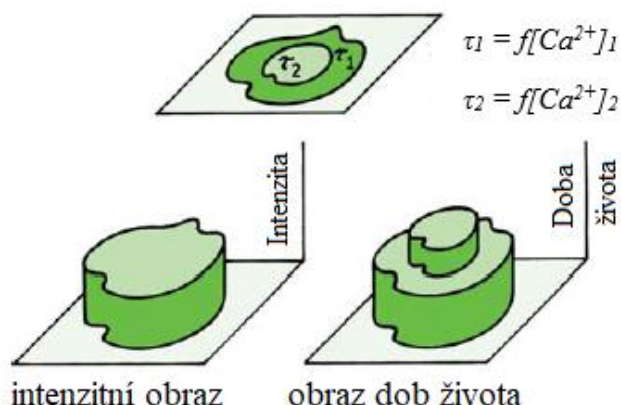
U fluorescenčních mikroskopů se využívají speciální filtry tří druhů umístěných ve fluorescenční kostce, excitační a emisní filtr a dichroické zrcadlo [40]. Obecně se filtry dělí dle vlnových délek, které propouští a odráží. Long-pass filtry propouští danou vlnovou délku a vyšší vlnové délky. Naopak short-pass filtry propouští nižší vlnové délky. Posledním typem jsou tzv. band-pass filtry, které jsou ohraničené z obou stran a propouští jen určitý rozsah vlnových délek [41]. Excitační filtr propustí pouze ty vlnové délky budícího záření, které účinně excitují daný fluorofor. Emisní filtr pak tlumí vlnové délky, které prošly přes excitační filtr, a propouští jen fluorescenci emitovanou vzorkem, která má vždy vyšší vlnové délky než budící

záření. Dichroické zrcadlo, někdy také tzv. dělič paprsků, je tenký kus potaženého skla, který je nastaven pod úhlem 45° k optické dráze mikroskopu. Povlak na skle je velmi důležitý, má jedinečnou schopnost odrážet excitační záření a propouštět jen fluorescenci. Dnešní dichroická zrcadla mají poměrně vysokou účinnost, a to až 90 % [40].

2.4.1 Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)

Metoda FLIM je technika umožňující současně zaznamenávat doby života fluoroforu a jeho prostorové umístění, kdy vytvoří obraz právě na základě dob života daného vzorku [25]. Ty nezávisí na koncentraci fluoroforu, jako např. intenzita fluorescence, ale zato závisí na změnách okolního prostředí, jako je viskozita, pH, koncentrace iontů apod. Touto metodou lze studovat i jednotlivé buňky [27].

Klasický fluorescenční mikroskop zobrazuje obrázek s různými intenzitami fluorescence, nevýhodou této metody je však závislost intenzity fluorescence na čase. Metoda FLIM pracuje právě na principu doby života, která na koncentraci nezávisí. Rozdíl je zobrazen na Obr. 16, kde má buňka dvě oblasti se stejnou intenzitou fluorescence a lišící se dobou života. Doba života fluoroforu ve vnější části buňky τ_1 je několikanásobně kratší než doba života uvnitř buňky τ_2 . Delší doba života uvnitř může být způsobena přítomností některých iontů, jako je vápník, vazbou sondy na jinou makromolekulu nebo může být ovlivněna změnou prostředí. Díky metodě FLIM lze odlišit jednotlivé oblasti lišící se dobou života. Obraz z měření na základě intenzit různá prostředí neodhalí [27].



Obr. 16: Zobrazení rozdílu měření na základě intenzity fluorescence a dob života metodou FLIM. Vpravo je zobrazeno měření FLIM, které je schopno rozlišit dvě prostředí, které mají sice stejnou koncentraci, ale liší se dobou života. Intenzitní obraz tohle není schopen rozeznat, protože intenzita fluorescence je na koncentraci závislá [27].

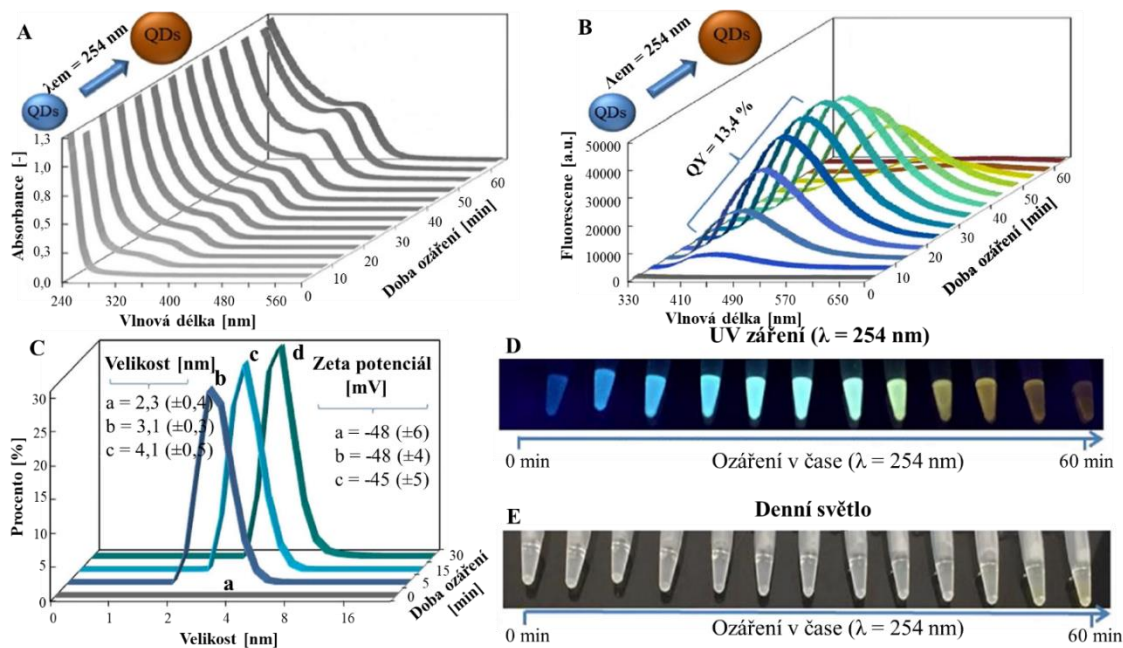
Existují dvě metody, jak pomocí mikroskopu lze získat obraz dob života. Jednou z nich je tzv. wide-field metoda založena na snímání poměrně velké oblasti, a to za použití detektoru pro zobrazování časově rozlišené fluorescence. Druhou metodou je laserová skenovací mikroskopie, která je v metodě FLIM pro nás důležitější. Princip této metody spočívá v měření dob života v každém pixelu daného obrázku. Toho lze docílit zaostřením laserového paprsku na vzorek a v každé pozici skeneru [27]. Výsledkem je pak obraz, kde různé doby života mohou být zakódovány v různých barvách, např. červená pro delší doby života, modré pro kratší [33].

FLIM je cenným nástrojem pro vyhodnocení změn prostředí v blízkosti fluorescenčně značené molekuly, které mohou být citlivé na změnu pH, změnu koncentrace vápenatých iontů, kyslíku, chloridů apod. [42]. Tyto změny okolních podmínek mohou mít za následek zhasení fluorescence a zkracují se tak doby života. Lze také provést značení více fluoroforů najednou a rozlišit tak od sebe některé organely nebo využít autofluorescence některých molekul. FLIM také umožňuje charakterizaci některých nových materiálů, jako jsou např. kvantové tečky, které mohou být novými fluorescenčními značkami [43].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

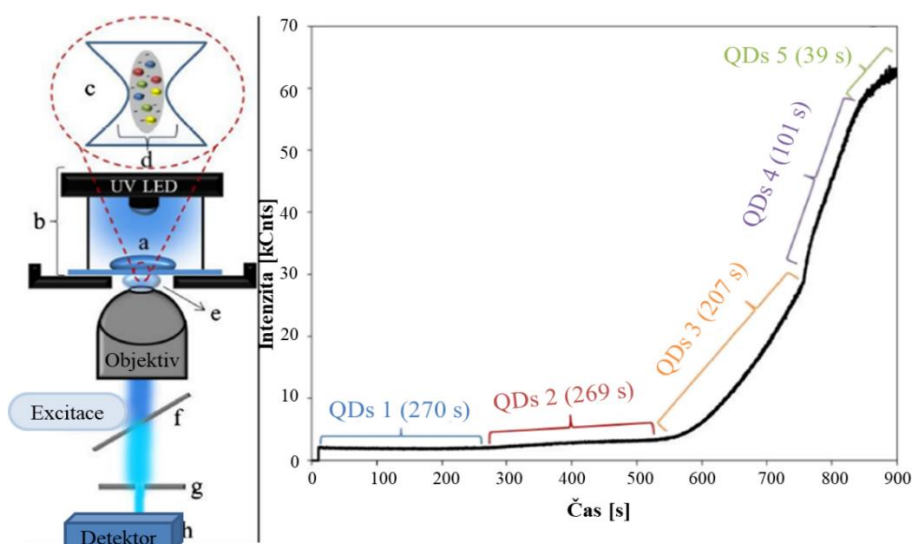
3.1 Formování kvantových teček z roztoku kovů a sirných sloučenin

Ve spolupráci Mendelovy univerzity v Brně, Ústav chemie a biochemie, a VUT, Fakulty chemické, vznikl článek, ve kterém se **L. Nejdli, F. Mravec a spol.** zabývali formováním fluorescenčních komplexů UV světlem. Práce se zabývá syntézou ve vodě rozpustných kvantových teček (z prekurzorů Cd:Se, Cd:Te, Cd, Zn:S, Zn:Se a Zn) pomocí UV záření, které jsou stabilizovány kyselinou merkaptopantárovou (MSA). Tato syntéza by měla být rychlá, poměrně méně nákladná a bez použití vysokých teplot. Prekurzory byly buď smíchané s redukčním činidlem (tyto prekurzory budou označeny symbolem „*“) nebo byly bez tohoto činidla. Součástí experimentu bylo i sledování vlivu teploty na tvorbu kvantových teček, kdy bylo zjištěno, že se zvyšující teplotou docházelo k bathochromnímu posunu emisního spektra, tedy posun k delším vlnovým délkám. Zároveň byl stanoven kvantový výtěžek, který u většiny prekurzorů byl pod 1 %. Výjimkou byl CdTe*, u kterého kvantový výtěžek rostl s rostoucí teplotou. Nejvyšší kvantový výtěžek CdTe* byl stanoven při 95 °C, a to na 20,1 %. V dalším kroku byl testován vliv UV záření o vlnové délce 254 nm na tvorbu QDs z daných prekurzorů. Vzorky byly umístěny do křemenné květy a ty byly ozářeny v transiluminátoru v různých časech (0, 10, 20 a 30 minut). U všech zkoumaných vzorků byla pozorována interakce s UV zářením, nejnižší kvantový výtěžek (pod 1 %) byl zaznamenán u ZnS, ZnS* a ZnSe, a to i s rostoucím časem, kdy docházelo k jasné ztrátě fluorescence. Naopak nejvyšší kvantové výtěžky byly zaznamenány u CdSe, kdy ve všech časech byl zaznamenán kvantový výtěžek na 13,4 %. U všech vzorků byl také pozorován bathochromní posun emisního spektra v závislosti na době ozáření. Na základě těchto výsledků byly pro další experimenty zvoleny prekurzory obsahující jen kadmium a selen. Tyto prekurzory byly v transiluminátoru ozářeny UV zářením po dobu 0 až 60 minut. V 5 minutových intervalech bylo část roztoku odebráno a byla změřena jejich absorpční spektra, kde byl pozorován posun absorpčního maxima kvantových teček CdSe (Obr. 17A). Stejně tak byla změřena fluorescenční spektra, kdy v prvních 30 minutách bylo pozorováno zvyšování intenzity fluorescence a poté docházelo ke snižování intenzity, navíc byl pozorován bathochromní posun. Po prvních 5 minutách bylo maximum při 450 nm, po 60 minutách se maximum posunulo o 158 nm (Obr. 17B). U takto ozářených prekurzorů byla změřena velikost a zeta potenciál pomocí metody DLS (dynamický rozptyl světla). Velikost po 5 minutovém ozáření činila 2,3 nm, po 30 minutách velikost vzrostla téměř o dvojnásobek, a to na 4,1 nm. Zeta potenciál se s časem tolik neměnil, po 5 minutách byl -48 mV a po 30 minutách byl -45 mV. Tato hodnota udává, že se jedná o stabilní roztoky částic, pokud je zeta potenciál vyšší než -30 mV nebo +30 mV (Obr. 17C). Jednotlivé roztoky jsou zobrazeny na Obr. 17D a E, kde jsou ozářeny UV světlem a denním světlem [44].



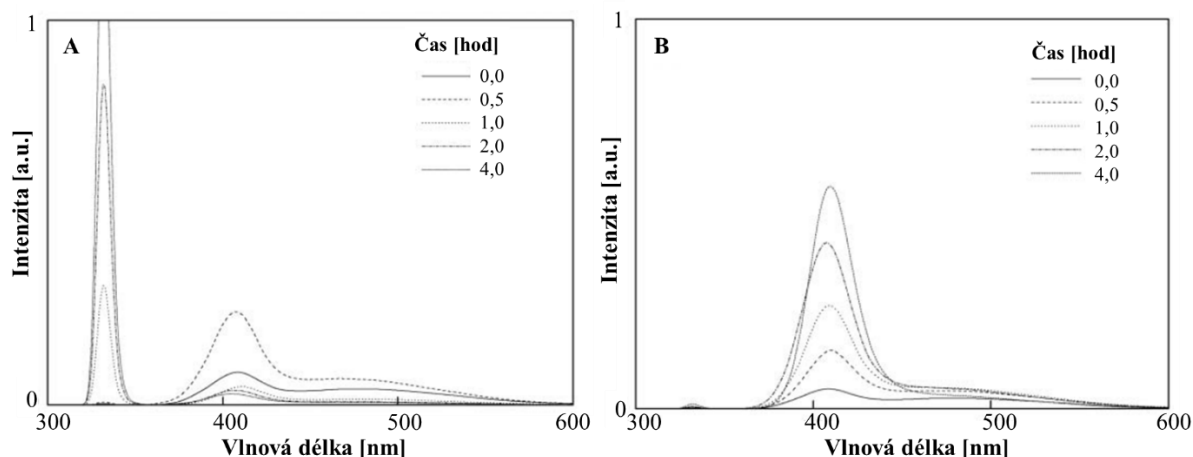
Obr. 17: Graf A znázorňuje absorpční spektrum zformovaných QDs z CdSe, které byly ozařovány UV zářením až 60 minut a absorbance byla měřena v 5 minutových intervalech. Graf B znázorňuje fluorescenční spektrum měřené za stejných podmínek. U obou grafů si lze všimnout bathochromního posunu vlnových délek. U fluorescenčního spektra si lze všimnout poklesu intenzity fluorescence od 35. minuty. Obrázek D znázorňuje roztoky částic v jednotlivých časech ozáření, které jsou pod UV světlem a které vracejí fluorescence. Stejně roztoky jsou na obrázku E, které jsou pod denním světlem a jeví se tak jako bezbarvé roztoky [44].

Důležitou součástí byla metoda FCS na fluorescenčním konfokálním mikroskopu MicroTime 200. Schéma instrumentace je znázorněna na Obr. 18. Po zapnutí UV LED (250 nm) se začaly tvořit QDs z prekursorů CdSe a ty byly pozorovány v konfokálním objemu pomocí excitačního laseru o vlnové délce 367 nm. Doby života byly změřeny metodou FCS (fluorescenční korelační spektroskopie), kdy jsou zaznamenány časové fluktuace intenzity fluorescence. Podle doby výskytu jednotlivých QDs CdSe může být vznik kvantových teček rozdělen do 5 částí, kdy každá je charakterizována délkou intervalu v sekundách (Obr. 18). Díky dekonvoluci časových průběhů byly tyto intervaly studovány odděleně pomocí dob život jednotlivých intervalů. Výsledkem bylo, že delší čas ozařování UV zářením vede ke zvýšení průměrné doby života. Kromě zvyšující se doby života byla zaznamenána i zvyšující se koncentrace CdSe QDs. Výhodou této syntézy je tvorba kvantových teček i ve velmi malém objemu (kapka o objemu cca 15 μl), díky tomu by byla poměrně nízká spotřeba chemikálií. Nejlepší výsledky byly pozorovány u prekursorů CdSe a CdTe, které vykazovaly nejlepší absorpční i fluorescenční vlastnosti. Nevýhodou je ale toxicita použitých těžkých kovů [44].



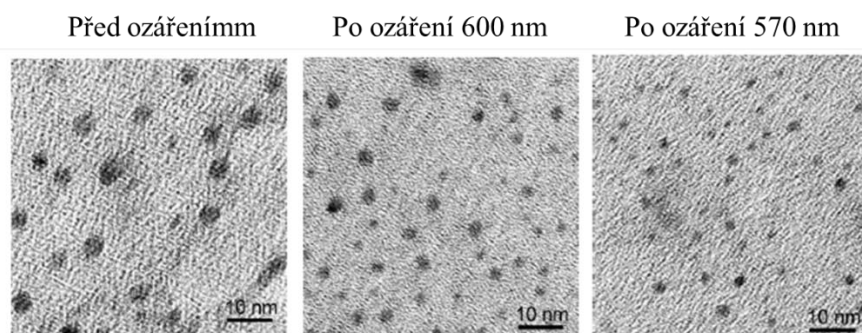
Obr. 18: V levé části obrázku se nachází instrumentace konfokálního fluorescenčního mikroskopu. a- kapka prekursoru na křemenném skle, b-UV LED o $\lambda = 250 \text{ nm}$, c-konfokální objem, d-schématické znázornění tvorby QDs v konfokálním objemu, e-objektiv s vodní imerzí, f,g-laser a optické prvky, h-detektor. Na obrázku vpravo je zaznamenána tvorba CdSe QDs, jejichž časový průběh lze rozdělit do 5 částí o různých časových intervalech [44].

Guo-Yu Lan a spol. se zabývali syntézou kvantových teček ZnSe, které byly stabilizovány kyselinou merkaptopropionovou (MPA). Syntéza probíhala ve vodném prostředí při teplotě $160 \text{ }^\circ\text{C}$, a to po dobu 9 hodin. Takto připravené QDs měly kvantový výtěžek 8,1 %. Po ozáření těchto částic UV lampou po dobu 30 minut došlo ke zvýšení kvantového výtěžku, a to až na 19 %. Nicméně při ozařování docházelo k agregaci kvantových teček ZnSe, což následně vede k nestabilitě tohoto systému. K překonání tohoto problému byly dodatečně přidávány další thiolové sloučeniny, jako je kyselina merkaptojantarová (MSA), kyselina 11-merkaptoundekanová a kyselina thioglykolová. Tyto sloučeniny byly do roztoku přidávány postupně během ozařování. Velikost a funkční skupiny thiolových sloučenin mohou hrát důležitou roli při určování optických vlastností a stability QDs ZnSe. Vyšší kvantový výtěžek, vyšší stabilitu i intenzitu fluorescence vykazovaly QDs při použití kyseliny merkaptojantarové. Dokonce jsou QDs ZnSe méně toxické než CdSe. Takto připravené QDs by mohly být lépe využitelné při biologickém značení molekul. Fluorescenční spektra jsou zobrazena na Obr. 19 [45].



Obr. 19: Porovnání spekter ZnSe QDs před (A) a po (B) přidání kyseliny MPA, která byla do roztoku přidána před ozáření UV lampou při vlnové délce 325 nm. Také je zde patrný rozdíl v intenzitě fluorescence v závislosti na čase ozařování. Čím delší čas ozařování, tím nižší intenzita fluorescence [45].

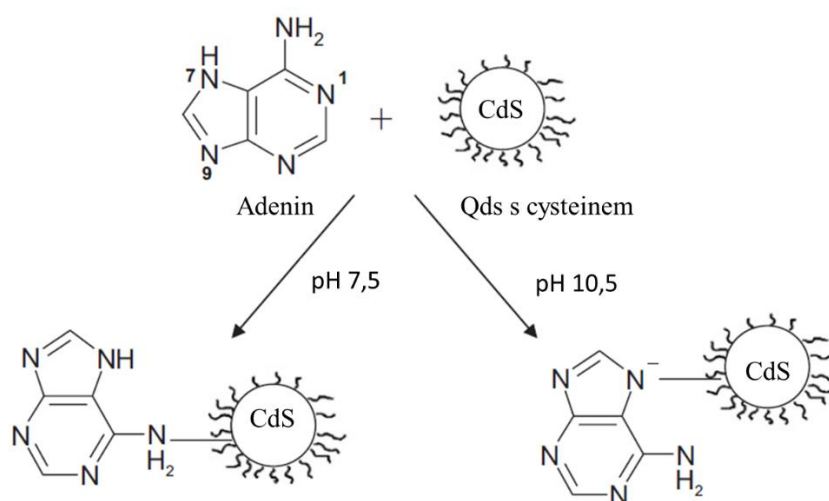
Uematsu a spol. se zabývali alternativní metodou syntézy kvantových teček, a to působením záření, díky čemuž by byla možná velmi jemná úprava velikosti těchto částic a zároveň možná příprava částic s požadovanými fluorescenčními vlastnostmi. Konkrétně se jedná o studium vlivu záření na thiolově zakončené CdTe QDs s poměrně vysokým kvantovým výtěžkem (49 %). Tato metoda je založena na fotokorozi částic fotogenerovanými oxidačními otvory v přítomnosti kyslíku, který zachycuje excitované elektrony. Roztok s příslušnými komponentami byl ozářen v křemenné kyvetě, a to při vlnové délce 580 nm. Roztok v kyvetě byl probubláván vzduchem, čímž byl zajištěn přívod kyslíku. Absorpční a fluorescenční spektra byla měřena průběžně během ozařování. K ozáření bylo použito monochromatické záření o vlnové délce vyšší, než je energie potenciálové jámy a ozařování bylo zastaveno v momentě, kdy se tyto energie vyrovnaly. Nejdříve byly experimenty provedeny v neutrálním prostředí, kdy bylo zjištěno, že ozáření v tomto prostředí způsobuje depozici telluru na částicích, což zabraňuje úspěšné fotokorozi a nelze tak provést požadovanou úpravu velikosti vznikajících kvantových teček. Proto byly vzorky připraveny v alkalickém prostředí. Ozařování při 580 nm způsobilo, že čím delší čas ozáření, tím byl fluorescenční pík ostřejší a zúžila se tak distribuce velikosti CdTe kvantových teček. Kvantový výtěžek zůstal i po ozáření vysoký, hodnota se pohybovala kolem 45 %. Dále bylo zjištěno, že s měnící se vlnovou délkou budícího záření se značně měnila velikost vznikajících kvantových teček. Konkrétně změna 2 nm u budícího záření odpovídá změně ve velikosti částic o 0,02 nm. Zmenšení distribuci velikosti byla potvrzena metodou TEM, kdy bylo potvrzeno, že QDs vykazující fluorescenční maximum při 606 nm měly před ozáření skutečný průměr 5,62 nm. Po ozáření při vlnové délce 600 nm došlo ke zmenšení velikosti částic na 3,43 nm, při vlnové délce 570 nm na velikost 2,85 nm. Rozdíly ve velikosti jsou patrné na Obr. 20 [46].



Obr. 20: Porovnání velikosti částic pomocí metody TEM před ozářením, kdy činila velikost částic 5,62 nm. Po ozáření při vlnové délce 600 nm se velikost částic zmenšila na 3,43 nm a při vlnové délce 570 nm se velikost zmenšila na 2,85 nm [46].

3.2 Interakce kvantových teček s organickými molekulami

Chatterjee A. a spol. se zabývali interakcí nukleotidů s kvantovými tečkami CdS, které byly na povrchu funkcionalizované aminokyselinou cysteinu. Připojením organické molekuly na povrch QDs by měla být snížena toxicita těchto částic, tak by mohly být aplikovatelné pro bio-aplikace, jako je např. fluorescenční značení nukleových kyselin. Čímž by QDs mohly nahradit klasické organické fluorofory, které nemají tak dobré fluorescenční vlastnosti. Konkrétně se tato práce zabývá změnou fluorescenčních vlastností QDs s navázaným cysteinem, pokud se na ně naváže některý z nukleotidů (ATP, CTP a GTP) a nukleovými bázemi (adenin, cytosin, thymin). Fluorescence byla studována pomocí luminiscenčního spektrometru. Během experimentu bylo zjištěno zvýšení luminiscence při dvou hodnotách pH (7,5 a 10,5), které je specifické pro adenin. Vazba mezi adeninem a QDs s navázaným cysteinem je zobrazena na Obr. 21. Jiné nukleové báze nezpůsobují žádnou znatelnou změnu fluorescence ani při bazickém ani při neutrálním pH. Mezi zmiňovanými nukleotidy zvyšoval intenzitu fluorescence přítomnost ATP. Tyto výsledky mohou být dále nápomocné při identifikaci a kvantifikaci adeninových nukleotidů v biologických vzorcích [47].



Obr. 21: Interakce mezi adeninem a QD funkcionalizovanou cysteinem při různé hodnotě pH [47].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

| | |
|------------------------|-----------------------------------|
| Agaróza: | Serva CAS: 9012-36-6 |
| S-adenosylmethionin: | Sigma-Aldrich CAS: 29908-03-0 |
| S-adenosylhomocystein: | Sigma-Aldrich CAS: 979-92-0 |
| Cystein: | Sigma-Aldrich CAS: 52-90-4 |
| Homocystein: | Sigma-Aldrich CAS: 454-29-5 |
| Glutathion disulfid: | Sigma-Aldrich CAS: 103239-24-3 |
| Octan zinečnatý: | Sigma-Aldrich CAS: 557-34-6 |
| Octan kademnatý: | Sigma-Aldrich CAS: 543-90-8 |

4.2 Použité přístroje

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Fluorescenční konfokální mikroskop: | MicroTime 200 PicoQuant GmbH |
| Fluorescenční spektrofotometr: | FS5 Edinburgh Instruments |
| TCSPC spektrofluorometr: | FluoroCube HORIBA Scientific |

4.3 Shrnutí cílů práce

Na základě vypracované literární rešerše na danou problematiku v kapitole 3 a na základě spolupráce s Mendelovou univerzitou v Brně, Ústavem chemie a biochemie, byly vybrány vhodná redukční činidla na bázi síry pro generování fluorescenčních komplexů pomocí UV záření. Z této spolupráce vznikl klíčový článek pro tuto diplomovou práci, kde ze zkoumaných prekurzorů (CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe) vykazoval nejvyšší intenzitu fluorescence, nejvyšší kvantový výtěžek a stabilitu roztok s prekurzory CdSe stabilizovaný kyselinou merkaptojantarovou (MSA). Na základě tohoto výsledku byly k experimentům, které jsou součástí této práce, použity prekurzory obsahující kadmium. U kadmia je ale známý problém s toxicitou, a proto byl vybrán jako další kov zinek, který se běžně vyskytuje v buňkách. Pro kombinaci Zn:Cd byla na základě výše zmiňovaného článku použita kyselina MSA, jako stabilizující sirmá sloučenina. U tohoto typu prekurzoru bylo na Mendelově univerzitě v Brně potvrzeno, že velikost vzniklých částic se pohybuje v jednotkách nanometrů, a odpovídá tak velikosti kvantových teček. Dále byla na základě literární rešerše zvolena redukční činidla na bázi síry ke kombinaci se zinkem v podobě organických molekul, aby se zvýšila

biokompatibilita vzniklých komplexů. Jako sirné organické molekuly byly vybrány SAM (S-adenosylmethionin), SAH (S-adenosylhomocystein), CYS (cystein), HCYS (homocystein) a GSSG (glutathion disulfid). Jedná se o látky, které se běžně vyskytují v buňkách, a navíc obsahují thiolovou skupinu, která vykazuje vysokou afinitu ke kovům, jako je právě například zinek. Po vybrání vhodných prekurzorů bylo cílem práce příprava fluorescenčních komplexů pomocí UV záření a vzniklé fluorescenční komplexy charakterizovat na základě jejich spektrálních a temporálních vlastností. Závěrem této práce je hodnocení vlivu stabilizujících sirných sloučenin na doby života a diskuze spektrálních vlastností.

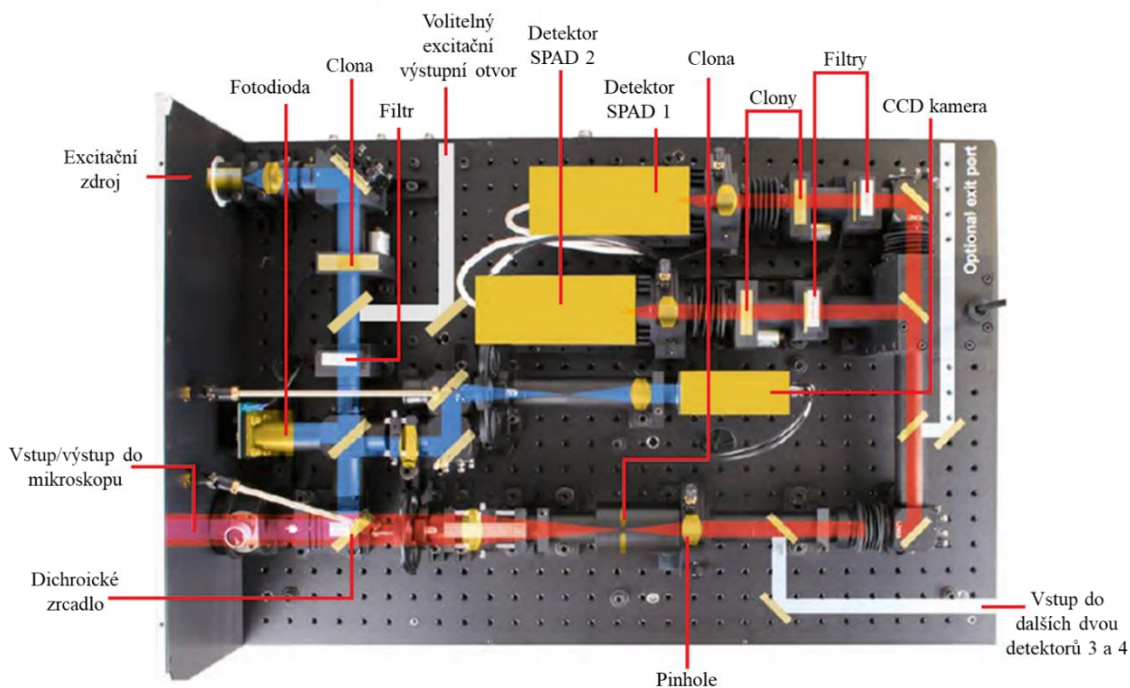
4.4 Pracovní postupy

4.4.1 Příprava roztoku prekurzorů

Dohromady bylo připraveno šest různých roztoků s následující kombinací prekurzorů: Zn:Cd-MSA, Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS, Zn:HCYS a Zn:GSSG. K přípravě zásobních roztoků byl použit fosfátový pufr o koncentraci 80 mM a o pH 7. Jako zdroj zinku byl využit 6 mM octan zinečnatý. V případě prekurzorů zinku a CYS, HCYS a GSSG bylo do zkumavky smícháno 500 μ l octanu zinečnatého, 250 μ l fosfátového pufru a 250 μ l zásobního roztoku příslušné druhé komponenty o koncentraci 2,4 mg/ml. Zásobní roztoky prekurzorů Zn:SAM a Zn:SAH byly připraveny ve stejném složení, akorát koncentrace zásobního roztoku SAM a SAH činila 1 mg/ml. V případě prekurzorů kadmia a zinku byl jako zdroj kadmia použit octan kademnatý o koncentraci 6 mM. Dále bylo nutné přidat stabilizační činidlo ve formě kyseliny MSA o koncentraci 2,4 mg/ml. Do zkumavky bylo smícháno 430 μ l octanu zinečnatého, 70 μ l octanu kademnatého, 250 μ l fosfátového pufru a 250 μ l MSA. Všechny roztoky prekurzorů byly připraveny na Mendelově univerzitě v Brně na Ústavu chemie a biochemie.

4.5 Měření a vyhodnocení dat FLIM

Měření metody FLIM bylo realizováno na fluorescenčním konfokálním mikroskopu MicroTime 200, který se skládá z několika částí. Tělem je mikroskop Olympus IX71. Využíván byl objektiv s vodní imerzí UPLSAPO s 60násobným zvětšením a numerickou aperturou 1,2. Skenování je umožněné díky skeneru s piezoelektrickým posuvem. Důležitou součástí je tzv. hlavní optická jednotka MOU (Main Optical Unit) znázorněna na Obr. 22. Zdrojem záření jsou pulzní pikosekundové diodové lasery s různými vlnovými délkami (375, 470, 510 a 640 nm) a různou polarizací (horizontální nebo vertikální). Laserový paprsek o zvolené vlnové délce a polarizaci je přiváděn z jednotky LCU (Laser Combining Unit) do MOU, kde projde přes fotodiodu, která poskytne informace o intenzitě vysílaného paprsku. Následně paprsek dopadá na dichroické zrcadlo, které je zvoleno podle vlnové délky laseru. Excitační záření o dané vlnové délce je odraženo směrem do mikroskopu, kde prochází přes objektiv ke vzorku. Vzorek emituje záření, které se vrací zpět přes objektiv k dichroickému zrcadlu, které propustí záření o určité vlnové délce. Za dichroickým zrcadlem může být umístěn emisní filtr a záření pokračuje přes pinhole k detektorům. MicroTime 200 disponuje dohromady čtyřmi detektory. Dva se přímo nacházejí v jednotce MOU, jedná se o tzv. SPAD detektory (Single Photon Avalanche Diodes) s časovým rozlišením lepším než 350 ps. Zbylé detektory se nacházejí ve vedlejší optické jednotce.



