

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2017

**ADÉLA
PATROCHOVÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Určení stability modelových fosfolipidových
membrán pomocí fluorescenční korelační
spektroskopie**

**Stability of a phospholipid bilayer
assessed by fluorescence correlation
spectroscopy**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor diplomové práce: Adéla Patrochová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.

Kladno 2017

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Adéla Patrochová**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Určení stability modelových fosfolipidových membrán pomocí fluorescenční korelační spektroskopie**
Téma anglicky: Stability of a phospholipid bilayer assessed by fluorescence correlation spectroscopy

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Metodou extruze přes membránový filtr připravte vzorky lipozomů značené zároveň lipofilním a hydrofilním fluorescenčním barvivem. Pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) pro kvantitativní studium interakce mezi biomolekulami studujte střednědobou (~7 dní) stabilitu lipozomů připravených s různým poměrem nabitých a nenabitých fosfolipidů. Zhodnoťte reprodukovatelnost přípravy lipozomů a výsledků měření korelace.

Seznam odborné literatury:

- [1] Beranová Lenka; Humpolíčková Jana; Hof Martin, Fluorescence Correlation Spectroscopy, Chemické Listy, ročník 103, číslo , 2009, 125-129 s.
- [2] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. 3rd, Springer, 2006, ISBN 0-387-31278-1
- [3] Radek Macháň, Thorsten Wohland, Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems, FEBS Letters, ročník 588, číslo 19, 2014
- [4] A. Pramanik, P. Thyberg, and R. Rigler, Molecular interactions of peptide with phospholipid vesicle membranes as studied by fluorescence correlation spectroscopy, Chem. Phys. Lipids, ročník 104, číslo 1, 2000, 35-47 s.

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.

Konzultant: Ing. Kateřina Žambochová


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 20.02.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Určení stability modelových fosfolipidových membrán pomocí fluorescenční korelační spektroskopie“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19.5.2017

.....

Adéla Patrochová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Daliboru Pánkovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky, kterými přispěl k vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat také slečně Ing. Kateřině Žambochové za hodnotné rady při práci v chemické laboratoři.

ABSTRAKT

Určení stability modelových fosfolipidových membrán pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Předmětem této bakalářské práce je pozorování stability modelových fosfolipidových membrán, které jsou značeny fluorescenčními barvivy. V práci jsou studovány fosfolipidové dvojvrstvy ve formě lipozomů, které představují jeden z nejjednodušších experimentálních modelových systémů pro výzkum biofyzikálních vlastností buněčné membrány. Pro studium stability biomembrán je v této práci použita fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) pro svoji vysokou citlivost a možnost kvantitativně studovat difúzní procesy. V práci je popsána struktura a funkce fluorescenčního konfokálního mikroskopu, dále pak příprava zkoumaných vzorků měřených metodou FCS a analýza dat. Na základě pozorování chování lipozomů po dobu sedmi dnů bylo zjištěno, že stabilitu vykazují vzorky, obsahující poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS). Naopak vzorky s poměrem lipidů 2:1 sedmidenní stabilitu nepotvrdily.

Klíčová slova

Fluorescenční korelační spektroskopie, lipozomy, stabilita, fluorescence, extruze

ABSTRACT

Stability of a phospholipid bilayer assessed by fluorescence correlation spectroscopy

The aim of this bachelor thesis is observation of stability of the phospholipid bilayers, which are marked by fluorescent dyes. In this thesis, the bilayers are studied in the form of liposomes, which represent one of the simplest experimental model systems for the research of the biological properties of the cell membrane. For the study of stability of biomembranes, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is used for its high sensitivity and the ability to quantitatively study diffusion processes. The thesis describes the structure and function of the fluorescent confocal microscope, the preparation of the studied samples measured by the FCS method and the data analysis. Based on the seven-day observation of liposome behavior, it can be concluded that samples with a 3:1 ratio of POPC:DOPS lipids are stable, on the contrary the samples with a 2:1 ratio failed to show the seven-day stability.

