



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

INVERZNÍ FCS VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

INVERSE FCS IN COLLOIDAL SYSTEMS RESEARCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Richterová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1122/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Veronika Richterová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Inverzní FCS ve výzkumu koloidních systémů

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na téma inverzní fluorescenční korelační spektroskopie se zaměřením na přípravu vzorků, experimentální nastavení, výhody a omezení této metody.
- 2) Na základě rešerše navrhnout postup přípravy vzorků pro ověření funkčnosti na vybavení dostupném v rámci FCH VUT, vyhodnocení získaných dat a interpretaci.
- 3) Experimentálně ověřit postup přípravy vzorků a měření na modelových částicích.
- 4) Vyhodnotit techniku inverzní FCS ve vztahu k výzkumu koloidních systémů.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Veronika Richterová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium inverzní fluorescenční korelační spektroskopie, a to zejména z hlediska použití různých fluorescenčních sond a sledovaných částic různých velikostí. Nejprve byla stanovena vhodná koncentrace fluorescenční sondy tak, aby byla vnímána jako médium obklopující stanovovanou látku. Na základě této koncentrace, která byla stanovena na 400 μM , bylo poté připraveno několik sad vzorků. Vzorky obsahovaly jak rozdílné polystyrenové částice o velikostech 100 a 500 nm v různých koncentracích, tak i multilamerní liposomy v různých koncentracích a byly proměřeny FCS křivky vzorků s různými druhy fluorescenčních sond, kterými byly fluorescein, rhodamin 6G a Atto 488. Z měření vyplývá, že pomocí žádné z fluorescenčních sond nelze stanovit částice o velikosti 100 nm. Metodu inverzní FCS lze aplikovat na systémy obsahující fluorescein a polystyrenové částice o velikosti 500 nm. Při použití fluorescenční sondy rhodaminu 6G dochází při vysoké koncentraci k dimerizaci a ani 500 nm částice nelze pomocí této sondy stanovit. V případě použití liposomů lze tyto částice stanovit metodou inverzní FCS, ale náhodná distribuce velikostí částic zkresluje výsledky autokorelace.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of inverse fluorescence correlation spectroscopy, especially with the regard for the usage of different fluorescent probes and different sized analysed particles. At first, the proper concentration of fluorescent probes was determined. In this concentration is the probe considered as a medium surrounding the analysed particles. Based on this concentration, which was determined as 400 μM , several sets of samples were prepared. This samples contained different concentration of polystyrene particles of 100 and 500 nm diameter and multilamellar liposomes. Then, the FCS curves of samples with different fluorescent probes were measured. Fluorescein, rhodamine 6G and Atto 488 were used as fluorescent probes. As a result from experiments, it was found, that particles with 100 nm diameter cannot be analysed with none of the fluorescent probes. Inverse FCS method can be applied to systems, that contains particles with 500 nm diameter and fluorescein. Systems with rhodamine 6G have the same behaviour as typical FCS measurement. It is caused by dimerization of this probe and it cannot be used for 500 nm particles. Liposome samples can be established with iFCS method, but the results are biased by random distribution of liposomes size.

KLÍČOVÁ SLOVA

FCS, fluorescenční korelační spektroskopie, inverzní FCS, iFCS, nanočástice, liposomy, fluorescein, Atto 488, rhodamin 6G

KEY WORDS

FCS, fluorescence correlation spectroscopy, inverse FCS, iFCS, nanoparticles, liposomes, fluorescein, Atto 488, rhodamine 6G

RICHTEROVÁ, V. *Inverzní FCS ve výzkumu koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

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

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., za jeho cenné rady a odborné vedení i přístup. Dále bych ráda poděkovala svým nejbližším za pevná objetí v případech potřeby.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Fluorescence.....	8
2.1.1	Jabloňského diagram.....	8
2.1.2	Charakteristiky fluorescence	9
2.1.3	Fluorescenční sondy	10
2.2	Fluorescenční korelační spektroskopie	12
2.2.1	Teorie FCS	12
2.2.2	Princip FCS	13
2.2.3	Autokorelační funkce	14
2.2.4	Dvoubarevná fluorescenční korelační spektroskopie.....	16
2.2.5	Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie	17
2.3	Liposomy	18
2.3.1	Fosfolipidy	19
2.3.2	Agregace asociativních koloidů	20
2.3.3	Druhy liposomů.....	21
2.3.4	Příprava liposomů	22
3	Současný stav řešené problematiky	23
3.1	Inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (iFCS).....	24
3.1.1	Princip iFCS	24
3.1.2	Teorie iFCS	24
3.1.3	Využití iFCS.....	26
3.2	Inverzní fluorescenční kros-korelační spektroskopie (iFCCS).....	27
3.2.1	Využití iFCCS.....	27
3.3	Skenovací inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (siFCS).....	28
3.3.1	Využití siFCS	28
4	Experimentální část	29
4.1	Použité chemikálie	29

4.2	Přístroje a zařízení.....	30
4.3	Měření a vyhodnocování FCS dat.....	30
4.3.1	Nastavení pro měření	31
4.3.2	Vyhodnocování dat	33
4.4	Příprava zásobních roztoků.....	34
4.4.1	Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond	34
4.4.2	Příprava zásobního roztoku neionogenního tenzidu	34
4.4.3	Příprava zásobních roztoků lipidů.....	34
4.4.4	Příprava zásobního roztoku pufru	34
4.5	Příprava vzorků	34
4.5.1	Příprava vzorků pro zjištění vhodné koncentrace pro iFCS.....	34
4.5.2	Příprava vzorků s nanočásticemi.....	35
4.5.3	Příprava vzorků s liposomy.....	35
5	Výsledky a diskuze.....	36
5.1	Stanovení vhodné koncentrace fluorescenčních sond.....	36
5.2	iFCS měření vzorků s částicemi o průměru 100 nm.....	37
5.2.1	Použití fluoresceinu.....	37
5.2.2	Použití Atto 488	38
5.3	iFCS měření vzorků s částicemi o průměru 500 nm.....	39
5.3.1	Použití fluoresceinu.....	40
5.3.2	Použití rhodaminu 6G	42
5.4	iFCS měření vzorků obsahujících liposomy	44
6	Závěr.....	46
7	Seznam použitých zdrojů	48
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	53
8.1	Seznam použitých zkratk	53
8.2	Seznam použitých symbolů	54

1 ÚVOD

Na počátku sedmdesátých let minulého století byla poprvé popsána metoda fluorescenční korelační spektroskopie (dále FCS, z angl. *fluorescence correlation spectroscopy*), jako aplikace konfokální skenovací mikroskopie, pro studium interakcí DNA s léčivými látkami. Metoda FCS se ovšem začala rozvíjet až v letech devadesátých a dnes je to jedna z důležitých a hojně používaných metod při studiu nejen biochemického zaměření, jako je studium buněk, proteinů nebo léčiv a jejich vzájemných interakcí, a stala se nástrojem pro stanovení dynamických vlastností makromolekul a nanočástic, které vykazují (ať už samy nebo po označení vhodnou látkou) fluorescenci.

Pokud látky, které jsou pomocí FCS sledovány, nejsou vhodně označeny nebo nevykazují fluorescenci, jedná o flukтуаční korelační spektroskopii, protože dochází ke sledování fluktuací konfokálním objemem obecně jiného signálu nežli jen fluorescenčního. Tento základní přístup umožňuje sledování nefluoreskujících koloidních částic nebo částic, které nelze fluorescenčně označit, což se stává kupříkladu v živých organismech, kde dochází k exkluzím fluorescenčních sond buněčnou membránou, a může být sledováno mnoho druhů signálu, jako je například rozptyl světla, Ramanovy rozptyly nebo plazmonová rezonance.

Jako alternativní metoda k FCS, která by byla vhodná právě pro tyto neoznačitelné látky, se nabízí možnost nesledovat zvýšení intenzity fluorescence průchodem označené částice konfokálním objemem, ale naopak, při použití velkého množství fluorescenční sondy, sledovat snížení intenzit fluorescence průchodem částice, která fluorescenci nevykazuje.

V této diplomové práci je teoretická část zaměřena na popis a principy klasické fluorescenční korelační spektroskopie, kdežto v rešeršní části jsou popsány metody využití flukтуаční korelační spektroskopie, zejména pak použití inverzní fluorescenční korelační spektroskopie. Metodě inverzní FCS je dále – zejména z hlediska použitelnosti, a to především v oblasti koloidních velikostí – věnována experimentální část diplomové práce, která je zaměřena na iFCS polystyrenových nanočástic a liposomů.

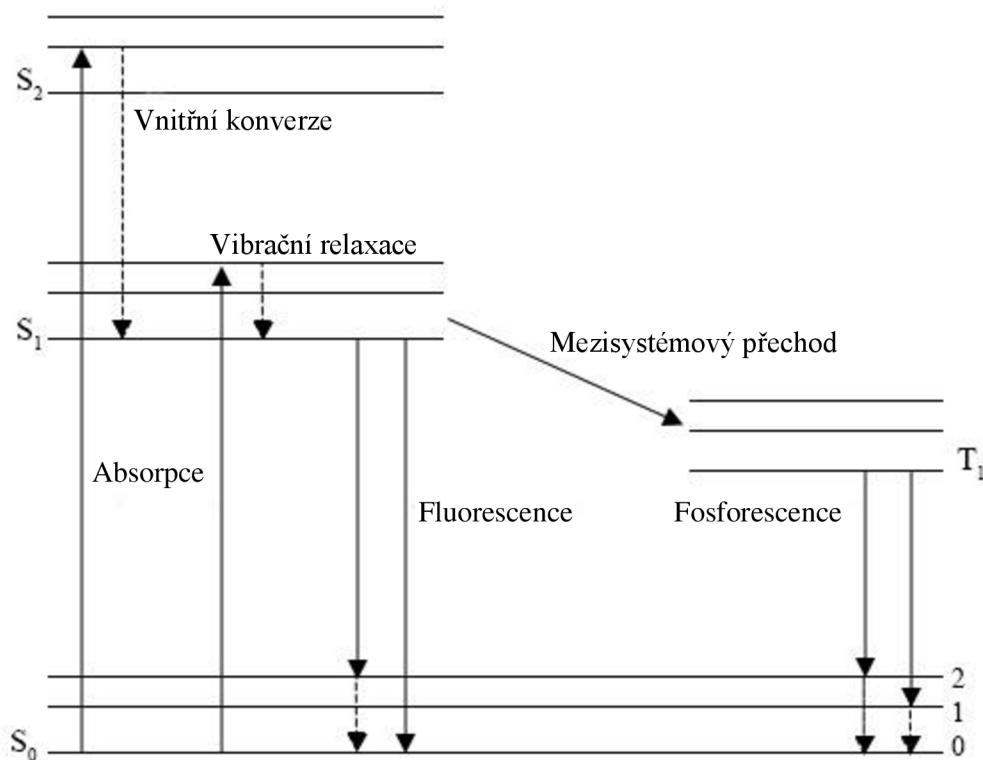
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

Jako luminiscence se označuje jev, který se projevuje emisí světla určitou látkou při deexcitaci. Jednotlivé luminiscenční druhy se odlišují v závislosti na druhu energie, který je potřebný k excitaci. Spadají zde metody jako je chemiluminiscence (excitace chemickou energií) nebo termoluminiscence (excitace energií ve formě tepla). K excitaci může dojít také elektromagnetickým zářením, tedy pomocí světelné energie, a pak se jedná o fotoluminiscenční metody. Fotoluminiscence se na základě charakteru v excitovaném stavu rozlišují na fluorescenci a fosforescenci [1],[2].

2.1.1 Jabloňského diagram

Procesy, ke kterým dochází při absorpci a emisi světla, tedy zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy, jsou často ilustrovány a vysvětlovány pomocí Jabloňského diagramu, který je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 1) [3].



Obr. 1 Jabloňského diagram

Pokud v systému v základním singletovém stavu, označovaném jako S₀, dojde k *absorpci*, tedy že systém přijme energii ve formě fotonu, tak je excitován do vyšších energetických stavů, označovaných jako S₁ a S₂. V případě, že energie fotonů postačí jak k elektronové excitaci, tak i k excitaci vibračních pásů, dochází k *vibrační relaxaci*, kdy se přebytečná energie vyzáří do okolí nezářivými přechody. K *vnitřní konverzi* dochází v případě přechodu mezi nejnižší excitovanou hladinou (S₂) na nejvyšší vibrační hladinu základní singletové hladiny (S₁).

Pokud molekula excituje na vyšší energetickou hladinu, spin zůstane zachován, a následně se vrátí na hladinu základní, dochází k jevu, který se označuje jako *fluorescence*, a jedná se o přechod z nejnižší hladiny stavu S_1 do stavu S_0 . Fluorescence má krátký dosvit a odeznívá velmi rychle po ukončení excitace.

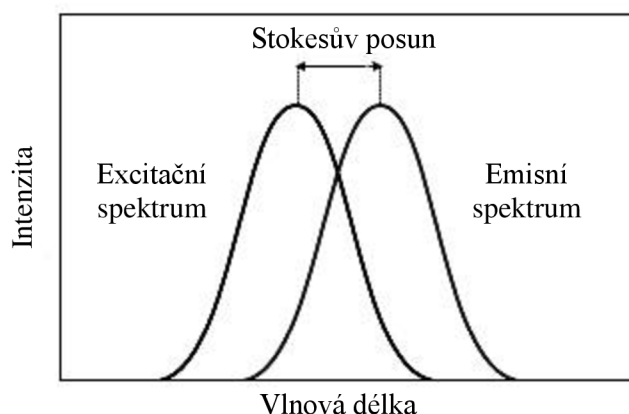
Proces, který zahrnuje změnu spinu elektronu, se nazývá *mezisystémový přechod* a nastává, když se ze singletového stavu se dvěma opačnými spiny (S_1) při přechodu na vyšší energetickou hladinu změní orientace jednoho spinu a nastane přechod do stavu tripletového (T_1). Mechanismus přechodu ze stavu S_1 do T_1 je podobný s vnitřní konverzí. Proces zahrnující změnu spinu elektronu je spinově zakázaný a je také méně pravděpodobný.

Emise fotonu z tripletového stavu T_1 do základního singletového stavu S_2 se označuje jako *fosforescence*. Jedná se o jev, který je méně častý než fluorescence. Fosforescence má na rozdíl od fluorescence vyšší vlnové délky, vzhledem k tomu, že přechod z T_1 do S_0 vyžaduje menší rozdíl energie. Dlouhý dosvit fosforescence je způsoben tím, že elektron po absorpci záření musí přejít z hladiny S_1 na T_1 .

Může nastat také *reverzní mezisystémový přechod* z nejnižší hladiny tripletového stavu T_1 zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Po návratu z hladiny S_1 do základního stavu S_0 pak dochází k jevu označovanému jako *zpožděná fluorescence*, který má dobu dosvitu srovnatelnou s fosforescencí, ale vlnová délka emitovaného záření je srovnatelná s fluorescencí.

2.1.2 Charakteristiky fluorescence

Typickým výstupem z fluorescenčního měření jsou emisní spektra. Emisní spektrum je definováno jako intenzita fluorescence v závislosti na vlnové délce emitovaného záření, přičemž vlnová délka excitačního záření je konstantní. Naopak excitační spektrum je definováno jako intenzita fluorescence v závislosti na vlnové délce budícího záření s konstantní vlnovou délkou emitovaného záření [4],[5].



Obr. 2 Stokesův posun a zrcadlové pravidlo

Pro molekuly jsou emisní a excitační spektra charakteristická, každá má unikátní spektrum s charakteristickými píky při daných vlnových délkách. Vzájemný vztah mezi emisním a excitačním maximem vyjadřuje *Stokesův posun*, tedy že fluorescence spektrum je posunuto k vyšším vlnovým délkám, což je způsobeno menším energetickým rozdílem při emisi než při excitaci, jak vyplývá z Jablůnského diagramu. *Zrcadlové pravidlo* říká, že emisní i excitační spektra mají podobný tvar, nicméně jsou k sobě zrcadlově obrácena. Stokesův posun a zrcadlové pravidlo jsou zobrazeny na předchozím obrázku (viz Obr. 2).

Podle *Vavilova zákona* nejsou emisní spektra, kvantový výtěžek ani doba dosvitu závislá na vlnové délce, a pro excitaci se obvykle volí vlnová délka s maximem absorpce dané molekuly. Toto pravidlo je důsledkem *Kashova pravidla*, podle kterého fluorescence nastává z nejnižší hladiny stavu S_1 , což je způsobeno vnitřní konverzí a vibrační relaxací, a tyto nezářivé přeměny jsou velmi rychlé a energeticky nenáročné [6].

Jednou z dalších základních charakteristik fluorescence (luminiscence) je *nejvyšší intenzita* fluorescence (luminiscence), které je dosaženo, pokud je systém excitován vlnovou délkou, která je rovna excitačnímu maximu daného systému.

Kvantový výtěžek fluorescence vyjadřuje míru intenzity fluorescence a je definován jako:

$$\varphi_F = \frac{N_F}{N} \quad (1)$$

kde N_F je počet kvant vyzářených a N je počet soustavou absorbovaných zářivých kvant. Celkový kvantový výtěžek fotoluminiscence je určen jako součet kvantového výtěžku fluorescence a fosforescence a vždy je v důsledku nezářivých deexcitací menší než 100 % [1].

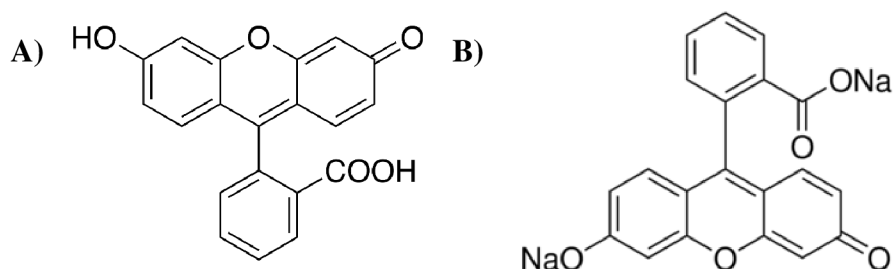
2.1.3 Fluorescenční sondy

Molekula nebo její část, která je odpovědná za vykazování luminiscence, se nazývá luminofor a pro fotoluminiscenční metody nesou označení fluorofor v případě fluorescence a fosforofor pro případ fosforescence. Fluorofory jsou tedy molekuly nebo části molekul, které jsou schopny absorbovat energii světelného záření a následně ji ztratit emisním zářením o delší vlnové délce, což podmiňuje jejich schopnost vykazovat fluorescenci.

Molekula může být sama o sobě fluoroforem a vykazuje vlastní fluorescenci. Tyto látky se označují jako *vnitřní sondy* a fluoreskující části jsou součástí jejich struktury. K látkám, které nemají schopnost vykazovat vlastní fluorescenci, se váží nevlastní fluorofory – *fluorescenční značky* kovalentní vazbou a nekovalentně se vážící *fluorescenční sondy* [7],[8],[9].

2.1.3.1 Fluorescein

Jednou z nejvýznamnějších fluorescenčních sond je fluorescein, který je ve formě červeného prášku rozpustný ve vodě i v alkoholech. Jeho chemická struktura je zobrazena na následujícím obrázku (viz Obr. 3A).



Obr. 3 *Struktura A) fluoresceinu a B) jeho disodné soli*

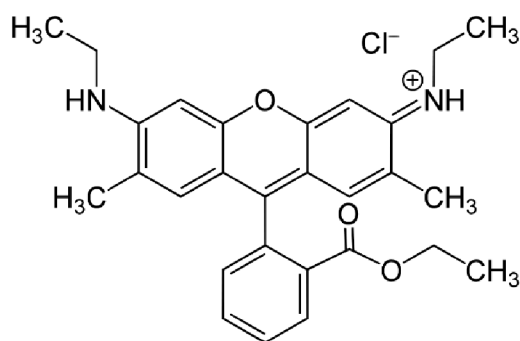
Fluorescein vykazuje absorpční maximum při 494 nm a emisní maximum ve vodném prostředí je při 521 nm. Krom použití ve fluorescenční mikroskopii nachází uplatnění také v barvivových laserech nebo při detekci různých látek.