Obr. 22: Schéma hlavní optické jednotky (Main Optical Unit – MOU), kde modrá barva znázorňuje excitační paprsek a červená barva emisní paprsek [48].

Pro genezi fluorescenčních komplexů bylo zvoleno následující nastavení. Jako zdroj záření byl zvolen laser o vlnové délce 375 nm ve vertikální polarizaci, ke kterému bylo zvoleno dichroické zrcadlo 375_{RDC}. Frekvence laseru byla nastavena na 40 MHz, jeho intenzita se pohybovala okolo 1 200 a.u. (přepočít intenzity pro použitý laser a dichroické zrcadlo byl 92,4 μ W). K měření byl zvolen detektor SPAD 2. Kvůli vysoké intenzitě fluorescence byly použity dva emisní filtry. Před pinhole byl použit filtr HQ405LP od Chroma Technology Corporation. Díky tomuto filtru byl eliminován signál pocházející z Ramanova rozptylu v rozpouštědle vzorku, čímž je nejčastěji voda. Před detektor byl pak zvolen neutrální filtr OD2, který emitované záření zeslabil 100násobně. Veškeré potřebné nastavení bylo provedeno v softwaru SymPhoTime 64, kde bylo provedeno i vyhodnocení dat. Pro účely experimentu byla zvolena metoda FLIM spojená s metodou Time Trace.

4.5.1 Příprava vzorku na měření

Z roztoku prekurzoru bylo odebráno 25 až 30 μ l. Tento objem byl napipetován na krycí sklíčko o tloušťce 25 μ m. K vzorku bylo přidáno cca 250 μ l 2% roztoku agarózy. Tím byl samotný vzorek i vznikající fluorescenční komplexy zafixovány.

4.6 Měření fluorescenčních spekter pomocí fluorimetru

K měření excitačních i emisních spekter byl použit fluorescenční spektrofotometr FS5, který v základní konfiguraci umožňuje měření v ustáleném stavu (steady-state). V této konfiguraci poskytuje, jak zmíněná excitační a emisní spektra, tak také emisní mapy. Excitační spektrální rozsah měření je od 230 do 1 000 nm, emisní spektrální rozsah od 200 do 870 nm. Jako zdroj záření je zde xenonová výbojka, za níž se nachází excitační monochromátor, díky němuž projde excitační záření o dané vlnové délce ke vzorkové komoře s držákem, ve kterém je umístěna kyveta se vzorkem. Následuje emisní monochromátor. Jak u excitačního, tak

u emisního monochromátoru, se jedná o tzv. Czerny-Turner monochromátor s rovinnými difrakčními mřížkami a vysokou účinností pro potlačení nežádoucího světla. V excitační i emisní dráze je umístěn karusel s optickými filtry, který je plně automatický. Za emisním monochromátorem se nachází emisní detektor, fotonásobič. V tomto systému se také nachází referenční detektor, který kontroluje intenzitu excitačního svazku. Jedná se o UV citlivou Si fotodiodu. V spektrofotometru je možné měnit vzorkové komory, tzv. moduly. Pro účely měření spekter byl zvolen modul SC-05, tzv. standardní modul s jednoduchým držákem kyvety. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Veškeré potřebné nastavení a vyhodnocení dat bylo provedeno v softwaru Fluoracle.

4.7 Měření dob života pomocí TCSPC spektrofluorometru

K měření dob života byl použit TCSPC spektrofluorometr FluoroCube HORIBA. Jako excitační zdroj jsou zde použity NanoLED diody o různých vlnových délkách (250 až 650 nm) s pracovní frekvencí 1 MHz. Budící záření prochází do měřicí cely s nástavcem až pro čtyři kyvety, kde je umístěn vzorek. Emitované záření prochází přes emisní monochromátor Seya-Namioka s rozsahem 200-800 nm k detektoru. Jedná se o detektor typu IHB TBX-04 s rozlišením 20 ps/kanál. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Veškeré nastavení přístroje a následné vyhodnocení dat bylo provedeno v příslušném softwaru DataStation DAS6.

Pro konkrétní vzorky byly použity různé diody o různých vlnových délkách (250, 280 a 330 nm), které byly zvoleny dle excitačních spekter naměřených na fluorimetru. Emisní monochromátor byl nastaven na konkrétní vlnovou délku dle naměřených emisních spekter na fluorimetru. Pro měření dob života je důležité měření referenčního vzorku, čímž byl Ludox.

4.8 Vyhodnocená doby života

Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno v programu DAS6, který pracuje na principu nejmenších nelineárních čtverců. Vyhodnocení probíhá z naměřených vyhasínacích křivek fluorescence, a to proložením 1 až 5 exponenciálních funkcí. Obecný tvar této funkce je následující:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right), \quad (6)$$

kde t je čas, A představuje korekční parametr, B je tzv. předexponenciální funkce související s relativním zastoupením emitující látky ve vzorku a τ je doba života, kterou chceme pro daný vzorek zjistit.

Zda se soubor dat shoduje s matematickým modelem, kterým byla data proložena, je zjištěno pomocí parametru χ^2 . Tento parametr lze získat z následující rovnice:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \quad (7)$$

kde $N(t_k)$ odpovídá naměřeným datům a $N_c(t_k)$ příslušnému matematickému modelu a v této rovnici jsou tyto dva parametry mezi sebou porovnávány. Proměnná n pak představuje počet dat (kanálů), která jsou pro danou analýzu použita a σ_k je standardní odchylka každého datového

bodu. Nevýhodou parametru χ^2 je jeho závislost na množství dat, proto je vhodnější používat k interpretaci dat redukovanou správnost proložení χ_R^2 , která je nezávislá od množství dat. Tuto hodnotu lze získat z rovnice:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{v}, \quad (8)$$

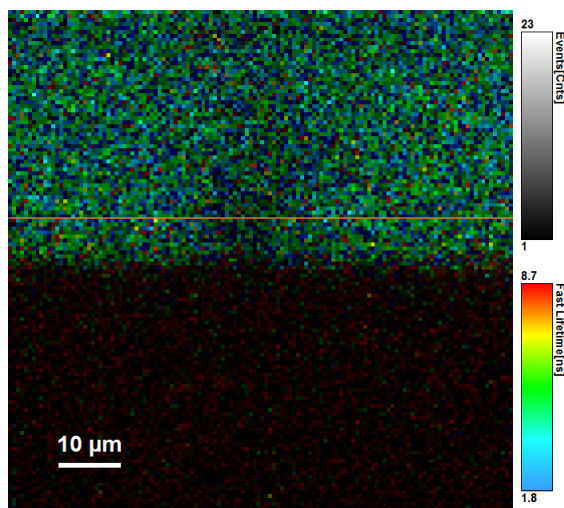
kde n odpovídá počtu bodů, p je počet parametrů volnosti a v představuje počet stupňů volnosti. Parametr χ_R^2 by se správně měl pohybovat v rozmezí 0,8 až 1,2. Pokud se v souboru dat budou vyskytovat jen náhodné chyby, bude se tato hodnota pohybovat kolem hodnoty 1 a rozložení kolem osy x bude rovnoměrné. Pokud bude tento parametr mnohem vyšší než 1, tak se zvolený matematický model nebude shodovat s naměřenými daty.

Výsledkem měření je vyhasínací křivka, která má exponenciální charakter, a proto se pro osu y standardně používá logaritmické měřítko. Dále pro každé vyhodnocení je získána reziduální analýza, jedná se o rovnoměrné rozložení odchylek v daném časovém rámci.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Tvorba fluorescenčních komplexů – metoda FLIM

Geneze fluorescenčních komplexů byla realizována pomocí metody FLIM na přístroji MicroTime 200. Pro tato měření byly zvoleny roztoky prekurzorů Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS, Zn:GSSG a Zn:Cd. Tyto vzorky byly zafixovány na krycí sklíčko 2% roztokem agarózy. Vzhledem k tomu, že už se nejedná o kapalné vzorky, ale o gel, tak je vyšší riziko rozptylu laserového záření v objemu vzorku. Je tedy vhodné laserový paprsek fokusovat těsně nad krycí sklíčko, na kterém je nanesený gel. K tomu je nejdříve nutné provést tzv. *xz* sken (případně *yz* sken). Maximální velikost obrázku je $80 \times 80 \mu\text{m}$, u něj lze zvolit rozlišení obrázku, a to nastavením počtu pixelů, které jej budou tvořit. Poté se zvolí dwell time, jedná se o čas, který nám určí, jak dlouho se budou zaznamenávat informace z jednoho pixelu. Tzn. že počet pixelů bude mít přímý vliv na délku měření. Pro tato prvotní zaměření není nutné mít obrázek v nejvyšším rozlišení, proto se volí velikost 128×128 pixelů, a proto se volí i minimální dwell time v nabídce softwaru dle nastavení. Po naskenování by mělo být patrné rozhraní mezi sklem a vzorkem, které je na ukázkou uvedené na Obr. 23. Po získání skenu *xz* byl následně zvolen sken *xy*, kdy je nutné nastavit souřadnici osy *z*, tak aby odpovídala cca $5 \mu\text{m}$ nad rozhraním krycí sklíčko-gel.

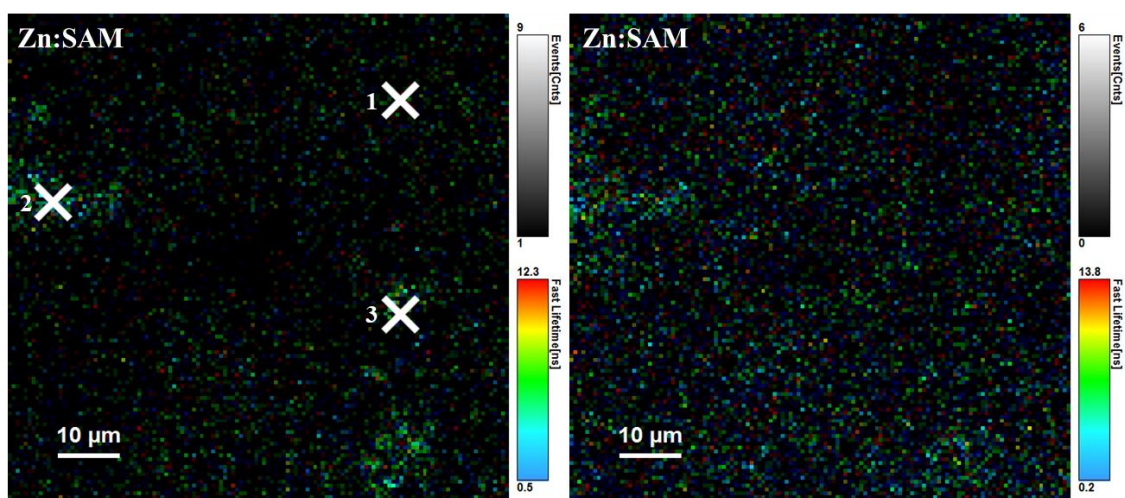


Obr. 23: Ukázka rozhraní mezi krycím sklíčkem (dolní polovina obrázku) a vzorkem ve formě gelu (horní polovina obrázku). Oranžovou čarou je naznačeno měření skenu *xy*, které probíhá $5 \mu\text{m}$ nad nalezeným rozhraním.

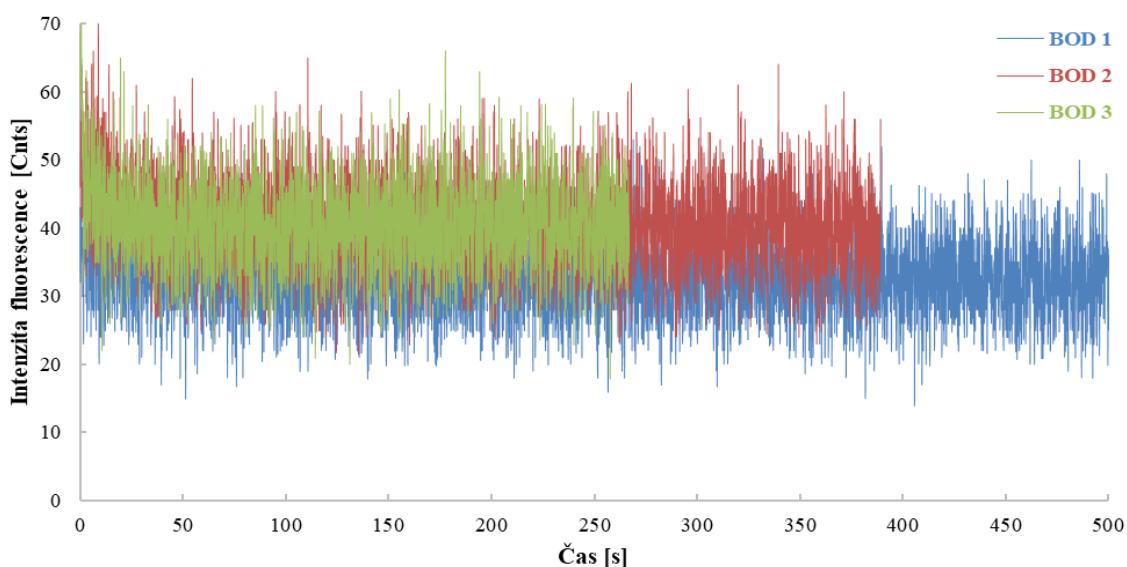
Tímto způsobem byly provedeny všechny prvotní skeny u všech zvolených prekurzorů. Ve skenu *xy* byly vybrány libovolné body, do kterých byl 5 až 8 minut nepřetržitě puštěn laserový paprsek v oblasti UV a ve kterých byla zaznamenána závislost intenzity fluorescence ve formě počtu fotonů na čas. Na základě předchozích experimentů ve spolupráci Fakulty chemické VUT a Ústavu chemie a biochemie na Mendelově univerzitě v Brně byl předpokládán nárůst intenzity fluorescence v čas, který udává tvorbu fluorescenčních komplexů. Během tohoto měření byl zjištěn zásadní vliv přípravy vzorků na genezi fluorescenčních komplexů. Nejdříve byly změřeny vzorky Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS a Zn:GSSG. Ke tvorbě fluorescenčních komplexů došlo jen u prekurzoru Zn:SAH a Zn:GSSG. U prekurzoru Zn:GSSG bylo

pozorováno, že byl vzorek poměrně vyschlý. Vzorky byly připraveny na začátku měření všechny najednou, během nastavení mikroskopu a měření prvních vzorků, agarózové gely s prekurzory postupně vysychaly, což bylo mylně vyhodnoceno, jako chybný způsob přípravy. Proto byl vzorek Zn:GSSG a Zn:Cd připraven znovu, přičemž vzorek s GSSG byl měřen cca 5 minut od přípravy a vzorek s Cd byl měřen cca 40 minut od přípravy. K jednotlivým vzorkům byly pořízeny skeny před a po ozáření a křivky Time Trace, které zaznamenávají změnu intenzity fluorescence v čase.

U prekurzorů Zn:SAM byly vybrány 3 body (Obr. 24). V každém z nich byla změřena změna intenzity fluorescence na čase, tzv. Time Trace (Obr. 25). Pro všechny body má tato závislost stejný průběh, intenzita fluorescence neklesala ani nerostla, držela se na stabilní hodnotě v průměru okolo 40 Cnts, což odpovídá šumu na detektoru. U tohoto typu prekurzoru tedy nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů pomocí UV záření.

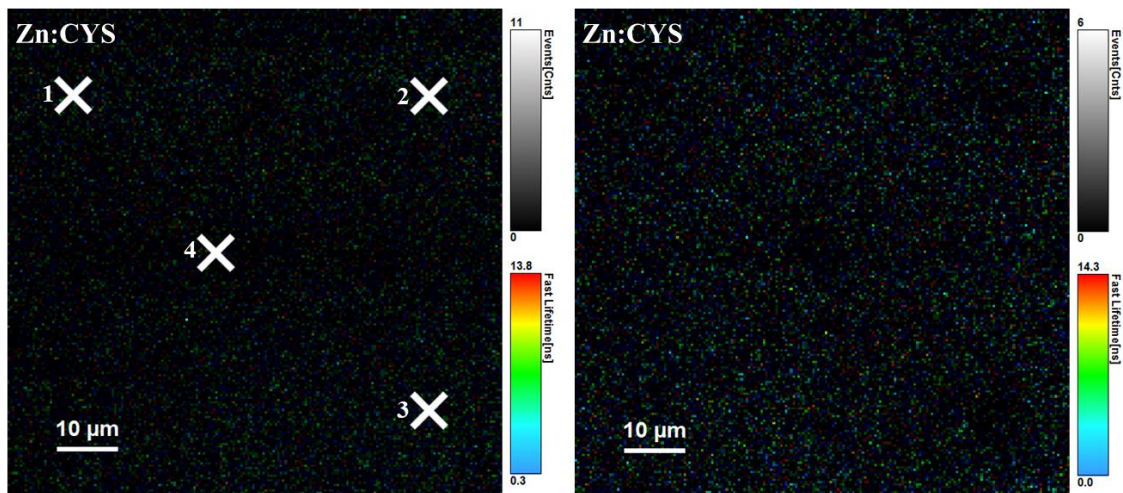


Obr. 24: V levé části se nachází sken před ozáření prekurzorů Zn:SAM, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.

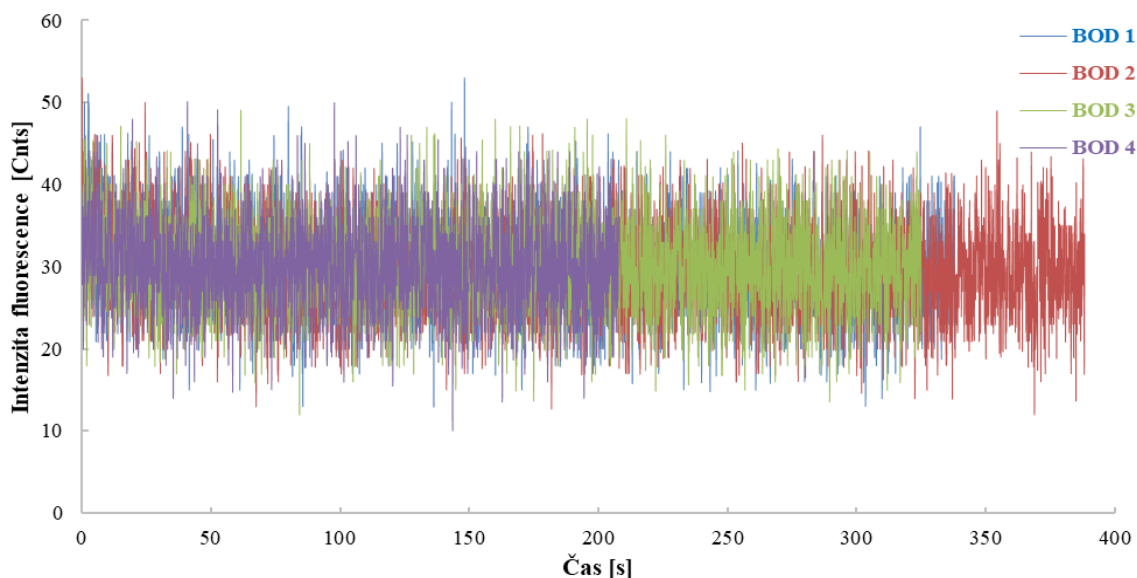


Obr. 25: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAM, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě prekurzorů Zn:CYS. U tohoto vzorku byly vybrány 4 doby, které byly 5 až 8 minut ozářeny UV laserem (Obr. 26). Na základě Time Trace křivky (Obr. 27) nedošlo v žádném z bodů k tvorbě fluorescenčních komplexů. Intenzita fluorescence zůstala na stabilní hodnotě po celou dobu ozáření, která odpovídá taktéž šumu detektoru a pohybuje se v průměru okolo 30 Cnts.

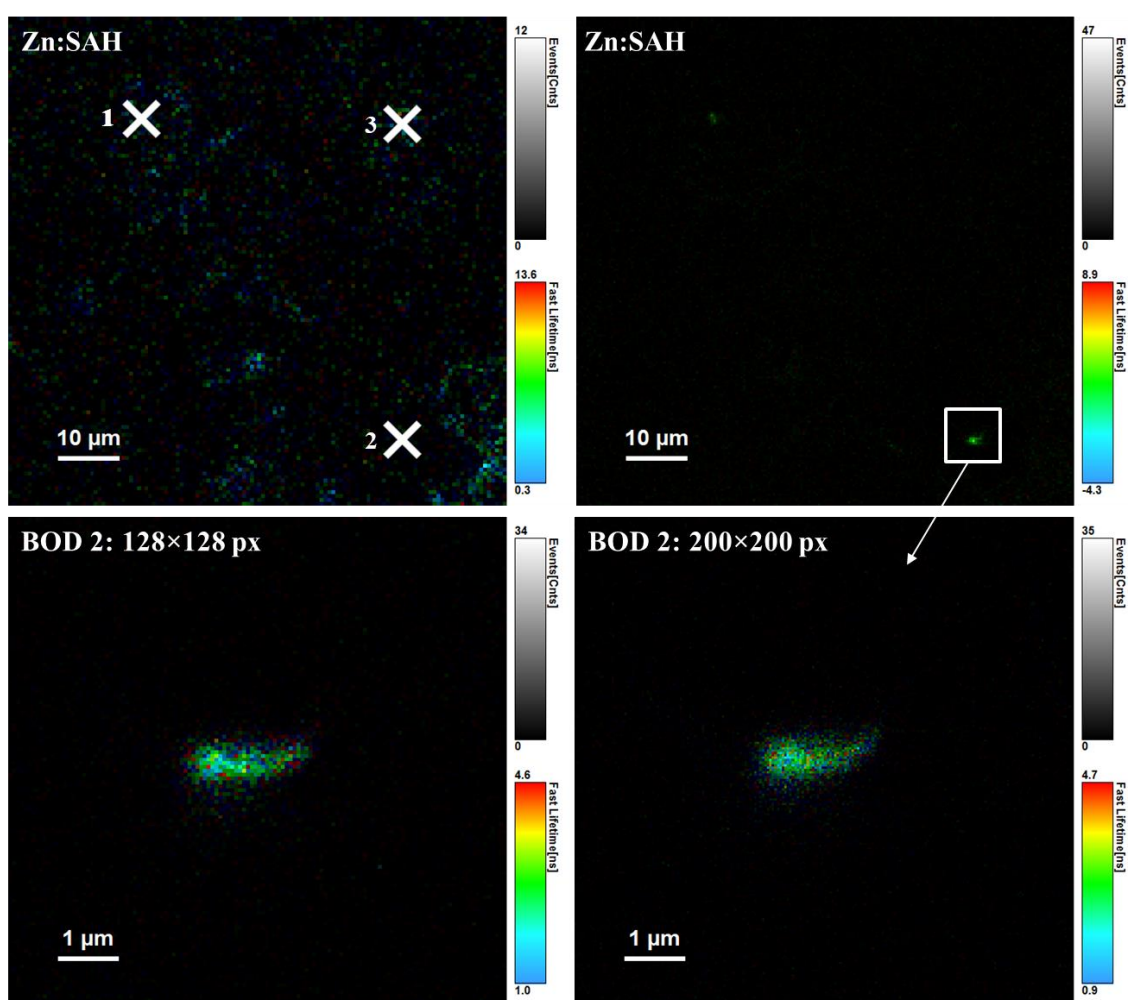


Obr. 26: V levé části se nachází sken před ozáření prekurzorů Zn:CYS, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.

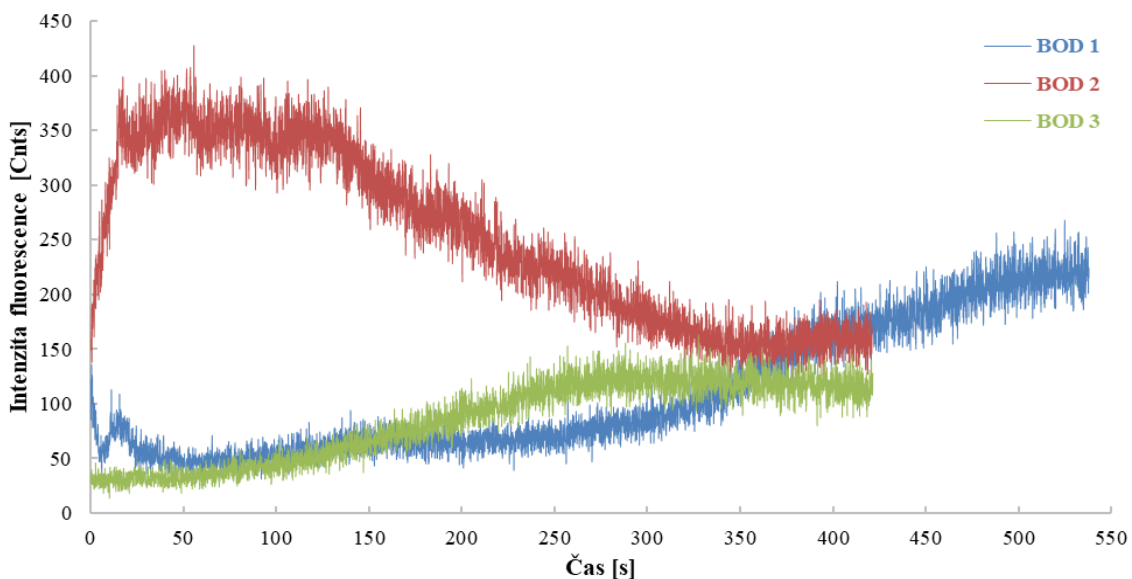


Obr. 27: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:CYS, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů.

Jako další byl změřen vzorek s prekurzory Zn:SAH, kde byly opět vybrány 3 libovolné body pro ozáření UV laserem (Obr. 28). Z celkového skenu po ozáření všech bodů vrací intenzivnější fluorescence komplex z bodu č. 2, intenzita fluorescence začala růst téměř ihned od spuštění měření a rostla až do 140 s a poté začala intenzita klesat, maximální hodnota intenzity fluorescence se pohybovala kolem 375 Cnts (Obr. 29). Méně intenzivní je komplex z bodu č. 1, zde intenzita nejdříve kolísala a pak od 4. minuty rostla, maximální hodnota se pohybovala kolem 225 Cnts. Nejméně intenzivní je komplex z bodu č. 3, který na Obr. 28 není viditelný. Podle křivky TimeTrace je ale patrné, že k tvorbě fluorescenčního komplexu došlo, intenzita fluorescence rostla a až v čase $t = 300$ s začala pomalu klesat. Jeho intenzita je oproti ostatním nejmenší, maximum se pohybovalo kolem 130 Cnts a na celkovém skenu se tento komplex neprojevil. Z dalších výsledků se lze přiklonit i k hypotéze, že mohlo dojít k difúzi tohoto komplexu do okolního prostředí. To je patrné i z detailního skenu vzniklého komplexu z bodu č. 2, který je jakoby posunutý ve směru osy x . To může být zapříčiněné právě jeho pohybem v prostředí.

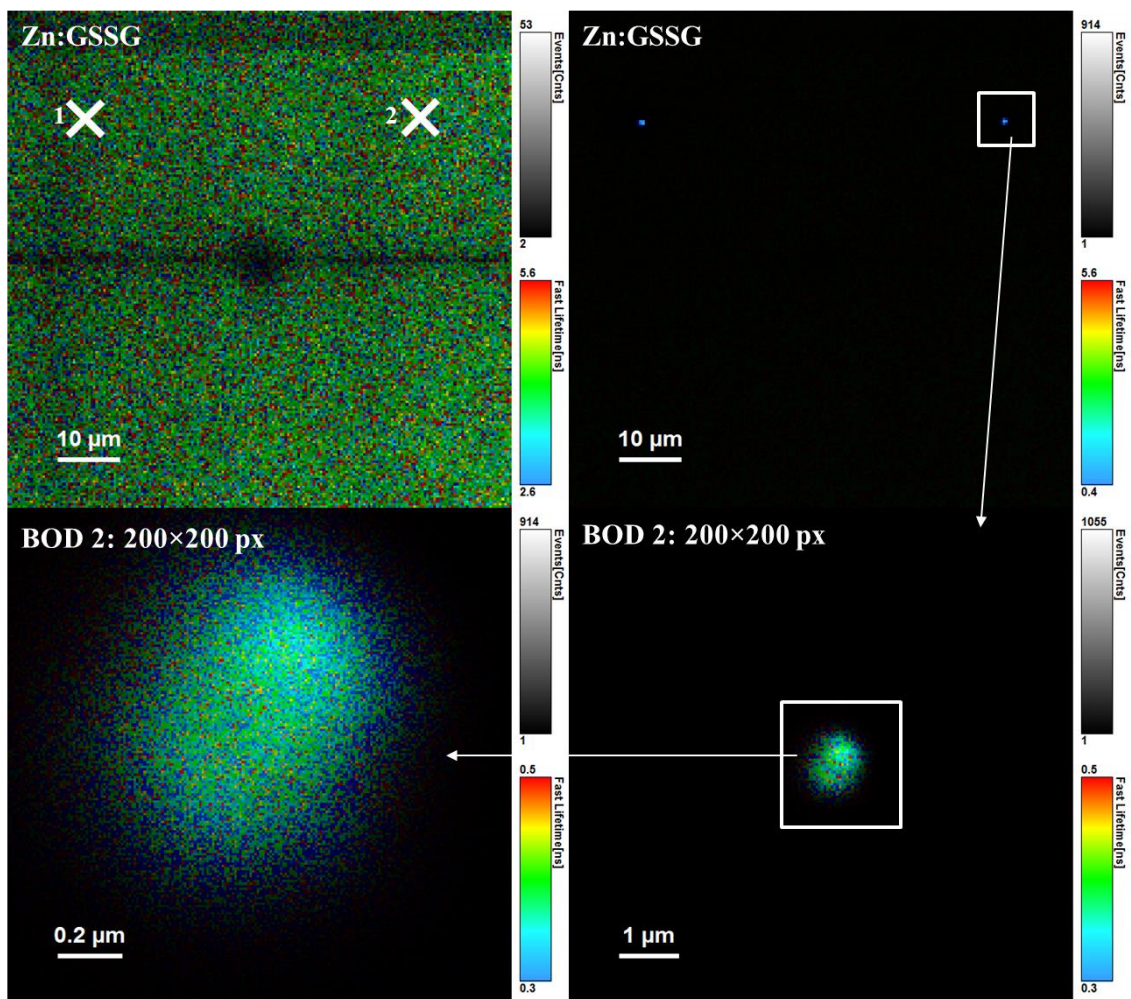


Obr. 28: V levé horní části se nachází sken před ozáření prekurzorů Zn:SAH, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé horní části je sken po ozáření. U tohoto typu prekurzoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní části se nachází detailní sken komplexu, který vznikl ozáření bodu č. 2. Na těchto snímcích lze porovnat rozlišení skenu, v levé části je rozlišení 128×128 pixelů, v pravé části je detailnější sken s rozlišením 200×200 pixelů.

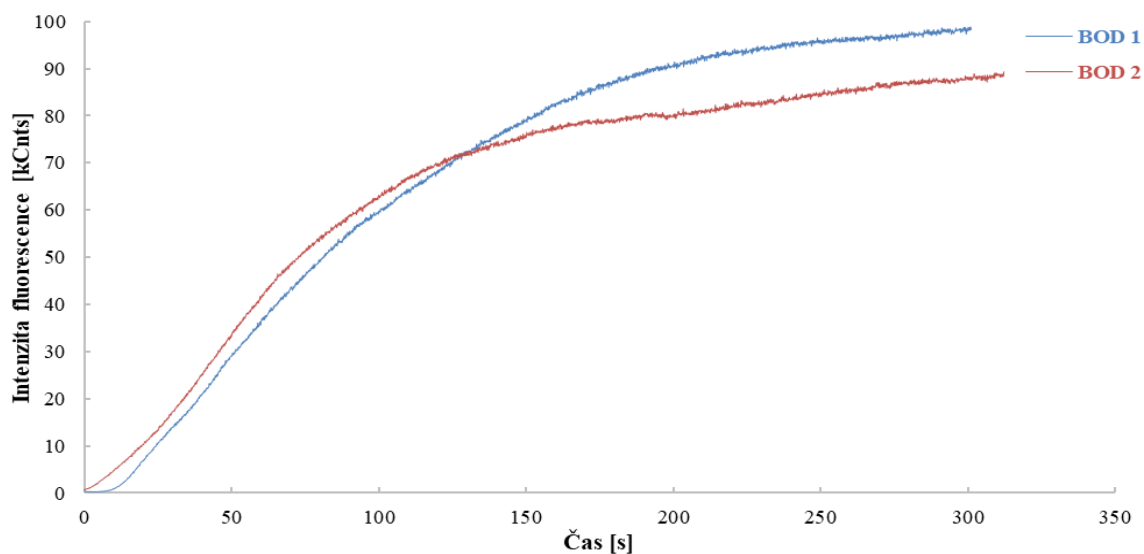


Obr. 29: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAH, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě.