Keywords

Fluorescence correlation spectroscopy, liposomes, stability, fluorescence, extrusion

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam zkratk | 9 |
| 1 Úvod a cíle práce | 10 |
| 1.1 Cíle práce..... | 11 |
| 2 Přehled současného stavu | 12 |
| 2.1 Modelové fosfolipidové membrány | 12 |
| 2.2 Příprava lipozomů | 14 |
| 2.3 Stabilita lipozomů | 15 |
| 3 Teoretická východiska a principy měřících metod | 16 |
| 3.1 Fluorescence a fluorofory..... | 16 |
| 3.2 Konfokální mikroskop..... | 16 |
| 3.3 Fluorescenční korelační spektroskopie | 17 |
| 3.3.1 Autokorelační funkce | 19 |
| 3.3.2 Parametry fitu | 20 |
| 3.3.3 Difúzní čas..... | 21 |
| 3.4 Časově korelované čítání fotonů | 21 |
| 3.5 Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie | 22 |
| 3.5.1 Filtry | 23 |
| 4 Experimentální metody | 25 |
| 4.1 Použité přístroje..... | 25 |
| 4.1.1 Fluorescenční mikroskop ConfoCor 2..... | 25 |
| 4.1.2 Konfokální mikroskop MicroTime 200..... | 26 |
| 4.2 Příprava vzorku | 28 |
| 4.2.1 Příprava vzorků | 28 |
| 4.3 Postup měření | 30 |
| 4.4 Zpracování dat..... | 31 |
| 5 Výsledky | 32 |
| 5.1 Lipozomy značené lipofilním barvivem DiI | 32 |
| 5.2 Lipozomy značené hydrofilním barvivem Rhodamin B a Rhodamin 6G..... | 33 |
| 5.3 Vliv pH na interakci barviva s lipozomy | 36 |
| 5.4 Vliv chelatačního činidla EDTA na přípravu lipozomů..... | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.5 | Stabilita fluorescenčně značených lipozomů | 39 |
| 5.5.1 | Vzorky značeny pouze hydrofilním barvivem | 41 |
| 5.5.2 | Vzorky značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem | 44 |
| 6 | Diskuse | 49 |
| 7 | Závěr | 53 |
| | Seznam použité literatury | 54 |
| | Příloha A: Výsledky měření..... | 58 |

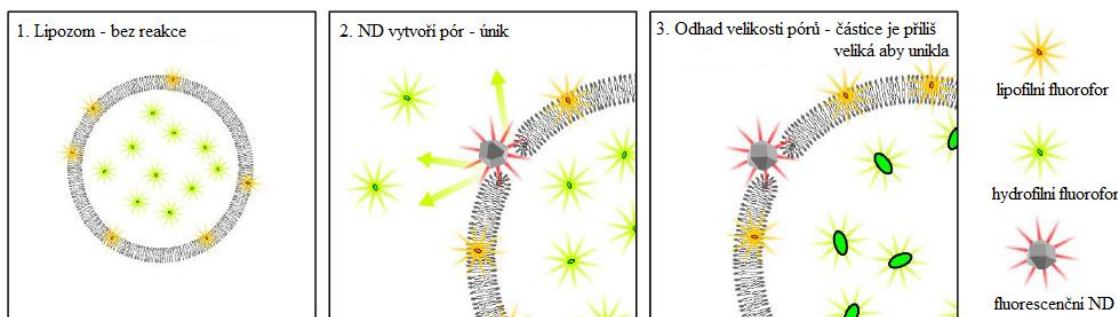
Seznam zkratek

| Zkratka | Význam |
|----------------------------------|---|
| FCS | Fluorescenční korelační spektroskopie (Fluorescence correlation spectroscopy) |
| TCSPC | Časově korelované čítání fotonů (Time correlated single photon counting) |
| FLCS | Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (Fluorescence lifetime correlation spectroscopy) |
| ACF | Autokorelační funkce |
| AF488 | Sukcinimidyl ester, AlexaFluor488 |
| DiO | Chloristan 3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin |
| EDTA | Kyselina ethylendiamintetraoctová |
| NaCl | Chlorid sodný |
| Na ₂ HPO ₄ | Hydrogenfosforečnan sodný |
| KH ₂ PO ₄ | Dihydrogenfosforečnan draselný |
| POPC | 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| DOPS | 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine] |
| CHCl ₃ | Chloroform |
| CH ₃ OH | Metanol |
| DiI | 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate |
| RhB | Tetraethylrhodamin, Rhodamin B |
| Rh6G | Rhodamin 6G |
| Countrate | Intenzita fluorescence při měření |
| cps | Počet fotonů za sekundu (Counts per second) |
| SUV | Malé unilamelární vezikuly (Small unilamellar vesicles) |