Hojně využívány jsou také jeho deriváty. Isothiokyanát fluoresceinu, označovaný jako FITC, se využívá při imunologických stanoveních nebo při práci s nukleovými kyselinami. Důležitým derivátem je taky disodná sůl fluoresceinu, jejíž struktura je zobrazena na předchozím obrázku (viz Obr. 3B). Uranin, jak se také disodný derivát označuje, má emisní maximum při 460 nm a excitační maximum při 515 nm [7],[9].

2.1.3.2 Rhodamin

Dalším z hojně používaných fluoroforů, využívaných také ve fluorescenční mikroskopii, jako barvivo v laserech a jako fluorescenční značka pro studium buněk, je rhodamin. Jako rhodaminy je označovaná skupina heterocyklických barviv, které se mohou vázat jak kovalentně, tak na základě nekovalentních interakcí, mezi které patří rhodamin B, rhodamin 110 a rhodamin 6G.

Rhodamin 6G má dlouhé vlnové délky excitace v rozmezí 480 – 600 nm, s excitačním maximem při 525 nm, i emise v rozmezí 500 – 700 nm, s emisním maximem při 555 nm. Jeho chemická struktura je znázorněna na následujícím obrázku (viz Obr. 4). Na rozdíl od fluoresceinu je odolnější k fotovybělování a je stabilnější vůči pH prostředí. Jeho nevýhodou je tvorba dimerů a oligomerů při vyšší koncentraci, což je blíže vysvětleno dále (viz kapitola 5.3.2) [7],[10],[11].



Obr. 4 *Struktura rhodaminu 6G*

2.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Metoda fluorescenční korelační spektroskopie (dále FCS, z angl. *fluorescence correlation spectroscopy*) byla poprvé popsána v 70. letech 20. století D. Medgem, E. Esonem a L. Webbem při studování interakcí DNA s léčivými látkami. V té době se FCS jevila jako metoda s velkým potenciálem pro měření kinetických vlastností, které v sobě FCS data obsahují. I přes její potenciál však nebyla atraktivní a hojně využívanou, vzhledem ke špatnému poměru signál-šum, slabým detektorům, kolísající intenzitě excitačních laserů a slabým kvantovým výtěžkům [12].

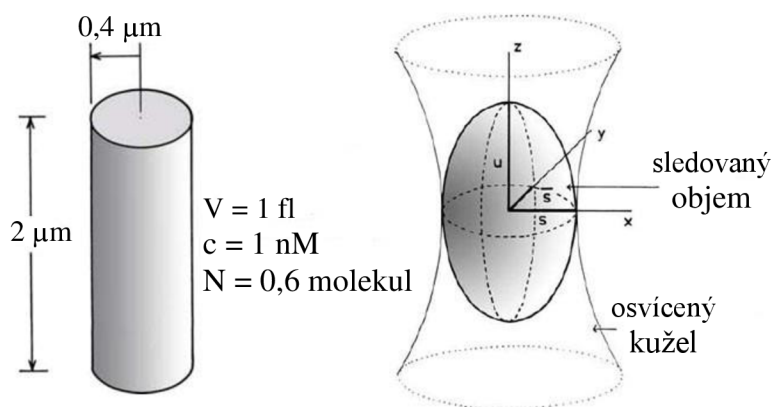
Ke zlomu došlo o 20 let později, kdy byla metoda přepracována N. L. Thompsonem a spojena s konfokální mikroskopií, čímž byla umožněna detekce na úrovni jedné molekuly [13].

Dnes je vybavení pro měření FCS běžně dostupné a metoda se tak začala hojně využívat pro celou řadu aplikací, zejména v biochemii, kde se využívá pro studium interakcí nebo detekci proteinů, v imunoanalýze nebo například při hybridizaci DNA [14].

Fluorescenční korelační spektroskopie se tak stala důležitým nástrojem pro stanovení dynamických vlastností malých částic, makromolekul a nanočástic vykazujících fluorescenci v různých médiích a obecně vlastností, které vycházejí z intenzity fluorescence. Tato metoda je založena na sledování fluktuací intenzity fluorescence různých částic difundujících skrz velmi malý sledovaný objem. Časově proměnné fluktuace intenzity jsou výsledkem dynamických procesů – difuze do a z malého objemu definovaného konfokální aperturou. Když fluorofor difunduje skrz laser, vzniká shluk emitovaných fotonů a korelační analýza fluktuací intenzity fluorescence poskytuje informace o difúzních koeficientech látek nebo jejich koncentraci [1],[15],[16].

2.2.1 Teorie FCS

FCS je běžně aplikována na volně difundující molekuly. Ke tvorbě konfokálního objemu dochází díky excitačnímu laseru, který je fokusován na rozhraní (difrakční limit), a konfokální pinhole, kdy dochází k odstínění nežádoucího signálu mimo požadovaný objem.



Obr. 5 Zobrazení válcového objemu s typickými rozměry a konfokálního objemu tvořeného optickými prvky (konfokální pinhole, excitační laser, objektiv) [1].

Použitím těchto optických podmínek má pozorovaný konfokální objem elipsoidní tvar protažený podél optické osy, což je znázorněno na předchozím obrázku (viz Obr. 5) [1],[15].

Pro správné provedení FCS experimentu je důležitá koncentrace fluoroforu. Aby mohly být detekovány jednotlivé molekuly, tak musí být koncentrace taková, aby ve stanovovaném objemu bylo přítomno pouze pár molekul. Velikost konfokálního objemu 1 fl vychází z velikosti cylindru a koncentrace fluoroforů v tomto objemu by měla být 1 nM, což odpovídá v průměru 0,6 molekuly v konfokálním objemu. Pokud je počet molekul 0,6, pak ze statistického hlediska (Poissonova statistika) vyplývá, že je 55 % pravděpodobnost, že se v konfokální objemu nevyskytuje žádný fluorofor, 33 % pravděpodobnost výskytu pouze jednoho fluoroforu a 10 % pravděpodobnost výskytu dvou fluoroforů v konfokálním objemu [1].

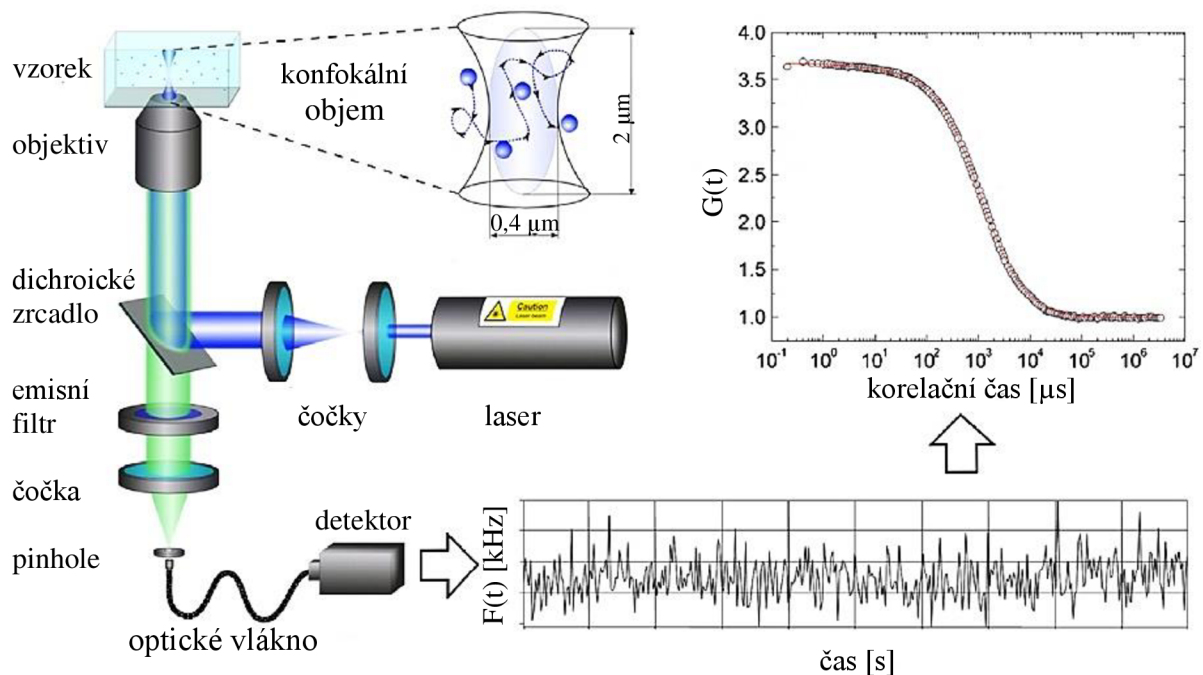
Časový průměr počtu molekul v konfokálním objemu je stejný, ale vzhledem k volné difuzi molekul skrz objem dochází k výkyvům v aktuálním počtu molekul. Difuzí molekul z a do konfokálního objemu dochází k excitaci a následné emisi, čímž narůstá nebo klesá počet emitovaných fotonů, a dochází tak ke kolísání fluorescenčního signálu. Tyto náhodné, časově závislé, změny jsou označovány jako fluktuace a intenzita fluktuací v konfokálním objemu odpovídá intenzitě fluorescence. FCS poskytuje informace o molekulách analýzou rychlosti a amplitud z intenzity fluktuací [4],[17],[18].

Pokud se v konfokálním objemu nenachází žádný fluorofor, změří se pouze šum. V případě nízké koncentrace fluoroforů v konfokálním objemu je intenzita fluorescence nízká a její změna je měřitelná. U ředěných vzorků s koncentrací 1 nM sice může dojít k pozorování pozadí rozpouštědla, nečistot nebo například Ramanových rozptylů, ale technika umožňuje tyto jevy potlačit pomocí konfokální optiky a použitím emisních filtrů. Na druhou stranu při použití vzorků s vysokou koncentrací fluoroforů by se v konfokálním objemu vyskytovalo velké množství molekul a změny intenzity fluorescence by nebyly pozorovatelné jako v případě malého množství molekul.

2.2.2 Princip FCS

Experimentální uspořádání konfokálního mikroskopu a princip fluorescenční korelační spektroskopie je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 6) [16].

Laserový paprsek o vhodné vlnové délce se přivádí do hlavní optické jednotky, kde se fotodetektořem (např. fotodiodové pole nebo fotonásobič) měří intenzita vysílaného záření. Poté paprsek dopadá na dichroické zrcadlo, od kterého se odrazí excitační záření dané vlnové délky do mikroskopu, ale záření emitované fluoroforem skrz zrcadlo projde a dopadne na detektor. Budící záření po průchodu objektivem dopadá na vzorek, čímž dochází k excitaci molekul a následní emisi o určité vlnové délce. Toto emitované záření pak prochází skrz dichroické zrcadlo zpět, kde dopadá na emisní filtry. Ty jsou umístěny za dichroickým zrcadlem v případě měření na více detektorech nebo před detektorem v případě použití jednoho detektoru. Emisní filtry slouží také k odfiltrování Ramanova rozptylu záření. Po průchodu emisními filtry záření dopadá na detektor [1],[15],[16].

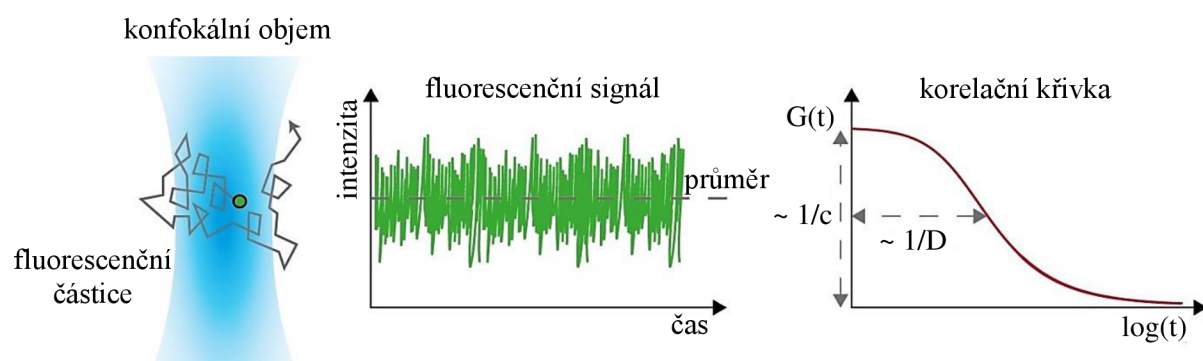


Obr. 6 Grafické znázornění principu FCS. Z detektoru je získaná závislost intenzity na čase, ze které je pak statisticky zpracována autokorelační křivka [16].

2.2.3 Autokorelační funkce

Měření FCS poskytuje jako primární data jednotlivé dopadající fotony na detektory. Tato data je nutné dále analyzovat, aby z nich mohly být získány potřebné informace o sledovaných molekulách, jako je ku příkladu počet molekul ve vzorku, jejich difúzní koeficienty nebo okupační čísla [2], [15].

Nejdříve musí být z dopadajících fotonů vypočítaná fluktuace intenzity $I(t)$. Zaznamenané fluktuace intenzity fluorescence jsou analyzovány statisticky pomocí autokorelační funkce. Následující obrázek (viz Obr. 7) popisuje základní princip získávání potřebných informací z FCS experimentu a vznik autokorelační křivky [1],[4],[15].



Obr. 7 Fluorescenční molekula difunduje do a z konfokálního objemu a vzniká fluktuální fluorescenční signál. Tyto fluktuace mohou být analyzované autokorelační křivkou. Difúzní koeficient molekul lze získat z autokorelační křivky a koncentrace fluoroforu z její amplitudy [19].

Autokorelační funkce tedy analyzuje časové změny intenzity fluorescence, které jsou způsobeny průchodem částic přes detekční objem. Vyjadřuje stupeň korelace mezi intenzitou fluorescence v daném časovém intervalu (pro rozpětí časů τ), tedy mezi intenzitou fluorescence v daném čase $I(t)$ a v čase pozdějším $I(t + \tau)$. Pokud je difuze částic skrz detekční objem dostatečně pomalá, pak jsou si hodnoty $I(t)$ a $I(t + \tau)$ podobné. V případě rychlé difuze je hodnota $I(t)$ odlišná od $I(t + \tau)$, a dochází tak k rapidnější změně intenzity fluorescence [1],[18].

Autokorelační funkce je dána součinem intenzit fluorescence v čase t s intenzitou v čase o τ pozdějším, který je zprůměrovaný přes velké množství dat, jejichž sběr probíhá v řádech vteřin až minut. Normalizovaná autokorelační funkce pro FCS je dána vztahem:

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

kde I je detekovaná intenzita fluorescence a δI je okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty $\delta I = I(t) - \langle I(t) \rangle$, kde $\langle I(t) \rangle = \frac{1}{T} \int I(t) dt$, která může být vyjádřena jako:

$$\delta I(t) = \int W(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r}, \quad (3)$$

kde C je lokální koncentrace částic, $W(\mathbf{r})$ udává prostorové rozložení emitovaného světla a η je parametr nezávislý na prostorových souřadnicích. Tento parametr určuje počet fotonů detekovaný z jedné částice za jednu sekundu a závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu, absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence [1], [18].

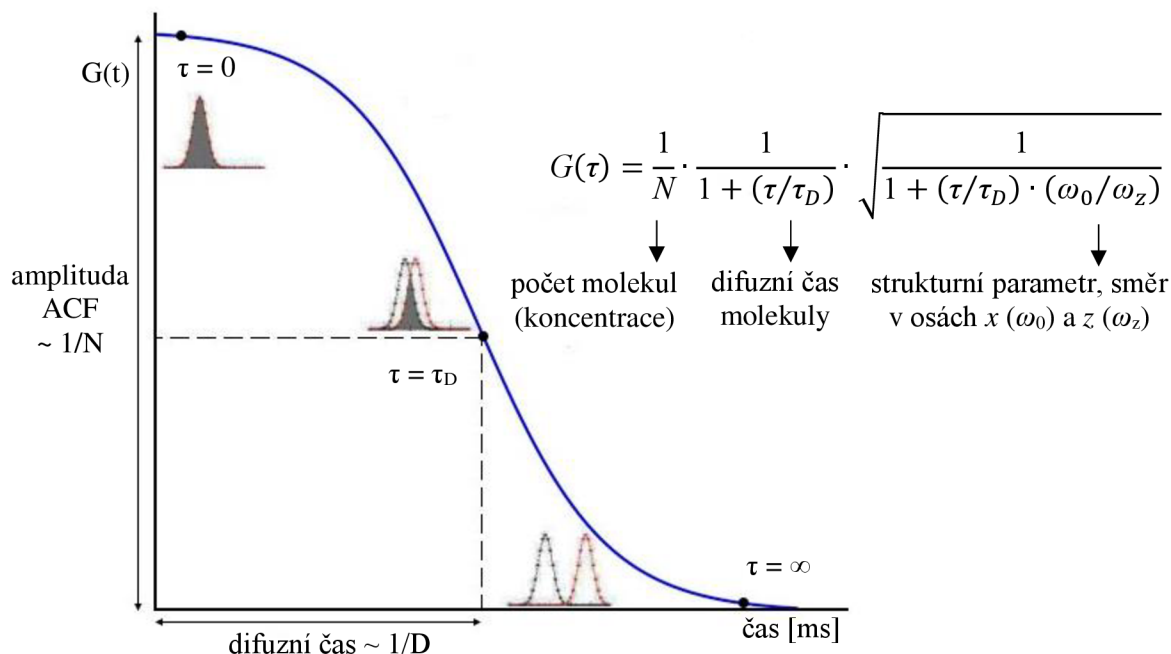
Za předpokladu, že se částice pohybují volnou difuzí ve všech třech směrech, a že u sledovaných částic se parametr η nemění v čase, je autokorelační funkce určena vztahem:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right) \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau \cdot w_0^2}{\tau_{D_i} \cdot z_0^2}}}, \quad (4)$$

kde V_{eff} je efektivní detekční objem $V_{eff} = \sqrt{\pi^3} \cdot w_0^2 \cdot z_0$, z_0 udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu, w_0 je rozměr v ohniskové rovině a τ_D je difuzní čas [1].

Autokorelační funkce nabývá maximálních hodnot pro krátké časové intervaly a postupně s rostoucím časem klesá k nule, protože při delších časových intervalech spolu hodnoty intenzity fluorescence na začátku a ke konci už nesouvisí. Časový interval, kdy má autokorelační funkce poloviční hodnotu než ve svém maximu, se označuje jako difúzní čas. Tento bod značí průměrnou dobu, kterou se částice vyskytuje v detekčním objemu [1],[15],[19].

Na následujícím obrázku (viz Obr. 8) je znázorněno schéma autokorelační křivky (resp. funkce) se všemi potřebnými parametry, které u ní lze získat.



Obr. 8 Grafické znázornění autokorelační funkce a její popis. Z amplitudy ACF (z angl. autocorrelation function) se dá zjistit počet molekul (respektive koncentrace částic) a ze zjištěného difuzního času lze získat difuzní koeficient dané molekuly.