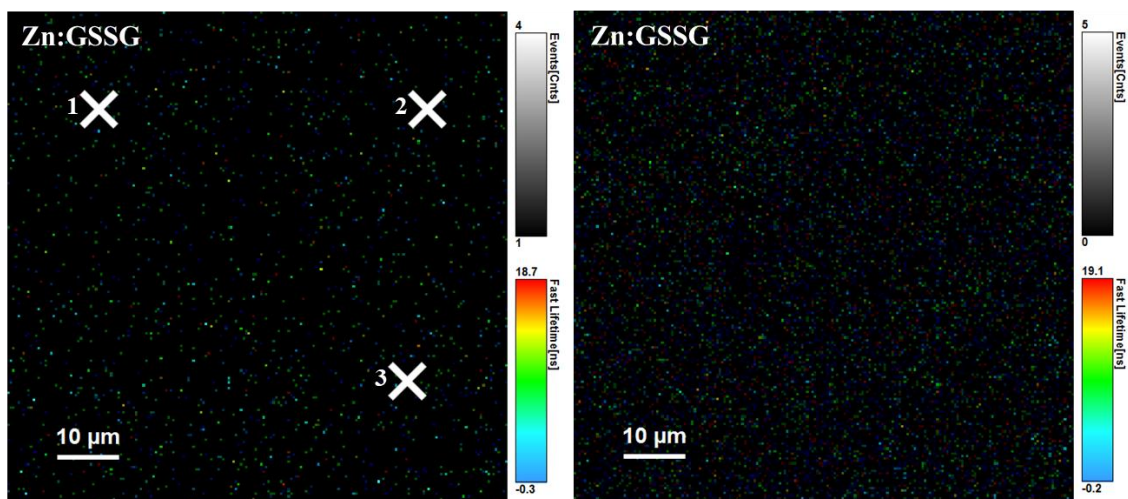
Jak už bylo zmíněno v úvodu, u vzorku Zn:GSSG bylo provedeno dvojí měření. Nejdříve byl změřen vzorek, který byl připraven téměř 3 hodiny před měřením. Ze skenu xy byly vybrány dva body pro ozáření UV laserem (Obr. 30). V obou případech došlo k nárůstu intenzity fluorescence ihned během 10 sekund od začátku ozařování (Obr. 31) a intenzita narostla až k 99 kCnts. Křivka Time Trace má v obou případech podobný průběh. U tohoto vzorku tedy došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V druhém měření byl agarózový gel s prekurzory připraven znovu, ponechán 5 minut zatuhnout a až poté bylo zahájeno měření. K ozáření UV laserem byly vybrány 3 libovolné body. Ani v jednom případě na základě skenu po ozáření (Obr. 32) a Time Trace křivky (Obr. 33) nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů, intenzita fluorescence se pohybuje kolem 25 Cnts, což odpovídá šumu.



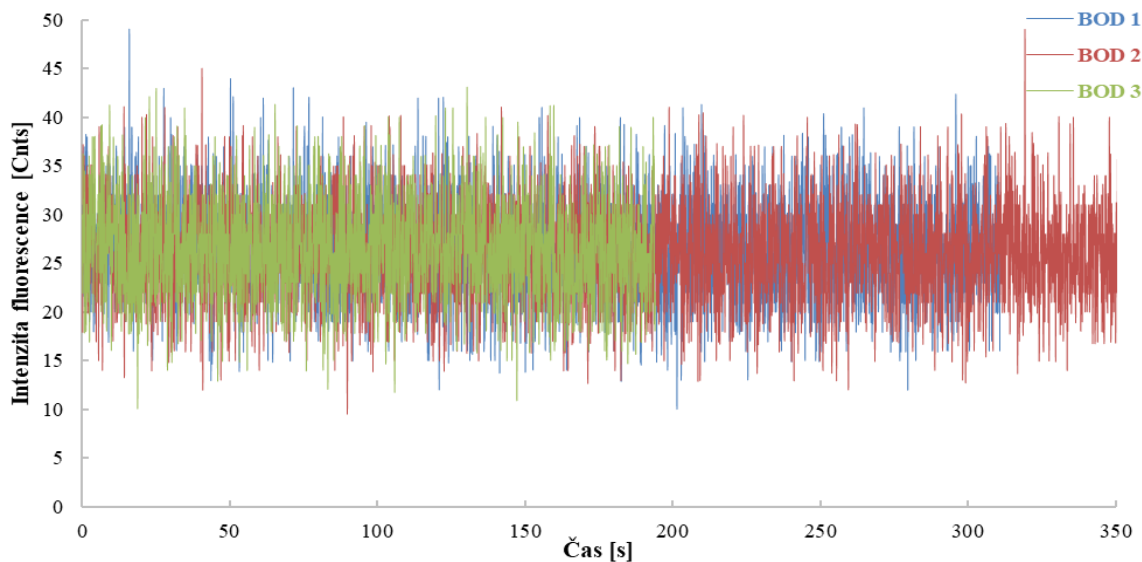
Obr. 30: V levé horní části se nachází sken před ozářením prekurzorů Zn:GSSG, jedná se o vzorek měřený cca 3 hodiny od přípravy, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. Na tomto obrázku si lze také všimnout černé stopy laseru v místě, kde proběhl sken xz. V pravé horní části je sken po ozáření. U tohoto typu prekurzoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní části se nachází detailní skeny komplexu, který vznikl ozářením bodu č. 2.



Obr. 31: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:GSSG, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě.

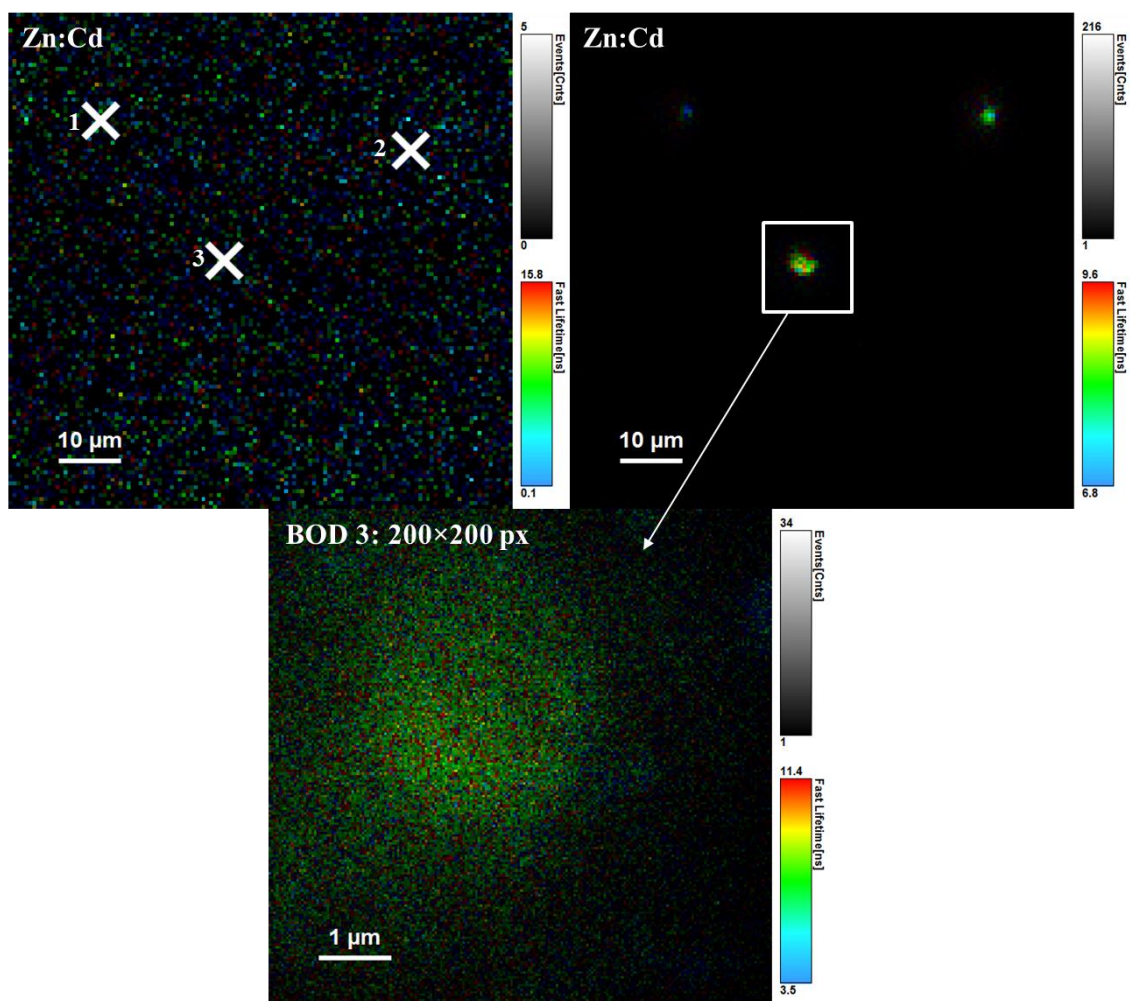


Obr. 32: V levé části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:GSSG, jedná se o vzorek měřený cca 5 minut od přípravy, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.

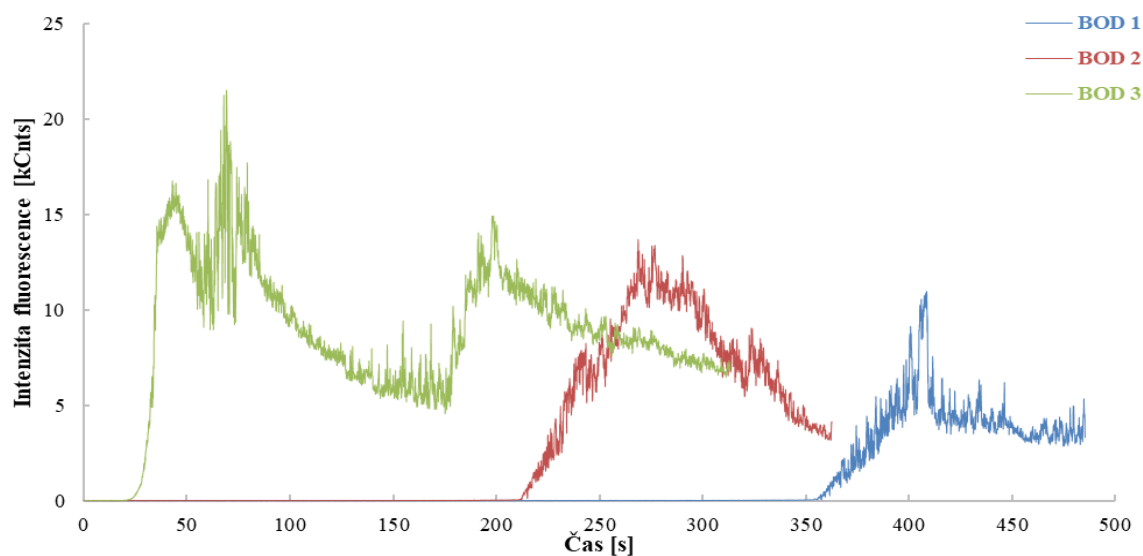


Obr. 33: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:GSSG, který byl měřen po 5 minutách od jeho přípravy. V tomto případě nedošlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v žádném z ozářených míst.

Posledním typem prekursoru byl Zn:Cd, který byl měřen cca po 40 minutách od přípravy. Byly vybrány 3 body, které byly ozářeny UV laserem. Na obrázku (Obr. 34) po ozáření jsou patrné 3 fluorescenční komplexy. Nejnižší intenzitu vykazuje komplex vzniklý ozářením bodu č. 1. Tomu i odpovídá závislost intenzity fluorescence na čase (Obr. 35), jejíž maximum činí necelých 11 kCnts. Podobně je na tom závislost pro komplex vzniklý ozářením bodu č. 2, zde maximum intenzity činí cca 13 kCnts. Obě křivky mají poměrně podobný průběh. Ke tvorbě fluorescenčního komplexu došlo v prvním případě po necelých 6 minutách a v druhém případě po necelých 4 minutách. V obou případech došlo po dosažení maxima k poměrně rychlému poklesu intenzity. Nejvyšší intenzitu vykazuje komplex z bodu č. 3, a to cca 20 kCnts. Intenzita fluorescence v čase poměrně kolísala, ale za to k tvorbě došlo po 20 sekundách od začátku měření.

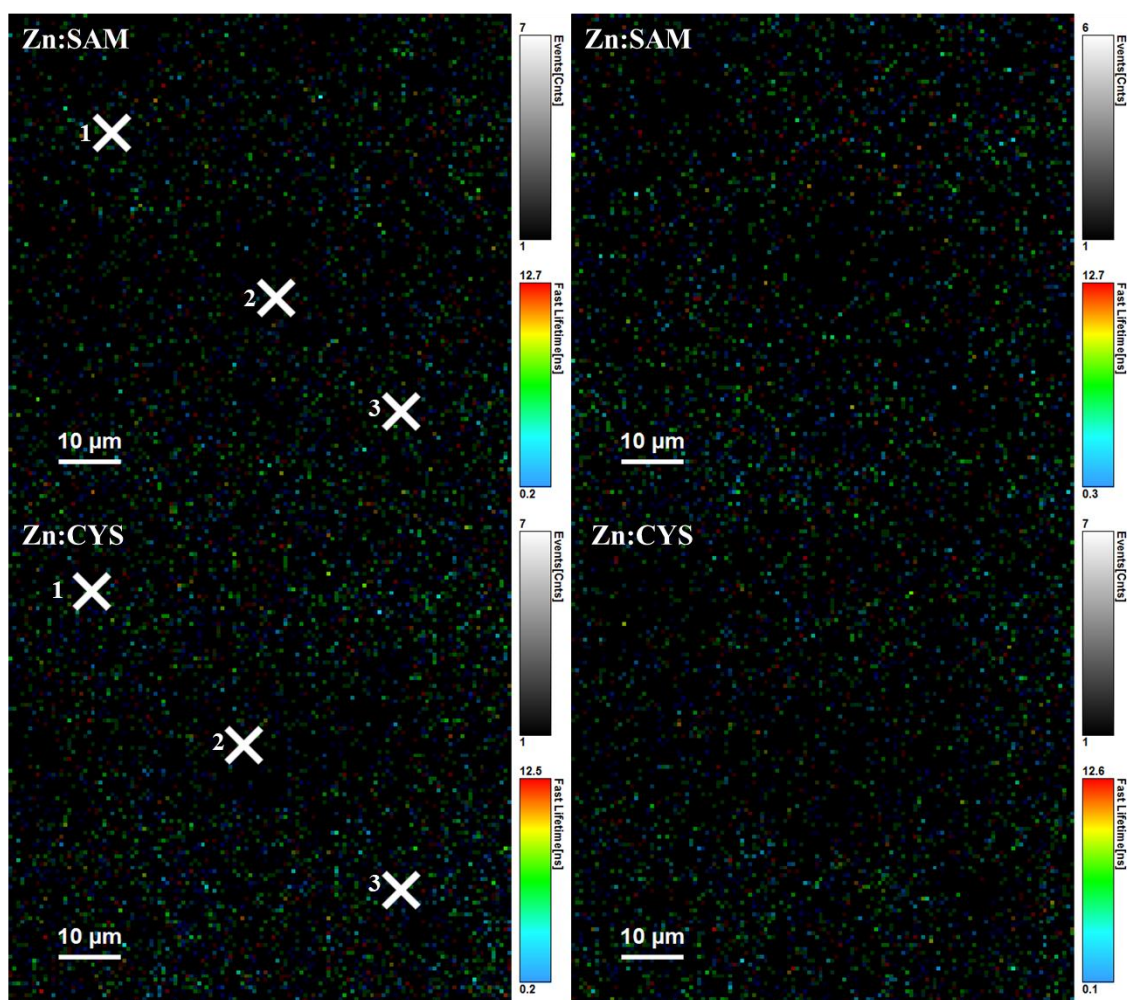


Obr. 34: V levé horní části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:Cd, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé horní části je sken po ozáření. U tohoto typu prekursoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní části se nachází detailní sken komplexu, který vznikl ozáření bodu č. 3. Tento sken je poměrně rozmazaný, což může být způsobené posunem fluorescenčního komplexu v daném prostředí.



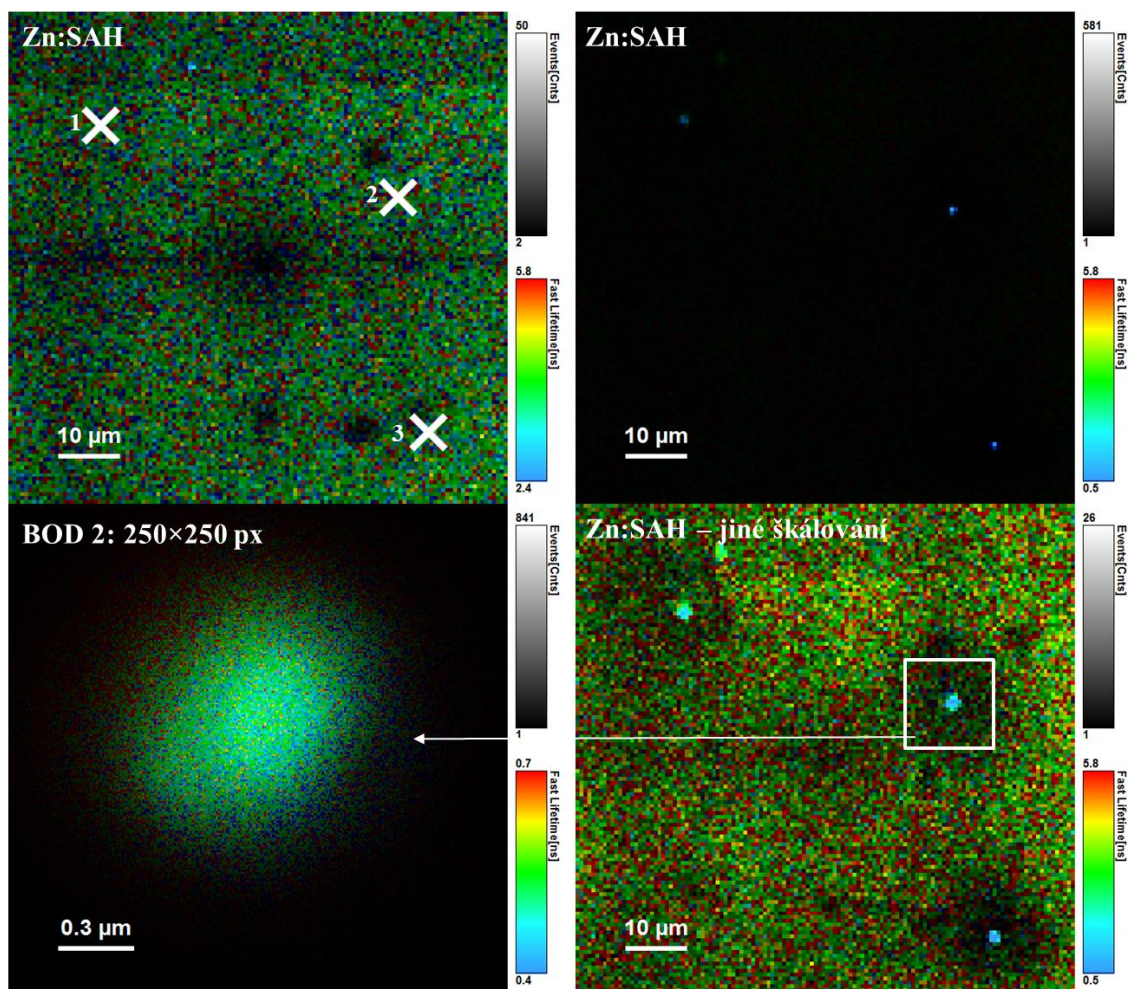
Obr. 35: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:Cd, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě.

Na základě těchto rozdílných výsledků s rozdílným způsobem přípravy bylo měření provedeno ještě jednou. V případě, kdy byl ke vzorkům přidán 2% roztok agarózy a měření proběhlo po 5 minutách od přípravy, nebyla ani v jenom typu prekurzoru pozorována tvorba fluorescenčních komplexů (skeny před a po ozáření UV laserem a grafy Time Trace jsou uvedeny v kapitole 9.1). Naopak v případě, kdy byly vzorky ponechány 2 hodiny a až poté byly měřeny, byl pozorován stejný průběh, jako u prvního měření, které je sepsané výše. U prekurzoru Zn:SAM ani Zn:CYS nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. K ozáření UV laserem byly v obou případech vybrány 3 body, ani v jednom z nich žádné komplexy nebyly pozorovány. Stejně tak nebyl pozorován nárůst intenzity fluorescence. Skeny pro oba typy prekurzorů jsou zobrazeny na Obr. 36. Hodnota intenzity pro vzorek s prekurzory Zn:SAM se pohybovala v průměru kolem hodnoty 45 Cnts. Pro vzorek s prekurzory Zn:CYS je průměrná intenzita také kolem 45 Cnts, to odpovídá šumu detektoru. Příslušné závislosti intenzity fluorescence na čase jsou zobrazeny v kapitole 9.1 (Obr. 77 a Obr. 78).

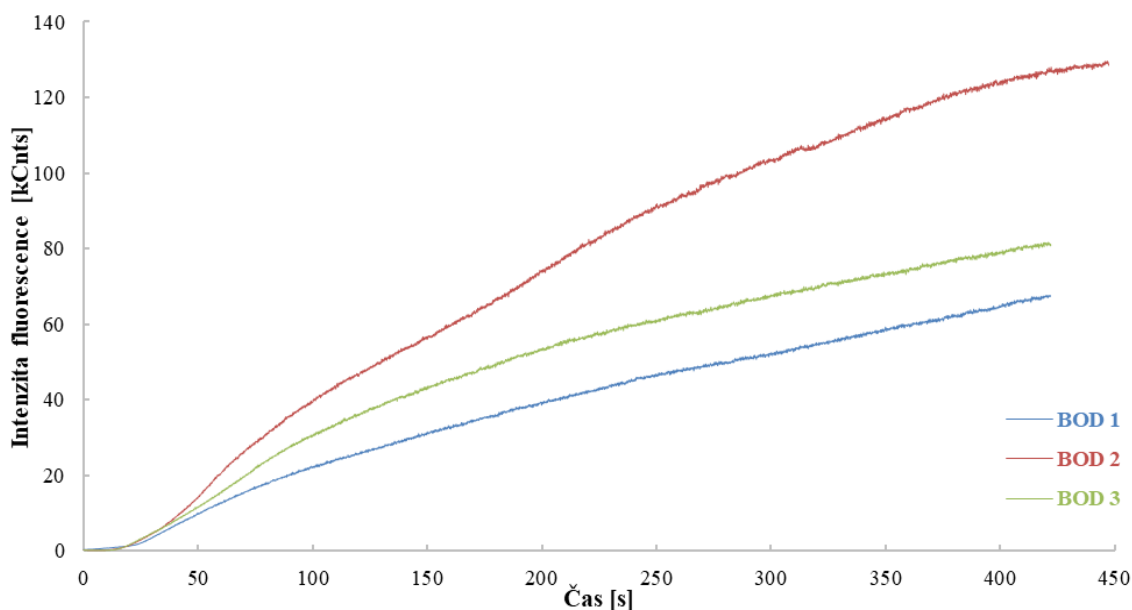


Obr. 36: V levé části se nachází sken před ozáření prekurzorů Zn:SAM a Zn:CYS, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 7 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.

Naopak u prekursoru Zn:SAH byla pozorována tvorba fluorescenčních komplexů. K ozáření byly vybrány 3 body. Intenzita fluorescence (Obr. 37) rapidně narostla už v prvních 10 sekundách měření. Nejvyšší intenzitu vykazuje bod č. 2, v tomto případě intenzita vzrostla až na hodnotu 130 kCnts. Pro ostatní dva komplexy intenzita vzrostla až k 90 kCnts. Na Obr. 38 jsou znázorněny skeny před a po ozáření, také je zde sken po ozáření s jiným škálováním, kde kolem vytvořeného komplexu je viditelné fotovybělené místo v agarózovém gelu a komplexy jsou zde lépe viditelné. Pro detailní sken byl vybrán bod č. 2.

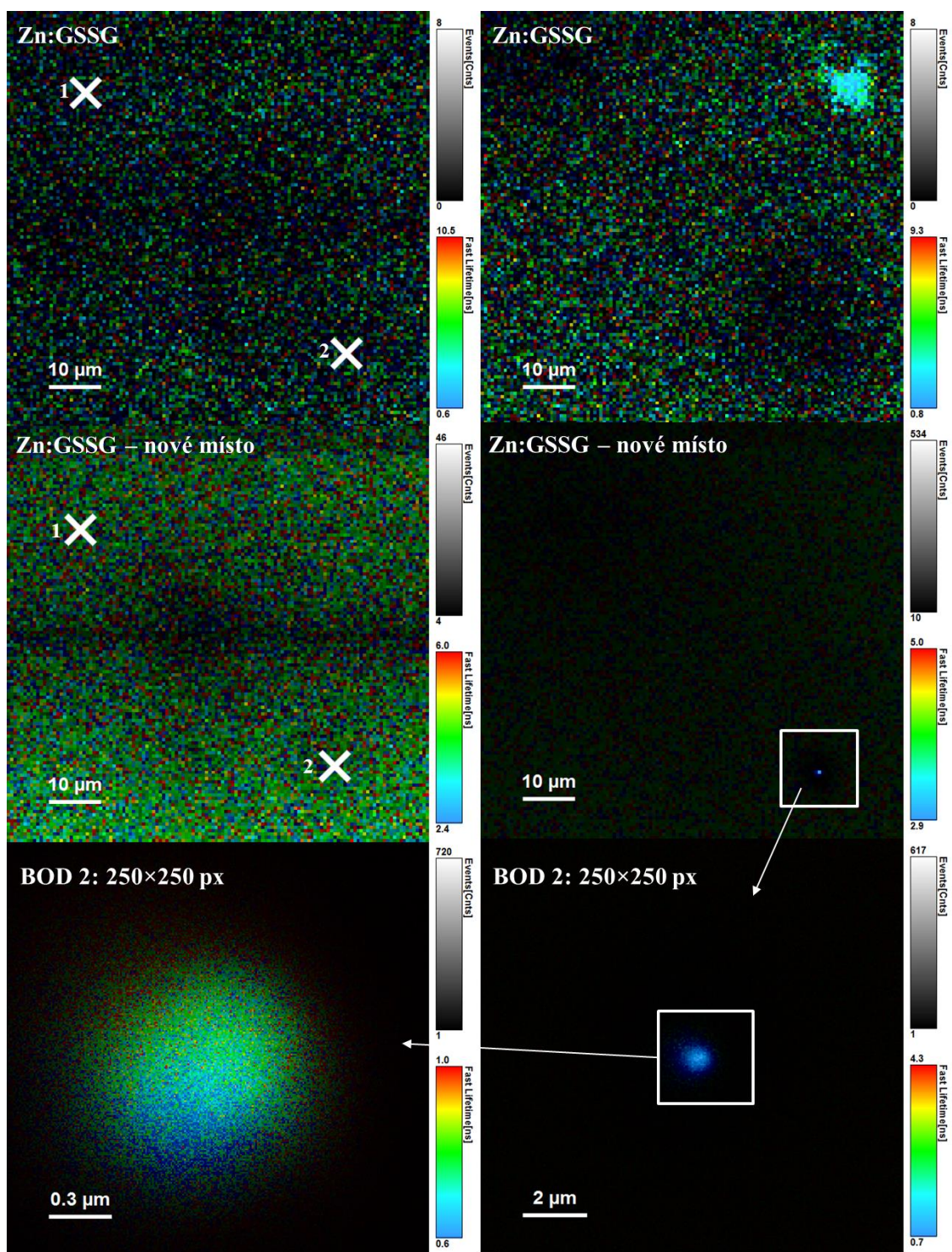


Obr. 37: V levé horní části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:SAH, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé horní části je sken po ozáření. U tohoto typu prekursoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní pravé části se nachází také sken po ozáření, ale bylo u něj zvolené jiné škálování. V dolní levé části se nachází detailní sken komplexu, který vznikl ozáření bodu č. 3.

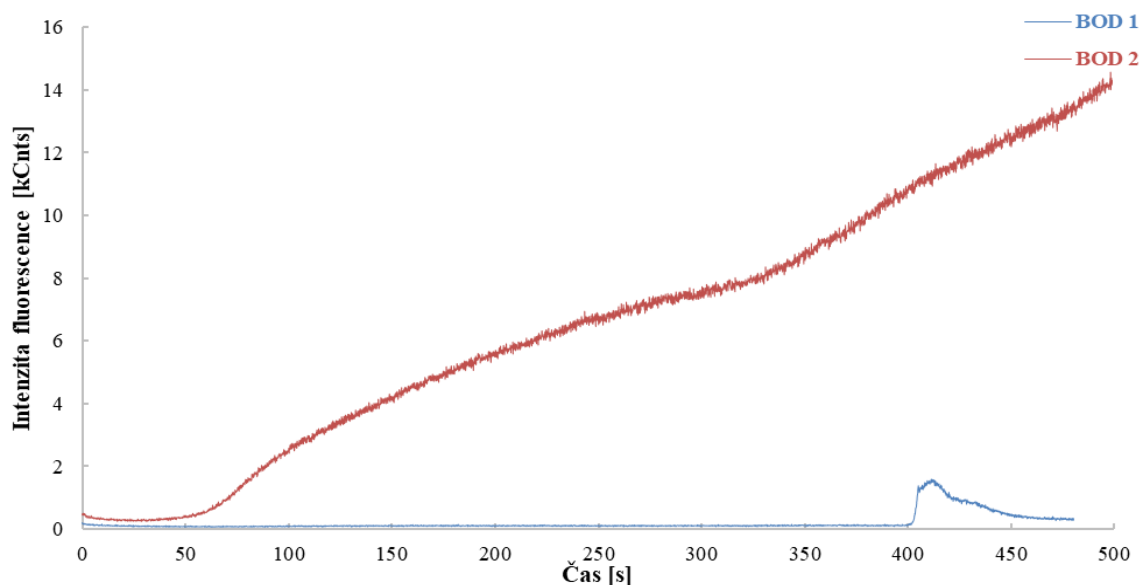


Obr. 38: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAH, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě.

Na základě výsledků z prvního měření byl předpokládán vznik fluorescenčních komplexů i u prekurzorů Zn:GSSG. Nejdříve byla vybrána oblast uprostřed vzorku, kde byly vybrány dva body k ozáření (Obr. 39) a v obou bodech se intenzita fluorescence držela kolem stabilní hodnoty cca 80 Cnts (v kapitole 9.1 na Obr. 79). Ze skenu po ozáření je ale patrné, že nějaký fluorescenční komplex byl vygenerován, ale nacházel se na místě, které nebylo ozářeno. Je tedy pravděpodobné, že došlo k posunu tohoto komplexu v prostředí. Měření bylo provedeno ve středu vzorku, kde bylo gelu nanášeno větší množství a kde nemusel být gel dostatečně zatuhlý. Proto bylo vybráno nové místo, více u kraje, kde bylo gelu méně a kde byl gel více ztuhlý. K ozáření UV laserem byly vybrány také dva body (Obr. 39), téměř na stejném místě, jako u předchozího skenování. Závislost intenzity fluorescence na čase je zobrazena na Obr. 40. U prvního zvoleného místa došlo k nárůstu intenzity fluorescence až od necelé 7. minuty, po 20 sekundách, ale začala opět klesat. Maximální hodnota intenzity činila 1 605 Cnts. V celkovém skenu vykazuje nízkou intenzitu oproti komplexu, který vznikl ozáření bodu č. 2. Zde došlo k nárůstu intenzity fluorescence téměř ihned po 1. minutě měření a intenzita rostla až do jeho konce, maximální hodnota činila 14 588 Cnts.