1 Úvod a cíle práce

Tato bakalářská práce vznikla v návaznosti na výzkumné téma laboratoře Nano zaměřené na interakce nanočástic s buňkami, zejména pak s buněčnou membránou. Vliv nanočástic na buněčné procesy a případná cytotoxicita nanočástic je vzhledem k rychlému rozvoji nanotechnologií vysoce aktuální a závažná problematika. Cílem naší skupiny je korelovat výsledky experimentálního výzkumu interakce nanočástic s tkáňovými kulturami (např. internalizace nanočástic v buňce či asociace s buněčnou membránou) s výsledky na vhodném systému modelujícím buněčnou membránu. Jedním z uvažovaných modelových systémů jsou fosfolipidové dvojvrstvy o přesně definovaném lipidovém složení ve formě lipozomů (vezikul). Interakce nanočástic s membránou lipozomů bude zkoumána pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), která umožňuje kvantitativní analýzu difúzního pohybu fluorescentních nebo fluorescenčně značených částic.

Na obrázku 1.1 je pro příklad schematicky znázorněn jeden z možných experimentů zaměřený na prokázání narušení membrány lipozomu vlivem interakce s nanočásticí. Na obrázku zcela vlevo (1.) je lipozom značený dvěma barvami – lipofilní, které je zakomponováno do membrány, a hydrofilní, které je uzavřeno ve vnitřním prostoru lipozomového váčku. V takovém případě difúze obou barviv sleduje difúzní pohyb lipozomů. V případě, že dojde k narušení membrány (2.), uzavřené barvivo uniká do roztoku vně lipozomu a část barviva tudíž difunduje mnohem rychleji než lipozomy. Použitím fluorescentních značek o různých molárních hmotnostech lze odhadnout velikost takového póru vzniklého v důsledku přítomnosti nanočástic (3.).



Obrázek 1.1: Schématické znázornění principu využití fluorescenční korelační spektroskopie při výzkumu interakce nanočástice s fosfolipidovou dvojvrstvou. Použito s laskavým svolením autora D. Pánka.

Tato práce se zabývá přípravou a testováním stability lipozomů značených dvěma fluorescentními barvami a také reprodukovatelností výsledků FCS analýzy. Je tedy součástí první, přípravné fáze pro uskutečnění experimentů nastíněných výše.

První část práce se zabývá typy modelových fosfolipidových membrán, jejich přípravou a aspekty ovlivňující stabilitu. Ve druhé části je popsána problematika fluorescenční spektroskopie a jednotlivých použitých technik. Třetí část je věnována popisu detekční jednotky (byly použity dva typy fluorescenčních mikroskopů), popisuje přípravu vzorků a zpracování naměřených dat.

1.1 Cíle práce

Prvním cílem této práce bylo zavést experimentální metodiku, tedy optimalizovat přípravu fluorescenčně značených lipozomů metodou extruze přes membránový filtr, nalézt optimální podmínky pro měření, ustanovit software pro zpracování naměřených dat a vyhodnotit reprodukovatelnost přípravy vzorků a měření. Vzorky mají obsahovat různé poměry nabitých a nenabitých fosfolipidů. Dále mají být značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem. Druhým cílem bylo pomocí zavedené metodiky studovat střednědobou (sedmidenní) stabilitu lipozomů. Ukázalo se, že splnění prvního dílčího cíle, tedy nalezení optimálního postupu pro přípravu vzorku a měření vedoucí k reprodukovatelným výsledkům, bylo časově nejnáročnější a tvořilo zdaleka největší část provedených experimentů.

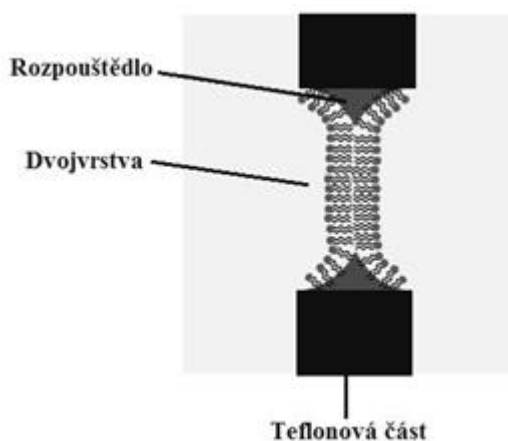
2 Přehled současného stavu

V této kapitole jsou stručně představeny vybrané typy fosfolipidových dvojvrstev a různé běžné metody přípravy lipozomů, které jsou používány jako studovaný systém v této práci.