Z autokorelační křivky proložené teoretickou závislostí lze získat důležité informace o sledované částici – koncentraci částic a difuzní koeficient částic. Z maxima autokorelační křivky, resp. z její amplitudy, lze získat průměrný počet částic v detekčním objemu N :

$$N = \frac{1}{G(0)} = V_{\text{eff}} \langle C \rangle, \quad (5)$$

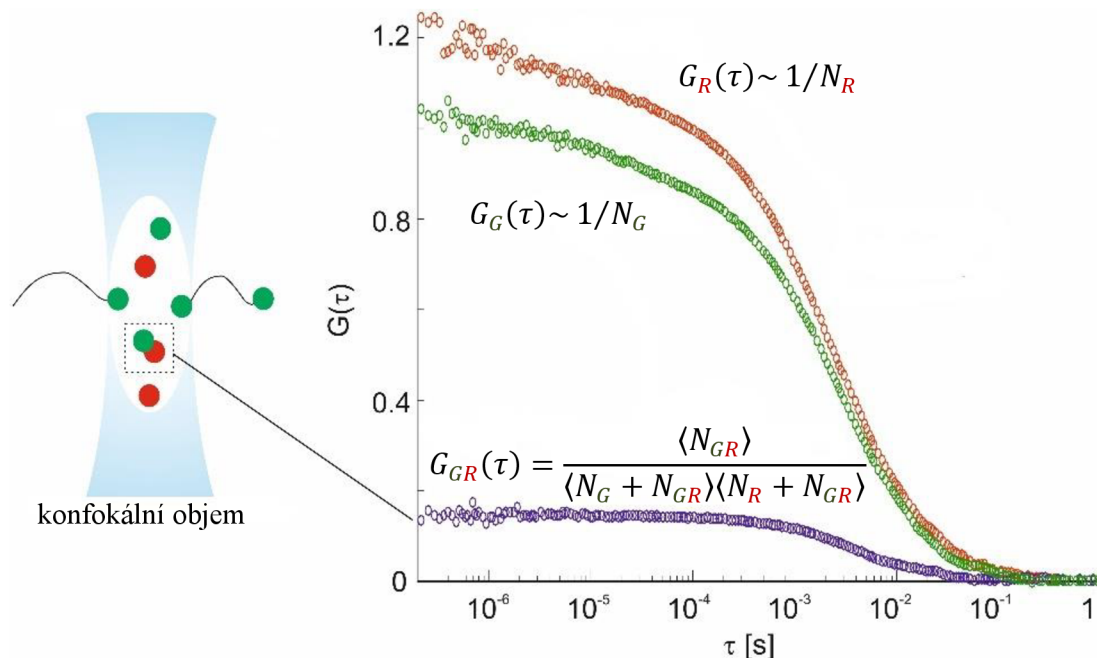
a z difuzního času lze získat difuzní koeficient částice D :

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D}. \quad (6)$$

2.2.4 Dvoubarevná fluorescenční korelační spektroskopie

U dvoubarevné FCS (dále FCCS, z angl. *fluorescence cross-correlation spectroscopy*) dochází ke sledování podobnosti jednoho signálu s jiným signálem v daném časovém intervalu. Výsledkem v tomto případě lze krom autokorelační funkce jednoho signálu spočítat také kroskorelační funkci, tedy korelaci mezi dvěma různými signály.

Tato variace techniky FCS nejčastěji spočívá v označení dvou druhů molekul dvěma fluorescenčními barvami s rozlišnými vlastnostmi – excitace různými vlnovými délkami a odlišné vlnové délky emise. K rozlišení těchto rozdílných vlastností slouží dichroická zrcadla a rozdílná fluorescence je snímána dvěma detektory. Výsledkem může být jak autokorelace každého fluoroforu jako takového, tak i kroskorelace mezi oběma fluorofory (viz Obr. 9) [20].



Obr. 9 Princip dvoubarevné fluorescenční spektroskopie (FCCS). Zobrazení autokorelačních křivek pro červené (G_R) i zelené (G_G) fluorofory a zobrazení kroskorelační křivky obou fluoroforů (G_{GR}) [20].

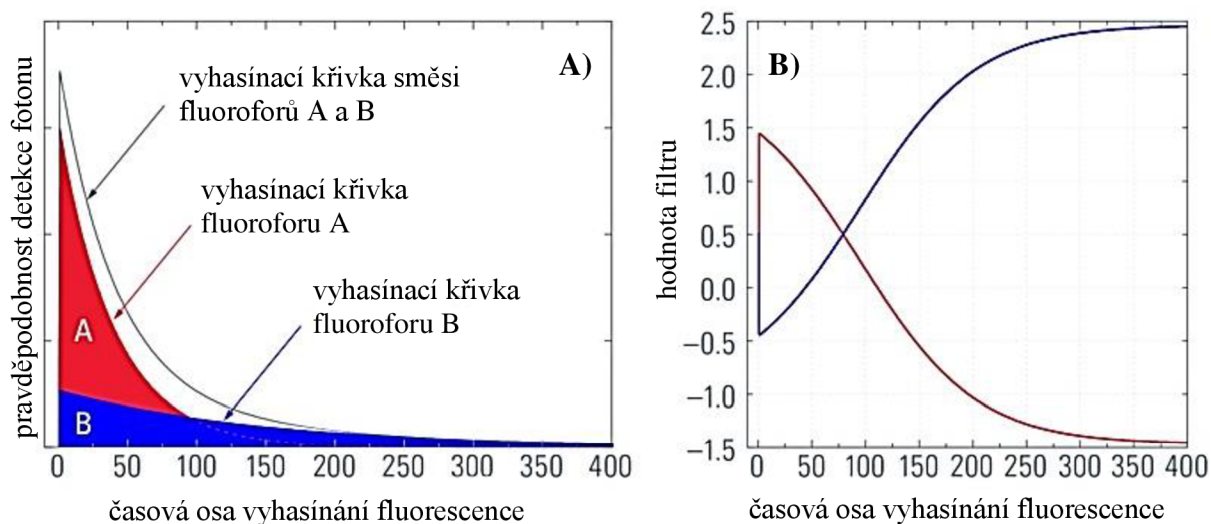
Využití této odvětví FCS nachází zejména ve studiu tvorby komplexů dvou molekul, např. při studiu bílkovin a vytváření komplexů enzym-substrát, kdy enzym je označen jednou fluorescenční sondou a substrát je označen jiným fluoroforem s jinými excitačními a emisními vlastnostmi [20], [21].

2.2.5 Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

Spojení fluorescenční korelační spektroskopie a časově rozlišeného sčítání fotonů* (TCSPC, z angl. *time correlated single photon counting*) využívá další rozšíření metody FCS. Technika je označována jako časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS, z angl. *fluorescence lifetime correlation spectroscopy*) a tato varianta FCS umožňuje rozlišit fluorofory, které mají odlišnou dobu života [22].

* TCSPC je metoda časově rozlišeného sčítání fotonů. U časově rozlišené fluorescence dochází k pulzní excitaci (délka pulzu je kratší než doba dohasínání fluorescence použitého fluoroforu) a při každém excitačním pulzu dochází k zaznamenání jednoho emitovaného fotonu. Výsledkem této metody je histogram tvořený závislostí distribuce fotonů na čase.

Analogicky k předchozímu druhu FCS (viz kapitola 2.2.4), FLCS umožňuje stanovit jak autokorelaci jednotlivých fluorescenčních sond, tak i kroskorelaci mezi dvěma signály na základě odlišných dob života. Princip FLCS analýzy je popsán následujícím obrázkem (viz Obr. 10) [22], [24].



Obr. 10 **A)** Zobrazení vyhasínání fluorescence dvou fluoroforů A (červeného) a B (modrého), a jejich kombinaci (černá). **B)** Funkce statistického filtru, která každému fotomu přiřazuje pravděpodobnost, se kterou byl emitován fluoroforem A nebo B [22].

FLCS analýza se, kromě procesů se změnou dob života fluoroforu se změnou okolí (např. kondenzace DNA při použití interkalačních barviv), využívá také při analýze klasického FCS měření, což je popsáno dále (viz kapitola 4.3.1.2).

2.3 Liposomy

Liposomy jsou útvary tvořeny několika na sebe uspořádanými lipidovými (nejčastěji fosfolipidovými) dvojrůstky, které vznikají spontánní agregací těchto amfifilních molekul. Svými vlastnostmi i velikostí patří mezi koloidní systémy.

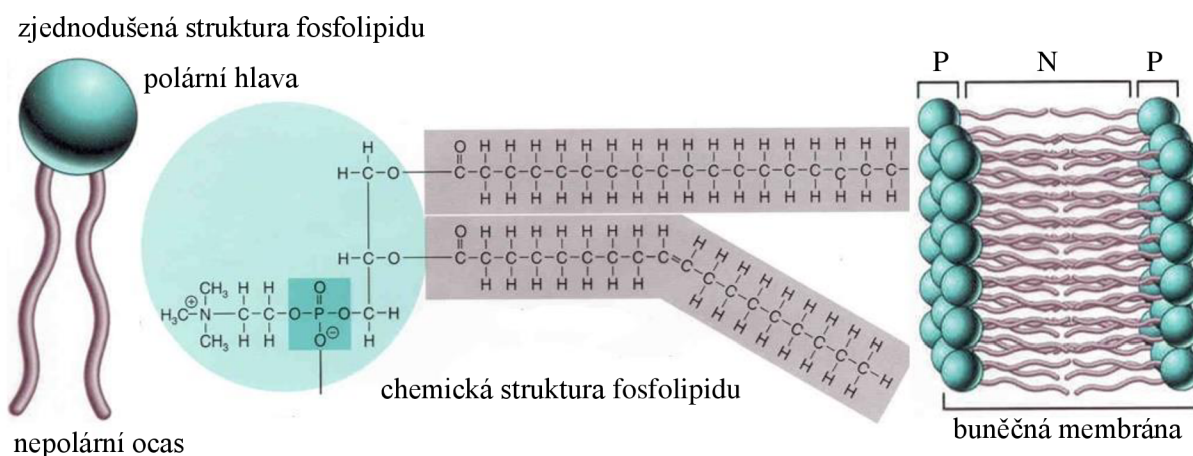
Koloidy spadají mezi disperzní systémy, což jsou systémy tvořené spojitým disperzním prostředím, ve kterém je rozptýlena dispergovaná látka. V případě *koloidních disperzí* jsou dispergovanými látkami částice specifických – koloidních – rozměrů, tedy rozměrů v rozmezí od 1 nm do 1 μm (příp. 500 nm). Mezi další typy disperzních systémů patří *analytické disperze*, které mají částice menší než koloidní disperze a *hrubé disperze*, jejichž částice jsou větší než v případě koloidních systémů. Koloidní disperze se dále rozděluje na homogenní *roztoky makromolekul*, *heterogenní koloidy* a *asociativní koloidy*, které na základě amfifility svých molekul asociují v micely (viz následující kapitola 2.3.2) [25], [26].

Lipidy jsou organické molekuly přirozeně se vyskytující v organismech, kde zastávají stavební, zásobní a ochrannou funkci, tvoří buněčné membrány a v lidském těle se zasluhují o vstřebávání vitaminů a tvorbu některých hormonů. Nejsou rozpustné ve vodě, ale mají výbornou rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech [27].

Lipidy se dělí na *jednoduché* (acylglyceroly a vosky), *složené* (fosfolipidy, sfingolipidy a glykolipidy) a *isoprenoidy* (terpenoidy a steroidy) [28].

2.3.1 Fosfolipidy

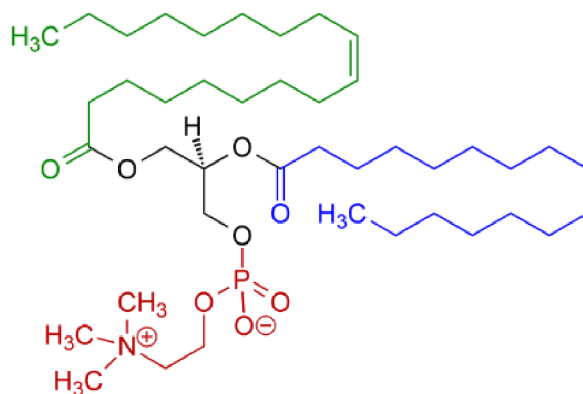
Estery glycerolu s mastnými kyselinami jsou označovány jako fosfolipidy, což jsou látky, které tvoří majoritní složku buněčných membrán v živočišných i rostlinných buňkách. Základem pro tyto látky je trojsytný alkohol glycerol, jehož dvě hydroxylové skupiny jsou esterifikovány mastnými kyselinami a jedna hydroxylová skupina je esterifikována kyselinou fosforečnou. Fosfolipidy se dále dělí na dvě skupiny – *glycerofosfolipidy* jsou odvozeny od kyseliny fosfatidové a kostru *sfingomyelinů* tvoří sfingosin nebo dihydroxyamin. Fosfátová skupina může být dále esterifikována aminoalkoholem – cholin, serin nebo ethanolamin. Specifické mastné kyseliny esterifikované na dvou hydroxylových skupinách dávají konkrétní fosfolipid. Obecná struktura těchto amifilních molekul je zobrazena na následujícím obrázku (viz Obr. 11) [27],[29].



Obr. 11 Obecná struktura fosfolipidu – hydrofilní hlavička je tvořena glycerolem, fosfátovou skupinou a polární skupinou, hydrofobní ocásek je tvořen dvěma řetězci mastných kyselin. Ve vodném prostředí dochází ke spontánní agregaci fosfolipidů a vzniká fosfolipidová dvojvrstva [30].

2.3.1.1 Lecitin

Fosfolipid získávaný z vaječných žloutků nebo sójových bobů – lecitin – je fosfolipid s velmi komplikovanou strukturou, vzhledem k různému zastoupení mastných kyselin. Jeho hlavní složkou je fosfatyldilcholin. Vyskytuje se jako složka buněčné membrány živočichů i rostlin, kde slouží k poskytování opory, udržení polopropustnosti a buněčné signalizaci. Krom využití ve farmacii nachází uplatnění i v kosmetice nebo v produkci potravin. Jeho chemická struktura je znázorněna na následujícím obrázku (viz Obr. 12) [30].



Obr. 12 *Struktura fosfatidylcholinu (převládající struktura lecitinu) – červeně je znázorněna aktivovaná kyselina fosforečná, modře a zeleně jsou vyznačeny struktury mastných kyselin*

2.3.2 Agregace asociativních koloidů

Molekuly fosfolipidů jsou amfifilní, což znamená, že jsou tvořeny hydrofilní a hydrofobní částí, jak je znázorněno na obrázku (viz Obr. 11) v přechodí kapitole (viz kapitola 2.3.1). Hydrofilní hlavička je tvořena glycerolem s fosfátem a polární skupinou, hydrofobní ocásek je tvořen nepolárními řetězci mastných kyselin.

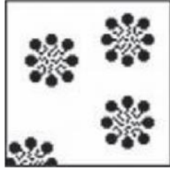
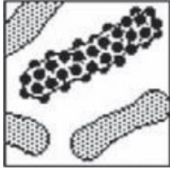



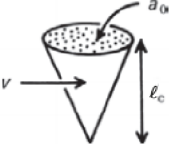




Právě amfifilita je důvodem, proč ve vodném prostředí dochází ke spontánní asociaci fosfolipidů v micely nebo dvojvrstvy. Tvorba shluků jednotlivých molekul v polárním prostředí zajišťuje minimalizaci kontaktů hydrofobních řetězců mastných kyselin s vodou a systém tak spěje do stavu s co nejnižší energií a největší stabilitou. Aby mohly micely, v případě fosfolipidů označované jako liposomy, vzniknout, musí jich být v roztoku dostatečná koncentrace, která je označovaná jako kritická micelární koncentrace (CMC, z angl. *critical micelle concentration*) [32].

Krom sférických micel nebo dvojvrstev mohou vznikat i jiné útvary, kterými jsou globulární micely a dvojvrstvé válečky. Výsledná struktura závisí na tvaru shlukovaných molekul a podmiňuje je jejich *molekulární sbalovací parametr*:

$$P = \frac{V}{a \cdot l} = \frac{n \cdot v}{a \cdot l}, \quad (7)$$

kde V značí objem hydrofobní části, který je daný součinem objemů jednoho alkylového řetězce v a jejich celkového počtu n , a značí příčnou plochu polární hlavičky a l udává maximální délku hydrofobního konce [33],[34].

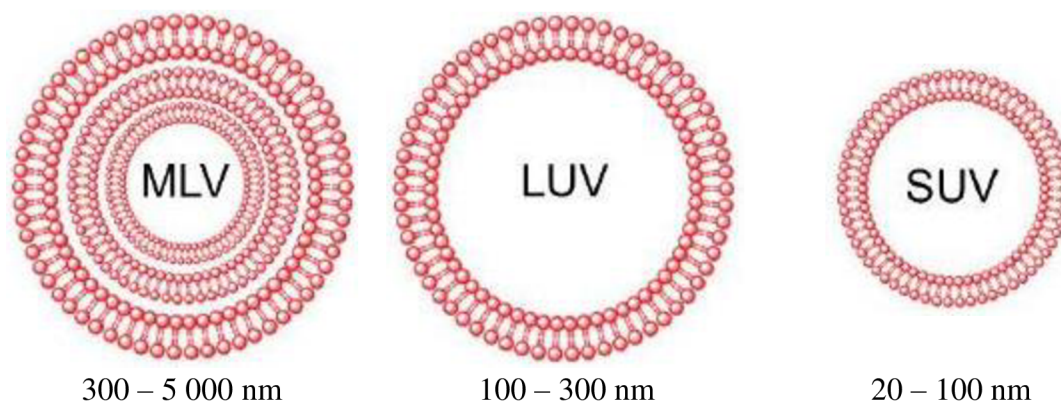
Následující přehled (viz Obr. 13) shrnuje jednotlivé vzniklé tvary agregátů na základě sbalovacího parametru, včetně tvaru molekuly, ze kterého jednotlivé formované struktury vycházejí.

Sférická micela	Cylindrická micela	Flexibilní dvojvrstva, vezikl	Planární dvojvrstva	Inverzní micela
				
$P < 1/3$	$P = 1/3 - 1/2$	$P = 1/2 - 1$	$P \sim 1$	$P > 1$
<i>Kužel</i>	<i>Komolý kužel</i>	<i>Komolý kužel</i>	<i>Válec</i>	<i>Klín</i>
				

Obr. 13 Druhy agregátů amfifilních molekul na základě sbalovacího parametru [35],[36]

2.3.3 Druhy liposomů

Jednotlivé typy liposomů se liší na základě jejich lamerality a velikosti. Jejich základní přehled je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 14).



Obr. 14 Druhy liposomálních typů – multilamelární vezikly (MLV) s velikostí 300 – 5000 nm, velké unilamelární vezikly (LUV) s velikostí 100 - 300 nm a malé unilamelární vezikly (SUV) s velikostí 20 – 100 nm [37]

Nejmenšími unilamelárními liposomálními částicemi jsou SUV (z angl. *small unilamellar vesicles*), které mají velikost pohybující se v řádech desítek nanometrů. Větší, ale opět unilamelární liposomy, s rozsahem velikostí 100 – 300 nm se označují jako LUV (z angl. *large unilamellar vesicles*). Poslední – největší – skupinou liposomů jsou MLV (z angl. *multilamellar vesicles*), které dosahují velikostí od 300 nm po 5 μ m a jsou tvořeny více lipidovými dvojvrstvami od sebe oddělenými vodným prostředím [37].

2.3.4 Příprava liposomů

Metod, kterými se dají liposomy připravovat, je několik, a liší se zejména typem připravených liposomů. Nejčastěji jsou připravovány MUV liposomy, které se poté různými metodami redukuje v menší částice.

Nejpoužívanější metodou přípravy liposomů je metoda *rehydratace z tenké vrstvy*. Roztoky lipidů jsou připravovány v organickém rozpouštědle, nejčastěji chloroformu, a z těchto zásobních roztoků je potřebné množství pipetováno do čisté vialky. Z vialky se poté nechá úplně odpařit rozpouštědlo – u menších objemů se využívá odpařování v digestoři a v přítomnosti suchého argonu nebo dusíku, při práci s většími objemy se využívá rotační vakuové odparky. Hydratace se provádí přidáním vodného pufru do vialky [39],[40].

Mezi další metody přípravy liposomů patří *odpařování reverzní fáze* (z emulze voda v oleji je za sníženého tlaku odpařena organická fáze za tvorby gelu, následným odpařením vzniká druhá vrstva fosfolipidů z gelu a vzniknou liposomy), *ethanolové vstříkávání* (roztok lipidů v ethanolu je vstříknut do pufru, čímž vzniknou MLV liposomy) a *detergentová metoda* (přidání tenzidu v CMC zprostředkuje tvorbu směsných micel a po odstranění tenzidu vznikají LUV liposomy) [37].