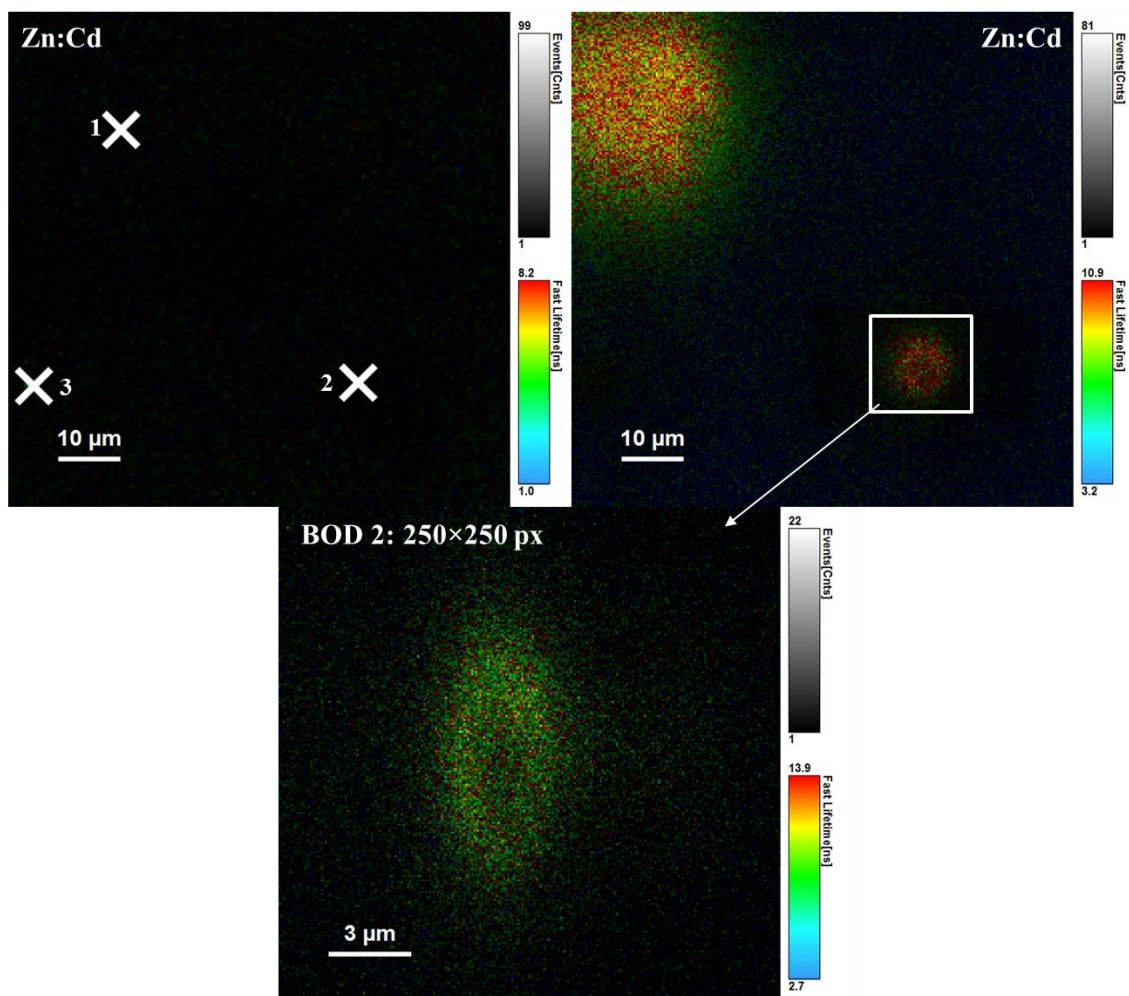


Obr. 39: V levé horní části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:GSSG, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. V tomto případě došlo k vygenerování fluorescenčního komplexu, který se ale nacházel mimo místa ozáření. V prostřední řadě se nachází měření z okrajového místa vzorku. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. U tohoto typu prekursoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní levé části se nachází detailní sken komplexu, který vznikl ozářením bodu č. 3.

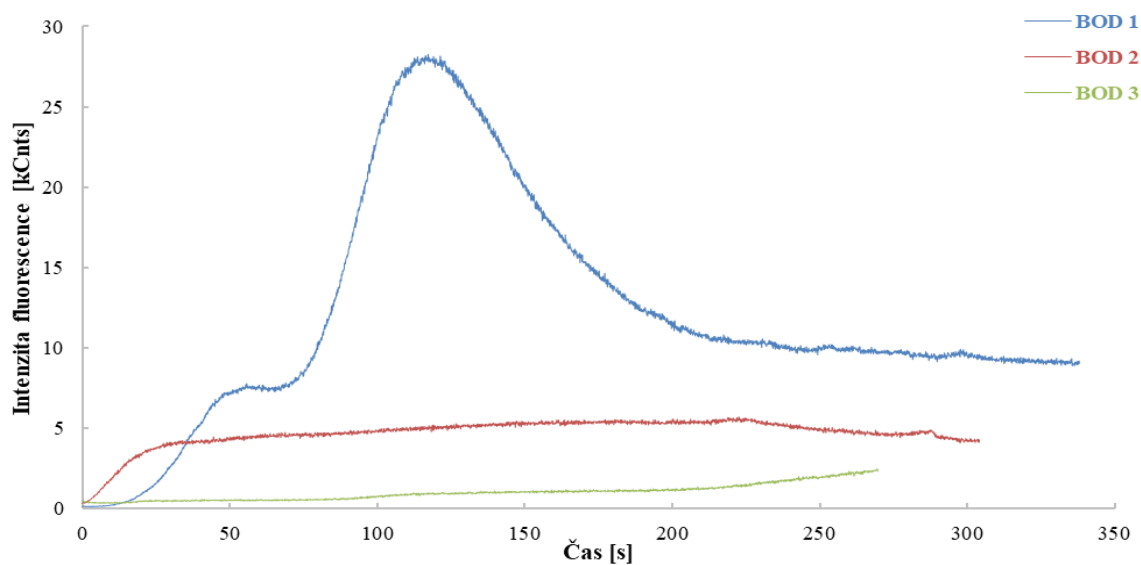


Obr. 40: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:GSSG, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě. Vzorek byl měřený na okraji, kde byl gel dostatečně ztuhlý.

Ke tvorbě fluorescenčních komplexů došlo i u posledního typu vzorku s prekurzory Zn:Cd. K ozáření byly vybrány 3 místa (Obr. 41). Závislost intenzity fluorescence na čase je znázorněna na Obr. 42. Intenzita fluorescence nejvíce narostla v bodě č. 1, a to až na hodnotu 28,3 kCnts. Z bodu č. 3 není na skenu patrný žádný komplex, ale dle křivky Time Trace intenzita fluorescence rostla už od 10. sekundy. Během měření mohlo dojít k posunu komplexu v prostředí, což může být potvrzené i detailním skenem komplexu z bodu č. 2, kdy je obraz poměrně rozmazaný. Průběh závislosti intenzity na čase v případě ozáření bodu č. 2 a 3 je velmi podobný.

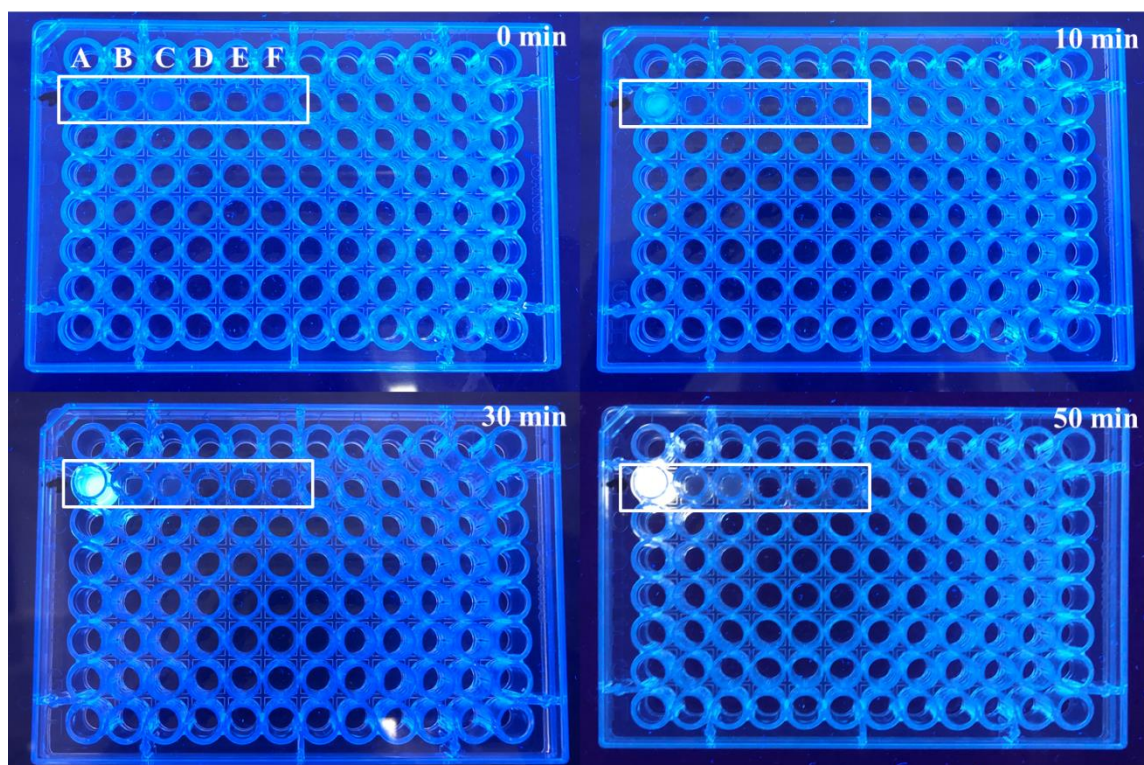


Obr. 41: V levé horní části se nachází sken před ozářením prekurzorů Zn:Cd, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. U tohoto typu prekurzoru došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V dolní levé části se nachází detailní sken komplexu, který vznikl ozáření bodu č. 2, sken je rozmazaný, což mohlo být způsobené pohybem komplexu v prostředí.



Obr. 42: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:Cd, ve kterém došlo ke tvorbě fluorescenčních komplexů v každém ozářeném místě.

U tohoto měření byl předpoklad vzniku fluorescenčních komplexů u všech typů prekurzorů, a to v důsledku poskytnutých výsledků z Mendelovy univerzity v Brně, kde prekurzory ozařovali 20 až 30 minut a ve všech případech docházelo ke tvorbě fluorescenčních komplexů, což se projevovalo tak, že roztok s prekurzory začal fluoreskovat a intenzita fluorescence se s časem zvyšovala. Je nutné, ale brát v potaz, že tento experiment byl proveden při ozáření o vlnové délce 250 nm. Geneze fluorescenčních komplexů na konfokálním fluorescenčním mikroskopu byla provedena při vlnové délce 375 nm. Jedná se o delší vlnovou délku s menší energií a tyto rozdíly mohou hrát důležitou roli, a proto mohly být získány odlišné výsledky. Proto bylo provedeno doplňující měření, kdy byly roztoky prekurzorů napipetovány do mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Destička s roztoky byla umístěna na transiluminátor a roztoky byly ozářeny při vlnové délce 330 nm. Bohužel žádný z dostupných transiluminátorů nedisponoval vlnovou délkou kolem 370 nm, tedy takovým zářením, které bylo použito na fluorescenčním mikroskopu. Nejbližší vlnová délka byla právě 330 nm a i zde jsou pozorovány určité změny. Na Obr. 43 jsou zobrazeny destičky s prekurzory, které byly ozářeny až 50 minut. Z tohoto obrázku je patrné, že došlo ke tvorbě fluoreskujících částic jen v roztoku s prekurzory Zn: Cd a intenzita fluorescence se zvyšovala se zvyšujícím se časem. U ostatních prekurzorů nedošlo ani po 50 minutách ke tvorbě komplexů. To může být právě způsobené nižší energií budícího záření, kdy ostatní prekurzory mohou potřebovat delší čas k tomu, aby se z nich zformovaly nějaké fluorescenční komplexy. To může být aplikováno i na měření na fluorescenčním mikroskopu, kdy má sice záření laseru mnohem vyšší intenzitu než xenonová lampa transiluminátoru, ale také má nižší energii, než záření o vlnové délce 250 nm.



Obr. 43: Ozáření roztoků prekurzorů v transiluminátoru při vlnové délce 330 nm po dobu 50 minut. Jamky A-Zn: Cd, B-Zn: SAM, C-Zn: SAH, D-Zn: CYS, E-Zn: HCYS a F-Zn: GSSG. Ke tvorbě fluoreskujících částic došlo jen u prekurzorů Zn: Cd.

5.2 Měření excitačních a emisních spekter

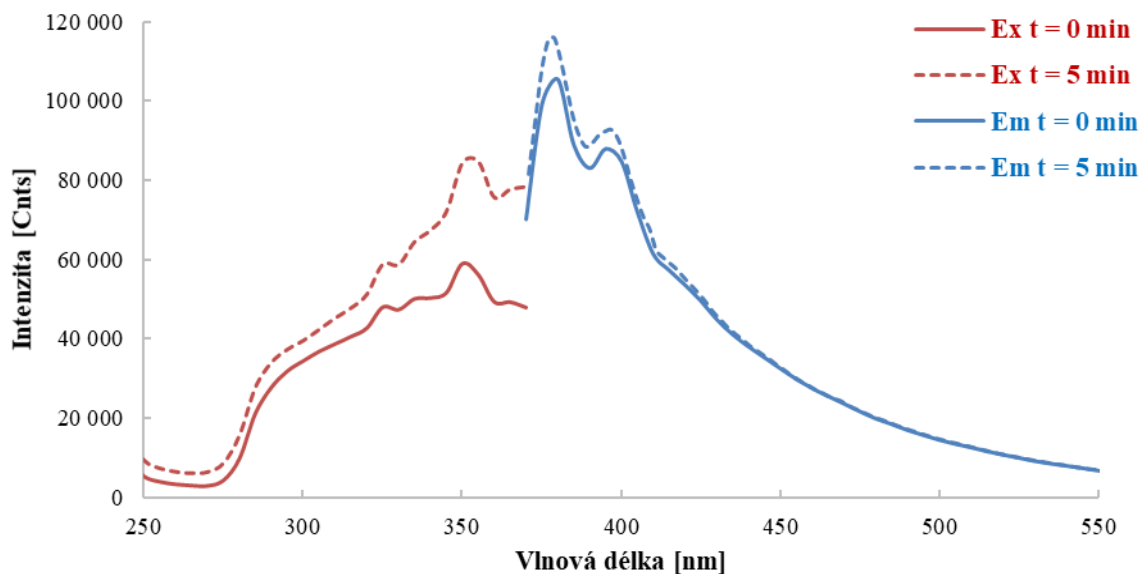
5.2.1 Vliv zakalených roztoků na spektrální charakteristiku

Zvolené roztoky prekurzorů a vzniklých fluorescenčních komplexů byly spektrálně charakterizovány pomocí excitačních a emisních spekter. K prvotnímu měření byly zvolené prekurzory Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS, Zn:HCYS, ozářené 20 minut a Zn:Cd ozářené 4 minuty při 250 nm v transiluminátoru na Mendelově univerzitě v Brně. Vzorek Zn:GSSG nebyl změřen z důvodu, že při ozařování nedošlo ke vzniku fluorescenčních komplexů. Ozářené prekurzory byly v křemenné kyvetě uloženy do měřicí cely fluorimetru. Z důvodu toho, že excitační ani emisní charakteristiky těchto roztoků fluorescenčních komplexů nejsou známy, bylo nutné najít optimální podmínky měření. V programu Fluoracle byly nastaveny podmínky pro excitaci i emisi, tak aby intenzita fluorescence byla v limitním rozhraní fluorimetru a nedošlo k poškození detektoru. Následně poté byl nastavený krok měření vlnové délky, velikost štěrbin a tzv. dwell time. Jedná se o čas, po který bude měřit jednotlivý krok vlnových délek. Tzn. čím delší dwell time bude zvolen, tím delší dobu bude analýza trvat, ale o to budou naměřená spektra přesnější a vyhlazenější. Podmínky měření jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 2: Zvolené optimální parametry pro měření excitačních a emisních spekter ozářených roztoků daných prekurzorů.

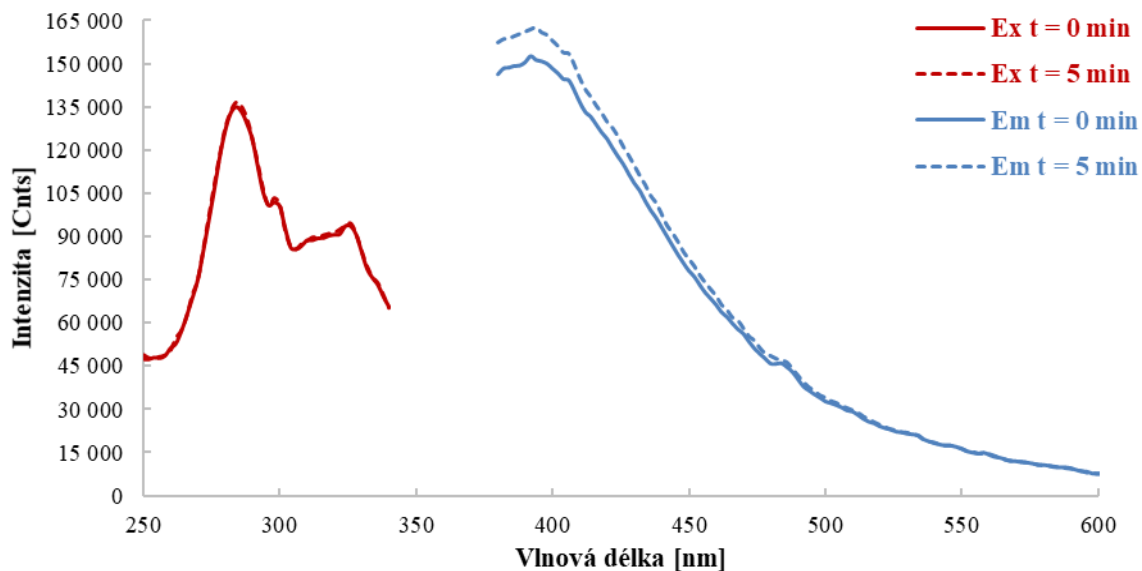
| Prekurzory | Doba ozáření [min] | λ_{EX} [nm] | λ_{EM} [nm] | Dwell time [s] | Krok [nm] | Štěrbiny ex:em |
|------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------|-----------|----------------|
| Zn:SAM | 20 | 350 | 400 | 0,1 | 2 | 4:2 |
| Zn:SAH | 20 | 325 | 399 | 0,1 | 2 | 4:2 |
| Zn:CYS | 20 | 286 | 369 | 0,1 | 2 | 4:2 |
| Zn:HCYS | 20 | 286 | 369 | 0,1 | 2 | 4:2 |
| Zn:Cd | 4 | 366 | 460 | 0,1 | 2 | 2:1 |

Během měření byl u vzorků obsahující Zn se SAM, SAH, CYS a HCYS pozorován jemný zákal s malými částicemi viditelné pouhým okem. Velmi zakalený se jevil vzorek se SAM a SAH. Méně zakalené byly roztoky CYS a HCYS. Naopak čirý roztok byl u ozářených prekurzorů Zn:Cd. Po cca 5 minutách byla pozorována sedimentace těchto částic, čímž došlo ke změně intenzity fluorescence, a to buď k vyšším nebo nižším hodnotám. Ale excitační a emisní maxima se nacházela při stejných vlnových délkách před i po sedimentaci částic. Excitační a emisní spektra byla tedy změřena ihned po převedení roztoku do kyvety a pak ještě jednou po 5 minutách. Během měření bylo u vzorku obsahující prekurzory Zn:SAM a Zn:CYS pozorován nárůst intenzity fluorescence během sedimentace větších částic. To mohlo být způsobené tím, že došlo k eliminaci rozptylu částic, které sedimentovaly na dno kyvety. Excitační a emisní spektrum pro Zn:SAM je zobrazeno na Obr. 44, kdy excitační maximum se nachází při vlnové délce 355 nm. U emisního spektra byla stanovena dvě emisní maxima. První maximum při vyšší intenzitě fluorescence bylo stanoveno při vlnové délce 379 nm, druhé maximum se pak nacházelo při vlnové délce 397 nm.



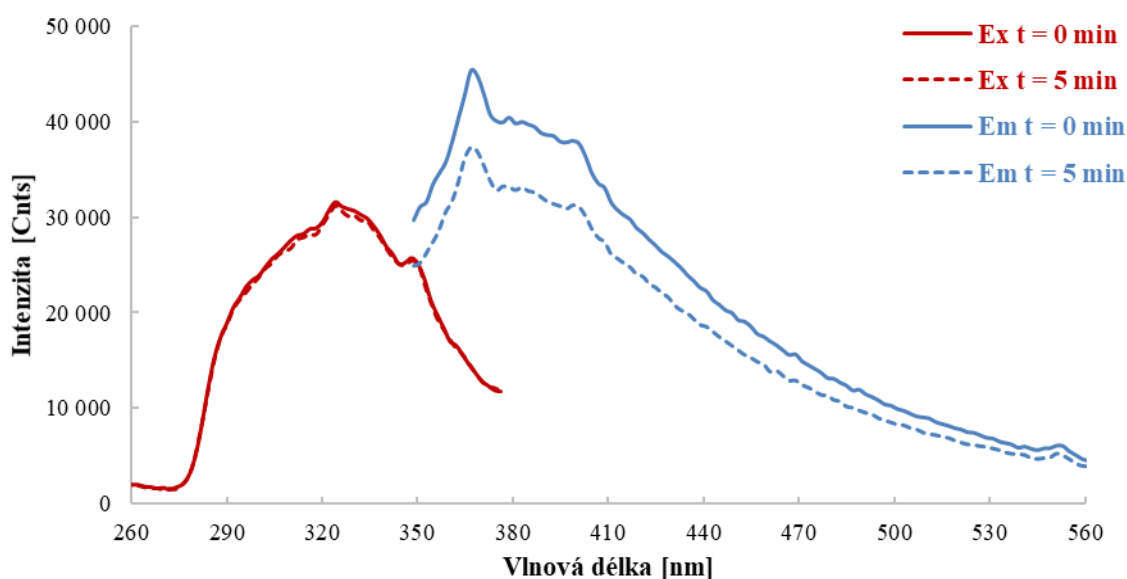
Obr. 44: Excitační (červená křivka) a emisní spektrum (modrá křivka) ozářeného vzorku s prekurzory Zn:SAM. Spektrum bylo změřeno v čase 0 minut a 5 minut. V průběhu měření došlo k postupné sedimentaci větších částic, což způsobilo zvýšení intenzity fluorescence.

Roztok Zn:CYS nebyl tak zakalený, jako v případě Zn:SAM, tím pádem v daném čase nebyla pozorována sedimentace částic. To je patrné i z excitačního a emisního spektra, kde rozdíl měření ihned na začátku a po čase 5 minut není tak velký. Excitační a emisní spektrum je zobrazeno na Obr. 45. V excitačním spektru není téměř žádný rozdíl v intenzitě fluorescence. Excitační maximum bylo stanoveno na 284 nm. U emisního spektra je rozdíl intenzit před a po sedimentaci patrnější. Bohužel v tomto případě není zaznamenáno celé emisní spektrum, lze tak jen předpokládat, že se emisní maximum nachází při vlnové délce 394 nm.



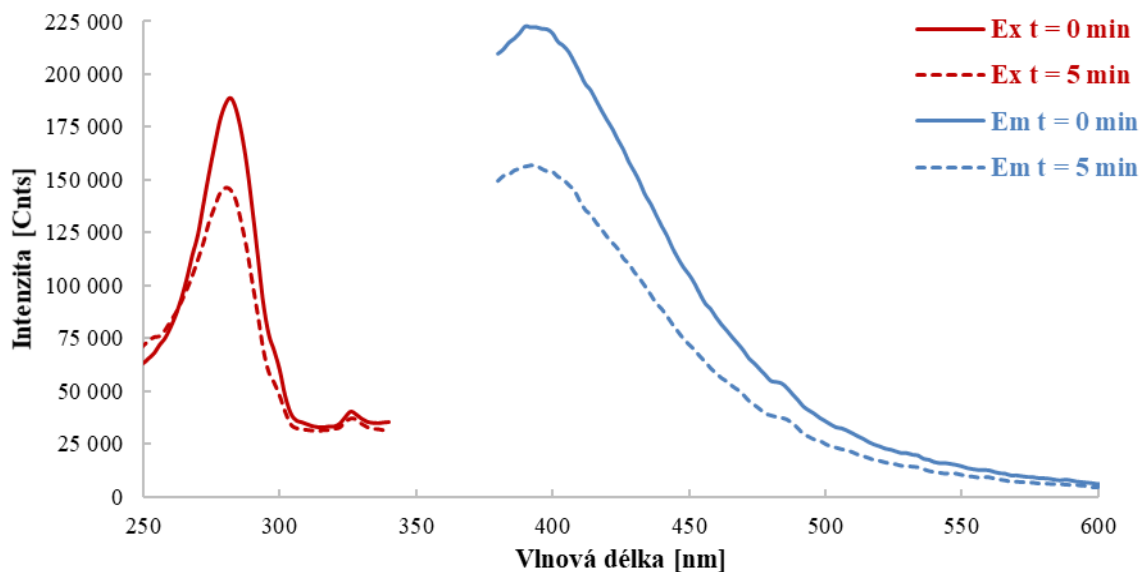
Obr. 45: Excitační (červená křivka) a emisní spektrum (modrá křivka) ozářeného vzorku s prekurzory Zn:CYS. Spektrum bylo změřeno v čase 0 minut a 5 minut. V průběhu měření došlo k postupné sedimentaci větších částic, což způsobilo zvýšení intenzity fluorescence.

Naopak u ozářeného vzorku s prekurzory Zn:SAH a Zn:HCYS došlo po sedimentaci větších částic k poklesu intenzity fluorescence. To mohlo být způsobené tím, že mohly sedimentovat vytvořené fluorescenční komplexy a tím klesla intenzita fluorescence. U roztoku Zn:SAH (Obr. 46) byl pozorován menší pokles intenzity, který byl nejvíce patrný v emisním spektru. V tomto spektru se nachází emisní maximum při 369 nm. S velkou pravděpodobností se ale jedná o nežádoucí ostrý pík Ramanova rozptylu vody, který se při zvolené excitační vlnové délce 325 nm ve spektru nachází při vlnové délce cca 365 nm. Emisní maximum by se teoreticky mohlo pohybovat kolem 380 nm. V excitačním spektru není rozdíl před a po sedimentaci částic tak markantní. Jedná se o poměrně široký pík, kde se excitační maximum pohybuje při vlnové délce 324 nm.



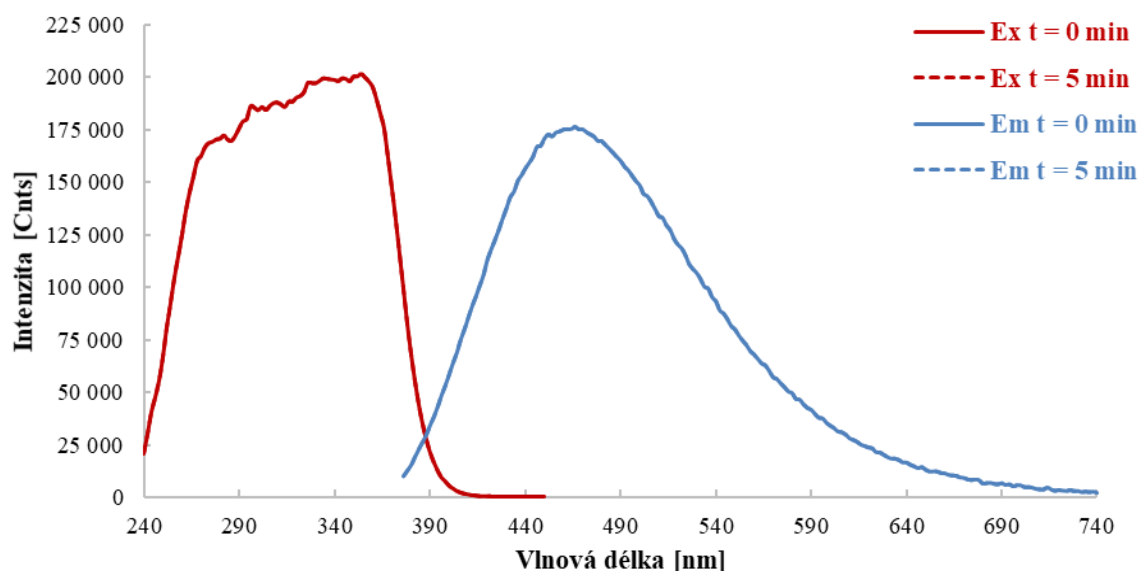
Obr. 46: Excitační (červená křivka) a emisní spektrum (modrá křivka) ozářeného vzorku s prekurzory Zn:SAH. Spektrum bylo změřeno v čase 0 minut a 5 minut. V průběhu měření došlo k postupné sedimentaci větších částic, což způsobilo snížení intenzity fluorescence.

Roztok s ozářenými prekurzory Zn:HCYS vykazoval výraznější pokles intenzity fluorescence než u Zn:SAH. Tento pokles intenzity je pozorovatelný v excitačním i emisním spektru (Obr. 47). Tvar spekter je velmi podobný jako u vzorku Zn:CYS. Excitační maximum bylo stanoveno při vlnové délce 282 nm, emisní maximum při 394 nm. Stejně hodnoty byly právě zjištěny i u Zn:CYS. A stejně tak emisní spektrum není zaznamenáno celé a emisní maximum tak lze jen odhadnout.



Obr. 47: Excitační (červená křivka) a emisní spektrum (modrá křivka) ozářeného vzorku s prekurzory Zn:HCYS. Spektrum bylo změřeno v čase 0 minut a 5 minut. V průběhu měření došlo k postupné sedimentaci větších částic, což způsobilo snížení intenzity fluorescence.

Posledním měřeným vzorkem byl roztok obsahující prekurzory Zn:Cd. Jedná se o jediný čirý vzorek, u kterého nedošlo ke změně intenzity fluorescence v čase. Excitační i emisní spektra na začátku a po 5 minutách jsou totožná (Obr. 48). Excitační maximum bylo stanoveno při vlnové délce 354 nm, ale vzhledem k tomu, že je toto spektrum poměrně široké, nelze excitační maximum určit se 100% přesností. Naopak u emisního spektra lze pozorovat užší pík s emisním maximumem při vlnové délce 466 nm.



Obr. 48: Excitační (červená křivka) a emisní spektrum (modrá křivka) ozářeného vzorku s prekurzory Zn:Cd. Spektrum bylo změřeno v čase 0 minut a 5 minut. Jelikož se jednalo o jediný čirý roztok, nedocházelo k sedimentaci, a tak nedocházelo ke změně intenzity fluorescence.

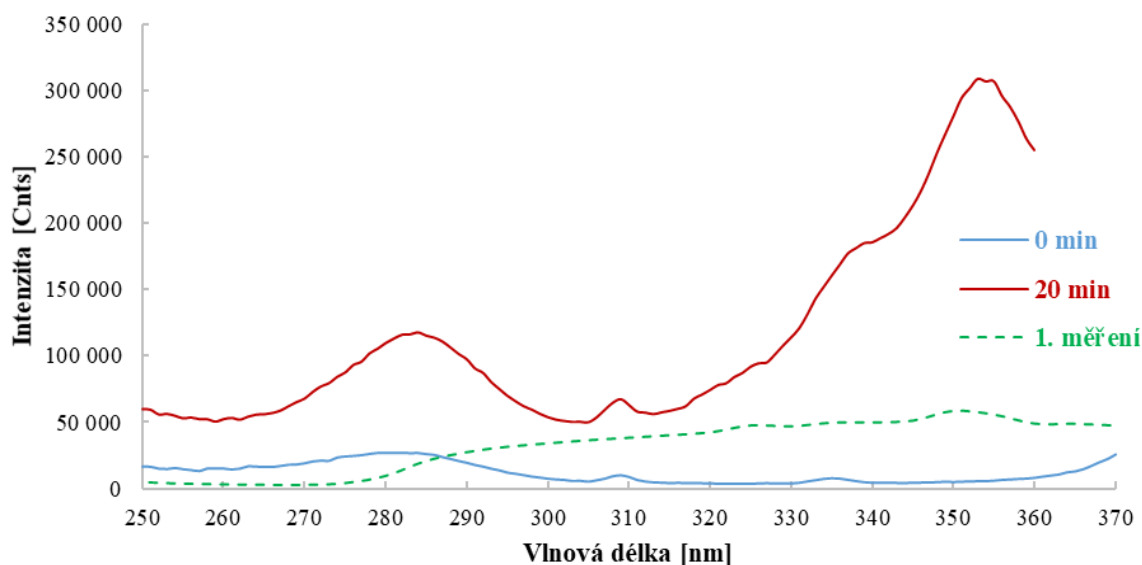
5.2.2 Kompletní spektrální charakteristika

Spektrální charakteristika byla doplněna excitačními a emisními spektry pro roztoky s prekurzory Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS, Zn:HCYS, Zn:GSSG a Zn:Cd před a po ozáření. Na základě těchto spekter bylo provedeno srovnání výsledků s prvotním měřením v kapitole 5.2.1. Roztok s prekurzory Zn:Cd byl ozářen po 4 a 8 minutách, Zn:HCYS a Zn:GSSG byly ozářeny 30 minut. Ostatní typy prekurzorů byly ozářeny 20 minut. Ozáření bylo provedeno v transiluminátoru při vlnové délce 250 nm na Mendelově univerzitě v Brně, na Ústavu chemie a biochemie. Nastavení fluorimetru FS5 bylo dle stejných pravidel, jako v předchozím měření. Parametry měření jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 3).