2.1 Modelové fosfolipidové membrány

Fosfolipidové dvojvrstvy jsou používány jako modelový systém pro experimentální studium vlastností buněčných membrán. Používají se dvojvrstvy složené jak ze syntetických, nebo z přírodních lipidů (např. izolovaných z vaječného žloutku). Membrány připravené ze syntetických lipidů umožňují lepší kontrolu nad složením vzorku a je tak možný detailní studování vlivu jednotlivých komponent buněčné membrány na její vlastnosti. Existuje několik druhů modelových fosfolipidových membrán, které se liší přípravou a konkrétním využitím.

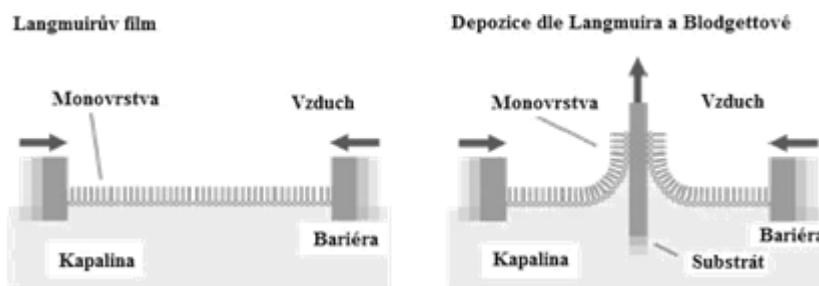
Prvním typem jsou planární fosfolipidové dvojvrstvy. Model se používá k charakterizaci elektrických vlastností pórů a iontových kanálů. Existují dvě možnosti přípravy těchto membrán. První je založena na spojení dvou monovrstev v jednu dvojvrstvu. Do vodného prostředí, které má na hladině vrstvu lipidů, je ponořena teflonová hydrofobní přepážka s otvorem uprostřed. Přepážka je ponořena do vody a při prostupu hladinou je na obě strany navázána lipidová monovrstva, která vytvoří v otvoru dvojvrstvu. Nevýhodou je velké napětí lipidové monovrstvy při přechodu do otvoru přepážky. [1]



Obrázek 2.1: Vznik planární dvojvrstvy v otvoru v teflonové membráně. [1]

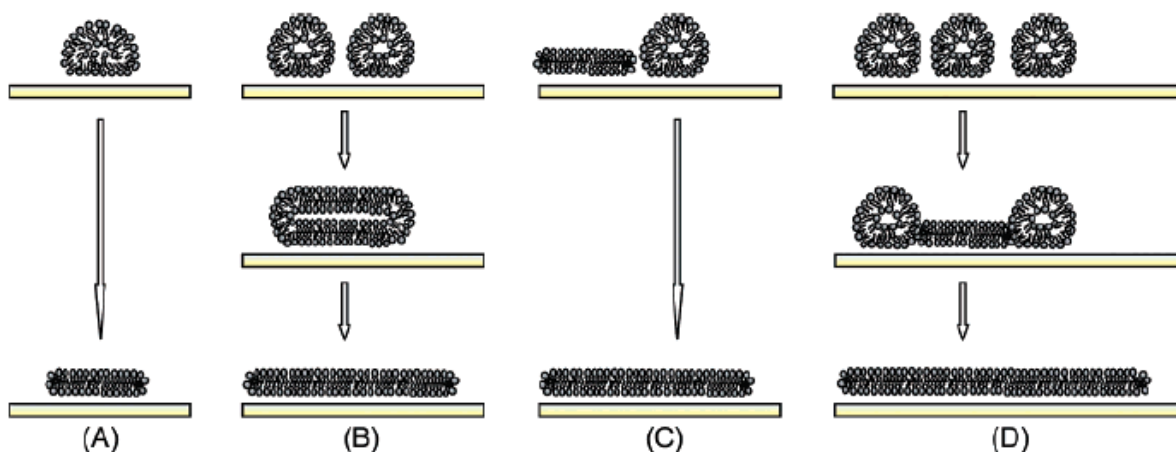
Druhá možnost přípravy planární fosfolipidové dvojvrstvy je založena na tvorbě ultratenkých organických filmů. Na vodní hladinu je nanášena vrstva fosfolipidů, jejichž hydrofilní část molekuly reaguje s vodou. [1] Tato vrstva je ze stran stlačována bariérou, aby došlo k eliminaci mezer. Poté je z vody vynořen hydrofobní substrát, který na sebe

naváže monovrstvu a vytvoří film o přesně definované tloušťce. Substrát s monovrstvou je následně přiložen k další monovrstvě za vzniku dvojvrstvy. [1]