Pomocí několika mechanicky dispergačních metod lze získat liposomy specifických velikostí a lamarity. Nejpoužívanější metodou je *sonifikace*, kdy dochází v sondovém nebo vanovém ultrazvuku k tvorbě SUV liposomů. Dalšími metodami jsou *French-Press*, *homogenizace* a *membránová extruze* [39], [41].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V poslední době se metoda fluorescenční korelační spektroskopie stala velmi významnou a hojně používanou metodou v analýze částic koloidních velikostí. Metoda se využívá zejména pro stanovení hydrodynamických poloměrů malých fluoreskujících molekul, makromolekul a nanočástic, zároveň je také využívána pro studium jejich interakcí a možných agregací. Pomocí FCS se charakterizuje také difuze různých roztoků a gelů v nehomogenních médiích. Dále je metoda využívána k charakterizaci tenzidů, a to zejména ke stanovení velikosti jejich micel [16].

Prvním předpokladem pro provedení FCS měření je to, že látky, které jsou charakterizovány, mají vhodnou velikost. Dalším předpokladem je pak to, že částice vykazují fluorescenci, ať už samy, nebo označením fluorescenční sondou. Nemusí být sledována pouze fluorescence, obecně se jedná o *fluktuální korelační spektroskopii*, a může být sledován jiný signál, kupříkladu rozptyl světla [42], plazmonová rezonance [43], Ramanovy rozptyly [44],[45], případně rentgenová fluorescence [46] pro analýzu částic, které nemohou být fluorescenčně označeny.

Základním přístupem k analyzování nefluoreskujících koloidních částic je namísto sledování fluorescence sledování rozptylu světla částic. Tomu se věnovali **Kuyper a spol.**, kteří krom klasického FCS měření, kde sledovali difuzní koeficienty fluoreskujících látek, provedli i měření *konfokální korelační spektroskopie* (CCS, z angl. *confocal correlation spectroscopy*), kde sledovali konfokální geometrii zpětného rozptylu světla nefluoreskujících látek. Experiment probíhal pro dva typy částic, které se lišily velikostí, zlaté částice o průměru 40 nm a latexové částice s průměrem 110 nm, a pro oba typy částic byl experiment úspěšný. Metoda CCS může být využita pro charakterizaci koloidů, polymerů virů nebo DNA, a vzhledem k dobré citlivosti – 0,3 fl – ve velmi nízké koncentraci nebo objemu vzorků [42].

Wang a spol. ukázali, že měření může být ještě účinnější, pokud by excitační vlnová délka odpovídala plasmonové rezonanci zlatých částic. Techniku, která je založena na extrémním rezonančním rozptylu světla, nazvali *rezonanční korelační spektroskopii s rozptylem světa* (RLSCS, z angl. *resonance light scattering correlation spectroscopy*). Věnovali se využití zejména ve stanovování velikosti zlatých nanočástic používaných s nukleotidy a detekovali DNA hybridizaci sledováním intenzity rozptylu světla a difuze nukleotidů. Autokorelační křivky u RLSCS mají podobný tvar jako křivky u FCS měření [43].

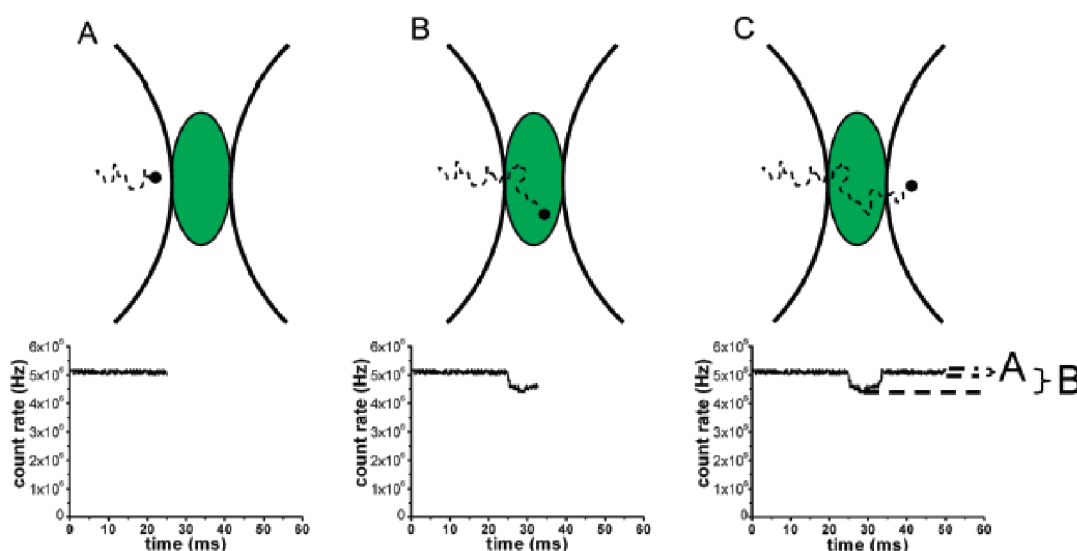
Aplikaci jednofotonové plasmonové luminiscenci ke korelační spektroskopii popsali **Tcherniak a spol.**, kteří se věnovali využití jak *rozptylové* tak *jednofotonové plasmonové luminiscenci* k měření translačních a rotačních difuzních koeficientů zlatých nanočástic. Měření poskytuje informace o mobilitě a agregaci nanočástic v různých prostředích, které jsou důležité zejména pro biomedicínské aplikace pro předpověď chování zlatých nanočástic v buňkách [47].

3.1 Inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (iFCS)

Alternativní metodou k FCS, vhodnou ke studiu nestabilních nebo velmi malých částic a biomolekul, je sledování intenzity signálu média, které obklopuje analyzovanou látku. Metoda označovaná jako *inverzní fluorescenční korelační spektroskopie* (iFCS, z angl. *inverse fluorescence correlation spectroscopy*) využívá, na rozdíl od klasické fluorescenční korelační spektroskopie, velmi vysoké koncentrace fluorescenčních sond.

3.1.1 Princip iFCS

Princip iFCS, který je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 15), je založen na sledování intenzity fluorescenčního signálu média obklopujícího analyzovanou látku. Nejprve je sledována vysoká intenzita fluorescence tvořená pouze rozpouštědlem vykazujícím fluorescenci (A). Po průchodu analytu difúzním objemem dochází ke snížení intenzity fluorescence (B). Když analyt opustí difúzní objem, dochází opět ke zvýšení intenzity fluorescence (C). Rozdíl intenzit (A–B) odpovídá snížení intenzity fluorescence průchodem nefluoreskující částice, což je úměrné velikosti této částice [48],[49],[50].



Obr. 15 Princip inverzní fluorescenční korelační spektroskopie [48]

3.1.2 Teorie iFCS

Stejně jako v případě standardní FCS, difúzní koeficienty nebo koncentrace částic mohou být získány na základě autokorelačních funkcí z detekované intenzity fluorescence. Normalizovaná autokorelační funkce pro FCS je dána vztahem:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} + 1 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \frac{a_i}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}} \sqrt{1 + \frac{\tau \cdot w_0^2}{\tau_{D_i} \cdot z_0^2}}} + 1, \quad (8)$$

kde N je průměrný počet molekul v detekčním objemu, τ_D je charakteristický difúzní čas, I je detekovaná intenzita fluorescence, δI je odchylka od intenzity v určitém časovém bodě ($\delta I = I(\tau) - \langle I \rangle$), a_i je odpovídající amplituda a z_0 a w_0 jsou vzdálenosti radiální a axiální dimenze. Pro inverzní i klasickou FCS platí, že amplituda vychází z předchozí rovnice (8) zavedením inzerce $\tau = 0$:

$$G(0) - 1 = \frac{\langle \delta I(0)^2 \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (9)$$

Pokud bude provedeno měření s různými koncentracemi částic pomocí klasické FCS, jmenovatel ($\langle I \rangle^2$) v každém měření bude úměrný koncentraci částic a signál z pozadí bude zanedbatelný. Pokud bude ve stejném případě provedeno iFCS měření, jmenovatel bude v podstatě nezměněný (krom velmi vysoké koncentrace částic). Čítec je úměrný koncentraci částic v obou případech – u klasické FCS i u inverzní FCS. Z tohoto vyplývá, že koncentrace částic u iFCS je úměrná amplitudě autokorelační funkce, a ne inverzní amplitudě u klasické FCS. Pokud bude do rovnice (9) zavedena inzerce $V_q = V_{part}/V_{dv}$, kde V_{part} je objem částice a V_{dv} je velikost detekčního objemu, pak získáme rovnici:

$$G(0) - 1 = \frac{(\sqrt{N} \cdot V_q \cdot I_{dv})^2}{(I_{dv} - N \cdot V_q \cdot I_{dv})^2} = \frac{N}{\left(\frac{1}{V_q} - N\right)^2}, \quad (10)$$

kde I_{dv} je celková intenzita fluorescence z média v detekčním objemu bez přítomnosti žádných částic a N je průměrný počet částic. Standardní odchylka N odpovídá $\delta N = \sqrt{N}$, protože N vychází z Poissonovy rovnice. Vynásobením \sqrt{N} a $V_q \cdot I_{dv}$ dává redukci totální fluorescence vzniklou přítomností částic v detekčním objemu.

Z rovnice (10) vyplývá, že amplituda autokorelační funkce není určena jen pomocí N , ale také pomocí V_q , které je určeno vztahem $V_q = V_{part}/V_{dv}$. Hodnotu V_{dv} lze získat ze standardního FCS měření difúzního času fluoroforu se známým difúzním koeficientem. Hodnota V_{part} může být stanovena z difúzního času $\tau_{D,part}$ z iFCS měření. Z rovnice (10) vyplývá také to, že existuje aproximovatelná lineární závislost mezi $G(0) - 1$ a koncentrací částic, pokud je objem všech částic v detekčním objemu menší než 20 % celkového objemu. Počet částic N je vyjádřen z rovnice (10):

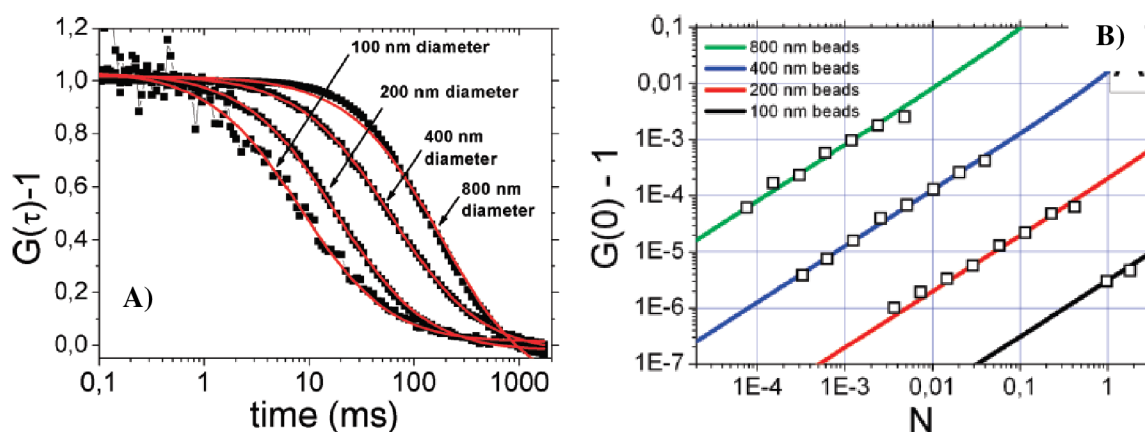
$$N = \frac{\frac{1}{G(0)-1} + \frac{2}{V_q}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{\frac{1}{G(0)-1} + \frac{2}{V_q}}{2}\right)^2 - \frac{1}{V_q^2}}. \quad (11)$$

Z tohoto vyplývá, že autokorelační funkce pro iFCS může být proložena stejným modelem jako autokorelační funkce u standardní FCS, nicméně amplituda $1/N$ je nahrazena výrazem v rovnici (10).

3.1.3 Využití iFCS

Této metodě se věnovali **Wennmalm a spol.**, kteří aplikovali metodu na polystyrenové částice o průměru 100, 200, 400 a 800 nm spolu s tenzidem (0,5% Triton X-100) a jako fluorescenční sondu využívali Alexa 488 o koncentraci 400 μM . K měření používali vlastní FCS sestavu: Paprsek o vlnové délce 488 nm z argonového iontového laseru byl zaměřena na vodní imerzní objektiv (63X) dichroickým zrcadlem (488 LP) a fokusován na vzorek (konfokální detekční objem byl 0,3 fl). Fluorescenční emise byla sbírána stejným objektivem, byla filtrována (pinhole o průměru 30 μm) a dopadala na dvě fotodiody.

Z normalizovaných iFCS křivek vzorků (viz Obr. 16A) lze usoudit, že prokládaný model je správný a předpoklad, že difúzní čas s poloměrem částic roste, je také správný. Z amplitud autokorelačních iFCS funkcí (viz Obr. 16B) vyplývá lineární závislost na počtu částic pro všechny stanovované velikosti částic. Z experimentu také vyplývá to, že nejmenší možné částice, které je možné pomocí iFCS sledovat, mají velikost 100 nm [48].



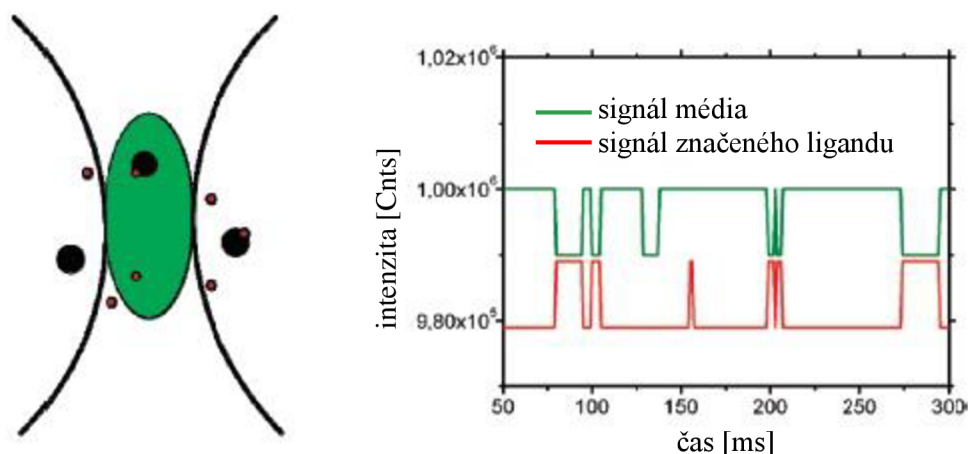
Obr. 16 A) Normalizovaná iFCS křivka a **B)** amplituda autokorelační funkce v závislosti na počtu částic z iFCS měření roztoků 100, 200, 400 a 800 nm polystyrenových částic v 400 μM roztoku Alexa 488 [48]

Metoda je tedy vhodná pro FCS analýzu částic bez nutnosti tyto částice fluorescenčně značit a je tedy vhodná zejména pro nestabilní molekuly nebo biomolekuly, u kterých dochází k exkluzím fluorescenčních sond. Zároveň je metoda vhodná pro velmi malé částice, vzhledem k tomu, že minimální velikost pro stanovení je 100 nm. **Jiang a spol.** také uvádějí, že metoda by mohla být vhodnou pro sledování lipidů a proteinů v syntetických i přírodních membránách [49],[51],[52].

3.2 Inverzní fluorescenční kros-korelační spektroskopie (iFCCS)

Možným rozšířením iFCS je *inverzní fluorescenční kros-korelační spektroskopie* (iFCCS, z angl. *inverse fluorescence cross-correlation spectroscopy*), která je založena na kros-korelačním signálu značených částic i prostředí. Metoda iFCS může být využita zejména k identifikaci vazeb mezi částicemi, kdy dochází k vazbě mezi fluorescenčně značeným ligandem a nefluoreskující molekulou, a dále pro nanodomény a proteinové shluky v membránách.

Princip iFCS je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 17). Komplexy malých zabarvených ligandů s většími neznačenými částicemi vytvářejí časové shodné píky ve dvou detekčních kanálech při průchodu difuzním objemem. Pokud negativní píky v obklopujícím prostředí odpovídají pozitivním píkům v ligandovém kanálu, pak jsou ligandy navázané na neoznačené částice [53].



Obr. 17 Princip inverzní fluorescenční kros-korelační spektroskopie [53]

Pro standardní i inverzní FCCS platí, že kros-korelační funkce je dána vztahem:

$$G_{cc}(\tau) = \frac{\langle I_g(t) \cdot I_r(t + \tau) \rangle}{\langle I_g \rangle \cdot \langle I_r \rangle}, \quad (12)$$

z čehož pro amplitudu funkce platí:

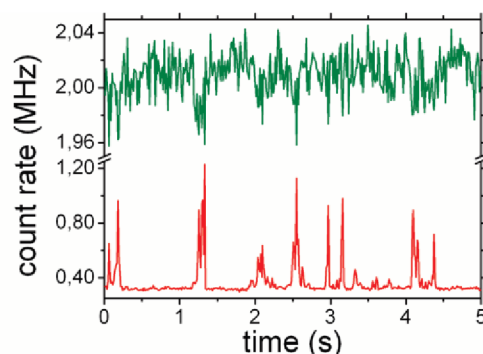
$$G_{cc}(0) - 1 = \frac{\langle \delta I_g(0) \cdot \delta I_r(0) \rangle}{\langle I_g \rangle \cdot \langle I_r \rangle}, \quad (13)$$

kde I_g je intenzita fluorescence z média (green channel) a I_r je intenzita fluorescence značeného ligandu (red channel).

3.2.1 Využití iFCCS

Kros-korelační variantě iFCS se věnovali také **Wennmalm a spol.**, kteří na konfokálním mikroskopu se stejným nastavením jako v případě klasické inverzní varianty FCCS

(viz kap. 3.1.3) sledovali 200 nm fluosféry a 320 nm polystyrenové mikrosféry, jako ligandy ve svých experimentech používali R-Phycoerythrin. Na následujícím obrázku (viz Obr. 18) jsou zobrazeny dva barevné kanály – červený pro barevné ligandy a zelený pro neoznačené částice) [54].



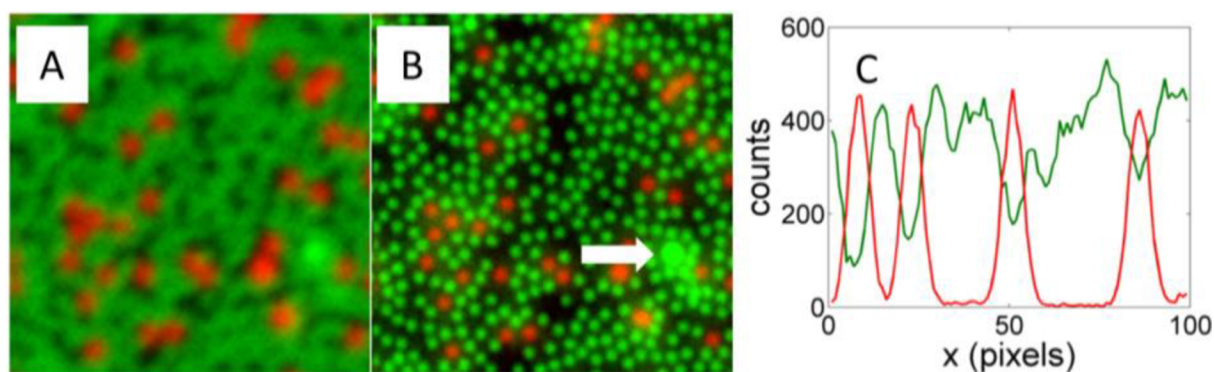
Obr. 18 Časový průběh intenzity fluorescence na dvou detekčních kanálech pro ligandy a neoznačené částice [54]

3.3 Skenovací inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (siFCS)

Jednou z dalších metod založených na iFCS je skenovací inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (siFCS, z angl. *scanning inverse fluorescence correlation spectroscopy*), která může být využita ke stanovení velikosti proteinů v buněčných membránách a obecně ke sledování imobilních povrchů.