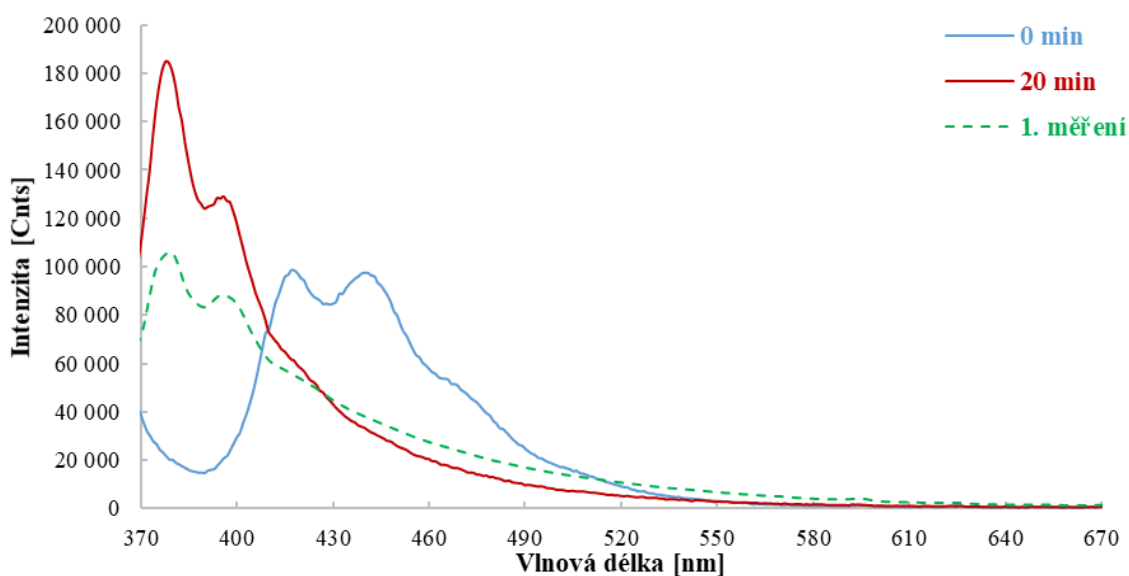
Tab. 3: Zvolené optimální parametry pro měření excitačních a emisních spekter ozářených roztoků daných prekurzorů.

| Prekurzory | Doba ozáření [min] | λ_{EX} [nm] | λ_{EM} [nm] | Dwell time [s] | Krok [nm] | Štěrby ex:em |
|------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------|-----------|--------------|
| Zn:SAM | 20 | 350 | 380 | 0,1 | 1 | 4:2 |
| Zn:SAH | 20 | 290 | 380 | 0,1 | 1 | 4:2 |
| Zn:CYS | 20 | 290 | 380 | 0,1 | 1 | 4:2 |
| Zn:HCYS | 30 | 290 | 350 | 0,1 | 1 | 4:2 |
| Zn:GSSG | 30 | 350 | 400 | 0,1 | 1 | 4:2 |
| Zn:Cd | 4 a 8 | 360 | 460 | 0,1 | 1 | 2:1 |

Excitační spektrum odpovídající prekurzorům Zn:SAM je zobrazeno na Obr. 49. Modrá křivka odpovídá excitačnímu spektru prekurzorů před ozářením. V tomto spektru bylo nalezeno charakteristické maximum při vlnové délce 284 nm. Toto maximum se nachází i ve spektru prekurzorů po ozáření (červená křivka), zde ale bylo nalezeno druhé maximum při vlnové délce 353 nm. Toto maximum je zřejmě charakteristické pro vytvořené fluorescenční komplexy. Dále se toto excitační spektrum nachází při vyšších hodnotách intenzity fluorescence. To odpovídá předpokládanému průběhu, kdy se během ozáření tvořily fluorescenční komplexy, které intenzitu zvyšují. Obě tyto spektra byla porovnána s excitačním spektrem naměřeném v kapitole 5.2.1 (zelená křivka), které má odlišný tvar, ale excitační maximum odpovídá maximum nalezeném ve spektru po ozáření, a to zde při vlnové délce 355 nm. Emisní spektrum je zobrazeno na Obr. 50. U prekurzorů před ozářením (modrá křivka) byly nalezeny dvě excitační maxima. První při vlnové délce 417 nm a druhé při 440 nm. Pík odpovídající pro první maximum je poměrně užší než před ozářením, tato změna by mohla být příkládána tvorbě fluorescenčních komplexů. Po ozáření ale došlo k tzv. hypsochromnímu posunu, tedy posunu ke kratším vlnovým délkám. První maximum se posunulo k 379 nm a druhé k 397 nm. Po ozáření taktéž došlo ke zvýšení intenzity fluorescence. Excitační spektrum naměřené v předchozí kapitole má podobný tvar, byly zde stanoveny dvě excitační maxima, která se shodují s maximy po ozáření. Z těchto výsledků je patrné, že excitační a emisní maxima jsou velmi blízko u sebe, Stokesův posun tu tedy bude minimální.



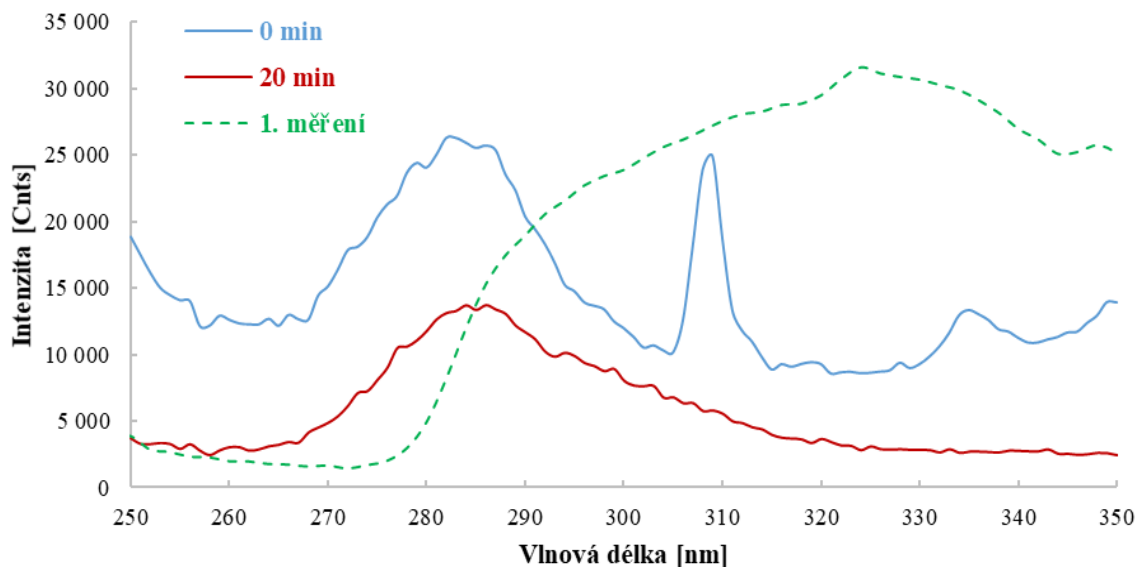
Obr. 49: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:SAF. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozáření. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému excitačnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.



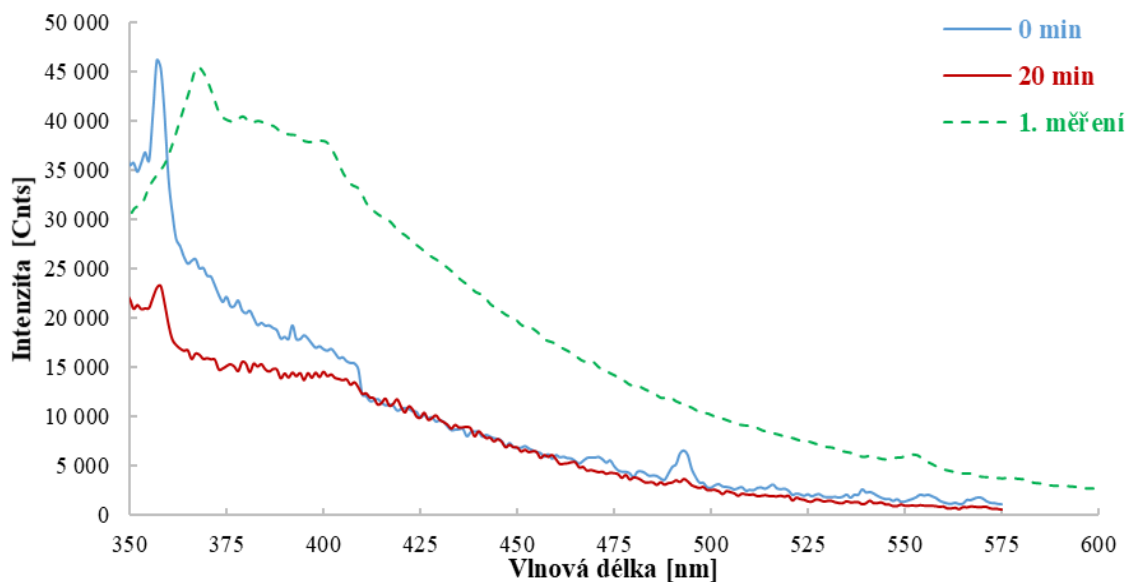
Obr. 50: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn:SAF. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozáření. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému excitačnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

Dalším typem prekurzorů je Zn:SAH, jehož excitační spektra jsou zobrazena na Obr. 51. U excitačního spektra před ozáření (modrá křivka) se nacházel ostrý pík při cca 310 nm. S velkou pravděpodobností se jedná o neelastický rozptyl. U vzorku, který byl ozářen 20 minut (červená křivka), došlo k poklesu intenzity fluorescence, což neodpovídá charakteristickému chování tvorby fluorescenčních komplexů, které by měly zvyšovat intenzitu fluorescence. Excitační maximum bylo pak stanoveno na 286 nm. To se neshoduje s maximem stanoveným v kapitole 5.2.1 (zelená křivka), a to na 324 nm. Toto excitační spektrum má úplně jiný tvar.

Pokles intenzity fluorescence byl ale zaznamenán i u emisního spektra (Obr. 52) před a po ozáření, které bylo měřeno při stejné excitační vlnové délce. Zde bylo emisní maximum stanoveno na 357 nm pro obě spektra (modrá i červená křivka). Tato hodnota se tolik nelišila od maxima stanoveném v předchozí kapitole (zelená křivka), a to na 380 nm. V obou spektrech se intenzita fluorescence pohybovala v poměrně nižších hodnotách, a to řádově v desítkách tisíc.

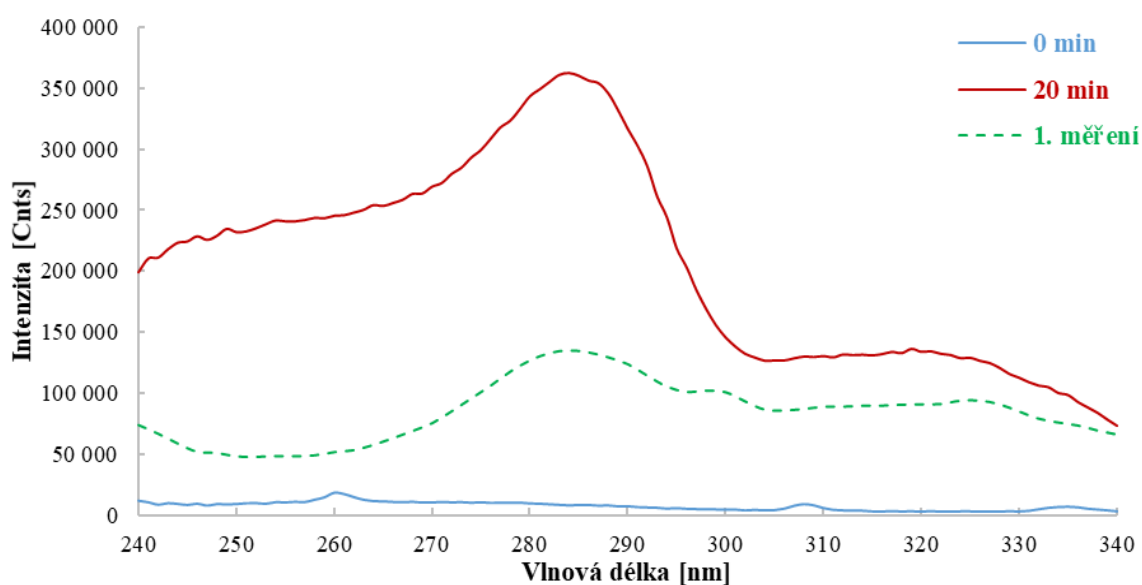


Obr. 51: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:SAH. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému emisnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

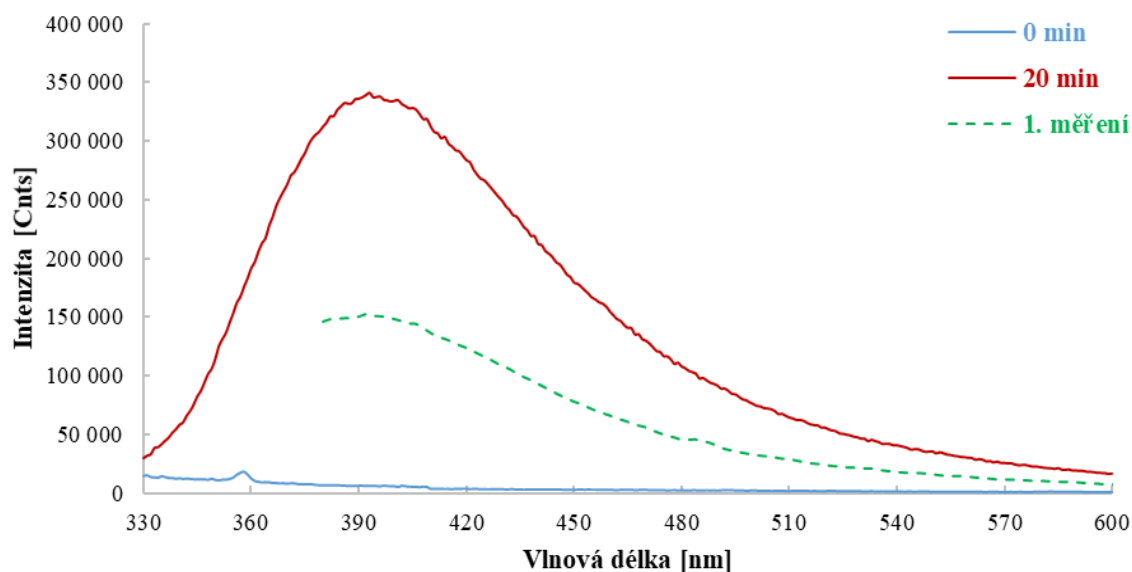


Obr. 52: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn:SAH. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému emisnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

Excitační spektrum pro vzorek s prekurzory Zn:CYS je znázorněn na Obr. 53. Vzorek před ozáření (modrá křivka) vykazoval nejnižší intenzitu fluorescence a nachází se zde velmi malý pík, jehož excitační maximum se nacházelo při vlnové délce 260 nm. Naopak po ozáření po dobu 20 minut (červená křivka) vykazoval poměrně vysokou intenzitu (až sta tisíce Cnts). Excitační maximum v tomto případě bylo stanoveno na 284 nm. Toto maximum se shoduje s hodnotou excitačního maxima v případě prvotního měření v kapitole 5.2.1., kde bylo stanoveno taktéž na hodnotu 284 nm. Toto spektrum má téměř shodný průběh jako spektrum roztoku po ozáření, jen se nachází při nižších hodnotách intenzity fluorescence. Emisní spektra pro tento typ prekurzoru je zobrazeno na Obr. 54. I zde vykazuje roztok před ozáření (modrá křivka) nejnižší intenzitu a emisní maximum bylo stanoveno při vlnové délce 358 nm. Po ozáření (červená křivka) bylo stanoveno emisní maximum při vlnové délce 394 nm. Tímto byla potvrzena správnost určení maxima u prvotního měření (zelená křivka), kde emisní spektrum není celé v potřebném rozsahu vlnových délek. I zde bylo emisní maximum stanoveno při vlnové délce 394 nm. Navíc má toto spektrum velmi podobný tvar, jako spektrum po ozáření.

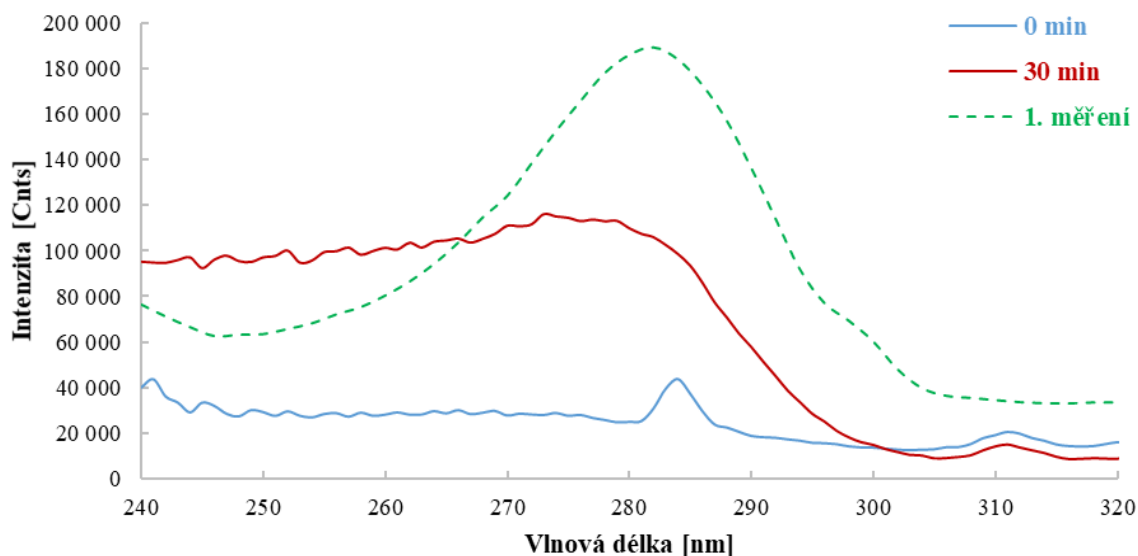


Obr. 53: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:CYS. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozáření. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému excitačnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

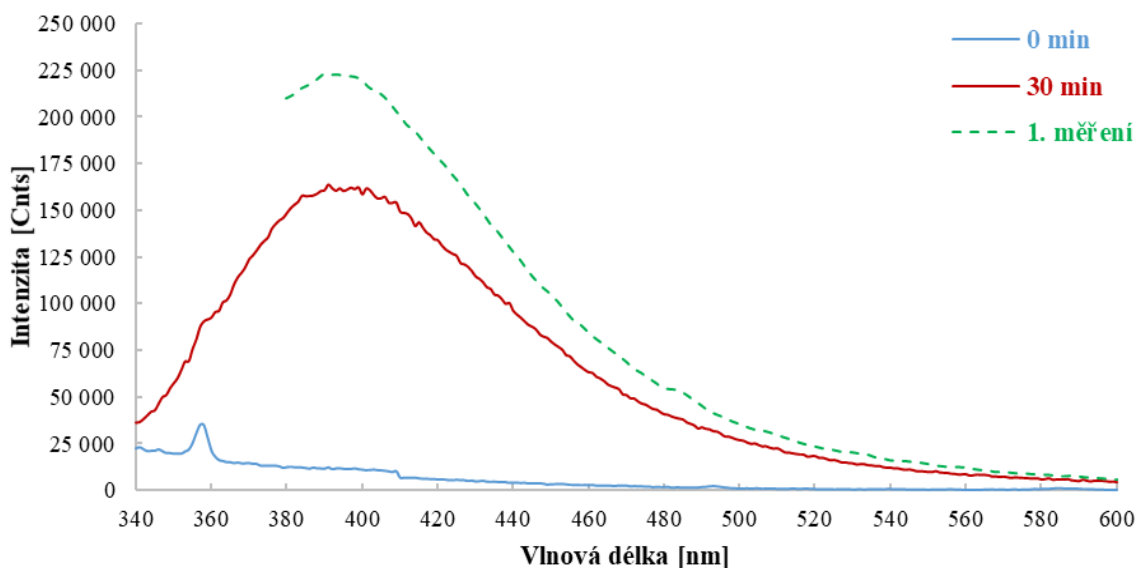


Obr. 54: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn:CYS. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 20 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému emisnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

Poměrně podobných výsledků bylo dosaženo při měření spekter u prekurzorů Zn:HCYS. Excitační spektrum je zobrazeno na Obr. 55. Nejnižší intenzitu opět vykazoval vzorek s prekurzory před ozářením (modrá křivka), excitační maximum bylo stanoveno při vlnové délce 284 nm. Podobný průběh má spektrum vzorku po ozáření, kde bylo ale maximum stanoveno při vlnové délce 277 nm. V tomto případě bylo potřeba prodloužit dobu ozáření na 30 minut, aby došlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. V prvotním měření v kapitole 5.2.1 byl roztok s prekurzory ozářen 20 minut, ale bylo dosaženo vyšších hodnot intenzity fluorescence a zároveň byl získán pík s viditelným maximem při vlnové délce 282 nm. Emisní spektrum je zobrazeno na Obr. 56. Emisní maximum bylo ze spektra pro ozářený vzorek (modrá křivka) stanoveno při vlnové délce 399 nm. To odpovídá maximu stanoveném v předchozí kapitole při vlnové délce 394 nm, určeného ze spektra, které nebylo změřeno celé. I zde byla pozorována vyšší intenzita fluorescence než u vzorku, který byl ozařován delší dobu.



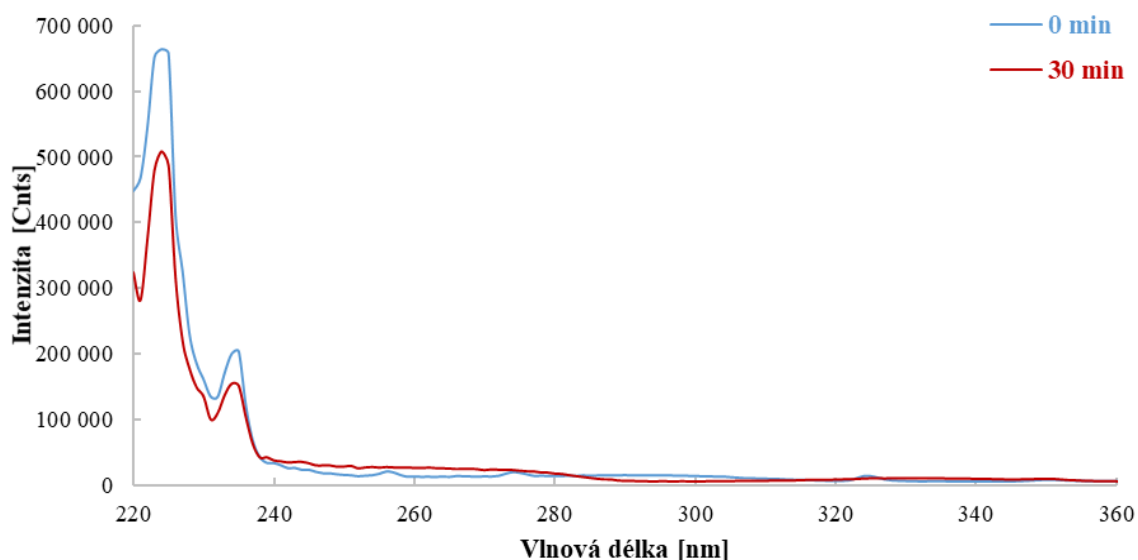
Obr. 55: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:HCYS. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 30 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému excitačnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.



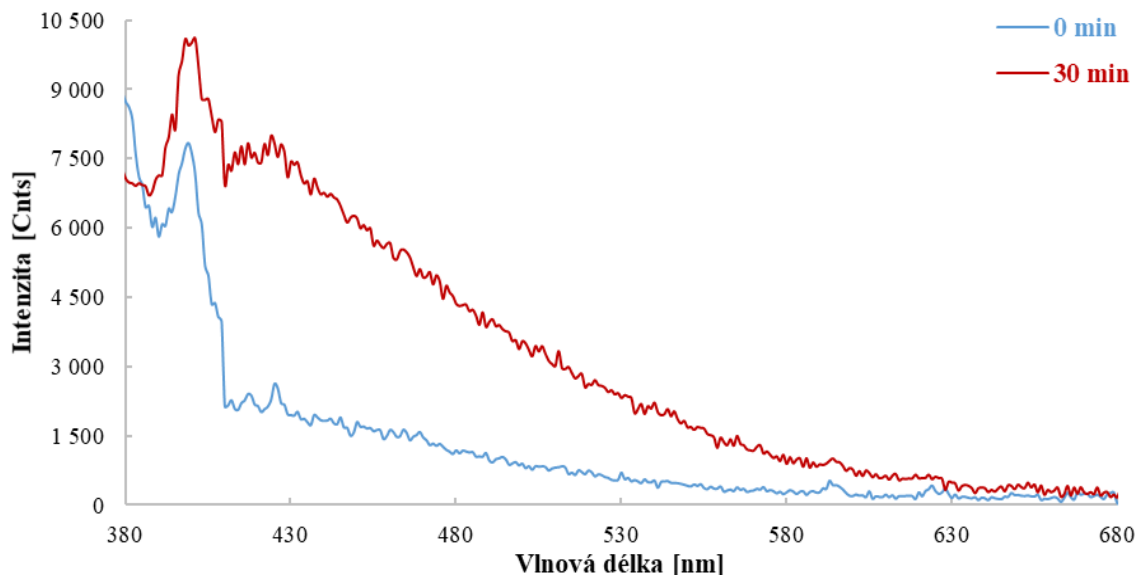
Obr. 56: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn:HCYS. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 30 min při vlnové délce 250 nm. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému emisnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

Dále byla spektrální charakteristika provedena u vzorku obsahující prekurzory Zn:GSSG. Pro tento typ prekurzoru nebylo provedeno měření, jako v kapitole 5.2.1, protože u toho vzorku nedošlo ani po 30 minutách k tvorbě fluorescenčních komplexů a nelze tedy provést srovnání. V excitačním spektru (Obr. 57) je patrné atypické chování, a to pokles intenzity po ozáření při 250 nm, kdy je předpokládáno, že vznik fluorescenčních komplexů způsobí zvýšení intenzity fluorescence. V excitačním spektru byly stanoveny dvě excitační maxima, první při vlnové délce 224 nm a druhé při 236 nm. Emisní spektrum je zobrazeno na Obr. 58. Pro toto měření

nebyla vybrána optimální excitační vlnová délka, která byla nastavena na 350 nm. Důsledkem toho může být i velmi nízká intenzita fluorescence oproti intenzitě v excitačním spektru. V tomto případě, ale vykazoval vyšší intenzitu vzorek po ozáření. Ve spektru jsou patrné dvě emisní maxima. První při vlnové délce 392 nm, to může odpovídat píku Ramanova rozptylu vody, který při excitační vlnové délce 350 nm se nachází cca při 397 nm. Druhé maximum bylo stanoveno při vlnové délce 423 nm, což může být charakteristické maximum pro tento typ prekurzoru.

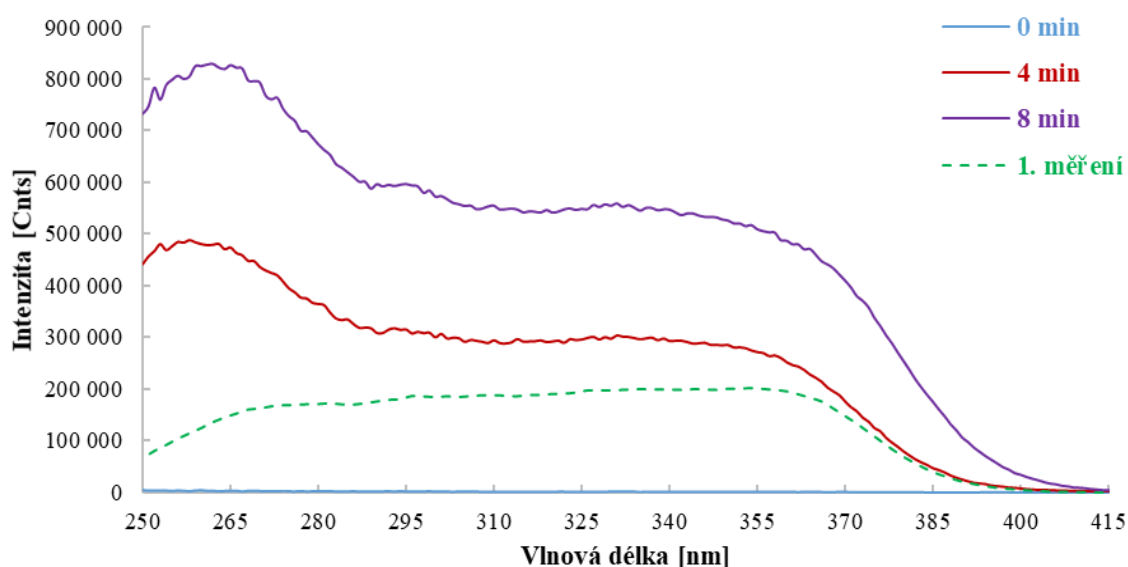


Obr. 57: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:GSSG. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 30 min při vlnové délce 250 nm.

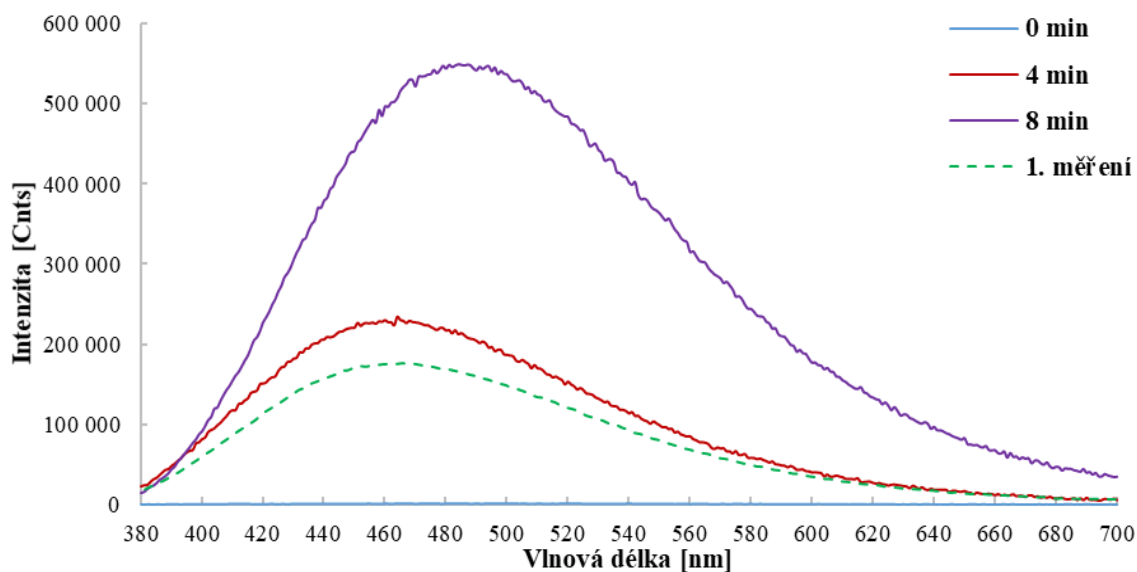


Obr. 58: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn:GSSG. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 30 min při vlnové délce 250 nm.

Posledním měřeným vzorkem byl vzorek s prekurzory Zn:Cd. Tento typ prekurzoru vykazoval po ozáření nejvyšší intenzitu fluorescence. Před ozářením (modrá křivka) je intenzita nulová. Excitační spektrum je zobrazeno na Obr. 59, se zvyšujícím se časem ozáření se zvyšovala i intenzita fluorescence. Excitační maximum bylo stanoveno při vlnové délce 265 nm, a to v obou křivkách po 4 a 8 minutách ozáření (červená a fialová křivka). V porovnání s prvotním měřením v předchozí kapitole bylo stanoveno excitační maximum při vyšší vlnové délce, a to 354 nm. Emisní spektrum je zobrazeno na Obr. 60, kde je patrný s rostoucím časem ozařování menší bathochromní posun, tedy posun k delším vlnovým délkám. U vzorku, který byl ozářen 4 minuty (červená křivka) bylo emisní maximum při 466 nm. U vzorku, který byl ozářen 8 minut (fialová křivka) bylo maximum při 488 nm. Stejný průběh mělo i emisní spektrum naměřené v předchozí kapitole.