Obrázek 2.2: Vznik planární dvojvrstvy podle modelu Langmuira a Blodgettové. [1]

Následujícím modelem jsou supportované fosfolipidové dvojvrstvy, jejichž princip spočívá v umístění planární membrány na pevný nosič (substrát). Používaným materiálem substrátu je nejčastěji sklo, popřípadě slída nebo křemík. [2] Použitý nosič musí být hydrofilní, aby mohlo dojít k interakci mezi povrchem a polárními částmi fosfolipidů. Jedna z možností přípravy tohoto typu membrán je metoda spojení vezikul. Nejprve je připraven roztok lipozomů, který se nanese na substrát a nechá se působit. Během působení se vytváří napětí na membránách lipozomů a vznikají interakce buď mezi dvěma lipozomy, nebo mezi lipozomem a substrátem. Po vystavení substrátu roztoku lipozomů, dochází k sorpci lipozomů na hydrofilní povrch substrátu. Při dosažení kritické koncentrace lipozomů na povrchu, začnou membrány postupně praskat a dochází ke spojování lipozomů mezi sebou, což vytvoří tenkou dvojvrstvu na povrchu substrátu. [2]

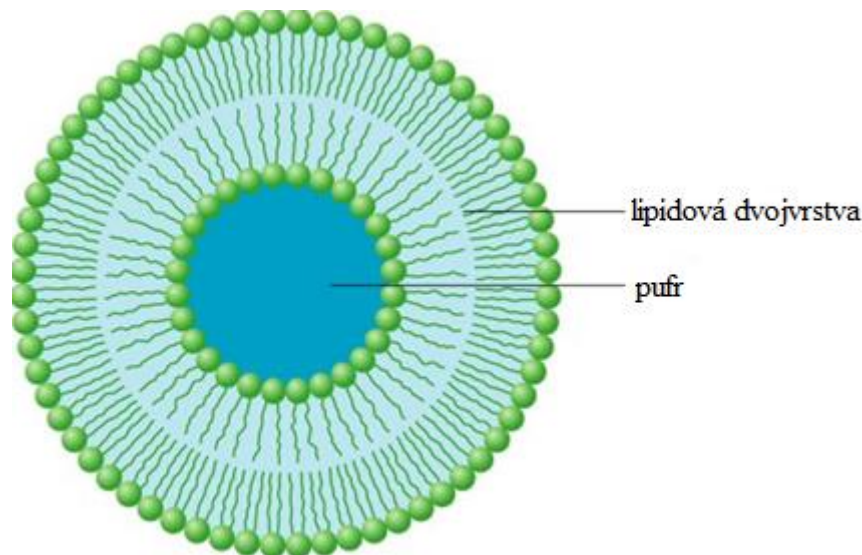


Obrázek 2.3: Princip vzniku supportované fosfolipidové dvojvrstvy, (A) vytvoření tenké dvojvrstvy způsobené prasknutím membrány lipozomu, (B) spojení dvou lipozomů a následné vytvoření tenké dvojvrstvy, (C) spojení lipozomu a tenké dvojvrstvy za vzniku dvojvrstvy na substrátu, (D) spojení více lipozomů a vznik dvojvrstvy. [1]

Třetím typem modelových fosfolipidových membrán jsou lipozomy. Na povrchu se nachází lipidová dvojvrstva, která odděluje vnitřní vodní prostředí od vnějšího. Lipozomy

vznikají samovolně agregací amfifilních lipidů ve vodném prostředí, kterým může být například rozpouštědlo. Následuje odpařování vodné složky směsi do doby, než se na stěně nádoby objeví tenký film. Ten je následně promíchán s přidáním pufru za vzniku multilamelárních vezikul. Z těch lze za použití některé metody, např. extruze přes membránu, získat unilamelární vezikuly. Lipozomy jsou klasifikovány podle velikosti, počtu dvojvrstev a náboje fosfolipidu. [1; 3]