3.3.1 Využití siFCS

Metodě se věnovali **Bergstrand a spol.**, kteří ve svých experimentech používali fluorescenční karboxylované nanočástice, zelené o průměru 200 a 36 nm a červené o průměru 250 a 40 nm, které byly zobrazovány na konfokálním a STED mikroskopu (viz Obr. 19). Na rozdíl od iFCS, kde bylo možné pozorovat pouze částice větší než 100 nm, u konfokálního zobrazování je možné pozorovat částice do velikosti 20 nm a u STED zobrazování pod 5 nm [54].



Obr. 19 Typické zobrazení pomocí A) konfokální a B) STED mikroskopie stejného skenovaného místa vzorku velikosti $5 \times 5 \mu\text{m}$ a C) Tracing z konfokálního zobrazení [54]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Fluorescenční sondy

Fluorescein sodný: Sigma-Aldrich

CAS: 2321-07-5

Číslo šarže: 101355957

Rhodamin 6G: Sigma-Aldrich

CAS: 989-38-8

Lot# MKBF7515V

Atto 488: Sigma-Aldrich

Nanočástice

Micro particle size standard based on polystyrene monodisperse
Sigma-Aldrich, analytical standard

100 nm

Aqueous suspension: 2 % solids

500 nm

Aqueous suspension: 2 % solids

Lipidy

Lecitin: Avanti Polar Lipids

CAS: 97281-44-2

Číslo šarže: EPC-599

Rozpouštědla

Triton X-100: Sigma-Aldrich Chemistry

CAS: 9002-93-1

Číslo šarže: 101597883

Deionizovaná voda

PureLab: ELGA

Dihydrogenfosforečnan draselný: Lachner

CAS: 7778-77-0

Číslo šarže: PP/2009/00261

Hydrogenfosforečnan draselný: Lachner

CAS: 7758-14-5

Číslo šarže: 22-24/25

Chlorid sodný: Lachner

CAS: 7647-14-5

Číslo šarže: PP/2014/0569

Chloroform: Sigma-Aldrich

CAS: 67-66-3

Číslo šarže: 03096CK

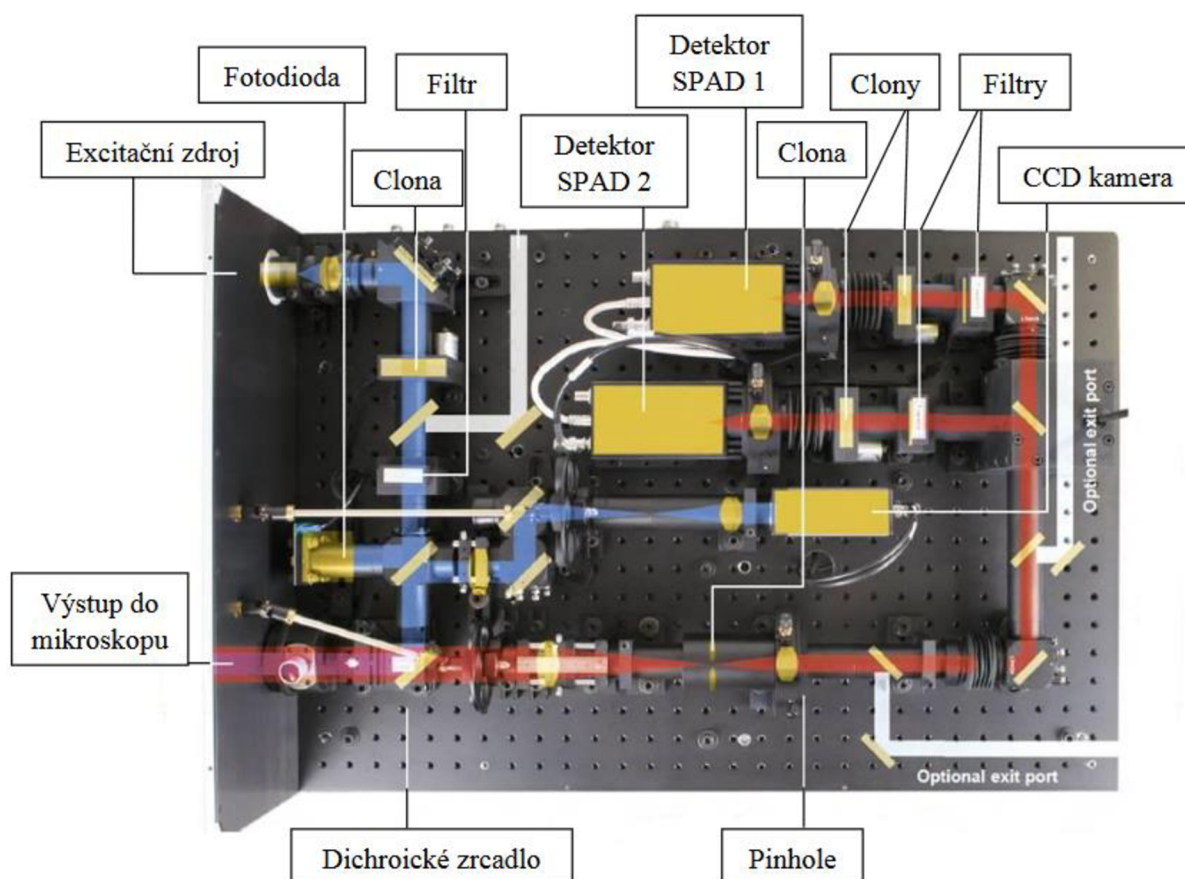
4.2 Přístroje a zařízení

Použité přístroje MicroTime 200 (Picoquant)
Ultrazvuk (s vodní lázní)
Analytické váhy (Denver Instrument, Mdl BC 100)
Mikropipety (Finnpipette, Eppendorf Research)
Magnetická míchačka

Použitý software Symphotime 64
Microsoft Word 2013
Microsoft Excel 2013

4.3 Měření a vyhodnocování FCS dat

Pro měření FCS byl použit přístroj MicroTime 200 od firmy PicoQuant s konfokálním mikroskopem Olympus IX71. Používanými excitačními zdroji jsou pulzní laserové diody, opět od firmy PicoQuant, o vlnových délkách 375, 470, 510 a 640 nm s horizontální nebo vertikální polarizací. Jako objektiv se používá planární superapochromatický objektiv UplanSApo s vodní imerzí, 60-ti násobným zvětšením a numerickou aperturou 1,2. Skener se sub-nanometrovým rozlišením a piezoelektrickým posuvem firmy Physik Instrumente umožňuje skenování vzorku. Na následujícím obrázku (viz Obr. 20) je naznačeno schéma měřicího přístroje.



Obr. 20 Schéma hlavní optické jednotky měřicího přístroje MicroTime 200

4.3.1 Nastavení pro měření

Pro jednotlivá měření bylo použito specifických nastavení pro jednotlivé fluorescenční sondy, specifické parametry jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Specifické parametry jednotlivých sond pro nastavení přístroje pro měření FCS

Použitá fluorescenční sonda	<i>Fluorescein, Atto 488</i>	<i>Rhodamin 6G</i>
Laser	470 nm	510 nm
	vertikální polarizace	horizontální polarizace
Pinhole o průměru	50 μm	50 μm
Dichroické zrcadlo	405/465 nm	514/640 nm
Emisní filtry	520/35 nm	550/49 nm

Před samotným měřením, je krom nastavení parametrů týkajících se použité fluorescenční sondy, je třeba nastavit maximální odezvu detektoru. To se provádí konfigurací pinhole tak, aby bylo nalezeno maximum intenzity.

4.3.1.1 Kalibrace konfokálního objemu

Důležitým faktorem před samotným měřením je také kalibrace konfokálního objemu. Je důležité znát velikost a tvar konfokálního objemu. K tomuto účelu se používají referenční fluorescenční sondy o známém difuzním koeficientu a k účelu kalibrace jsou tyto sondy

proměřeny se stejným experimentálním nastavením a stejnými parametry měření – stejnou použitou vlnovou délkou a intenzitou laseru, tloušťkou podložního sklíčka, použitým rozpouštědlem a imerzním médiu.

Při použití laseru o vlnové délce 470 nm byla použita fluorescenční sonda Atto 488 a pro laser s vlnovou délkou 510 nm byl použit Rhodamin 6G. Jejich difuzní koeficienty jsou vypsány v následující tabulce (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 Difuzní koeficienty a parametry referenčních fluorescenčních sond pro kalibraci

Fluorescenční sonda	Excitace laserem	Emisní maximum	Difuzní koeficient*
	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	D [10^{-6} cm ² s ⁻¹]
<i>Atto 488</i>	470	523	4,0 ± 0,1
<i>Rhodamin 6G</i>	510	550	4,14 ± 0,05

* Difuzní koeficient daný při teplotě 25 °C ve vodě

Difuzní koeficient je závislý na teplotě a tabelované hodnoty se udávají pro 25 °C. Přepočítání na danou laboratorní teplotu je zprostředkováno Stokes-Einsteinova vztahu:

$$D(T) = \frac{kT}{6\pi\eta(T)r}, \quad (14)$$

kde D je difuzní koeficient (při dané teplotě), k je Boltzmanova konstanta, r je hydrodynamický poloměr a η je viskozita rozpouštědla (také při dané teplotě).

Přepočítání difuzního koeficientu při jiné teplotě, než 25 °C, je prováděn podle následující rovnice:

$$D(T) = D(25\text{ °C}) = \frac{T}{298,15\text{ K}} \cdot \frac{8,9 \cdot 10^{-4}\text{ Pa} \cdot \text{s}}{\eta(T)}. \quad (15)$$

Po naměření FCS křivky dané fluorescenční sondy je hodnota difuzního koeficientu dosazena do matematického modelu (více v kapitole 4.3.2) a ve vyhodnocovacím módu *FCS Calibration* jsou změřená data tímto modelem prokládána, čímž dochází ke zjištění hodnoty velikosti konfokálního objemu [55].

4.3.1.2 Ověření dob života

Důležité je taky ověření dob života, k čemuž se využívá metod TCSPC a FLCS (viz kapitola 2.2.4). Pro čistě orientační hledisko se dá použít jakákoliv z těchto dvou metod, nicméně v případě náhledu na FCS křivky oddělené vzhledem k dobám života slouží pouze FLCS analýza. Při ladění a nastavování přístroje se využívá TCSPS analýzy, kdy se hledá nejlepší odezva detektoru na přichodící signál IRF (z angl. *instrument response function*, odezva detektoru a optiky).

V případě měření na dvou detektorech je potřebné nastavit maximální odezvu pinhole i TCSPC analýzu pro oba detektory souběžně tak, aby si signály co nejvíce odpovídali. Výhoda použití kroskorelačního signálu ze dvou detektorů spočívá v tom, že dochází k automatickému odstranění tzv. *afterpulsingu* (tvorba impulzů v důsledku odezvy detektoru) a není tak potřebné při vyhodnocování dat zavádět funkci *FLCS background correction*, kterou je potřebné zavést pro odstranění šumu při použití jednoho detektoru.

4.3.2 Vyhodnocování dat

Po změření je potřeba výsledky správně zpracovat v programu SymphoTime64. Získána data jsou zpracovávána vhodně zvolenou analýzou, a to buď pomocí klasické FCS, kdy se využívá kroskorelace signálu ze dvou detektorů, nebo pomocí časově rozlišené FLCS analýzy.

Získaná autokorelační (resp. kroskorelační) křivka je poté v programu SymphoTime64 prokládána vhodnými modely. Základním modelem je *Prostá difuze* (v programu označovaný jako Pure Diffusion), který předpokládá fluktuace způsobené pouze difundujícími molekulami. Rozšířený model *Triplet* uvažuje i vliv dlouho dohasínajícího signálu od měřených molekul. *Rozšířeným 3D Tripletním modelem* (v programu označovaný jako Triplet Extended 3D) se popisují difuze ovlivněné nejen přítomností tripletového stavu, ale je rozšířen o koeficient tzv. anomální difuze, tedy proces, kdy vztah mezi středním kvadratickým posuvem a časem není lineární.

Jednotlivé matematické modely:

- *Pure Diffusion*

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]} \cdot \kappa^2\right]^{0,5}}$$

- *Triplet*

$$G(\tau) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Triplet}}}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]} \cdot \kappa^2\right]^{0,5}}$$

- *Triplet Extended 3D*

$$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{\text{Triplet}}-1} T(j) \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Triplet}}(j)}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left(\frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right)\right]^{\alpha[i]} \cdot \left[1 + \frac{\left(\frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right)^{\alpha[i]}}{\kappa^2}\right]^{0,5}} + G_{\text{inf}}$$

4.4 Příprava zásobních roztoků

4.4.1 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

Pro přípravu zásobního roztoku fluoresceinu o koncentraci 500 μM bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství fluoresceinu a v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku.

Pro přípravu zásobního roztoku Rhodaminu 6G o koncentraci 500 μM bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství Rhodaminu 6G a v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku.

Pro přípravu zásobního roztoku Atto 488 o koncentraci 25 μM bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství Atto 488 a v odměrné baňce o objemu 25 ml bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku.

4.4.2 Příprava zásobního roztoku neionogenního tenzidu

Pro ředění vzorků byl použit neionogenní tenzid Triton X-100 o koncentraci 0,25 hm. %. Pro jeho přípravu bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství tenzidu ze zásobní lahve a v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku. Pro rozpuštění bylo do roztoku vloženo magnetické míchadlo a roztok byl umístěn na magnetickou míchačku.

4.4.3 Příprava zásobních roztoků lipidů

Zásobní roztoky lipidů byly připraveny v koncentraci 25 g/l, jako rozpouštědlo byl použit chloroform. Tyto roztoky byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 Příprava zásobního roztoku pufru

Pro přípravu vzorků s liposomy bylo potřebné připravit fosfátový pufr o koncentraci 10 mM. Ten byl připraven navážením potřebné množství chloridu sodného, hydrogenfosforečnanu draselného a dihydrogenfosforečnanu draselného. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 250 ml a dopuštěno deionizovanou vodou po rysku.

4.5 Příprava vzorků

4.5.1 Příprava vzorků pro zjištění vhodné koncentrace pro iFCS

Pro zjištění vhodné koncentrace fluorescenčních sond pro iFCS měření byla připravena koncentrační řada deseti vzorků obou fluorescenčních sond v rozmezí od 10 nM po 500 μM . Do skleněných vialek bylo vždy ze zásobního roztoku napipetováno potřebné množství sondy, to bylo poté doplněno deionizovanou vodou na celkový objem 2 ml.

4.5.2 Příprava vzorků s nanočásticemi

Pro iFCS experimenty byly vytvořeny sady vzorků, které obsahovaly konstantní koncentraci fluorescenčních sond – 400 μM v případě fluoresceinu a rhodaminu 6G a 20 μM v případě Atto 488 – a různé koncentrace polystyrenových částic v různých velikostech. Při použití polystyrenových částic s průměrem 100 nm byla připravena koncentrační řada obsahující 8 vzorků v koncentračním rozmezí od 0,25 nM do 2 nM. V případě polystyrenových částic o průměru 500 nm bylo připraveno taktéž 8 vzorků, a to v rozmezí koncentrací od 0,002 nM do 0,05 nM.

Jednotlivé vzorky byly připraveny pipetováním potřebného množství fluorescenčních sond i polystyrenových částic ze zásobních roztoků. Vzorky byly připraveny tak, aby byly do výsledného objemu 2 ml doplněny neionogenním tenzidem Tritonem X-100 o koncentraci 0,25 hm. %. Po přidání neionogenního tenzidu byly 20 minut sonifikovány ve vodní lázni, stejně tak byly sonifikovány před jejich měřením.

4.5.3 Příprava vzorků s liposomy

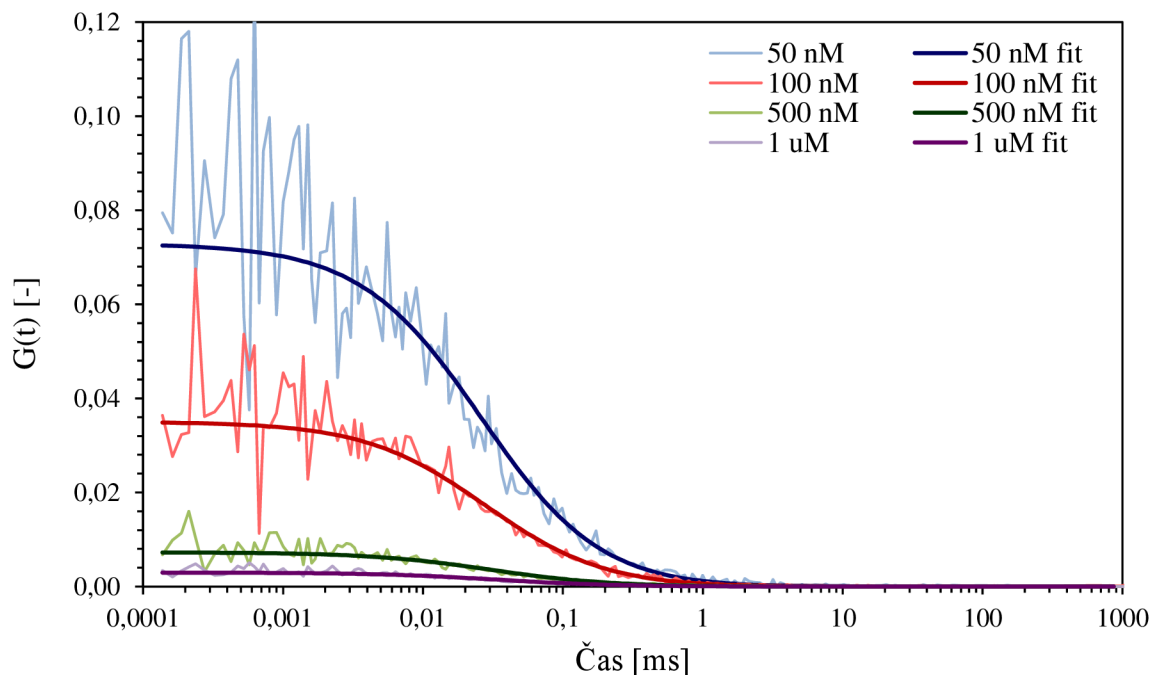
Liposomální vzorky byly připraveny metodou rehydratace tenké vrstvy. Do skleněných vialek bylo pipetováno potřebné množství lipidů ze zásobního roztoku tak, aby koncentrace ve vzorku byla 0,5 a 1 g/l, a chloroform byl následně odpařen v digestoři, čímž vznikl tenký film. Tento byl poté rehydratován potřebným množstvím fosfátového pufru a k uvolnění filmu ze stěny vialky bylo docíleno vortexováním. Poté bylo do vialek pipetováno potřebné množství fluorescenční sondy ze zásobního roztoku. Celkový objem každého vzorku byl 2 ml. Ze vzniklých multilamelárních liposomů byly získány unilamelární liposomy ultrazvukováním ve vodní lázni při 45 °C do vyčeření roztoku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení vhodné koncentrace fluorescenčních sond

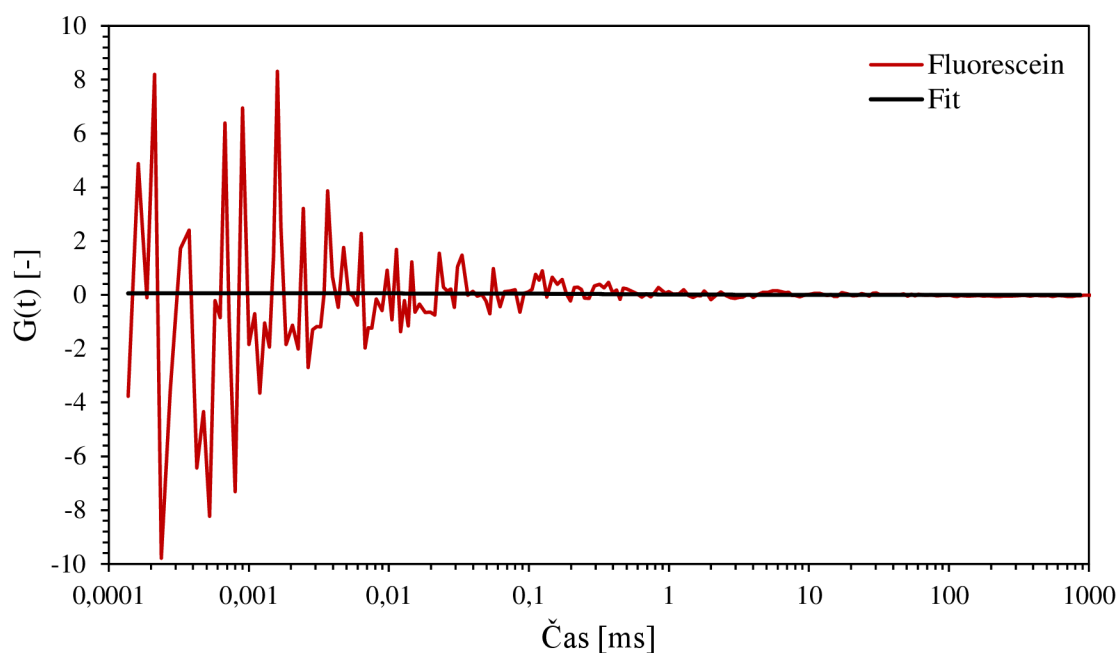
Před samotnými iFCS experimenty bylo nutné stanovit vhodnou koncentraci fluorescenčních sond. Koncentrace pro provedení iFCS měření musí být dostatečně vysoká, aby nedocházelo ke sledování difuze fluorescenční sondy skrz konfokální objem, ale aby mohla být sledována difuze sledovaných částic a fluorescenční sonda byla vnímána jako medium obklopující analyzovanou látku. Pro stanovení vhodné koncentrace fluorescenční sondy fluoresceinu byla změřena koncentrační řada vzorků obsahujících 10 nM až 500 μ M fluorescein.