Obr. 59: Excitační spektrum vzorku s prekurzory Zn:Cd. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozářením. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 4 min při vlnové délce 250 nm. Fialová křivka odpovídá roztoku, který byl ozářen 8 min. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému excitačnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.



Obr. 60: Emisní spektrum vzorku s prekurzory Zn: Cd. Modrá křivka náleží roztoku s prekurzory před ozáření. Červená křivka odpovídá roztoku s prekurzory, které byly ozářeny po dobu 4 min při vlnové délce 250 nm. Fialová křivka odpovídá roztoku, který byl ozářen 8 min. Zelená přerušovaná křivka pak odpovídá naměřenému emisnímu spektru z prvního měření, před sedimentací částic.

5.3 Měření dob života

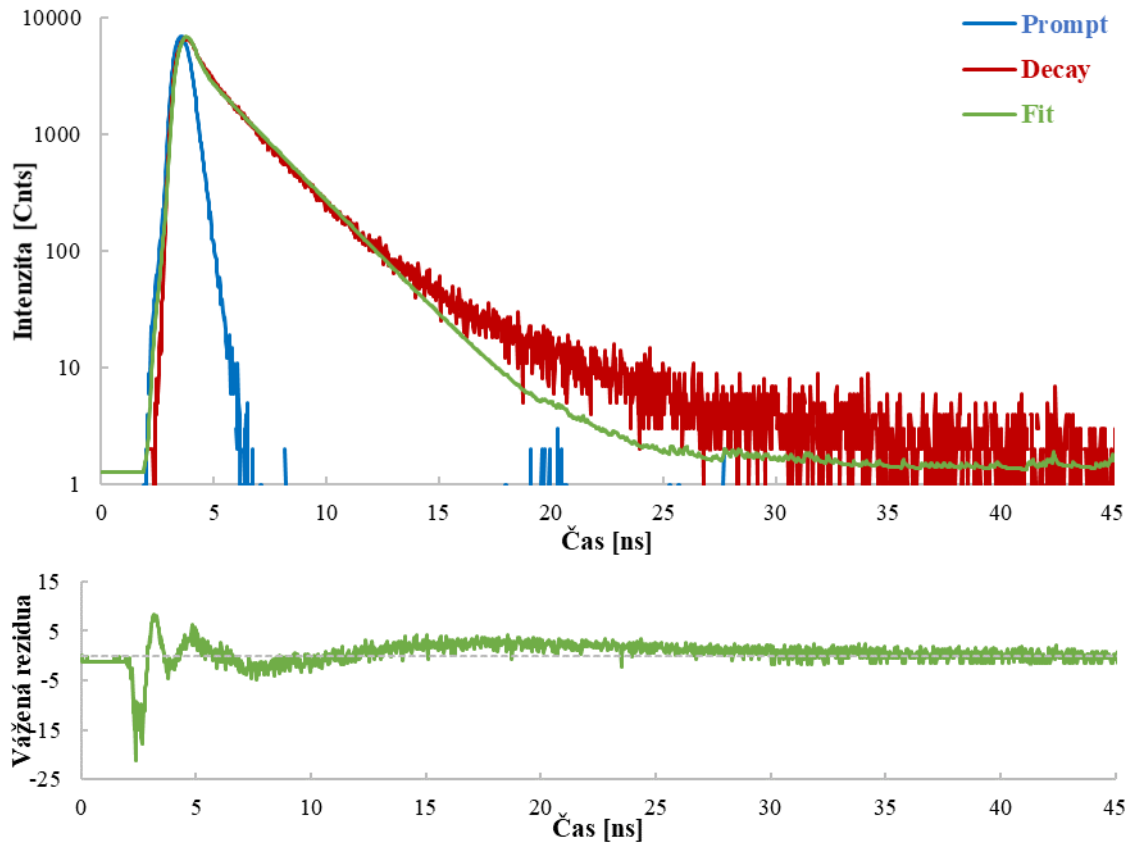
Charakteristika vytvořených fluorescenčních komplexů byla doplněna měřením dob života na TCSPS spektrofluorometru HORIBA Scientific. K měření byly zvoleny ozářené prekurzory Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS a Zn:HCYS, které byly ozářeny 20 minut, prekurzory Zn:GSSG byly ozářeny 30 minut a Zn: Cd 4 minuty. Pro jednotlivé typy prekurzorů byl zvolen excitační zdroj o příslušné vlnové délce, a to na základě naměřených excitačních spekter. Emisní monochromátor byl nastaven taktéž pro každý vzorek zvlášť, a to na základě naměřených emisních spekter. Roztok s prekurzory byl měřen v křemenné kyvetě. Pro proměření vzorku byl vždy změřen rozptyl světla z roztoku koloidního křemíku, kdy byla získána křivka IRF. Nastavení bylo vždy stejné, kromě nastavení emisního monochromátoru, jehož hodnota odpovídala vlnové délce budícího záření. Naměřené vyhasínací křivky byly proloženy exponenciální funkcí. Správnost výsledků byla hodnocena na základě vizuální kontroly proložení vyhasínací křivky danou exponenciální funkcí, vizuální kontrolou náhodného rozložení vážených reziduí, dále na základě hodnoty parametru χ_R^2 , který se má ideálně nacházet v rozmezí 0,8 až 1,2. Správnost vyhodnocení dob života byla také kontrolována dle hodnot relativních amplitud, které udávají procentuální zastoupení dob života ve vzorku. Kompletní analýza jedné až pěti dob života jsou uvedeny v kapitole 9.2.

Pro měření vyhasínací křivky fluorescence vzorku Zn:SAM byla zvolena NanoLED dioda o vlnové délce 330 nm a emisní monochromátor byl nastaven na 400 nm. Na základě vizuální kontroly proložení dat zvolenou exponenciální funkcí bylo zjištěno, že se nejedná o monoexponenciální křivku, tedy jedná se o vzorek s více doby života. To lze vidět i ze samotné naměřené křivky pro vzorek, kdy křivka za píkem nemá lineární tvar, což by bylo typické pro jednu dobu života. Bude se tedy jednat o multiexponenciální křivku. Výsledek jedné doby života lze také vyvrátit tvarem vážených reziduí, kdy rozložení bodů není zcela náhodné

a nekopírují osu x . Chybnému proložení dat pak odpovídá i parametr $\chi_R^2 = 18.49$, který je dost vysoký. Přidáním další doby života došlo ke zlepšení parametru χ_R^2 , a to na 5,23 a postupným zvyšováním parametrů docházelo ke snižování hodnoty tohoto parametru až na hodnotu 3,19. Ani v jednom případě se ale nejednalo o hodnotu, která by se nacházela v intervalu 0,8 až 1,2, který udává správnost analýzy. Ovšem postupným přidáváním parametru doby života docházelo ke zlepšení tvaru vážených reziduí, kdy rozložení bodu bylo více náhodné. Na začátku reziduí se ve všech případech nachází systematická odchylka, která se ani úplně nevyhladila přidáváním parametrů v podobě dob života. Naopak u pěti dob života se tato odchylka ještě prohloubí, navíc jeden z pěti časů vychází v desítkách milisekund, což je poměrně vysoký čas pro daný vzorek s fluorescenčními komplexy. Na základě vážených reziduí a parametru χ_R^2 by mohly být správným výsledkem tři nebo čtyři doby života, kde se vyskytovala alespoň jedna velmi krátká komponenta s dobou života řádově v jednotkách pikosekund. Tomu ale odpovídají nesmyslné relativní amplitudy, podle kterých je nakonec ve vzorku obsažena pouze jedna doba života se 100% zastoupením. Dle této analýzy by zvolený vzorek Zn:SAM vykazoval dvě doby života (Tab. 4) s průměrnou hodnotou 1,15 ns ($\pm 0,02$ ns), i když tvar vážených reziduí není úplně ideální a body zcela nekopírují osu x . Parametr χ_R^2 pro dvě doby života činí 5,23. Vyšší relativní zastoupení má čas s vyšší hodnotou 2,20 ns. Graf s vyhasínací křivkou, s proložení dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 61.

Tab. 4: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:SAM. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 2 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| 2 doby života | $\chi_R^2 = 5,23$ | | | |
|---------------|----------------------|-------------|----------------------|-------|
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T₁ | 0,11 ± 0,02 | B₁ | 31,36 |
| | T₂ | 2,20 ± 0,02 | B₂ | 68,64 |
| T | 1,15 ± 0,02 | ΣB | 100,00 | |



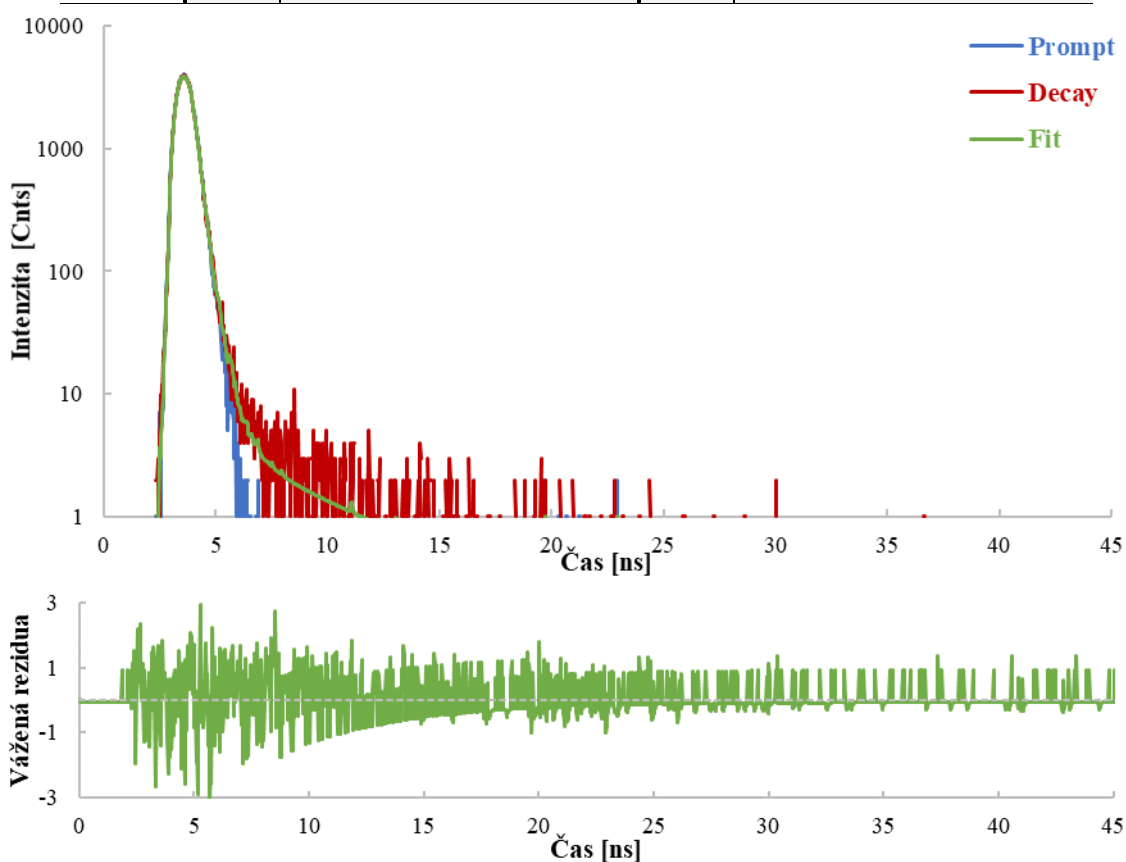
Obr. 61: Vyhasinací křivka pro vzorek s prekurzory Zn:SAH (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro dvě doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x, která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x.

Pro vzorek obsahující prekurzory Zn:SAH byla zvolena NanoLED dioda o vlnové délce 330 nm a emisní monochromátor byl nastaven na 360 nm. U tohoto vzorku nelze úplně jednoznačně určit počet dob života. Dle proložení dat exponenciální funkcí bylo zjištěno, že se opět nejedná o monoexponenciální křivku, tedy vzorek s jednou dobou života. Tomu odpovídá i tvar vyhasinací křivky, která opět za píkem nemá lineární tvar. Dle vizuální kontroly proložení dat by se mohlo jednat o vzorek, který vykazuje 4 nebo 5 dob života, což je poměrně vysoký počet časů. Tomuto vyhodnocení by sice odpovídal správný tvar vážených reziduí, kdy rozložení bodů je poměrně náhodné a kopíruje osu x, ale neodpovídá tomu hodnota parametru χ_R^2 , která se s přibývajícím počtem parametrů, v podobě dob života, snižovala a pro čtyři i pět dob života tato hodnota činila 0,39. Dle tohoto parametru by se jako správné vyhodnocení jevila 1 doba života, což bylo viz. výše vyvráceno. Další parametr, který je nutný brát v úvahu, jsou hodnoty relativních amplitud, které ve většině případů vycházely záporně, což je nesmyslný výsledek. Navíc se také tato hodnota nacházela v tisících procent. Nelze určit správnost výsledku ani dle naměřených dob života. Všechny časy jsou velmi nízké a většina se nachází řádově v desítkách pikosekund. V porovnání vyhodnocení čtyř a pěti dob života se dle amplitud nejlépe jeví čtyři doby života, kde průměrná doba života vychází na 1,46 ns ($\pm 0,13$ ns), i když se zde nachází velmi krátká komponenta se zápornou amplitudou v tisících procent (Tab. 5).

Parametr χ_R^2 pro toto vyhodnocení činí 0,39. Graf s vyhasínací křivkou, s proložením dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 62.

Tab. 5: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:SAH. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 4 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| | | $\chi_R^2 = 0,39$ | | | |
|---------------|----------------------|--------------------|--|----------------------|---------------|
| | | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| 4 doby života | T₁ | 0,079 ± 0,015 | | B₁ | -9 349,00 |
| | T₂ | 0,078 ± 0,005 | | B₂ | 9 447,26 |
| | T₃ | 0,696 ± 0,103 | | B₃ | 1,27 |
| | T₄ | 4,982 ± 0,413 | | B₄ | 0,47 |
| | T | 2,28 ± 0,07 | | ∑B | 100,00 |



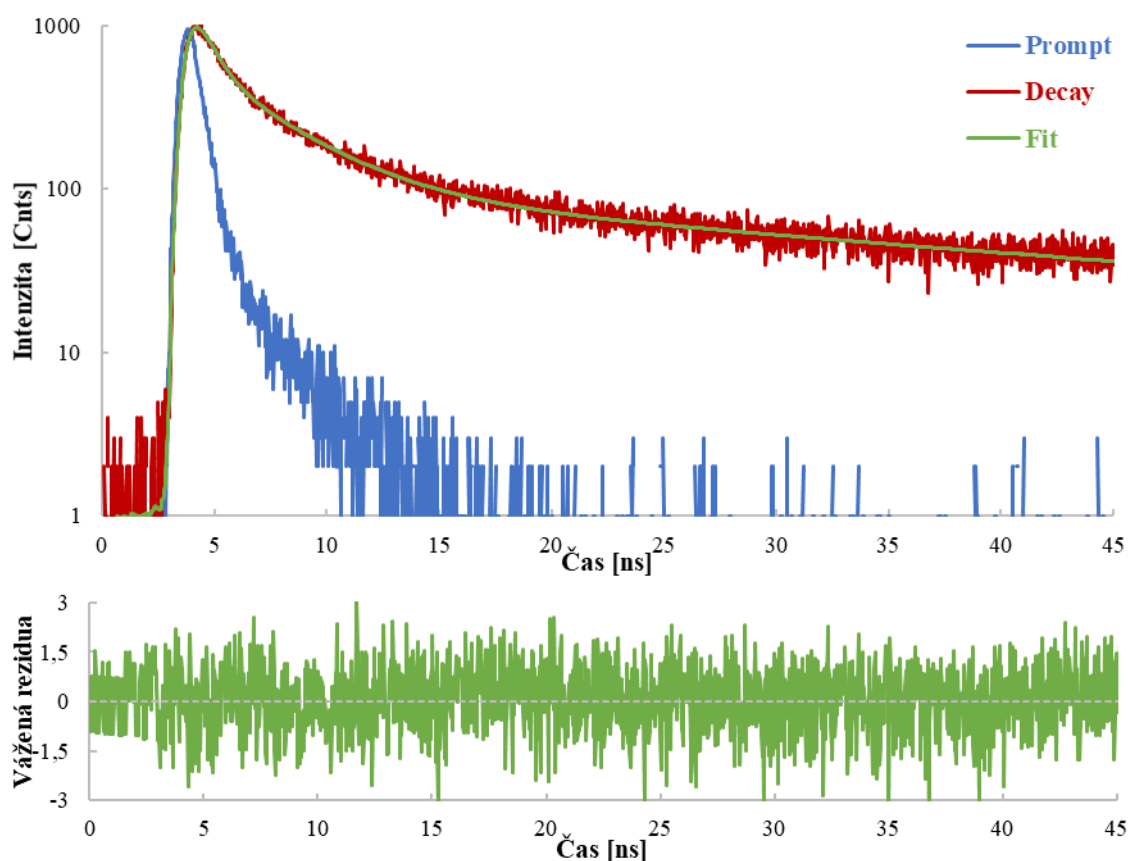
Obr. 62: Vyhasínací křivka pro vzorek s prekuzory Zn:SAH (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro čtyři doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x, která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x.

K měření vyhasínací křivky fluorescence vzorku s prekuzory Zn:CYS byla zvolena NanoLED dioda o vlnové délce 280 nm a emisní monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 400 nm. Na základě vizuální kontroly proložení dat příslušnou exponenciální funkcí by tento vzorek měl vykazovat tři až pět dob života. Pro jednu a dvě doby života proložení není úplně ideální a jednu dobu života lze opět vyloučit z tvaru naměřené vyhasínací křivky, kdy křivka za píkem není lineární. Navíc se tato křivka nevrátila do šumu detektoru, jak by tomu

správně mělo být. Tyto doby života lze také vyvrátit pomocí parametru χ_R^2 , jehož hodnoty jsou v těchto případech vyšší než optimální rozhraní od 0,8 do 1,2. Dalším rozhodujícím parametrem je tvar vážených reziduí, kdy náhodné rozložení dat kolem osy x je v případě pro tři až pět dob života. Tedy přidáním dalšího parametru doby života došlo k vylepšení tvaru reziduí, proložení dat a ke zlepšení hodnoty parametru χ_R^2 . Rozhodujícím faktorem byly výsledné časy a relativní amplitudy, přičemž pro čtyři a pět dob života vycházely nesmyslné hodnoty v tisících sekundách pro pět dob života a jednotkách sekund pro čtyři doby života. Těmto hodnotám odpovídala stejná hodnota odchylky, a navíc u těchto časů vycházela 100% relativní amplituda a pro ostatní časy byla naopak nulová. Vzorek s prekurzory Zn:CYS tedy vykazoval 3 doby života (Tab. 6), jejichž průměrná hodnota činí 14,19 ns ($\pm 0,27$ ns), kdy nejvyšší zastoupení má nejdelší čas s hodnotou 38,70 ns. Parametr χ_R^2 pro toto vyhodnocení činí 0,99. Graf s vyhasínací křivkou, s proložení dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 63.

Tab. 6: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:CYS. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| 3 doby života | $\chi_R^2 = 0,99$ | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T₁ | 3,32 ± 0,09 | B₁ | 26,85 |
| | T₂ | 0,55 ± 0,02 | B₂ | 15,73 |
| T₃ | 38,70 ± 0,69 | B₃ | 57,42 | |
| T | 14,19 ± 0,27 | ∑B | 100,00 | |

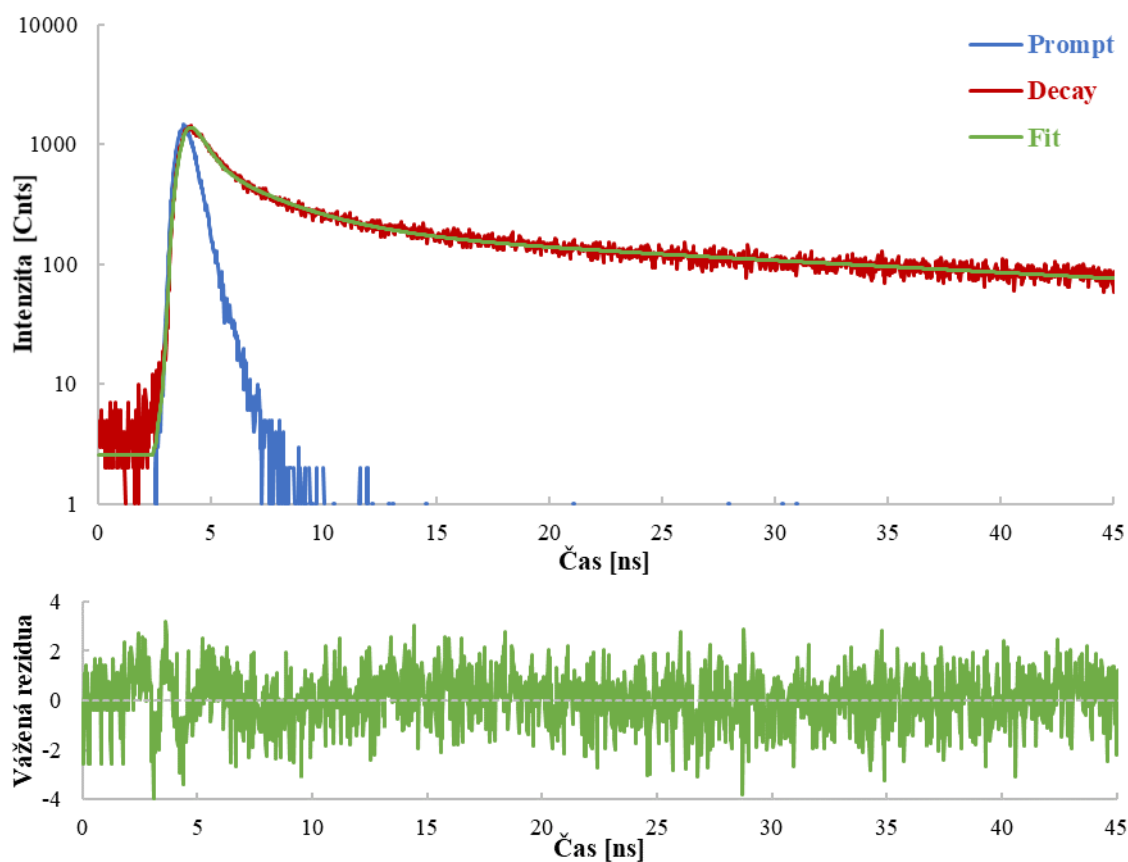


Obr. 63: Vyhasinací křivka pro vzorek s prekurzory Zn:CYS (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro tři doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x, která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x.

Pro vzorek s prekurzory Zn:HCYS byla zvolena NanoLED dioda o vlnové délce 280 nm a emisní monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 400 nm. Tento vzorek se choval velmi podobně jako vzorek s prekurzory Zn:CYS a také vykazoval 3 doby života. Na základě vizuální kontroly proložení dat by tento vzorek mohl vykazovat tři až pět dob života, což potvrzuje i parametr χ_R^2 , který se pro jednu a dvě doby života nachází mimo optimální rozmezí 0,8 až 1,2. Jednu dobu života lze také vyvrátit tvarem vyhasinací křivky, který odpovídá multiexponenciální křivce. Navíc se tato křivka nevrátila do šumu detektoru, jak by tom správně mělo být. Na základě rozložení vážených reziduí kolem osy x je patrné, že by vzorek měl vykazovat tři až pět dob života. Pro čtyři a pět dob vychází ale nesmyslné hodnoty, a to v desítkách milisekund pro čtyři doby a stovkách mikrosekund pro pět dob života, kdy stejnou hodnotu mají jejich odchylky. Nakonec je nutné brát v úvahu hodnoty relativních amplitud, které dávají smysl jen pro jednu, dvě a tři doby života. Na základě této analýzy je tedy patrné, že vzorek obsahující prekurzory Zn:HCYS vykazoval tři doby života (Tab. 7), s průměrnou hodnotou 15,31 ns ($\pm 0,23$ ns), přičemž nejvyšší relativní zastoupení má nejdelší čas s hodnotou 42,39 ns. Parametr χ_R^2 činí 1,19. Graf s vyhasinací křivkou, s proložení dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 64.

Tab. 7: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:HCYS. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| 3 doby života | $\chi_R^2 = 1,19$ | | | |
|---------------|-------------------|-----------------|--------------------|-------|
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $3,17 \pm 0,12$ | B_1 | 16,59 |
| | T_2 | $0,36 \pm 0,01$ | B_2 | 11,44 |
| T_3 | $42,39 \pm 0,57$ | B_3 | 71,97 | |
| T | $15,31 \pm 0,23$ | ΣB | 100,00 | |



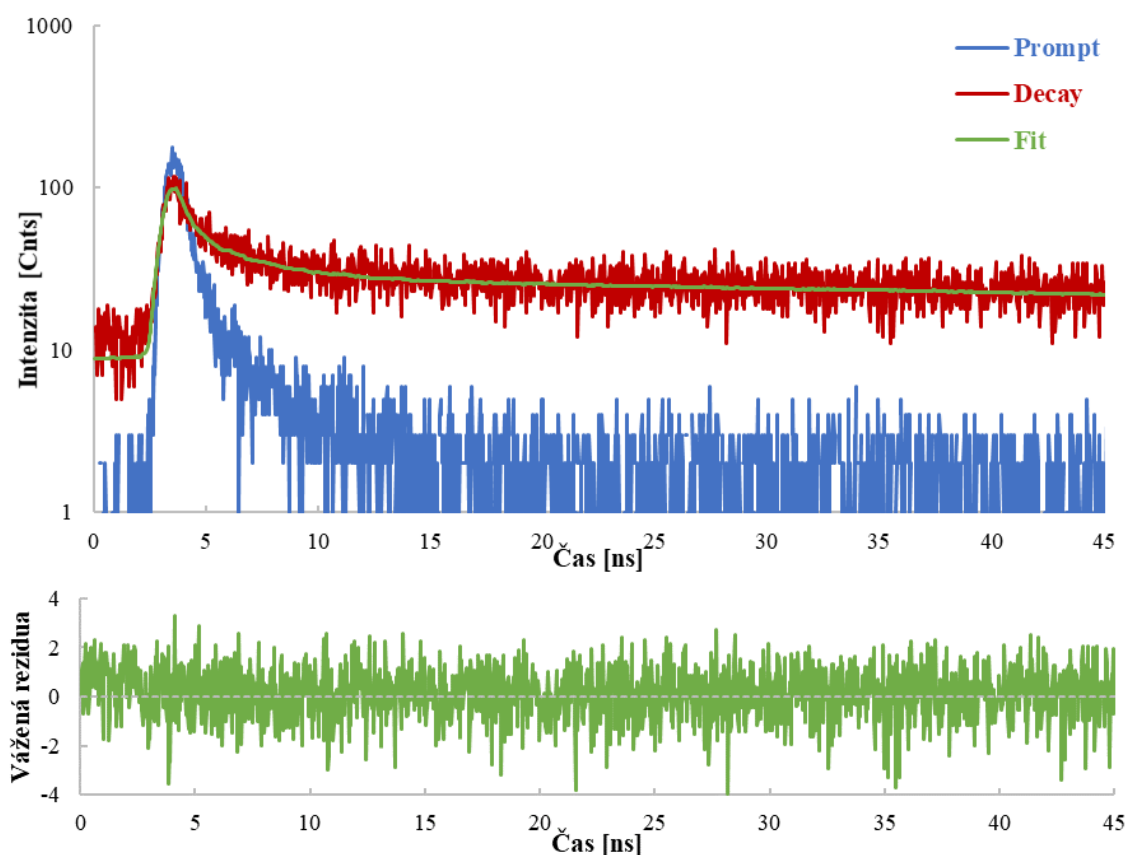
Obr. 64: Vyhasinací křivka pro vzorek s prekurzory Zn:HCYS (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro tři doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x , která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x .

Měření dob života vzorku obsahující prekurzory Zn:GSSG probíhalo za použití NanoLED diody o vlnové délce 250 nm a při nastavení emisního monochromátoru na vlnovou délku 400 nm. Dle excitačního spektra pro tento vzorek by správně měla být zvolena vlnová délka budícího záření kolem 225 nm. Bohužel touto diodou tento přístroj nedisponuje a musela být použita nejkratší možná vlnová délka. Na základě vizuální kontroly položení naměřených dat exponenciální křivkou je patrné, že se nejedná o mono ani o bi-exponenciální křivku. Vyhodnocení pro jednu dobu života lze opět vyvrátit díky tvaru vyhasinací křivky, která za píkem nemá úplně lineární tvar. Navíc se tato křivka nevrátila do šumu detektoru, jak by tomu

správně mělo být. Parametr χ_R^2 se nachází nad hranicí optimální hodnoty 1,2 v případě vyhodnocení pro jednu dobu života. V ostatních případech se nachází v optimálním rozmezí této hodnoty. Dle tvaru vážených reziduí by tento vzorek měl vykazovat tři až pět dob života, kdy jsou body náhodně rozložena kolem osy x . Ale pro čtyři doby života je zde přítomen čas v jednotkách milisekund se stejnou hodnotou odchylky, a navíc je tento čas zastoupen se 100% relativní amplitudou a tento výsledek nedává tedy smysl. Nesmyslné hodnoty amplitud jsou u v případě pěti dob života. Na základě všech těchto parametrů bylo pro vzorek Zn:GSSG vyhodnoceny tři doby života (Tab. 8) s průměrnou hodnotou 27,38 ns ($\pm 2,35$). Nejvyšší procentuální zastoupení má nejdelší čas 79,77 ns. Parametr χ_R^2 pro toto vyhodnocení činí 1,15. Graf s vyhasínací křivkou, s proložením dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 65.

Tab. 8: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:GSSG. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| 3 doby života | $\chi_R^2 = 1,15$ | | | |
|---------------|----------------------|--------------|----------------------|-------|
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T₁ | 2,15 ± 0,46 | B₁ | 4,44 |
| | T₂ | 0,22 ± 0,04 | B₂ | 6,53 |
| | T₃ | 79,77 ± 6,55 | B₃ | 89,03 |
| T | 27,38 ± 2,35 | ∑B | 100,00 | |

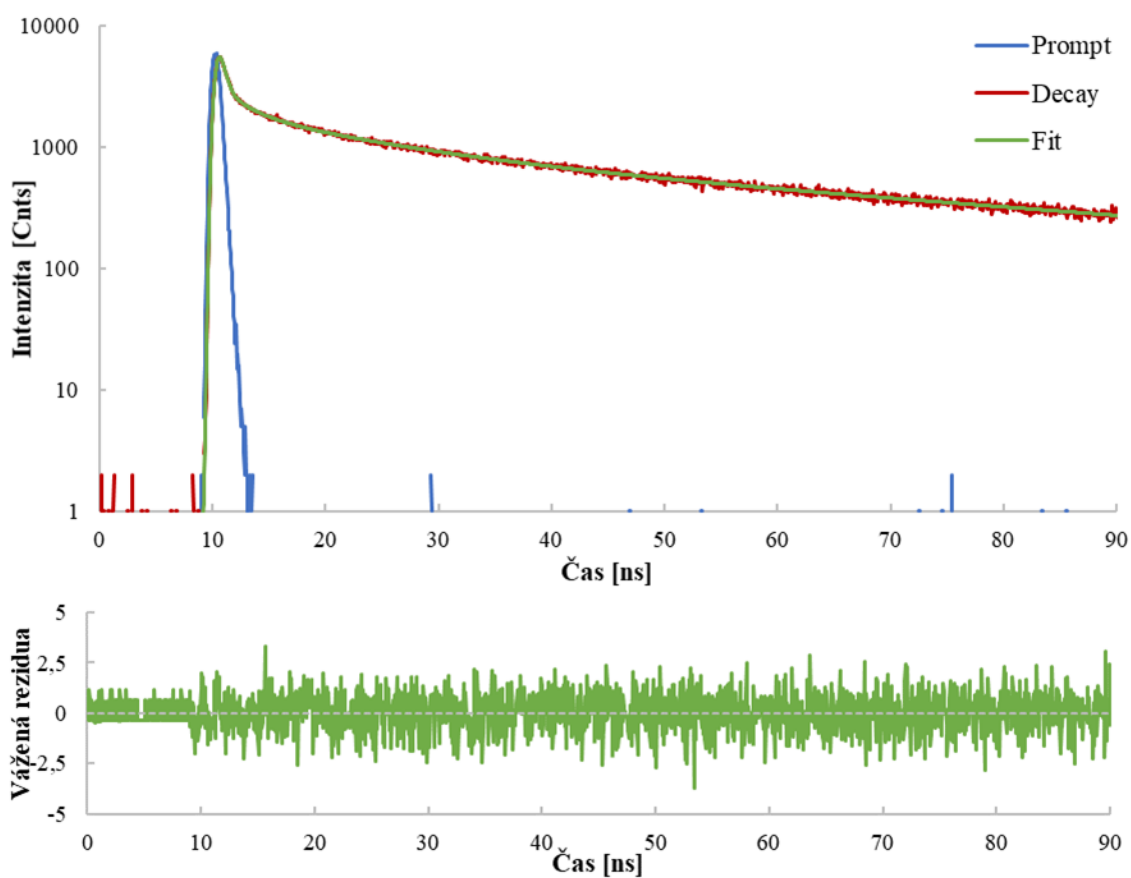


Obr. 65: Vyhasínací křivka pro vzorek s prekurzory Zn:GSSG (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro tři doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x, která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x.