Podle velikosti a počtu dvojvrstev (lamel) můžeme lipozomy rozdělit na malé unilamelární (SUV - small unilamellar vesicles) s průměrem 25-100 nm, střední unilamelární (IUV - intermediate-sizes unilamellar vesicles), které mají průměr několik stovek nanometrů a velké unilamelární (LUV - large unilamellar vesicles) o průměru větším než 1000 nm. Všechny výše uvedené typy vezikul mají jen jednu lipidovou dvojvrstvu (jsou unilamelární). Průměr multilamelárních lipozomů (MUV – multilamellar vesicles) dosahuje velikosti přibližně 100-1000 nm a lipozomy mají 5-20 lipidových dvojvrstev. [1; 3]



Obrázek 2.4: Modelová fosfolipidová membrána-lipozom, převzato a upraveno z [4].

2.2 Příprava lipozomů

Existuje několik způsobů, kterými lze připravit lipozomy. Postup přípravy je vybrán podle konkrétního účelu použití fosfolipidových membrán.

Jednou z možností je použití sonikační metody, která nabízí dvě metody sonikace. První je sonikační sonda, kdy je špička sonikátoru ponořena přímo do disperze lipozomů. Vazební energie na hrotu sondy způsobí přehřátí suspenze lipidů (degradace), takže nádoba musí být ponořena do ledové lázně. [5] Druhou metodou je sonikační lázeň, do které je umístěn válec, ve kterém probíhá disperze lipidů. Řízení teploty disperze je obvykle snadnější než při sonikaci hrotem. Materiály, které se nacházejí pod působením

ultrazvuku, mohou být chráněny ve sterilní nádobě, v jiné sondovací jednotce, nebo v inertní atmosféře. [5]

Druhým typem přípravy je proces zmražení a rozmražení. Metoda spočívá v rychlém zmražení (až $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) lipozomů a následném pomalém rozmražení. Krátkodobé použití ultrazvuku způsobí rozptýlení agregovaných částic. Formování unilamelárních vezikul nastane v důsledku fúze SUV během procesu zmražení a rozmražení. [5]

Membránová extruze je další způsob přípravy lipozomů. Metoda je založena na protlačování lipidové suspenze přes polykarbonátovou membránu o definované velikosti pórů. Průměr protlačených částic se pohybuje okolo velikosti pórů v membráně použitého filtru. Před extruzí je vhodné použít buď několik cyklů zmražení a rozmražení suspenze nebo předfiltraci suspenze přes větší póry ($0,2\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$). To předchází znečištění membrány a zlepšuje homogenitu distribuce velikosti v konečné suspenzi. [6]

Experimenty prezentované v této práci byly prováděny s lipozomy připravenými metodou extruze přes polykarbonátovou membránu s póry o průměru 100 nm. Jde o instrumentálně a časově nenáročnou metodu, pomocí které lze obdržet lipozomy o relativně úzké distribuci velikosti.

2.3 Stabilita lipozomů

U lipozomů je zkoumána především chemická stabilita, při které dochází k chemické změně komponent dvojvrstvy, a fyzikální stabilita.

Struktura lipozomů může být změněna procesy, jako je např. oxidace mastných kyselin a hydrolýza esterových vazeb. Vhodnou přípravou a skladováním (teplota, pH, použití čistých surovin) je možné tyto reakce eliminovat. [7]

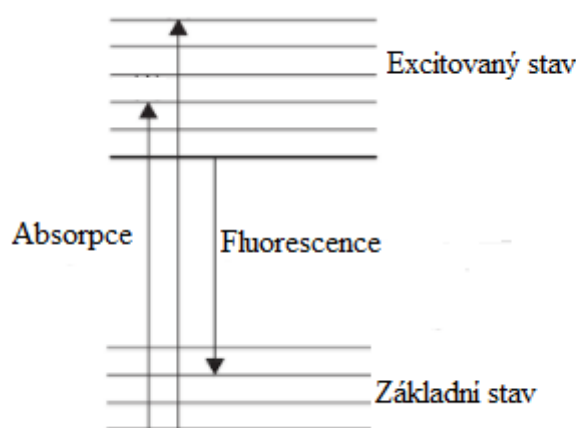
Fyzikální stabilita lipozomů spočívá v zachování jejich velikosti. Fyzikální vlastnosti můžou být ovlivněny chemickou nestabilitou lipidů. Dále ji ovlivňuje fosfolipidové složení membrány, velikost a zeta potenciál (povrchová vlastnost). Lepší fyzikální stability lze dosáhnout začleněním např. cholesterolu do membrány. [7]

Tato práce se zabývá testováním fyzikální stability lipozomů metodou fluorescenční korelační spektroskopie (viz sekce 3.3), která umožňuje zároveň sledovat difúzi samotných fluorescenčně značených lipozomů a barviva, které je uzavřené ve vnitřním prostoru váček. Na změnách difúze lipozomů je možné monitorovat jejich fúzování, či úbytek jejich počtu s časem.