Autokorelační křivky těchto vzorků jsou zobrazeny v následujícím grafu (viz Obr. 21). S rostoucí koncentrací fluoresceinu dochází k poklesu hodnoty amplitudy autokorelační funkce, což odpovídá teorii klasické FCS. U vzorku, který obsahoval 1 μ M koncentraci fluoresceinu ještě docházelo ke korelaci, nicméně ve vzorcích s vyšší koncentrací než 100 μ M už data žádnou korelaci nevykazovala.



Obr. 21 Autokorelační křivky fluoresceinu v různých koncentracích (50 nM – 1 μ M). S rostoucí koncentrací fluoresceinu klesá hodnota autokorelační funkce a data přestávají korelovat.

Pro samotné měření nebyly používány vzorky ve 100 μ M koncentraci, ale s koncentrací 400 μ M, což odpovídá zhruba $7 \cdot 10^4$ molekulám fluoroforu v konfokálním objemu 0,3 fl. Tuto koncentraci využívali také v experimentech v odborných publikacích (viz kapitola 3.1.3). Stejná koncentrace byla použita i pro fluorescenční sondu Rhodamin 6G. V následujícím grafu (viz Obr. 22) je zobrazena autokorelace 400 μ M fluoresceinu, kde data žádnou korelaci nevykazují, a při této koncentraci tedy v konfokálním objemu nedochází k detekci difuze molekul fluoroforu.



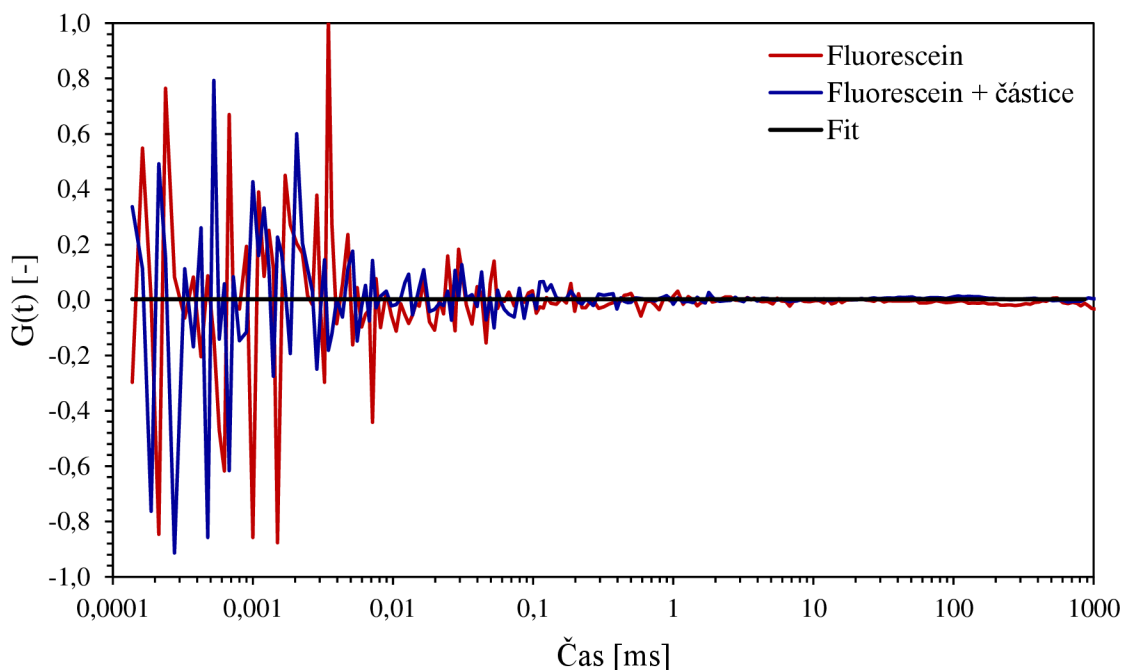
Obr. 22 Autokorelace pro systém obsahující 400 μM fluorescein. Z grafu je patrné, že data nevykazují žádnou korelaci a nedocházelo tak k detekci difuze molekul fluoroforu.

5.2 iFCS měření vzorků s částicemi o průměru 100 nm

5.2.1 Použití fluoresceinu

V odborných publikacích (viz kapitola 3.1) je uvedeno, že nejmenší možné částice, které lze pomocí metody inverzní FCS stanovit, mají velikost 100 nm. Z toho důvodu byly provedeny experimenty iFCS měření systémů obsahujících polystyrenové nanočástice o velikosti 100 nm a fluoresceinu. Byly proměřeny FCS křivky pro sadu vzorků, která obsahovala polystyrenové částice v koncentračním rozmezí od 0,25 nM do 2 nM a koncentrace fluoresceinu ve všech vzorcích byla 400 μM .

Na následujícím grafu (viz Obr. 23) jsou zobrazena získaná data pro samotný fluorescein v koncentraci 400 μM a zároveň data systému obsahujícího 100 nm polystyrenové částice v koncentraci 1 nM.

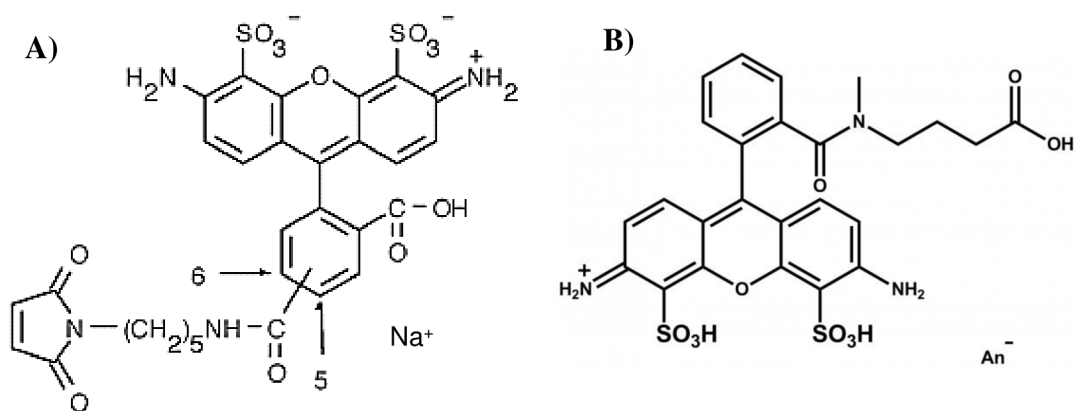


Obr. 23 Nekorelující data systému obsahujícího fluorescein o vysoké koncentraci v přítomnosti 100 nm částic i bez nich.

Jak lze z grafu pozorovat, data nevykazují žádnou korelaci, ať už v systému se samotným fluoresceinem, tak i v systému obsahujícím 100 nm částice. Obdobná data byla získána i pro ostatní koncentrace 100 nm částic. Pomocí fluoresceinu, i ve velmi vysoké koncentraci, tedy nelze částice této velikosti stanovit ani při použití většího množství těchto částic.

5.2.2 Použití Atto 488

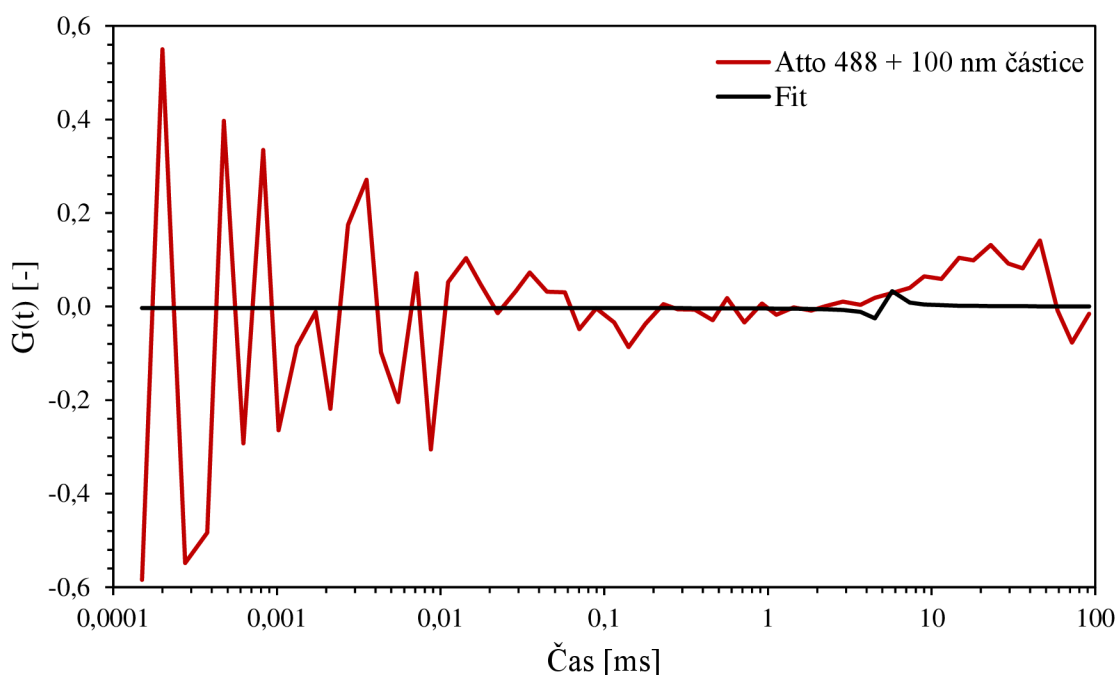
Od fluoresceinu je odvozeno několik stabilnějších derivátů, mezi které patří Alexa 488 a Atto 488. V experimentech v odborných publikacích (viz kapitola 3.1.3) byla používána právě fluorescenční sonda Alexa 488 ve 400 μM koncentraci. Chemická struktura těchto dvou derivátů je znázorněna na následujícím obrázku (viz Obr. 24).



Obr. 24 Chemická struktura derivátů fluoresceinu – A) Alexa 488 a B) Atto 488

Vzhledem k dostupnosti v laboratoři byla jako další sonda pro iFCS experimenty vybrána fluorescenční sonda Atto 488. Ve vzorcích obsahujících Atto 488 byla použita nižší koncentrace – 20 μM – vzhledem k dostupnému množství této sondy, nicméně i ta by měla být pro provedení iFCS měření dostačující (viz kapitola 5.1). Byly proměřeny FCS křivky obsahující 100 nm částice ve stejném koncentračním rozmezí částic jako v předchozím případě s Atto 488 namísto fluoresceinu.

Na následujícím grafu (viz Obr. 25) jsou zobrazena získaná data pro systém obsahující Atto 488 v koncentraci 20 μM a 100 nm polystyrenovými částicemi v koncentraci 1 nM. Jak je z grafu patrné, ani v případě stabilnějšího derivátu fluoresceinu není možné částice 100 nm velikosti stanovit pomocí inverzní metody FCS.



Obr. 25 Nekorelující data systému Atto 488 a 100 nm částic

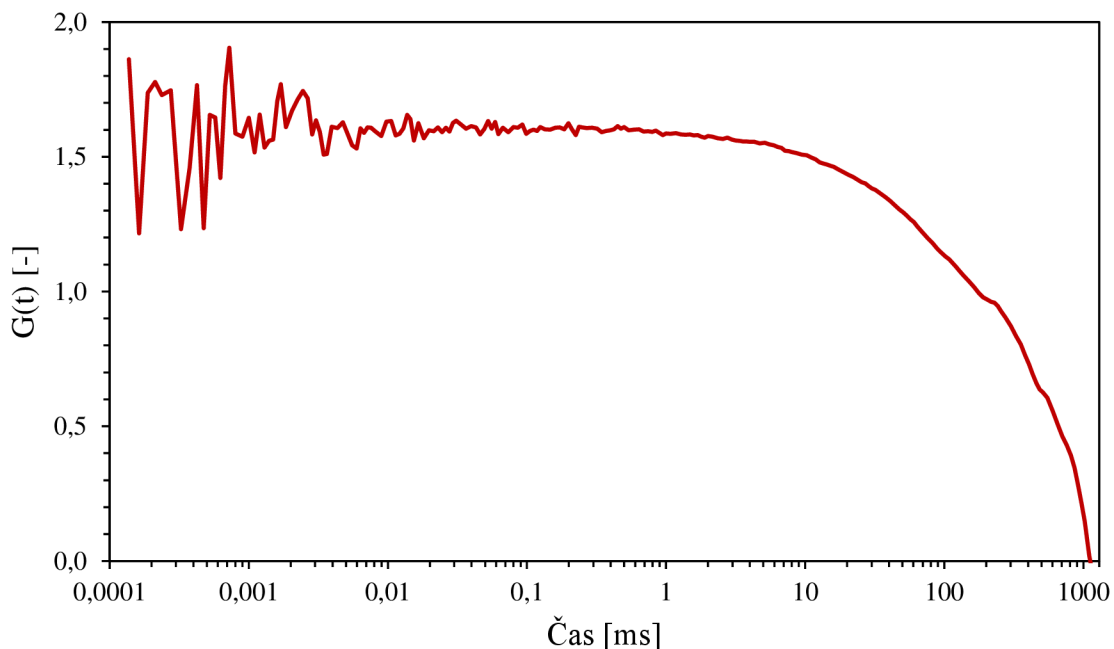
5.3 iFCS měření vzorků s částicemi o průměru 500 nm

Vzhledem k předchozím experimentům, které ukázaly, že částice o velikosti 100 nm nelze iFCS měřením stanovit ani pomocí fluoresceinu ani pomocí jeho stabilnějšího derivátu Atto 488 ve vysokých koncentracích, byly jako další částice pro studium inverzní FCS metody vybrány částice větší velikosti, a to o průměru 500 nm.

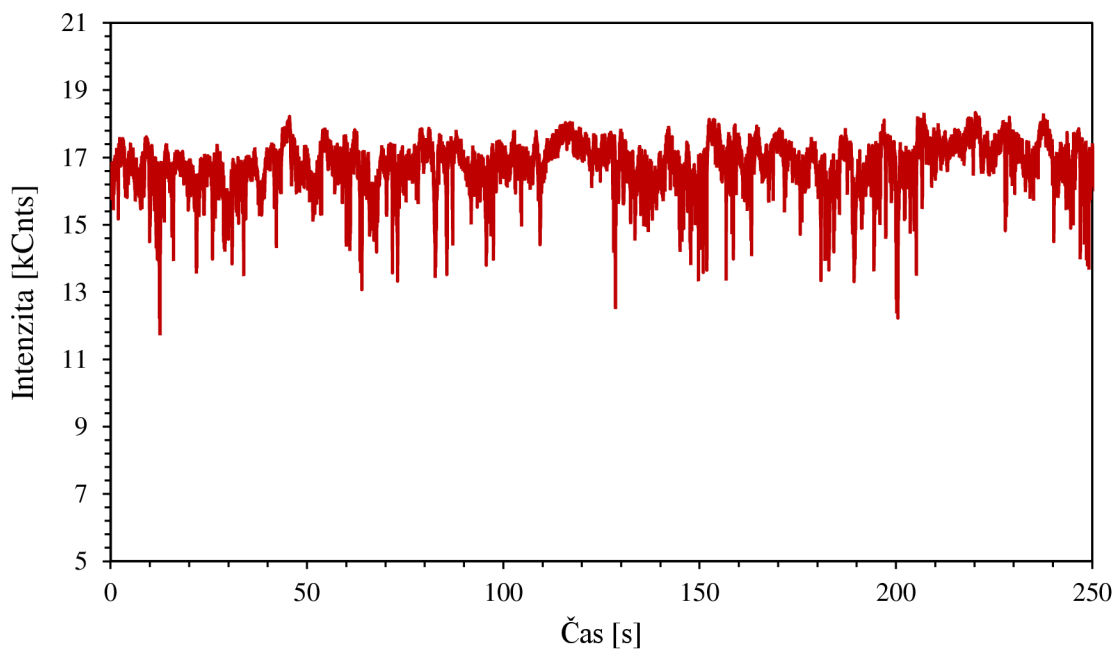
V následujících experimentech byla provedena iFCS měření, analogicky k předchozímu případu, pro systémy obsahující 500 nm polystyrenové nanočástice v koncentračním rozmezí od 0,002 nM do 0,05 nM s fluorescenčními sondami fluorescein a rhodamin 6G v koncentraci 400 μM .

5.3.1 Použití fluoresceinu

Na následujícím grafu (viz Obr. 26) je zobrazena autokorelační křivka systému polystyrenových částic o průměru 500 nm v koncentraci 0,05 nM s fluoresceinem v koncentraci 400 μ M a časový záznam fluktuační intenzity fluorescence téže vzorku je zobrazen níže (viz Obr. 27).



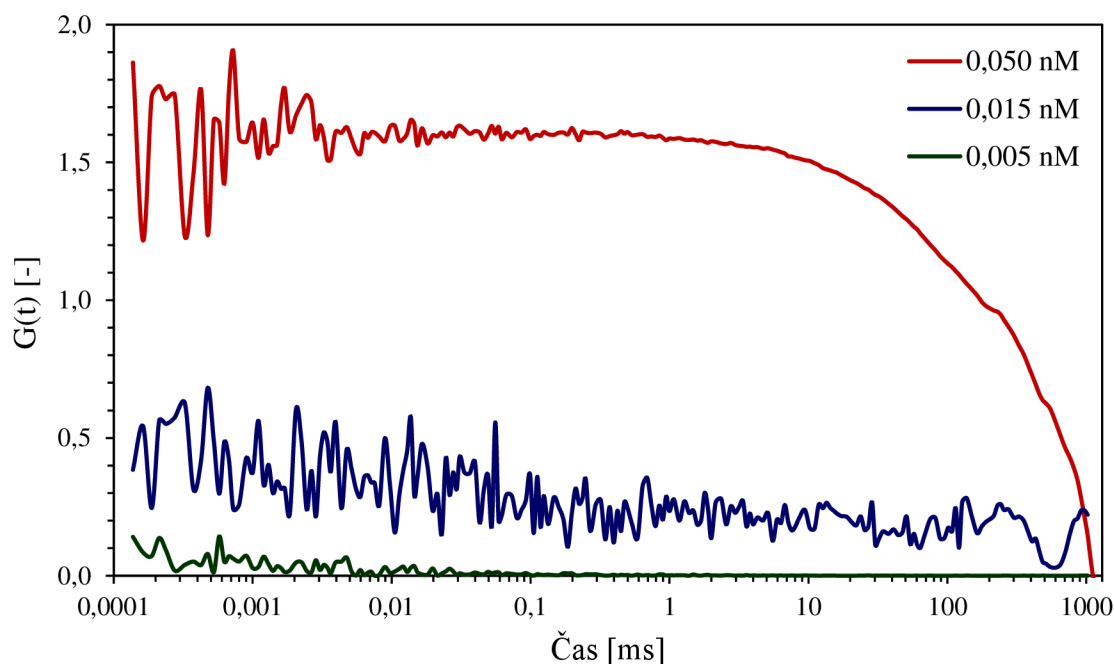
Obr. 26 Autokorelační křivka vzorku obsahujícího fluorescein v koncentraci 400 μ M a polystyrenové částice o průměru 500 nm v koncentraci 0,05 nM.