Posledním měřeným vzorkem byl roztok obsahující prekurzory Zn:Cd. Pro toto měření byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 280 nm a emisní monochromátor byl nastaven na hodnotu 480 nm. Na základě vizuální kontroly proložení dat se jedná o vzorek, který vykazuje tři až pět dob života. I zde je možné z tvaru vyhasínací křivky vyloučit jednu dobu života, jelikož křivka nemá lineární tvar za píkem. Jednalo se o vzorek, který vykazoval nejvyšší intenzitu fluorescence a v tomto případě nedošlo k vrácení signálu do šumu. Jednu a dvě doby života lze také vyvrátit pomocí parametru χ_R^2 , který je pro tato vyhodnocení vyšší než 1,2. Naopak pro tři, čtyři i pět dob života se hodnota tohoto parametru nachází v optimálním rozmezí 0,8 až 1,2. Dle náhodného rozložení dat kolem osy x u vážených reziduí by tento vzorek vykazoval čtyři nebo pět dob života. Hodnoty relativních amplitud ani pro jedno vyhodnocení dob života nejsou vyšší než 100 % ani nejsou záporné. Na základě časů lze vyvrátit pět dob života, kde se nachází čas řádově v desítkách mikrosekund. Dle všech těchto parametrů by tento vzorek měl vykazovat čtyři doby života, což může být poměrně vysoký počet časů. Průměrná hodnota doby života činí 19,81 ns ($\pm 0,28$ ns), kdy nejvyšší procentuální zastoupení má nejdelší čas 64,04 ns. Je zde přítomna i poměrně krátká komponenta s hodnotou 310,27 ps. Hodnota parametru χ_R^2 činí 0,92. Graf s vyhasínací křivkou, s proložením dat a s váženými reziduí je zobrazen na Obr. 66.

Tab. 9: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:Cd. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 4 doby života. Hodnota T odpovídá průměrné době života.

| 4 doby života | $\chi^2_R = 0,92$ | | | |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|------|
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T₁ | $2,25 \pm 0,23$ | B₁ | 3,68 |
| T₂ | $12,64 \pm 0,41$ | B₂ | 16,82 | |
| T₃ | $64,04 \pm 0,47$ | B₃ | 74,49 | |
| T₄ | $0,31 \pm 0,01$ | B₄ | 5,01 | |
| T | $19,81 \pm 0,28$ | ΣB | 100,00 | |



Obr. 66: Vyhasínací křivka pro vzorek s prekurzory Zn:Cd (červená křivka, Decay), která je proložena exponenciální funkcí pro čtyři doby života (zelená křivka, Fit), při analýze se odečítá odezva lampy (modrá křivka, Prompt). Dále je na obrázku zobrazen graf pro vážená rezidua, kde je šedou čarou naznačena osa x , která protíná osu y v bodě 0, tak aby bylo lépe znázorněno rozložení dat kolem osy x .

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá formováním fluorescenčních komplexů pomocí UV záření a následnou jejich charakterizací. Na základě spolupráce mezi Fakultou chemickou VUT a Ústavem chemie a biochemie na Mendelově univerzitě v Brně vznikl článek (zmiňovaný v kapitole 3.1), který se zabýval formováním fluorescenčních částic pomocí UV záření. Z těchto výsledků vykazovaly nejlepší vlastnosti QDs vznikající z kadmia. U tohoto kovu je ale známý problém s toxicitou a následnou aplikací, proto byly k dalším experimentům vybrány organické molekuly, které se běžně vyskytují v buňkách, a to konkrétně S-adenosylmethionin (SAM), S-adenosylhomocystein (SAH), cystein (CYS), homocystein (HCYS) a glutathion disulfid (GSSG). Tyto organické molekuly byly kombinovány se zinkem, který velmi dobře interaguje se sírou, která je součástí všech výše zmíněných organických molekul a docházelo tak k formování fluorescenčních komplexů přes thiolovou skupinu. K těmto typům prekurzorů byla k porovnání vybrána kombinace dvou kovů zinku a kadmia, kdy jako stabilizační sirná sloučenina byla vybrána kyselina merkaptotantarová (MSA). U prekurzorů Zn:Cd lze hovořit o kvantových tečkách, a to na základě výsledků dynamického rozptylu světla (DLS), které byly získány na Mendelově univerzitě v Brně, kdy velikost těchto částic se pohybovala v jednotkách nanometrů. Ostatní typy prekurzorů nebyly pro toto měření vhodné, roztoky byly zakalené a jednalo se o nestabilní systém, kde docházelo k agregaci. Nicméně to bylo pozorováno i při měření fluorescenčních spekter na Fakultě chemické. Na základě těchto výsledků u prekurzorů s organickými molekulami nelze s jistotou mluvit o kvantových tečkách, proto vzniklé částice jsou nazývány jako fluorescenční komplexy.

První část této práce je věnována samotné **tvorbě fluorescenčních komplexů** pomocí UV záření. K tomuto experimentu byly vybrány roztoky prekurzorů Zn:Cd, Zn:SAM, Zn:SAH, Zn:CYS a Zn:GSSG. Aby bylo zabráněno difúzi vzniklých komplexů v daném prostředí roztoku, byl ke vzorku přidán 2% roztok agarózy, čímž došlo k jeho zafixování. Vzorky s prekurzory byly ozařovány 5 až 8 minut, a to laserem o vlnové délce 375 nm. Během měření byl zjištěn značný vliv přípravy vzorků pro měření na fluorescenčním mikroskopu. Vzorky s 2% roztokem agarózy bylo nutné ponechat dostatečně zatuhnout, aby došlo ke genezi fluorescenčních komplexů UV zářením. Pokud bylo měření provedeno cca 5 minut od doby přípravy ke tvorbě fluorescenčních komplexů vůbec nedošlo. Roztok prekurzorů nejspíš nebyl v gelu dostatečně zafixován, a tak nedocházelo ke tvorbě fluorescenčních komplexů s vyšší intenzitou fluorescence. Tvorba fluorescenčních komplexů byla pozorována pouze u prekurzorů Zn:SAH, Zn:GSSG a Zn:Cd. U těchto prekurzorů byl pozorován značný nárůst intenzity fluorescence v čase, což právě značí tvorbu fluorescenčních komplexů. Geneze fluorescenčních komplexů lze vysvětlit tak, že thiolové skupiny jsou fotooxidovány použitím UV záření za vzniku disulfidických můstků. V reakčním prostředí dojde k disociaci za vzniku záporného náboje na této molekule. Zinek je fotooxidován za vzniku zinečnatého iontu, který interaguje se záporně nabitou molekulou s disulfidickým můstkem. V daném prostředí pak dochází k agregaci těchto molekul za vzniku fluorescenčních komplexů [44, 45]. Dále by mohl být zkoumán vliv způsobu přípravy a gelace roztoku agarózy na genezi fluorescenčních komplexů, také by mohl být tento experiment doplněn ozářením prekurzorů Zn:HCYS, aby tato analýza byla kompletní.

Druhá část diplomové práce se zabývala **spektrální charakteristikou zvolených prekurzorů**, a to před a po ozáření při vlnové délce 250 nm v transiluminátoru. U oszářených prekurzorů byl pozorován zákal, a to nejvíce u vzorku SAM a SAH. Jako čirý se jevil roztok s ozářenými prekurzory Zn:Cd. U zakalených vzorku byla pozorována sedimentace větších částic, které byly viditelné pouhým okem. Se sedimentací docházelo ke změně intenzity fluorescenčních spekter. U roztoků obsahujících prekurzory Zn:SAM a Zn:CYS byl pozorován nárůst intenzity fluorescence po sedimentaci. Nárůst intenzity může být způsoben eliminací rozptylu částic, které sedimentovaly na dno kyvety. Naopak u roztoků obsahujících prekurzory Zn:SAH a Zn:HCYS byl pozorován pokles intenzity fluorescence se sedimentací částic. Zde zřejmě vznikaly větší fluorescenční komplexy, které sedimentovaly na dno kyvety a tím se snížila intenzita fluorescence. Každopádně je to zajímavé a nečekané chování, které by určitě stalo za další zkoumání. Při tomto měření byly zaznamenány excitační a emisní maxima, která byla porovnávána s maximy naměřených u stejných prekurzorů, ale nově připravených. Tyto prekurzory byly změřeny před jejich ozářením, i po ozáření při vlnové délce 250 nm. Nejlepší fluorescenční vlastnosti vykazoval roztok s prekurzory Zn:Cd. Intenzita fluorescence dosahovala hodnot až 800 kCnt. Emisní spektrum bylo symetrické a s rostoucím časem ozáření docházelo k bathochromnímu posunu vlnových délek, zároveň s rostoucím časem ozáření rostla intenzita fluorescence. Tento jev byl pozorován u většiny vzorků, kromě Zn:SAH a Zn:GSSG. Zde byl pozorován s rostoucím časem ozáření pokles intenzity fluorescence. Toto chování neodpovídá očekávané tvorbě fluorescenčních komplexů, které zvyšují intenzitu fluorescence. Dále bylo pozorováno velmi podobné chování prekurzorů zinku s CYS a HCYS. Jejich excitační i emisní maxima jsou téměř identické (shrnutí výsledků naměřených excitačních a emisních spekter je uvedeno v Tab. 10). Nejnižší intenzitu fluorescence vykazoval roztok s Zn:SAH. U roztoku s prekurzory Zn:SAM byl v emisním spektru pozorován hypsochromní posun vlnových délek, po ozáření se emisní maximum posunulo směrem ke kratším vlnovým délkám. Každopádně u měření fluorescenčních spekter prekurzorů před a po jejich ozáření byl očekáván nejen nárůst intenzity, ale přítomnost druhého maxima, které se pouze u prekurzorů nevyskytovalo. To bohužel u většiny spekter nebylo pozorováno, jen u roztoku s prekurzory Zn:SAM bylo po ozáření nalezeno druhé excitační i emisní maximum.

Tab. 10: Shrnutí výsledků excitačních (λ_{EX}) a emisních (λ_{EM}) maxim při daných vlnových délkách.

| Prekurzory | 1. měření | | 2. měření | | | |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | PO ozáření | | PŘED ozářením | | PO ozáření | |
| | λ_{EX} [nm] | λ_{EM} [nm] | λ_{EX} [nm] | λ_{EM} [nm] | λ_{EX} [nm] | λ_{EM} [nm] |
| Zn:SAM | 355 | 379 a 397 | 284 | 417 | 284 a 353 | 379 a 397 |
| Zn:SAH | 324 | 380 | 286 | 357 | 286 | 380 |
| Zn:CYS | 284 | 394 | 260 | 358 | 284 | 394 |
| Zn:HCYS | 282 | 394 | 284 | 357 | 277 | 399 |
| Zn:GSSG | - | - | 224 a 236 | 392 a 423 | 224 a 236 | 423 |
| Zn:Cd | 354 | 466 | 0 | 0 | 265 | 466 488 |

Poslední část této práce se zabývala **měřením dob života** ozářených vzorků s prekurzory. Z důvodu toho, že pro tyto typy vzorků nejsou známy doby života, bylo vyhodnocení provedeno dle několika kritérií. A to podle vizuální kontroly proložení dat danou exponenciální funkcí, vizuální kontrolou vážených reziduí, dle parametru χ_R^2 , který se správně má pohybovat od 0,8 do 1,2, dle relativních amplitud a také dle výsledných dob života a jejich hodnot. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 11. Nejhorší temporální vlastnosti vykazoval vzorek Zn:SAM a Zn:SAH. Vyhasínací křivka měla velmi úzký pík a dle parametru χ_R^2 nebyla žádná z možných variant správná. Pro vzorek Zn:SAM bylo možné na základě ostatních parametrů určit počet dob života, i když body vážených reziduí nebyly rovnoměrně rozloženy kolem osy x . Tento vzorek s vzniklými fluorescenčními komplexy vykazoval 2 doby života, přičemž průměrná doba života je poměrně krátká a pohybuje se řádově v jednotkách ns. U vzorku Zn:SAH nelze se 100% správností říct, kolik dob života tento vzorek vykazuje. Všechny výše zmiňované parametry se nacházely mimo optimální hodnoty. Nejrozzumnější výsledky byly u 4 dob života, kde je taktéž poměrně krátká průměrná doba života v jednotkách ns. Naopak nejlepší vlastnosti vykazovaly vzorky zinku s CYS, HCYS a GSSG. Všechny tyto vzorky vykazovaly 3 doby života a průměrná doba života se pohybovala v desítkách nanosekund. Nejdelší čas vykazoval vzorek Zn:GSSG, a to 27,38 ns ($\pm 2,35$ ns). Vzorek Zn:Cd vykazuje ze všech nejvyšší počet časů, a to 4 doby života. Průměrná hodnota se také pohybovala řádově v desítkách ns, a to 18,81 ns ($\pm 0,28$ ns). Tento vzorek vykazoval nejvyšší intenzitu fluorescence.

Tab. 11: Shrnutí výsledků měření dob života pro všechny typy prekurzorů.

| Prekurzory | Počet dob života | Průměrná doba života [ns] | χ_R^2 [-] |
|------------|------------------|---------------------------|----------------|
| Zn:SAM | 2 | 1,15 \pm 0,02 | 5,23 |
| Zn:SAH | 4 | 1,46 \pm 0,13 | 0,39 |
| Zn:CYS | 3 | 14,19 \pm 0,27 | 0,99 |
| Zn:HCYS | 3 | 15,31 \pm 0,23 | 1,19 |
| Zn:GSSG | 3 | 27,38 \pm 2,35 | 1,15 |
| Zn:Cd | 4 | 18,81 \pm 0,28 | 0,92 |

Jelikož se jedná o kombinaci prekurzorů, které nebyly zatím spektrálně ani temporálně charakterizovány, nelze s určitostí říci, které výsledky jsou správné a které špatné. Jedná se o popis těchto prekurzorů a zformovaných fluorescenčních komplexů. Vybrané vzorky byly poměrně nestabilní, docházelo ke srážení a vzniku zákalu, který následně negativně ovlivňoval spektrální charakteristiku těchto látek. I přesto poměrně reprodukovatelné výsledky byly u vzorků, kde jako stabilizující sirná sloučenina vystupoval cystein, homocystein v kombinaci se zinkem a kyselina merkaptojantarová v kombinaci se zinkem a kadmium. Nejlepší spektrální vlastnosti byly zejména u Zn:Cd, který vykazoval vysokou intenzitu fluorescence a bylo potvrzeno, že kadmium zlepšuje fluorescenční vlastnosti. U tohoto vzorku byla také pozorována tvorba fluorescenčních komplexů na fluorescenčním konfokálním mikroskopu. Pro ozáření 375 nm lze brát v úvahu také vzorky se zinkem a SAH a GSSG.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] DRBOHLAVOVA, Jana, Vojtech ADAM, Rene KIZEK a Jaromir HUBALEK. Quantum Dots — Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, 10(2), 656-673 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.3390/ijms10020656. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/2/656>
- [2] HLAVÁČEK, Antonín a Petr SKLÁDAL. Kvantové tečky: Příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy* [online]. 2011, (105), 611-615 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_611-615.pdf
- [3] MURPHY, Douglas B. a Michael W. DAVIDSON. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, c2013. ISBN 978-047-1692-140.
- [4] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6
- [5] DEERINCK, Thomas J. The Application of Fluorescent Quantum Dots to Confocal, Multiphoton, and Electron Microscopic Imaging. *Toxicologic Pathology* [online]. 2008, 36(1), 112-116 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1177/0192623307310950. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623307310950>
- [6] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2010. ISBN 978-80-200-1846-5.
- [7] GOMES, Suzete A.O., Cecilia Stahl VIEIRA, Diogo B. ALMEIDA, Jacenir R. SANTOS-MALLET, Rubem F. S. MENNA-BARRETO, Carlos L. CESAR a Denise FEDER. CdTe and CdSe Quantum Dots Cytotoxicity: A Comparative Study on Microorganisms. *Sensors* [online]. 2011, 11(12), 11664-11678 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.3390/s111211664. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/11/12/11664>
- [8] DERFUS, Austin M., Warren C. W. CHAN a Sangeeta N. BHATIA. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters* [online]. 2004, 4(1), 11-18 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1021/nl0347334. ISSN 1530-6984. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl0347334>
- [9] ZHOU, Juan, Yong YANG a Chun-yang ZHANG. Toward Biocompatible Semiconductor Quantum Dots: From Biosynthesis and Bioconjugation to Biomedical Application. *Chemical Reviews* [online]. 2015, 115(21), 11669-11717 [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00049. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00049>
- [10] BALLOU, Byron, B. Christoffer LAGERHOLM, Lauren A. ERNST, Marcel P. BRUCHEZ a Alan S. WAGGONER. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2004, 15(1), 79-86 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1021/bc034153y. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc034153y>

- [11] CHAN, Warren C.W, Dustin J MAXWELL, Xiaohu GAO, Robert E BAILEY, Mingyong HAN a Shuming NIE. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2002, 13(1), 40-46 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00282-3. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902002823>
- [12] JAMIESON, Timothy, Raheleh BAKHSHI, Daniela PETROVA, Rachael POCOCK, Mo IMANI a Alexander M. SEIFALIAN. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* [online]. 2007, 28(31), 4717-4732 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.014. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120700539X>
- [13] BARROSO, Margarida M. Quantum Dots in Cell Biology [online]. 2011, 59(3), 237-251 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1369/0022155411398487. ISSN 0022-1554. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155411398487>
- [14] MCPHERSON, Robert A. a Gil HARDY. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* [online]. 2011, 14(6), 562-568 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32834c1780. ISSN 1363-1950. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00075197-201111000-00009>
- [15] FLORA, Swaran J.S. a Vidhu PACHAURI. Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2010, 7(7), 2745-2788 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.3390/ijerph7072745. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/7/7/2745>
- [16] Cysteine. PubChem [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5862>
- [17] MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 8073190133.
- [18] PŘISTOUPILOVÁ, Kamila, Tomáš Ivan PŘISTOUPIL a Michael HEYROVSKÝ. Homocystein - molekula těšící se rostoucí pozornosti. *Chemické listy* [online]. 1999, (93), 365-374 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_365-374.pdf
- [19] SELHUB, J. Homocysteine Metabolism. *Annual Review of Nutrition* [online]. 1999, 19(1), 217-246 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1146/annurev.nutr.19.1.217. ISSN 0199-9885. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.19.1.217>
- [20] LU, Shelly C. S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2000, 32(4), 391-395 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/S1357-2725(99)00139-9. ISSN 13572725. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272599001399>
- [21] S-adenosylmethionine. PubChem [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/34755>
- [22] PRYOR, William. *Free Radicals in Biology* [online]. Elsevier, 1982 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/B978-0-12-566505-6.X5001-7. ISBN 9780125665056.

- [23] OWEN, Joshua B. a D. Allan BUTTERFIELD. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. BROSS, Peter a Niels GREGERSEN, ed. Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-7-7, s. 269-277 [cit. 2019-04-20]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60761-756-3_18. ISBN 978-1-60761-755-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-756-3_18
- [24] Oxiglutatione. PubChem [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65359>
- [25] VALEUR, Bernard. Molecular fluorescence: principles and applications. New York: Wiley-VCH, c2002. ISBN 35-272-9919-X.
- [26] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [27] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [28] CHANG, Raymond a John W. THOMAN. Physical chemistry for the chemical sciences. Mill Valley, California: University Science Books, [2014]. ISBN 978-1-891389-69-6.
- [29] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. Biofyzikální chemie. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0791-1.
- [30] Fluorescence SpectraViewer. ThermoFisher Scientific [online]. [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
- [31] AUTY, M.A.E. Confocal microscopy: principles and applications to food microstructures. Food Microstructures [online]. Elsevier, 2013, 2013, 96-P8 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1533/9780857098894.1.96. ISBN 9780857095251. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709525150004X>
- [32] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. Praha 2, 2003 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>. Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta UK.
- [33] WAHL, Michael. PICOQUANT. Time-Correlated Single Photon Counting [online]. In: Berlin: PicoQuant, 2014 [cit. 2019-03-24]. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf
- [34] HIRVONEN, Liisa M a Klaus SUHLING. Wide-field TCSPC: methods and applications. Measurement Science and Technology [online]. 2017, 28(1) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1088/1361-6501/28/1/012003. ISSN 0957-0233. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-0233/28/i=1/a=012003?key=crossref.9e6b28e7886f019e4e359d1c7f8a7fca>
- [35] SHOTTON, David M. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. Journal of Cell Science [online]. 1989, (94), 175-206 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/content/joces/94/2/175.full.pdf>

- [36] SHOTTON, David M. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *Journal of Cell Science* [online]. 1989, (94), 175-206 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/content/joces/94/2/175.full.pdf>
- [37] NAREDI-RAINER, Nikolaus, Jens PRESCHER, Achim HARTSCHUH a Don C. LAMB. *Confocal Microscopy. Fluorescence Microscopy* [online]. Weinheim, Germany, 2013, 2013-04-04, , 175-213 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1002/9783527671595.ch5. ISBN 9783527671595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527671595.ch5>
- [38] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy* [online]. 2009, (103), 125-129 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [39] BUURMAN, E. P., R. SANDERS, A. DRAAIJER, H. C. GERRITSEN, J. J. F. VAN VEEN, P. M. HOUPPT a Y. K. LEVINE. Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope. *Scanning* [online]. 1992, 14(3), 155-159 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1002/sca.4950140305. ISSN 01610457. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sca.4950140305>
- [40] Fluorescence Filter Types. Chroma Technology Corporation [online]. [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://www.chroma.com/knowledge-resources/about-fluorescence/fluorescence-filters/fluorescence-filter-types>
- [41] Optical Filters. Newport Corporation [online]. [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://www.newport.com/c/optical-filters>
- [42] BASTIAENS, P. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in Cell Biology* [online]. 9(2), 48-52 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/S0962-8924(98)01410-X. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096289249801410X>
- [43] TRAUTMANN, Susane, Volker BUSCHMANN, Sandra ORTHAUS, Felix KOBERLING, Uwe ORTMANN a Rainer ERDMANN. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview [online]. In: . Berlin: PicoQuant, 2014 [cit. 2019-03-24].
- [44] NEJDL, Lukas, Jan ZITKA, Filip MRAVEC, Vedran MILOSAVLJEVIC, Ondrej ZITKA, Pavel KOPEL, Vojtech ADAM a Marketa VACULOVICOVA. Real-time monitoring of the UV-induced formation of quantum dots on a milliliter, microliter, and nanoliter scale. *Microchimica Acta* [online]. 2017, 184(5), 1489-1497 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1007/s00604-017-2149-8. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-017-2149-8>
- [45] LAN, Guo-Yu, Yang-Wei LIN, Yu-Fen HUANG a Huan-Tsung CHANG. Photo-assisted synthesis of highly fluorescent ZnSe(S) quantum dots in aqueous solution. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2007, 17(25) [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1039/b702469j. ISSN 0959-9428. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b702469j>
- [46] UEMATSU, T, H KITAJIMA, T KOHMA, T TORIMOTO, Y TACHIBANA a S KUWABATA. Tuning of the fluorescence wavelength of CdTe quantum dots with 2 nm resolution by size-selective photoetching. *Nanotechnology* [online]. 2009, 20(21) [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1088/0957-4484/20/21/215302. ISSN 0957-4484.

- Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/20/i=21/a=215302?key=crossref.5758aad95eac210e60be95062ad9711d>
- [47] CHATTERJEE, Anindita, Amiya PRIYAM, Subhash C. BHATTACHARYA a Abhijit SAHA. PH dependent interaction of biofunctionalized CdS nanoparticles with nucleobases and nucleotides: A fluorimetric study. Journal of Luminescence [online]. 2007, 126(2), 764-770 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/j.jlumin.2006.11.010. ISSN 00222313. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231306007691>
- [48] PICOQUANT. MicroTime 200: A versatile platform for time-resolved confocal microscopy. Berlin. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/microtime200_brochure.pdf

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

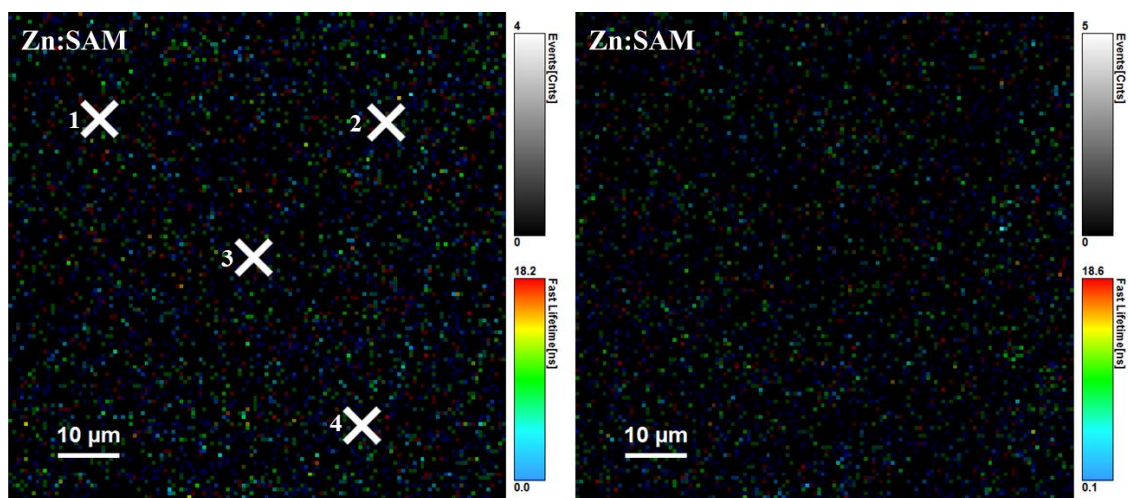
| | |
|-------|--|
| ADC | <i>analog-to-digital convertor</i> |
| ATP | adenosintrifosfát |
| CCD | <i>chargé coupled device</i> |
| CFD | <i>constant function discriminator</i> |
| CNS | centrální nervová soustava |
| CTP | cytidintrifosfát |
| CYS | cystein |
| DPC | <i>Digital PiezoControler</i> |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| FCS | fluorescenční korelační spektroskopie |
| FLIM | <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i> |
| GSG | glutathion |
| GSSG | glutathion disulfid |
| GTP | guanosintrifosfát |
| HCYS | homocystein |
| IC | vnitřní konverze (<i>internal conversion</i>) |
| IRF | <i>Instrument Response Function</i> |
| ISC | mezisystémový přechod (<i>inter-system crossing</i>) |
| KLSM | konfokální laserová skenovací mikroskopie |
| LCU | <i>laser combining unit</i> |
| MAA | kyselina merkaptooctová |
| MOU | hlavní optická jednotka (<i>main optical unit</i>) |
| MPA | kyselina merkaptopropionová |
| MSA | kyselina merkaptojantarová |
| NADPH | nikotinamidadenindinukleotid fosfát |
| NIR | blízká infračervená oblast |
| PGA | <i>programmable gain amplifier</i> |
| QDs | kvantové tečky (<i>quantum dots</i>) |
| QY | kvantový výtěžek (<i>quantum yield</i>) |
| SAH | S-adenosylhomocystein |
| SAM | S-adenosylmethionin |
| SPAD | <i>Single Photon Avalanch Diodes</i> |
| TAC | <i>time-to-amplitude convertor</i> |
| TCSPC | <i>time-correlated single-photon counting</i> |
| TOP | trioktylfosfin |
| TOPO | trioktylfosfinoxid |
| VR | vibrační relaxace (<i>vibrational relaxation</i>) |
| WD | window discriminator |

8.2 Seznam použitých symbolů

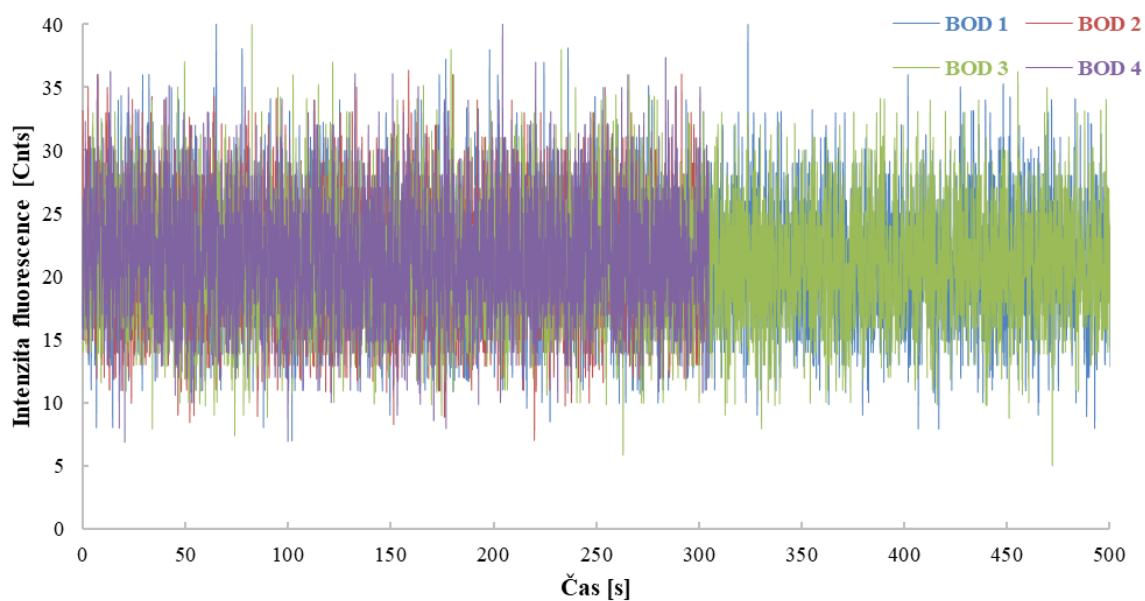
| | |
|----------------|---|
| A | korekční faktor |
| $[A]$ | koncentrace fluoroforu A |
| A^* | excitovaný stav fluoroforu A |
| $[A^*]$ | koncentrace fluoroforu A v excitovaném stavu |
| $[A^*]_0$ | koncentrace fluoroforu A v excitovaném stavu v čase 0 |
| B | předexponenciální funkce |
| $F(t)$ | obecný tvar exponenciální funkce |
| χ^2 | správnost proložení dat |
| χ_R^2 | redukovaná správnost proložení dat |
| k_r | rychlostní konstanta zářivého přechodu |
| k_{nr} | rychlostní konstanta nezářivého přechodu |
| λ_{EX} | excitační vlnová délka |
| λ_{EM} | emisní vlnová délka |
| n | počet dat (kanálů) |
| $N(t_k)$ | naměřená data |
| $N_c(t_k)$ | matematický model |
| S_0 | základní singletová hladina |
| S_1, S_2 | excitované singletové hladiny |
| σ_k | standardní odchylka |
| p | počet parametrů volnosti |
| t | čas |
| T_1 | excitovaná tripletová hladina |
| τ_S | doba života |
| τ_n | přirozená (vnitřní) doba života |
| Γ | rychlost emise fluoroforu |
| ν | počet stupňů volnosti |

9 PŘÍLOHY

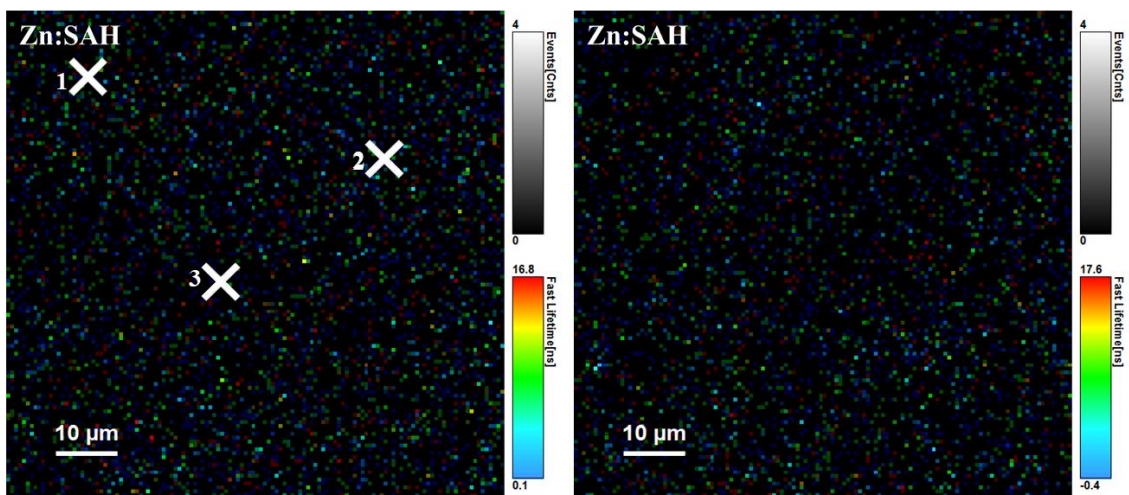
9.1 Tvorba fluorescenčních komplexů – metoda FLIM



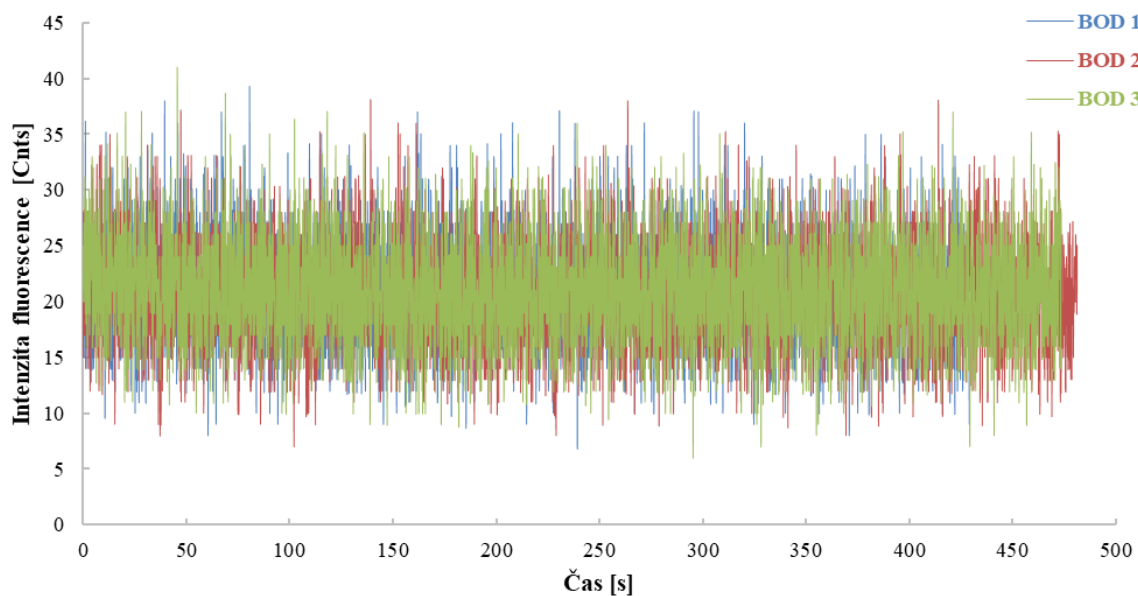
Obr. 67: V levé části se nachází sken před ozářením prekurzorů Zn:SAM, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.



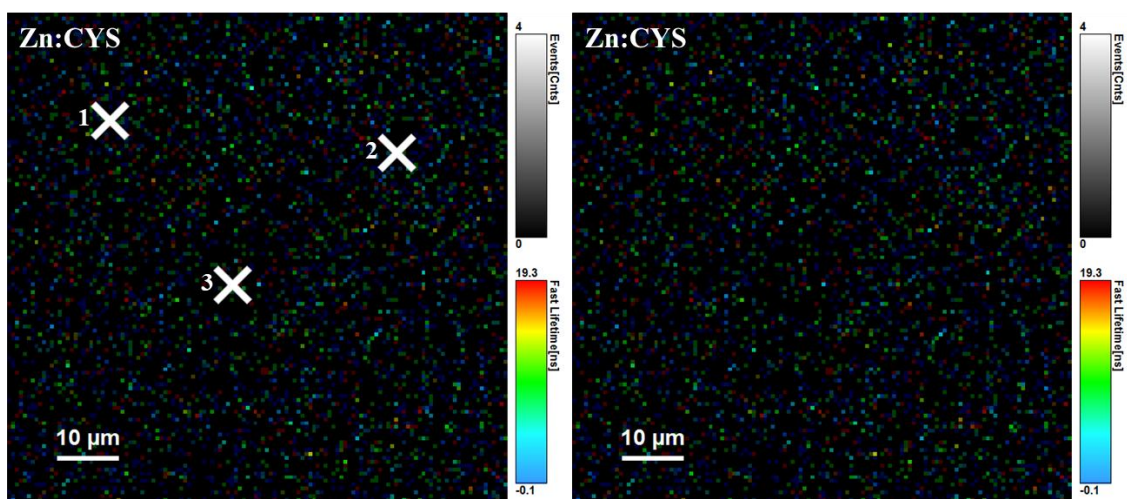
Obr. 68: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAM, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků.



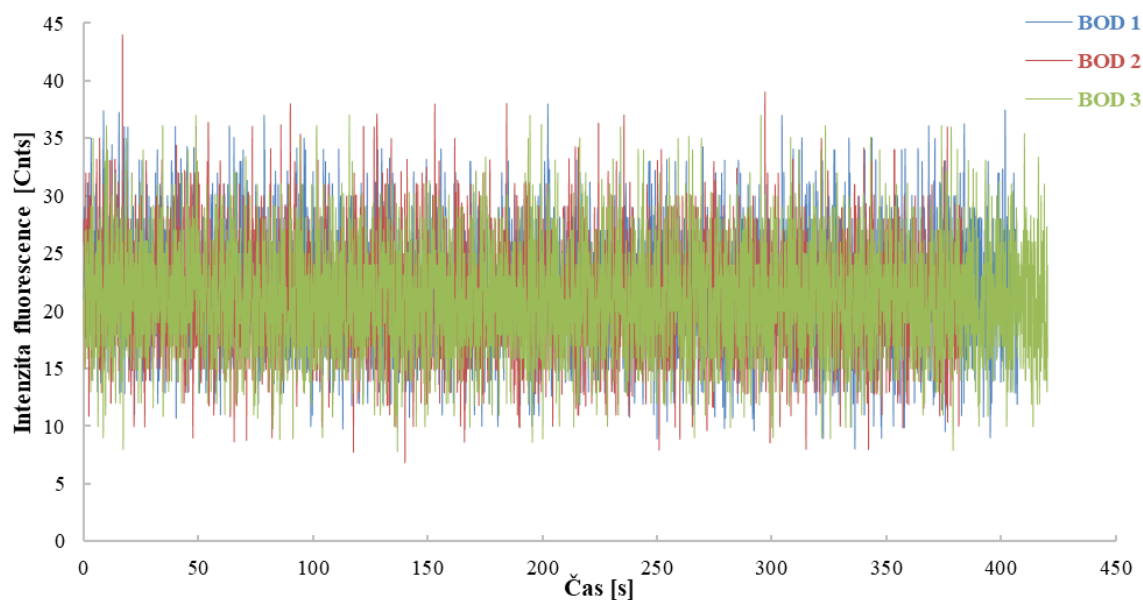
Obr. 69: V levé části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:SAH, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.



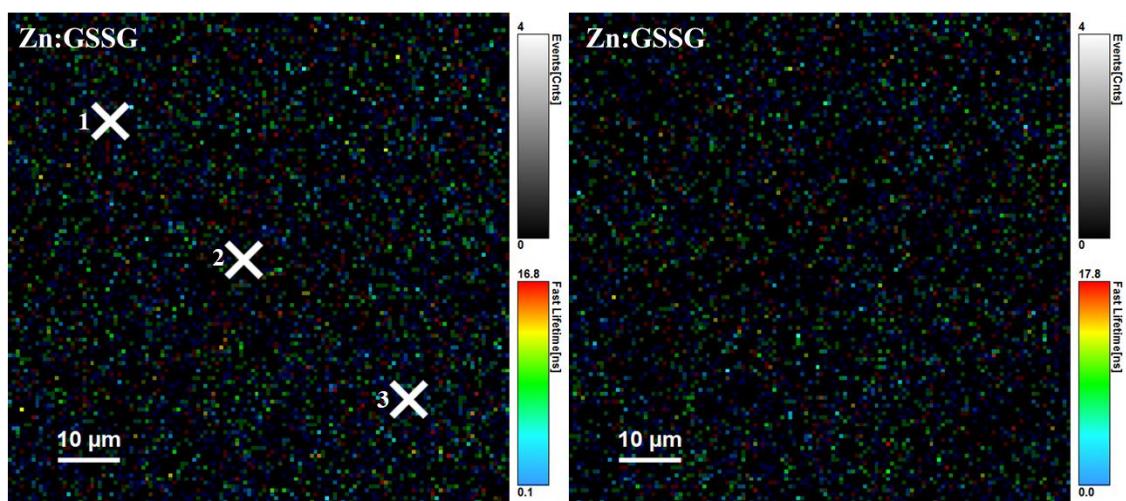
Obr. 70: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAH, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků.



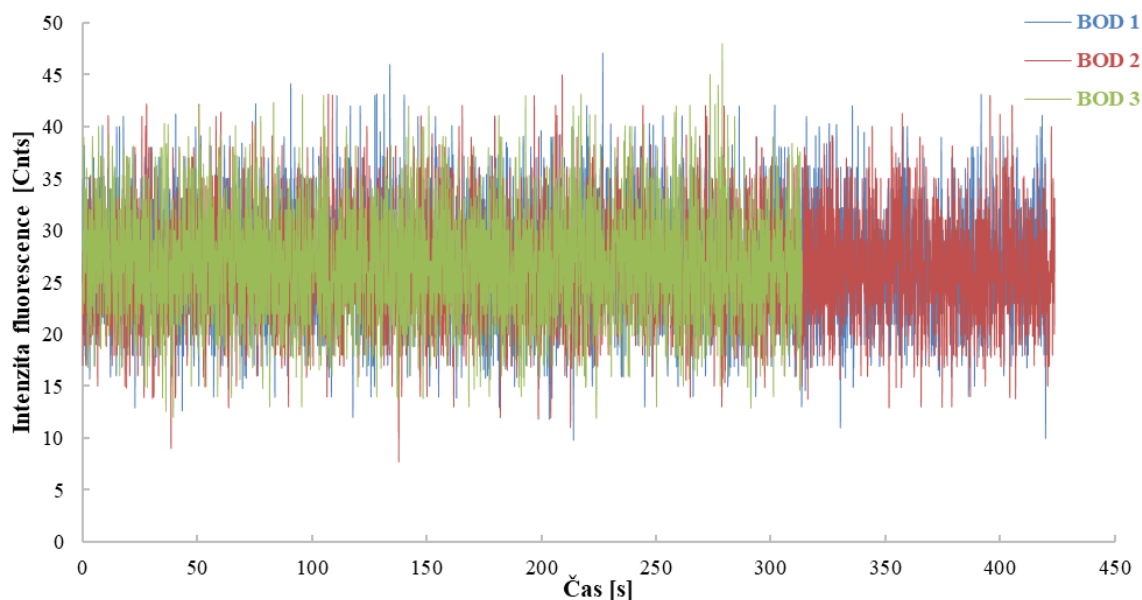
Obr. 71: V levé části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:CYS, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.



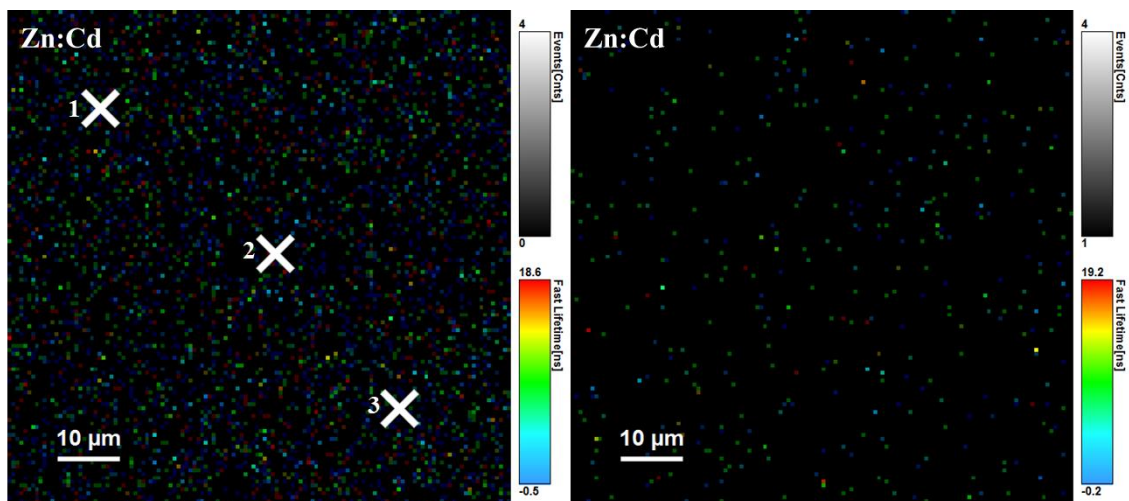
Obr. 72: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:CYS, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků.



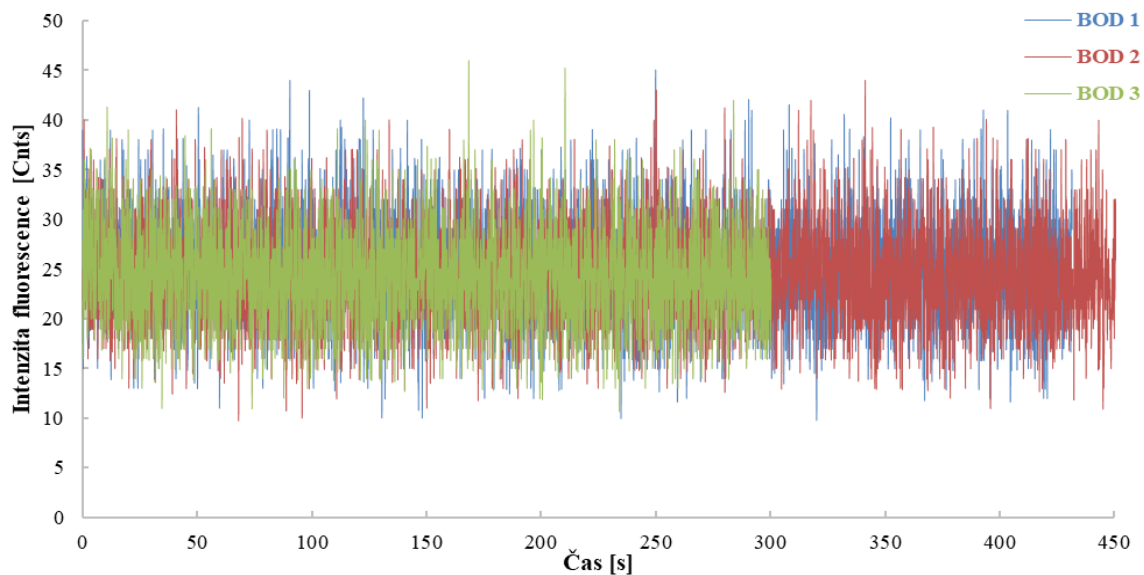
Obr. 73: V levé části se nachází sken před ozářením prekursorů Zn:GSSG, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.



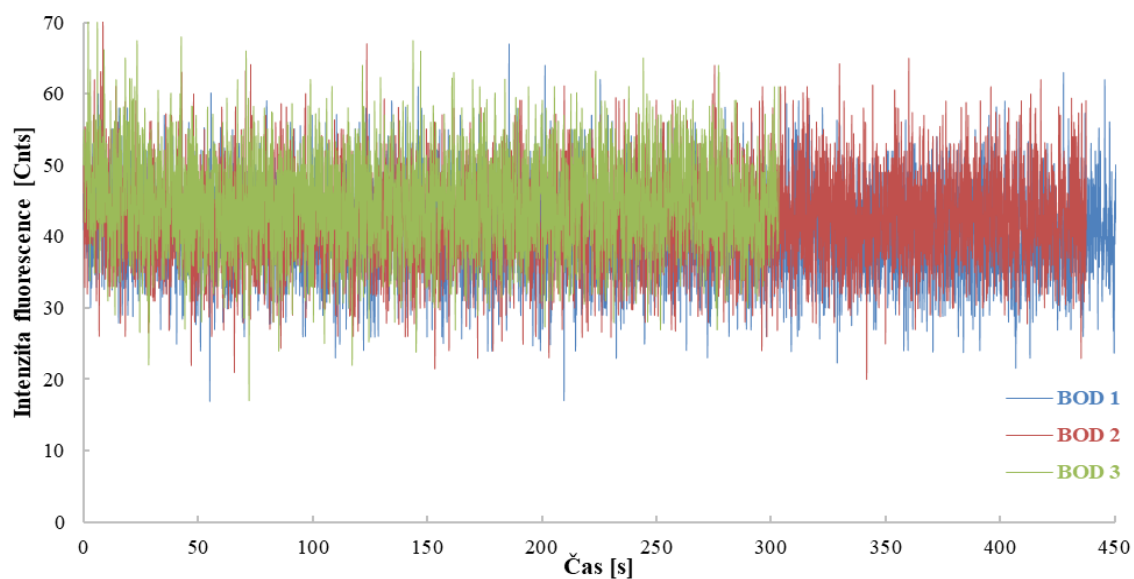
Obr. 74: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:GSSG, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků.



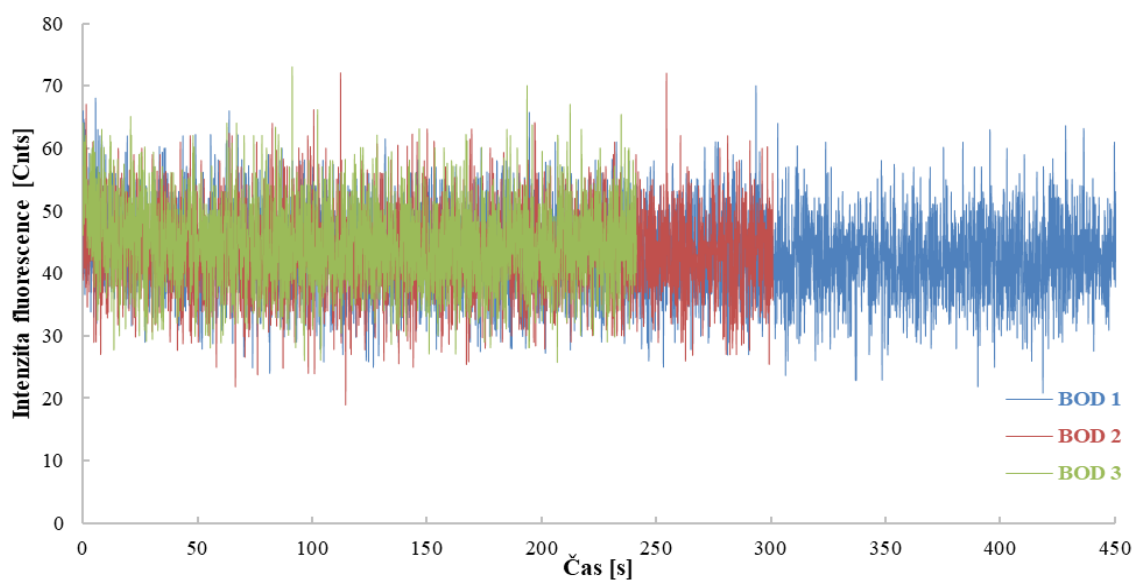
Obr. 75: V levé části se nachází sken před ozářením prekurzorů Zn:Cd, bílými křížky jsou vyznačeny zvolené body ozáření UV laserem. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků. Každý bod byl ozářen 5 až 8 min. V pravé části je sken po ozáření. Z obrázku je patrné, že nedošlo k tvorbě žádného fluorescenčního komplexu.



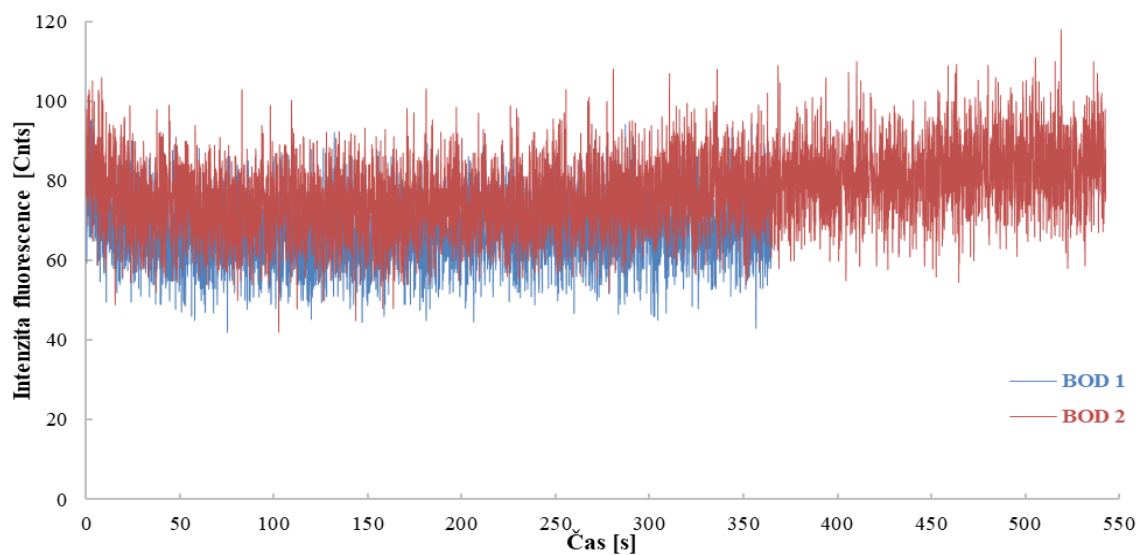
Obr. 76: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:Cd, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 5 minut od přípravy vzorků.



Obr. 77: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:SAM, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 2 hodiny od přípravy vzorků.



Obr. 78: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:CYS, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Měření bylo zahájeno cca 2 hodiny od přípravy vzorků.



Obr. 79: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vzorek Zn:GSSG, ve kterém nedošlo k tvorbě fluorescenčních komplexů. Vzorek byl měřený ve středu, kde nebyl gel dostatečně zatuhlý. Měření bylo zahájeno cca 2 hodiny od přípravy vzorků.

9.2 Měření dob života

Tab. 12: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:SAM. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 2 doby života.

| | | | | |
|---------------|--------------------|--|--------------------|---------------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 18,49$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,77 \pm 0,02$ | B_1 | 100,00 |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 5,23$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,11 \pm 0,02$ | B_1 | 31,36 |
| | T_2 | $2,20 \pm 0,02$ | B_2 | 68,64 |
| | T | $1,15 \pm 0,02$ | ΣB | 100,00 |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 3,38$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,81 \pm 0,03$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $0,001 \pm 0,049$ | B_2 | 100,00 |
| | T_3 | $5,04 \pm 0,12$ | B_3 | 0,00 |
| | T | $2,28 \pm 0,07$ | ΣB | 100,00 |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 3,19$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,63 \pm 0,02$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $38,99 \pm 4,77$ | B_2 | 0,00 |
| | T_3 | $3,52 \pm 0,07$ | B_3 | 0,00 |
| | T_4 | $0,002 \pm 0,034$ | B_4 | 100,00 |
| | T | $11,04 \pm 1,22$ | ΣB | 100,00 |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 3,38$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,19 \pm 0,01$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $1,73 \pm 0,03$ | B_2 | 0,04 |
| | T_3 | $4,33 \pm 0,09$ | B_3 | 0,01 |
| | T_4 | $10\,354\,490 \pm 2\,368\,113$ | B_4 | 99,88 |
| | T_5 | $0,01 \pm 0,01$ | B_5 | 0,07 |
| | T | $2\,070\,899 \pm 473\,622$ | ΣB | 100,00 |

Tab. 13: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:SAH. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek nelze s určitostí určit počet dob života.

| | | | | |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 0,69$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,027 \pm 0,002$ | B_1 | $100,00$ |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 0,68$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,057 \pm 0,013$ | B_1 | -11 081,13 |
| | T_2 | $0,057 \pm 0,004$ | B_2 | 11 181,13 |
| | T | $0,057 \pm 0,009$ | ΣB | $100,00$ |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 0,43$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,048 \pm 0,009$ | B_1 | -9 317,15 |
| | T_2 | $0,048 \pm 0,002$ | B_2 | 9 416,60 |
| | T_3 | $2,690 \pm 0,171$ | B_3 | 0,55 |
| | T | $0,929 \pm 0,061$ | ΣB | $100,00$ |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 0,39$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,079 \pm 0,015$ | B_1 | -9 349,00 |
| | T_2 | $0,078 \pm 0,005$ | B_2 | 9 447,26 |
| | T_3 | $0,696 \pm 0,103$ | B_3 | 1,27 |
| | T_4 | $4,982 \pm 0,413$ | B_4 | 0,47 |
| | T | $2,28 \pm 0,07$ | ΣB | $100,00$ |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 0,39$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,007 \pm 0,001$ | B_1 | 315,22 |
| | T_2 | $0,076 \pm 0,002$ | B_2 | -21 949,20 |
| | T_3 | $0,077 \pm 0,004$ | B_3 | 21 737,08 |
| | T_4 | $0,701 \pm 0,106$ | B_4 | -2,27 |
| | T_5 | $4,992 \pm 0,414$ | B_5 | -0,83 |
| | T | $1,171 \pm 0,105$ | ΣB | $100,00$ |

Tab. 14: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:CYS. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života.

| | | | | |
|---------------|--------------------|---|--------------------|----------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 22,81$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $8,79 \pm 0,36$ | B_1 | $100,00$ |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 1,89$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,55 \pm 0,02$ | B_1 | 38,19 |
| | T_2 | $26,23 \pm 0,36$ | B_2 | 61,81 |
| | T | $13,89 \pm 0,19$ | ΣB | $100,00$ |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 0,99$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $3,32 \pm 0,09$ | B_1 | 26,85 |
| | T_2 | $0,55 \pm 0,02$ | B_2 | 15,73 |
| | T_3 | $38,70 \pm 0,69$ | B_3 | 57,42 |
| | T | $14,19 \pm 0,27$ | ΣB | $100,00$ |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 0,96$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,44 \pm 0,03$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $2,44 \pm 0,09$ | B_2 | 0,00 |
| | T_3 | $14,01 \pm 0,57$ | B_3 | 0,00 |
| | T_4 | $1,29 \cdot 10^{12} \pm 1,29 \cdot 10^{12}$ | B_4 | 100,00 |
| | T | $3,22 \cdot 10^{11} \pm 3,22 \cdot 10^{11}$ | ΣB | $100,00$ |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 0,96$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,29 \pm 0,12$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $0,89 \pm 0,23$ | B_2 | 0,00 |
| | T_3 | $2,89 \pm 0,19$ | B_3 | 0,00 |
| | T_4 | $15,89 \pm 0,95$ | B_4 | 0,00 |
| | T_5 | $2,86 \cdot 10^9 \pm 2,86 \cdot 10^9$ | B_5 | 100,00 |
| | T | $5,73 \cdot 10^8 \pm 5,73 \cdot 10^8$ | ΣB | $100,00$ |

Tab. 15: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:HCYS. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života.

| | | | | |
|---------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|----------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 29,00$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $17,53 \pm 0,57$ | B_1 | $100,00$ |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 2,63$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,19 \pm 0,02$ | B_1 | 24,09 |
| | T_2 | $30,59 \pm 0,35$ | B_2 | 75,91 |
| | T | $15,89 \pm 0,19$ | ΣB | $100,00$ |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 1,19$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $3,17 \pm 0,12$ | B_1 | 16,59 |
| | T_2 | $0,36 \pm 0,01$ | B_2 | 11,44 |
| | T_3 | $42,39 \pm 0,57$ | B_3 | 71,97 |
| | T | $15,31 \pm 0,23$ | ΣB | $100,00$ |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 1,09$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,67 \pm 0,08$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $13,09 \pm 0,33$ | B_2 | 0,00 |
| | T_3 | $0,16 \pm 0,02$ | B_3 | 0,00 |
| | T_4 | $4,05 \cdot 10^7 \pm 4,05 \cdot 10^7$ | B_4 | 100,00 |
| | T | $1,01 \cdot 10^7 \pm 1,01 \cdot 10^7$ | ΣB | $100,00$ |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 0,96$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,91 \pm 0,11$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $3,57 \pm 0,37$ | B_2 | 0,01 |
| | T_3 | $18,88 \pm 1,35$ | B_3 | 0,01 |
| | T_4 | $446\,876,50 \pm 446\,876,50$ | B_4 | 99,98 |
| | T_5 | $0,04 \pm 0,01$ | B_5 | 0,00 |
| | T | $89\,380,18 \pm 89\,375,67$ | ΣB | $100,00$ |

Tab. 16: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:GSSG. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 3 doby života.

| | | | | |
|---------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------|----------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 2,43$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,48 \pm 0,14$ | B_1 | $100,00$ |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 1,18$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,65 \pm 0,06$ | B_1 | 10,56 |
| | T_2 | $62,98 \pm 3,63$ | B_2 | 89,44 |
| | T | $31,82 \pm 1,84$ | ΣB | $100,00$ |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 1,15$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $2,15 \pm 0,46$ | B_1 | 4,44 |
| | T_2 | $0,22 \pm 0,04$ | B_2 | 6,53 |
| | T_3 | $79,77 \pm 6,55$ | B_3 | 89,03 |
| | T | $27,38 \pm 2,35$ | ΣB | $100,00$ |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 1,09$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,80 \pm 0,51$ | B_1 | 0,00 |
| | T_2 | $32,66 \pm 17,43$ | B_2 | 0,00 |
| | T_3 | $0,21 \pm 0,04$ | B_3 | 0,00 |
| | T_4 | $3,77 \cdot 10^6 \pm 3,77 \cdot 10^6$ | B_4 | 100,00 |
| | T | $9,42 \cdot 10^5 \pm 9,42 \cdot 10^5$ | ΣB | $100,00$ |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 1,15$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $0,79 \pm 0,82$ | B_1 | 8,71 |
| | T_2 | $4,69 \pm 2,63$ | B_2 | 2,58 |
| | T_3 | $0,38 \pm 0,38$ | B_3 | -109,91 |
| | T_4 | $89,92 \pm 12,19$ | B_4 | 89,11 |
| | T_5 | $0,36 \pm 0,20$ | B_5 | 109,51 |
| | T | $19,23 \pm 3,24$ | ΣB | $100,00$ |

Tab. 17: Vyhodnocení dat měření dob života ozářeného vzorku Zn:Cd. V tabulce je kompletní analýza 1 až 5 dob života s uvedenými jednotlivými časy T_1 až T_5 v nanosekundách a jejich průměr T . Dále je zde uveden parametr χ a relativní amplitudy pro jednotlivé časy B_1 až B_5 , které udávají relativní procentuální zastoupení jednotlivých časů. Pro tento vzorek byly vyhodnoceny 4 doby života.

| | | | | |
|---------------|--------------------|------------------------------|--------------------|----------|
| 1 doba života | $\chi_R^2 = 44,56$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $35,86 \pm 0,41$ | B_1 | $100,00$ |
| 2 doby života | $\chi_R^2 = 6,82$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,34 \pm 0,03$ | B_1 | 10,93 |
| | T_2 | $42,62 \pm 0,25$ | B_2 | 89,07 |
| | T | $21,98 \pm 0,14$ | ΣB | $100,00$ |
| 3 doby života | $\chi_R^2 = 1,09$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $7,86 \pm 0,16$ | B_1 | 14,05 |
| | T_2 | $0,45 \pm 0,01$ | B_2 | 6,26 |
| | T_3 | $55,54 \pm 0,24$ | B_3 | 79,69 |
| | T | $21,28 \pm 0,14$ | ΣB | $100,00$ |
| 4 doby života | $\chi_R^2 = 0,92$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $2,25 \pm 0,23$ | B_1 | 3,68 |
| | T_2 | $12,64 \pm 0,41$ | B_2 | 16,82 |
| | T_3 | $64,04 \pm 0,47$ | B_3 | 74,49 |
| | T_4 | $0,31 \pm 0,01$ | B_4 | 5,01 |
| | T | $19,81 \pm 0,28$ | ΣB | $100,00$ |
| 5 dob života | $\chi_R^2 = 1,15$ | | | |
| | Doba života [ns] | | Rel. amplituda [%] | |
| | T_1 | $1,24 \pm 0,22$ | B_1 | 0,03 |
| | T_2 | $7,28 \pm 0,39$ | B_2 | 0,07 |
| | T_3 | $38,31 \pm 0,69$ | B_3 | 0,43 |
| | T_4 | $84\,926,62 \pm 113\,433,50$ | B_4 | 99,44 |
| | T_5 | $0,26 \pm 0,11$ | B_5 | 0,03 |
| | T | $16\,994,74 \pm 22\,686,97$ | ΣB | $100,00$ |