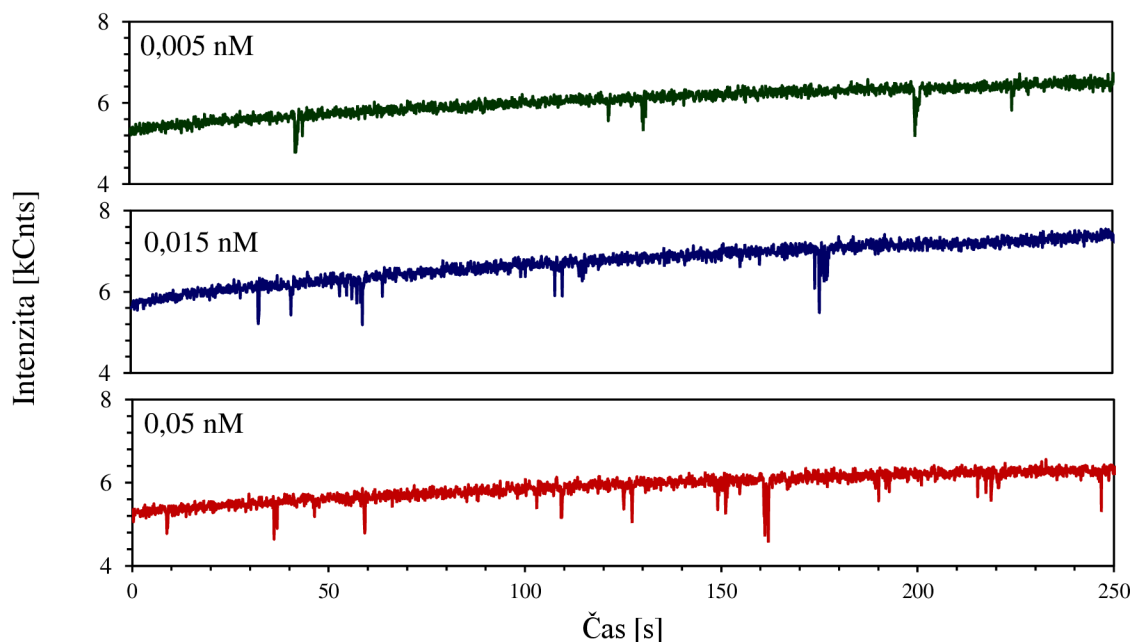
Obr. 27 Časová závislost fluktuační intenzity fluorescence v systému s 500 nm částicemi v koncentraci 0,5 nM a 400 μ M fluoresceinem.

Jak lze v grafu vidět, píky směřující dolů – mimo vysokou intenzitu fluorescence (zhruba 17 kCnts) – značí průchod částice konfokálním objemem. Kratší píky znamenají průchod jedné částice, kdežto ty větší značí průchod shluku částic.

Fluorescein je tedy pro inverzní FCS metodu vhodnou sondou, a to pro částice, které svými rozměry spadají do půl mikronové oblasti. V následujícím grafu (viz Obr. 28) je porovnání iFCS křivek pro polystyrenové částice v různých koncentracích (0,005 – 0,05 nM). Porovnání časového záznamu intenzity fluorescence stejných vzorků je zobrazeno níže (viz Obr. 29).



Obr. 28 Autokorelační křivky iFCS experimentu pro koncentrační rozmezí 0,005 – 0,05 nM. S rostoucí koncentrací polystyrenových částic roste hodnota amplitudy autokorelační funkce.



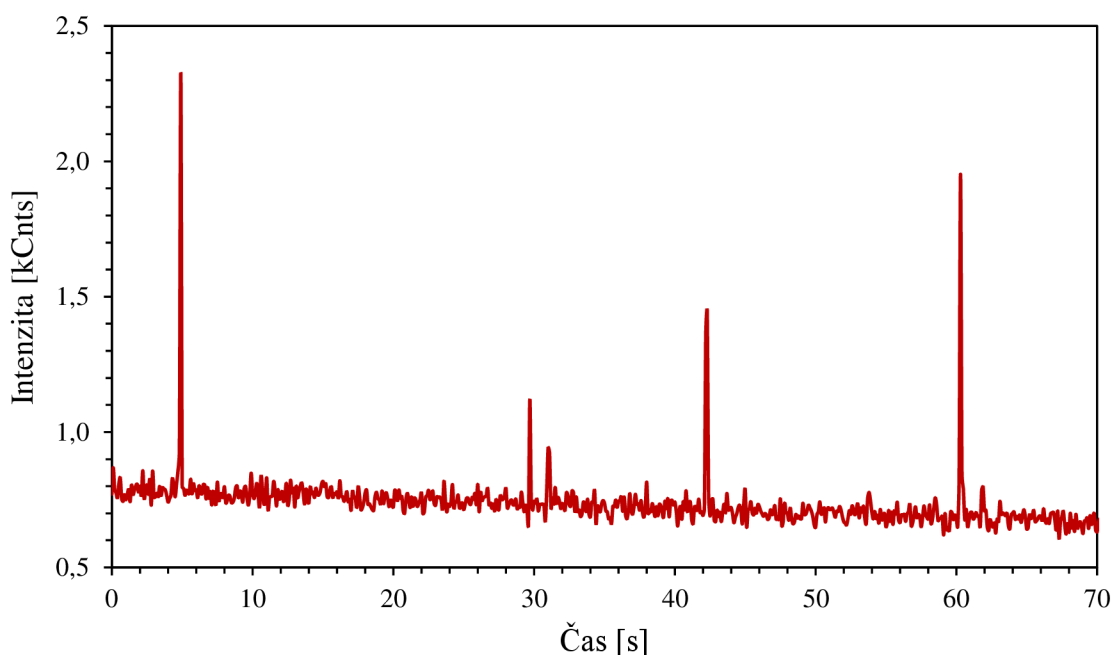
Obr. 29 Porovnání časových závislostí intenzity fluorescence pro tři koncentrace 500 nm částic

Jak lze z grafu autokorelační funkce pozorovat, s rostoucí koncentrací částic roste i amplituda autokorelační funkce, což odpovídá teoretickým vztahům (viz kapitola 3.1.2). Inverzní FCS se tímto odlišuje od klasické FCS, kdy je tomu naopak, a s rostoucí koncentrací hodnota amplitudy autokorelační funkce klesá. Zvyšující se koncentraci částic procházejících skrz konfokální objem potvrzuje časová závislost intenzity fluorescence jednotlivých vzorků.

5.3.2 Použití rhodaminu 6G

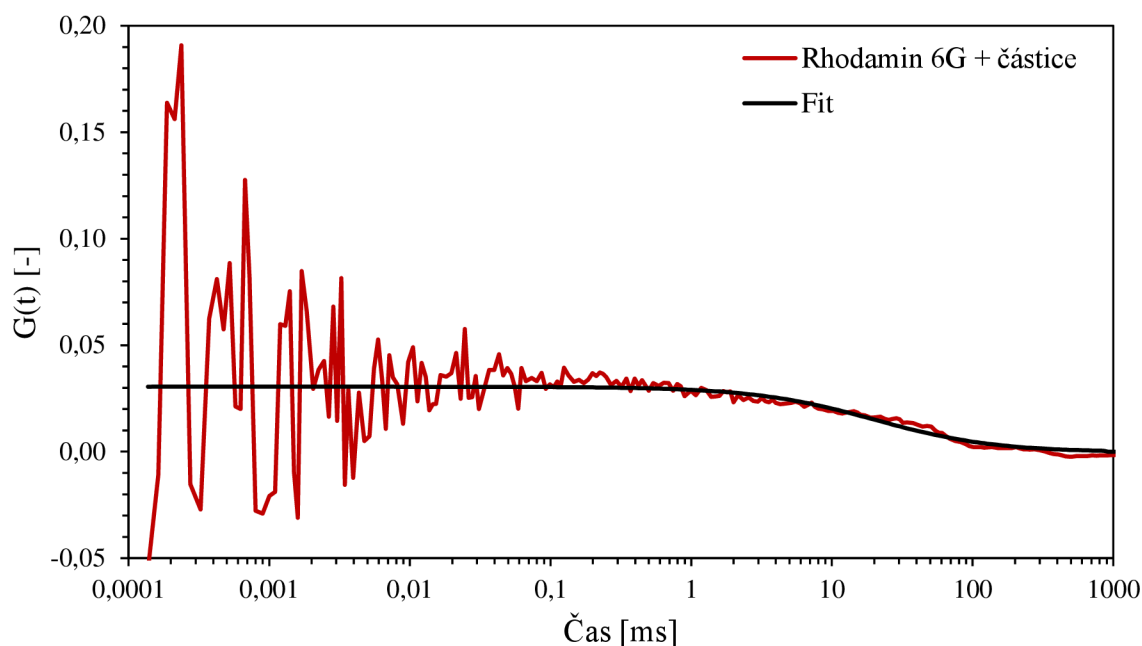
Vzhledem k tomu, že částice půl mikronové velikosti lze stanovit pomocí fluoresceinu, není třeba používat jeho derivát Atto 488, který je sice stabilnější, ale také je cenově méně dostupný. K dalšímu studiu byla použita fluorescenční sonda rhodamin 6G, opět ve 400 μM koncentraci.

Na následujícím grafu (viz Obr. 30) je zobrazen časový záznam fluktuace intenzity fluorescence pro 500 nm polystyrenové částice o koncentraci 0,05 nM v 400 μM roztoku rhodaminu 6G. Jak lze z grafu pozorovat, systém se chová jako při klasické FCS metodě, tedy, že dochází ke zvýšení intenzity fluorescence průchodem označené částice konfokálním objemem.



Obr. 30 Fluktuace intenzity v průběhu času v systému 500 nm polystyrenových částic v koncentraci 0,01 nM a Rhodaminu 6G v koncentraci 400 μM

Autokorelační křivka tohoto systému je zobrazena na následujícím grafu (viz Obr. 31).

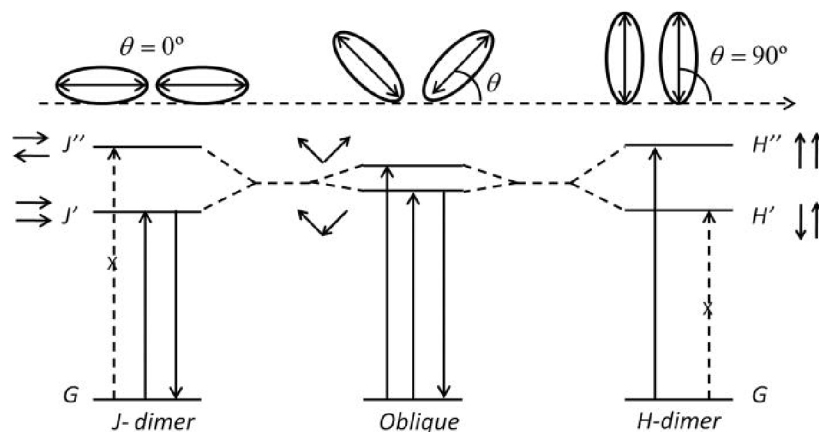


Obr. 31 Autokorelační funkce systému obsahujícího 400 μM rhodamin 6G a 500 nm polystyrenové částice v koncentraci 0,05 nM

I přes vysokou koncentraci (400 μM) je z předchozího grafu patrné, že fluorescenční sonda rhodamin 6G není vhodná pro iFCS stanovení a časový záznam fluktuace odpovídá standardnímu FCS měření, kdy dochází ke sledování zvýšení intenzity fluorescence průchodem částic skrz konfokální objem. Malá intenzita (zhruba 0,8 kCnts) je pravděpodobně způsobena tvorbou agregátů, v tomto případě dimerů H-typu.

Ke tvorbě agregátů, příp. dimerů, může docházet u roztoků organických barviv ve vyšší koncentraci (zpravidla v rozmezí 10^{-6} – 10^{-4} M), jejichž velikost je na pomezí mezi velikostí krystalu a samotné molekuly. V případě dimerů se vyskytují dva absorpční pásy. J-typ dimeru vykazuje nižší energii vůči monomeru – bathochromní posun – a tento typ dimeru vykazuje vyšší intenzitu fluorescence než samotná molekula. Druhým typem dimeru je H-typ, kdy se jedná o hypsochromní posun s vyšší energií oproti monomeru, a fluorescence je v těchto případech silně zhasena [56],[57].

Tvorba dimerů je znázorněna na následujícím obrázku (viz Obr. 32), kde úhel θ znamená relativní úhel, nazýván také úhel skluzu, mezi molekulovým dipólovým momentem a podélnou osou paralelní molekuly, a šipky značí orientaci dipólového momentu.

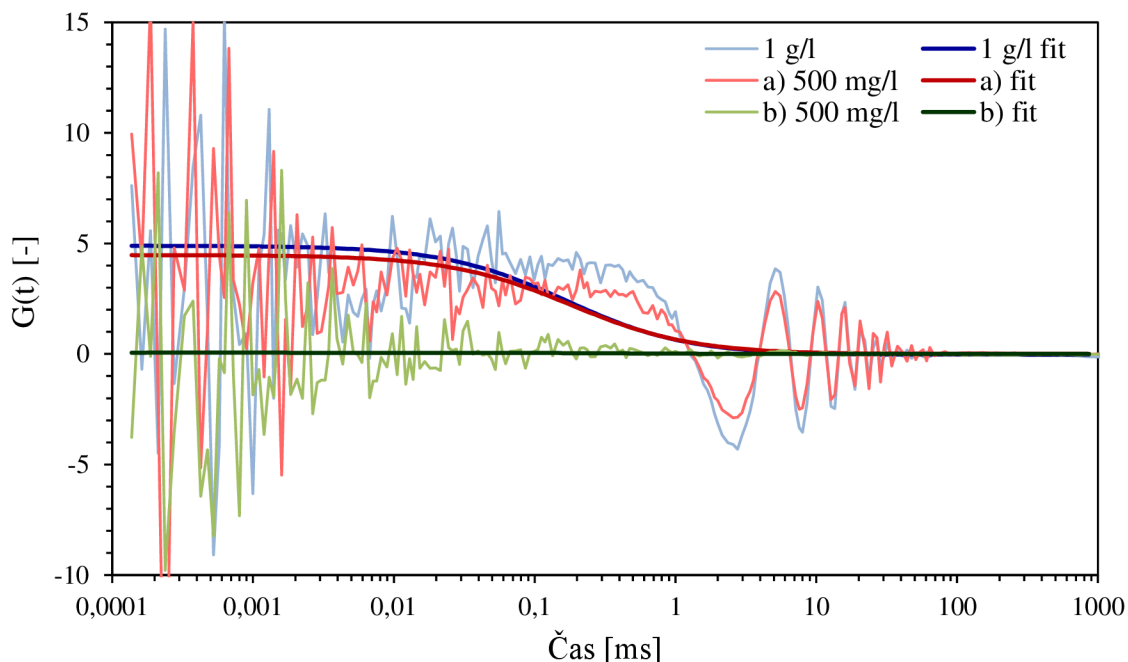


Obr. 32 Princip tvorby J-typu a H-typu dimerů rhodaminu [58]

5.4 iFCS měření vzorků obsahujících liposomy

Jak se ukázalo v předchozích experimentech, tak pomocí metody inverzní FCS nelze stanovit částice, které mají velikost 100 nm, ale lze stanovit částice, jejichž velikost je 500 nm. Proto byly pro další studium sledovány vzorky obsahující liposomy. Liposomy, které jsou připraveny metodou rehydratace tenké vrstvy, mají velikost v rozmezí 100 – 300 nm, příp. i více, a tak by měly jít metodou iFCS stanovit.

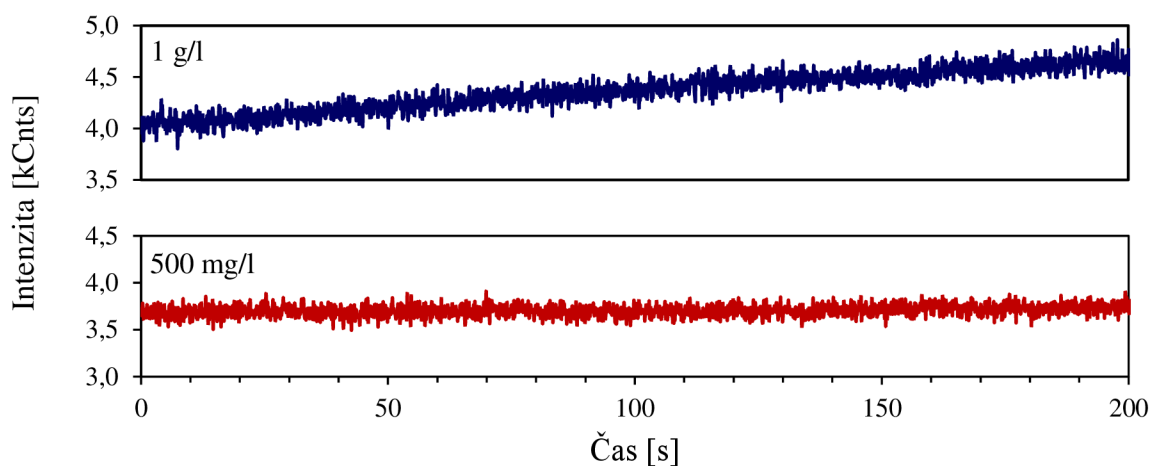
Pro měření iFCS křivek byly použity vzorky obsahující liposomy s koncentrací lecitinu 500 mg/l a 1 g/l a fluorescein ve 400 μM koncentraci. Získané autokorelační křivky jsou zobrazeny v následujícím grafu (viz Obr. 33).



Obr. 33 Autokorelační křivky liposomálních vzorků

Jak je z grafu patrné, data nevykazují velkou korelaci, každopádně z fitované křivky lze detekci liposomů uvažovat. Vzhledem k rozmezí velikostí připravených liposomů, a tomu, že distribuce velikostí je v případě liposomů náhodná, dochází tak pravděpodobně ke korelaci dat pouze těch liposomů, které jsou dostatečně velké, kolem 300 nm, a ty menší, okolo 100 nm, nelze stanovit a dochází tak ke zkreslení autokorelační křivky. V grafu jsou také zobrazeny dvě FCS křivky pro částice o koncentraci 500 mg/l. V jednom případě nedocházelo ke korelaci dat, ve druhém už ano. To je pravděpodobně opět způsobeno náhodnou distribucí velikosti, kdy v prvním vzorku bylo nejspíš mnohem více částic s menší velikostí.

Na následujícím grafu (viz Obr. 34) jsou zobrazeny časové záznamy intenzity fluorescence pro tyto vzorky. Sice v záznamech nejsou tak patrné píky jako v případě předchozích měření, nicméně dá se usuzovat, že i tyto malé značí průchod částic skrz konfokální objem.



Obr. 34 Časová závislost intenzity fluorescence vzorků obsahujících liposomy v koncentraci 500 mg/l a 1 g/l

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá metodou inverzní fluorescenční korelační spektroskopie ve výzkumu koloidních systémů. Mezi cíle této diplomové práce patřilo sesbírání literárních poznatků týkajících se využití fluktuální korelační spektroskopie, zejména využití inverzní varianty fluorescenční korelační spektroskopie, a to se zaměřením na přípravu vzorků, experimentální nastavení a výhody a omezení této metody. Na základě literární rešerše bylo dalším cílem této diplomové práce navržení experimentů pro ověření funkčnosti metody v rámci vybavení dostupném na Fakultě chemické. Posledním cílem této diplomové práce bylo zhodnocení inverzní FCS ve vztahu k výzkumu koloidních systémů.

Na teoretickou část, která je zaměřena na klasickou FCS, navazuje rešeršní část, týkající se zejména využití tzv. inverzní fluorescenční korelační spektroskopie, což je nová metoda, založená na sledování změn intenzity fluorescence média, které obklopuje analyzovanou látku. Za základě této rešerše byly pro iFCS experimenty vybrány tyto fluorescenční sondy: fluorescein z důvodu jeho dobré dostupnosti, Atto 488 jakožto stabilnější derivát fluoresceinu a rhodamin 6G opět z důvodu jeho dostupnosti. Jako částice koloidních rozměrů byly v této diplomové práci použity lecitinové liposomy a polystyrenové nanočástice s průměrem 100 nm a 500 nm.

Pro provedení iFCS měření bylo nejdříve nutné stanovit vhodné koncentrace fluorescenčních sond tak, aby nedocházelo ke sledování fluktuací intenzity fluorescence způsobené difuzí fluorescenční sondy, ale aby byla vnímána opravdu jako médium, které obklopuje analyzovanou látku. Z tohoto důvodu byly změřeny autokorelační křivky koncentrační řady fluoresceinu v rozmezí koncentrací od 10 nM po 500 μ M. V klasické FCS se používají velmi nízké koncentrace fluorescenčních sond, řádově nanomolární, a změřená data nevykazovala korelaci při 100 μ M koncentraci. Ve vzorcích byla, vzhledem k odborným publikacím, použita koncentrace 400 μ M.

Samotná experimentální část, krom stanovení vhodné koncentrace fluorescenčních sond, spočívala v iFCS měření různých částic koloidních velikostí. Nejprve byly sledovány polystyrenové nanočástice o průměru 100 nm, vzhledem k tomu, že v odborných publikacích je tato velikost uváděna jako hraniční nejmenší stanovitelná velikost. Pro systémy, které obsahovaly tyto částice s fluoresceinem ve 400 μ M koncentraci data nevykazovala žádnou korelaci. Z toho důvodu byla pro další experimenty vybrána fluorescenční sonda Atto 488, což je stabilnější derivát fluoresceinu. Ani v tomto případě, s použitím Atto 488, nedocházelo k žádné korelaci dat. Částice o průměru 100 nm tedy nebylo možné stanovit pomocí inverzní FCS. Proto byly pro další experimenty vybrány polystyrenové nanočástice o 500 nm velikosti. Při použití fluoresceinu ve 400 μ M byly získány FCS křivky s korelujícími daty pro koncentrace vyšší než 0,005 nM a i v časových závislostech intenzity fluorescence lze pozorovat průchod částic skrz konfokální objem. S rostoucí koncentrací částic také docházelo ke vzrůstu amplitudy autokorelační funkce, což odpovídá teorii u inverzní FCS, kdežto u klasické FCS je tomu naopak a s rostoucí koncentrací klesá hodnota amplitudy autokorelační funkce. Částice půlmikronové velikosti tedy lze metodou inverzní FCS stanovit. Protože tyto částice lze stanovit s použitím fluoresceinu, pak není nutné provádět

tyto experimenty se stabilnějším Atto 488, vzhledem k jeho menší dostupnosti. Pro 500 nm částice byly také změřeny FCS křivky s fluorescenční sondou rhodaminem 6G. Získaná data vykazovala trendy jako při měření klasické FCS, tedy že s průchodem částic konfokálním objemem docházelo ke zvýšení intenzity fluorescence, což je pravděpodobně způsobeno tvorbou H-typu agregátů, k čemuž dochází při vyšší koncentraci kladně nabitých fluorescenčních sond jako je rhodamin 6G a tato sonda tedy není vhodná pro měření inverzní FCS. Nakonec, krom modelových polystyrenových částic, byly provedeny experimenty s liposomy. U vzorků obsahujících liposomy v koncentraci 500 mg/l v jednom případě nedocházelo k žádné korelaci dat, v druhém případě a v systémech s koncentrací 1 g/l už ke korelaci, i když ne veliké, docházelo.

Metoda inverzní FCS se na základě literární rešerše jeví jako vhodnou metodou pro sledování různých biologických systémů, ať už jde o syntetické nebo přírodní membrány, nebo různé buňky, u kterých dochází k exkluzi fluorescenčních sond, a nelze je tak pomocí klasické FCS sledovat. Z provedených měření v experimentální části, při běžném vybavení, které je dostupné na Fakultě chemické, vyplývá, že nelze stanovit částice s velikostí 100 nm. Pro inverzní variantu FCS je také limitující to, že vzhledem k vysoké používané koncentraci fluorescenčních sond nelze použít ty s kladným nábojem. Metodu lze ovšem aplikovat na větší částice a liposomy, což může mít potenciál právě při sledování přírodních i syntetických biomembrán.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, c1999. ISBN 03-064-6093-9.
- [2] SAUER, Markus, Johan. HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles*. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [3] JABŁOŃSKI, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik*. 1935, **94**(1-2), 38-46. DOI: 10.1007/BF01330795. ISSN 1434-6001. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01330795>
- [4] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Second edition. Weinheim, Germany, 2013. ISBN 978-3-527-65003-3.
- [5] VALEUR, Bernard a Mário N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education*. 2011, **88**(6), 731-738. DOI: 10.1021/ed100182h. ISSN 0021-9584. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed100182h>
- [6] STOKES, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1852, **142**, 463-562. DOI: 10.1098/rstl.1852.0022. ISSN 0261-0523. Dostupné také z: <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1852.0022>
- [7] SPENCE, Michelle T. Z. a Iain D. JOHNSON. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11th ed. Carlsbad, CA: Live Technologies Corporation, c2010. ISBN 09-829-2790-8.
- [8] *The Molecular Probes Handbook* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
- [9] *Fluorofory v biomedicině* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [10] ZHANG, Xian-Fu, Yakui ZHANG a Limin LIU. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: Structural effect on emission mechanism in different solvents. *Journal of Luminescence*. 2014, **145**, 448-453. DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.07.066. ISSN 00222313. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231313004675>
- [11] PENZKOFER, A. a W. LEUPACHER. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions. *Journal of Luminescence*. 1987, **37**(2), 61-72. DOI: 10.1016/0022-2313(87)90167-0. ISSN 00222313. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022231387901670>
- [12] MAGDE, Douglas, Elliot ELSON a W. W. WEBB. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters*. 1972, **29**(11), 705-708. DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.29.705>

- [13] LAKOWICZ, Joseph R. a Chris D. GEDDES. *Topics in fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum Press, 2005. ISBN 03-064-3875-5.
- [14] TIAN, Yu, Michelle M. MARTINEZ a Dimitri PAPPAS. Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review of Biochemical and Microfluidic Applications. *Applied Spectroscopy*. 2011, **65**(4), 115-124. DOI: 10.1366/10-06224. ISSN 00037028. Dostupné také z: <http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/10-06224>
- [15] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [16] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. *Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science*. 2012, **17**(6), 377-387. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. ISSN 13590294. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000994>
- [17] ELSON, Elliot L. a Hans-Jürgen BUTT. Fluorescence Correlation Spectroscopy Measures Molecular Transport in Cells. *Traffic*. 2001, **2**(11), 789-796. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2001.21107.x. ISSN 13989219. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0854.2001.21107.x>
- [18] RIES, Jonas a Petra SCHWILLE. Fluorescence correlation spectroscopy. *BioEssays*. 2012, **34**(5), 361-368. DOI: 10.1002/bies.201100111. ISSN 02659247. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201100111>
- [19] *Mobility & Interaction Measurements: Fluorescence Correlation Spectroscopy* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/methods/mobility/mobility.html>
- [20] BORODAVKA, Alexander, Eric C DYKEMAN, Waldemar SCHRIMPF a Don C LAMB. Protein-mediated RNA folding governs sequence-specific interactions between rotavirus genome segments. *ELife*. 2017, **6**, -. DOI: 10.7554/eLife.27453. ISSN 2050-084X. Dostupné také z: <https://elifesciences.org/articles/27453>
- [21] GREGOR, Ingo, Jörg ENDERLEIN a R. LOPEZ-DELGADO. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Photochemical*. 2007, vol. 6, issue 1, s. 615-620. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/9781-4757-1634-4_32
- [22] MARCU, Laura, Paul M. W. FRENCH a Daniel S. ELSON. *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics*. Boca Raton, 2014. ISBN 978-143-9861-677.
- [23] *FLCS – Advances in Fluorescence Correlation Spectroscopy* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/flcs-advances-in-fluorescence-correlation-spectroscopy>
- [24] HUMPOLÍČKOVÁ, Jana, Aleš BENDA, Jan SÝKORA, Radek MACHÁŇ, Teresa KRAL, Barbara GASINSKA, Joerg ENDERLEIN a Martin HOF. Equilibrium Dynamics of Spermine-Induced Plasmid DNA Condensation Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2008, vol. 94, issue 3, L17-L19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.122408>
- [25] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.

- [26] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [27] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [28] MURRAY, Robert K. a Judith G. VOET. *Harperova Biochemie*. Jinočany: Victoria Publishing, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [29] MCMURRY, John a Judith G. VOET. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [30] BRANCALEONI, Marinella. *MEMBRANE BIOL E TRASPORTI* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.tes.com/lessons/F5UuH0JQSWpvLA/membrane-biol-e-trasporti>
- [31] POHL, J.; ERDÉLYI, A. P.; STICHER, O. a SHIBATA, S.: *Lecithin: Technological, Biological, and Therapeutic Aspects*. Chicago: Springer, 1986. ISBN 978-1-4757-1935-2
- [32] JACOB N. ISRAELACHVILI., John a Judith G. VOET. *Intermolecular and surface forces: technological, biological, and therapeutic aspects*. 3rd ed. Burlington, MA: Academic Press, 2011. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-012-3919-274.
- [33] Tanford, C.: *Theory of micelle formation in aqueous solution*. *Journal of Physical Chemistry*, 1974, č. 78, s. 2469–2479.
- [34] Israelachvili, J. N., Mitchel, D. J., Ninham, B. W.: *Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers*. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, 1976, č. 72, s. 1525–1568.
- [35] Zhang, J., Li, X., Li, X.: *Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies*. *Progress in Polymer Science*, 2012, č. 37, s. 1130–1176.
- [36] Troutier, A.-L., Véron, L., Delair, T., Pichot, Ch., Ladavière, C.: *New insights into selforganization of a model lipid mixture and quantification of its adsorption on spherical polymer particles*. *Langmuir*, 2005, č. 21, s. 9901–9910.
- [37] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. *Liposome and Their Applications in Cancer Therapy*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016, **59**, -. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1516-8913.
- [38] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1), 102-. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné také z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [39] VEMURI, S. a RHODES, C.T.: *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* [online]. 1995, vol. 70, issue. 2, p. 95-111 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031686595000107>
- [40] VEMURI, Sriram a C.T RHODES. *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995, vol. 70, issue 2, s. 95-111. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).

- [41] DUA, J.S. 1, A. C. RANA a A. K. BHANDARI. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012, III, II, s. 14-20. Dostupné z: <http://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [42] KUYPER, Christopher L., Kristi L. BUDZINSKI, Robert M. LORENZ a Daniel T. CHIU. Real-Time Sizing of Nanoparticles in Microfluidic Channels Using Confocal Correlation Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, 128(3), 730-731. DOI: 10.1021/ja0569252. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0569252>
- [43] WANG, Kanglin, Xin QIU, Chaoqing DONG a Jicun REN. Single-Molecule Technology for Rapid Detection of DNA Hybridization Based on Resonance Light Scattering of Gold Nanoparticles. *ChemBioChem*. 2007, 8(10), 1126-1129. DOI: 10.1002/cbic.200700174. ISSN 14394227. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200700174>
- [44] SCHROF, Wolfgang, Jürgen F. KLINGLER, Stanislaw ROZOUVAN a Dieter HORN. Raman correlation spectroscopy: A method for studying chemical composition and dynamics of disperse systems. *Physical Review E*. 1998, 57(3), R2523-R2526. DOI: 10.1103/PhysRevE.57.R2523. ISSN 1063-651x. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.57.R2523>
- [45] CHENG, Ji-xin, Eric O. POTMA, Sunney X. XIE a Dieter HORN. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Correlation Spectroscopy: Probing Dynamical Processes with Chemical Selectivity. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2002, 106(37), 8561-8568. DOI: 10.1021/jp025774b. ISSN 1089-5639. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp025774b>
- [46] WANG, Jin, Ajay K. SOOD, Parlapalli V. SATYAM, Yiping FENG, Xiao-zhong WU, Zhonghou CAI, Wenbing YUN a Sunil K. SINHA. X-Ray Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Method for Studying Particle Dynamics in Condensed Matter. *Physical Review Letters*. 1998, 80(5), 1110-1113. DOI: 10.1103/PhysRevLett.80.1110. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.80.1110>
- [47] TCHERNIAK, Alexei, Sergio DOMINGUEZ-MEDINA, Wei-Shun CHANG, Pattanawit SWANGLAP, Liane S. SLAUGHTER, Christy F. LANDES a Stephan LINK. One-Photon Plasmon Luminescence and Its Application to Correlation Spectroscopy as a Probe for Rotational and Translational Dynamics of Gold Nanorods: Probing Dynamical Processes with Chemical Selectivity. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2011, 115(32), 15938-15949. DOI: 10.1021/jp206203s. ISSN 1932-7447. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp206203s>
- [48] WENNMALM, Stefan, Per THYBERG, Lei XU, Jerker WIDENGREN, Xiao-zhong WU, Zhonghou CAI, Wenbing YUN a Sunil K. SINHA. Inverse-Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Method for Studying Particle Dynamics in Condensed Matter. *Analytical Chemistry*. 2009, 81(22), 9209-9215. DOI: 10.1021/ac9010205. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac9010205>

- [49] WENNMALM, Stefan; WIDENGREN, Jerker. Inverse-fluorescence correlation spectroscopy: more information and less labeling. *Frontiers in Bioscience*, 2011, 3: 385-392.
- [50] WENNMALM, Stefan a Jerker WIDENGREN. *Inverse-fluorescence correlation spectroscopy*. PCT/EP2010/054970 US 13/264,651.
- [51] JIANG, Yanfei, Kenneth M. PRYSE, Artem MELNYKOV, Guy M. GENIN a Elliot L. ELSON. Investigation of Nanoscopic Phase Separations in Lipid Membranes Using Inverse FCS. *Biophysical Journal*. 2017, **112**(11), 2367-2376. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.04.013. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349517304290>
- [52] JIANG, Yanfei, Guy GENIN, Elliot L. ELSON a Guy M. GENIN. Study of Nanoscopic Phase Separation in Membranes using Inverse FCS. *Biophysical Journal*. 2013, **104**(2), 373a-. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.11.2075. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349512033218>
- [53] WENNMALM, Stefan, Jerker WIDENGREN, Elliot L. ELSON a Guy M. GENIN. Inverse-Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(13), 5646-5651. DOI: 10.1021/ac1006409. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac1006409>
- [54] BERGSTRAND, Jan, Daniel RÖNNLUND, Jerker WIDENGREN, Stefan WENNMALM a Elliot L. ELSON. Scanning inverse fluorescence correlation spectroscopy. *Optics Express*. 2014, **22**(11), 13073-. DOI: 10.1364/OE.22.013073. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-22-11-13073>
- [55] KAPUSTA, Peter. *Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data For FCS Calibration* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/scientific/technical-and-application-notes/category/technical_notes_techniques_and_methods/details/absolute-diffusion-coefficients-compilation-reference-fcs-data
- [56] WÜRTHNER, Frank, Theo E. KAISER a Chantu R. SAHA-MÖLLER. J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, **50**(15), 3376-3410. DOI: 10.1002/anie.201002307. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201002307>
- [57] SCHEIBE, G., L. KANDLER a H. ECKER. Polymerisation und polymere Adsorption als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von organischen Farbstoffen. *Die Naturwissenschaften*. 1937, **25**(5), 75-75. DOI: 10.1007/BF01493278. ISSN 0028-1042. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01493278>
- [58] DE QUEIROZ, Thiago B., Moema B. S. BOTELHO, Leonardo DE BONI, Hellmut ECKERT a Andrea S. S. DE CAMARGO. Strategies for reducing dye aggregation in luminescent host-guest systems: Rhodamine 6G incorporated in new mesoporous sol-gel hosts. *Journal of Applied Physics*. 2013, **113**(11), 113508-. DOI: 10.1063/1.4795506. ISSN 0021-8979. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4795506>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
ACF	Autokorelační funkce (z angl. <i>Autocorrelation function</i>)
CCS	Konfokální korelační spektroskopie (z angl. <i>Confocal correlation spectroscopy</i>)
CMC	Kritická micelární koncentrace (z angl. <i>Critical micelle concentration</i>)
FCS	Fluorescenční korelační spektroskopie (z angl. <i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FCCS	Dvoubarevná fluorescenční korelační spektroskopie (z angl. <i>Fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>)
FLCS	Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (z angl. <i>Fluorescence lifetime correlation spectroscopy</i>)
IRF	Funkce odezvy instrumentace (z angl. <i>Instrument response function</i>)
iFCS	Inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (z angl. <i>Inverse fluorescence correlation spectroscopy</i>)
iFCCS	Inverzní fluorescenční kros-korelační spektroskopie (z angl. <i>Inverse fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>)
LUV	Velké unilamelární liposomy (z angl. <i>Large unilamellar vesicles</i>)
MLV	Multilamelární liposomy (z angl. <i>Multilamellar vesicles</i>)
RLSCS	Rezonanční korelační spektroskopie s rozptylem světla (z angl. <i>Resonance light scattering confocal spectroscopy</i>)
siFCS	Skenovací inverzní fluorescenční korelační spektroskopie (z angl. <i>Scanning inverse fluorescence correlation spectroscopy</i>)
SUV	Malé unilamelární liposomy (z angl. <i>Small unilamellar vesicles</i>)
TCSPC	Časově rozlišené sčítání fotonů (z angl. <i>Time correlated single photon counting</i>)

8.2 Seznam použitých symbolů

<i>Symbol</i>	<i>Význam</i>
$\langle \rangle$	Průměrná hodnota signálu
a	Příčná plocha polární hlavičky
a_i	Amplituda autokorelační funkce
C	Lokální koncentrace částic
D	Difuzní koeficient
$G(t)$	Normalizovaná autokorelační funkce
$G_{cc}(t)$	Kros-korelační funkce
I	Detekovaná intenzita signálu (fluorescence)
k	Boltzmanova konstanta
l	Maximální délka hydrofobního konce
M	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
N	Počet molekul
n	Celkový počet alkylových řetězců
N_C	Počet soustavou absorbovaných kvant
N_F	Počet vyzářených kvant
P	Molekulární sbalovací parametr
r	Hydrodynamický poloměr
S_0	Základní singletový stav
S_1	První excitovaná singletová hladina
S_2	Druhá excitovaná singletová hladina
T	Teplota
T_1	První tripletový stav
V	Objem hydrofobní části
v	Objem jednoho alkylového řetězce
V_{dv}	Objem detekčního objemu
V_{eff}	Efektivní detekční objem
V_{part}	Objem částice
$W(\mathbf{r})$	Prostorové rozložení emitovaného světla
w_0	Charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu
z_0	Charakteristický rozměr detekčního objemu v ohniskové rovině objektivu
δ	Okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty
η	Počet fotonů detekovaných z jedné molekuly za jednu sekundu
$\eta(T)$	Viskozita rozpouštědla při dané teplotě
τ_D	Difuzní čas
φ_F	Kvantový výtěžek fluorescence