3 Teoretická východiska a principy měřících metod

3.1 Fluorescence a fluorofory

Fluorescence je vlastnost některých molekul, která spočívá v absorpci světla jedné barvy a emise světla jiné barvy. Při absorpci elektromagnetického záření (fotonu), získá molekula energii, díky které dochází k excitaci elektronu na vyšší energetickou hladinu. V té setrvá krátkou dobu a vrátí se zpět do základního stavu. Při tomto ději je přebytečná energie vyzářena v podobě fotonu o nižší energii a větší vlnové délce, než bylo původní elektromagnetické záření. Intenzita fluorescence vyjadřuje počet fotonů procházejících v daném směru za jednotku času. [8; 9]



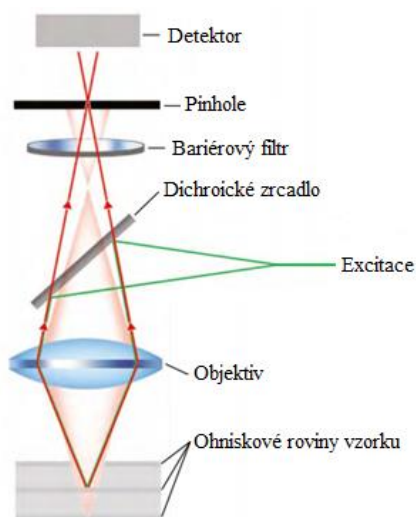
Obrázek 3.1: Princip fluorescence, převzato a upraveno z [10].

Fluorofory jsou tvořeny molekulami s aromatickým uhlovodíkem nebo heterocyklem, které jsou schopny fluorescence. Jsou schopny absorbovat energii světla určité vlnové délky a následně emitovat světlo s delší vlnovou délkou. Fluorofory lze rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní neboli vlastní fluorofory, se vyskytují v přírodě a mohou provádět vlastní fluorescenci. Vnější fluorofory jsou přidávány ke vzorkům, aby byly schopny fluorescence. Důležitá vlastnost fluoroforů je jejich fotostabilita, protože při fluorescenční mikroskopii je používán světelný zdroj o vysoké intenzitě. Pokud by nebyly dostatečně stabilní, mohlo by dojít k efektu zvanému „photobleaching“ (vyblednutí), což je fotochemická změna barviva, po které už není schopné fluorescence. [11; 12; 13]

3.2 Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskop je typem optického mikroskopu, ve kterém je detekována fluorescence z jediného místa vzorku, není zde tedy použit 2D detektor (CCD, CMOS čip), ale jednokanálový detektor s vysokou citlivostí (fotonásobič, lavinová

fotodioda). V konfokálním mikroskopu je detekováno světlo pouze z ohniskové roviny a osy objektivu a paprsky, které přicházejí z jiných míst ve vzorku, jsou filtrovány aperturou. Laserový paprsek je nejprve fokusován na clonku, která tvoří bodový zdroj (v některých případech je tento bodový zdroj tvořen výstupem z optického vlákna), jehož obraz je vytvořen objektivem ve vzorku. Tento obraz clonky má ideálně průměr odpovídající difrakčnímu limitu. Stejným objektivem prochází fluorescence či světlo odražené nebo rozptýlené do děliče svazku, který odfiltruje rozptýlené a odražené záření. Za tímto děličem je v zadní fokální rovině mikroskopu umístěna výstupní kruhová clonka, která slouží jako prostorový filtr, který na detektor propouští pouze fluorescenci pocházející z fokusu objektivu. K vytvoření obrazu fluorescence dochází skenováním buď vzorku, objektivu, či svazku vstupujícího do objektivu. [14] V systému MicroTime použitým v této práci dochází ke skenování objektivu, který je umístěn na piezoskenovacím stolku v rovině xy. Systém ConfoCor 2 neumožňuje skenování, a tudíž ani konfokální mikroskopii - zobrazování, je určen pouze pro FCS.



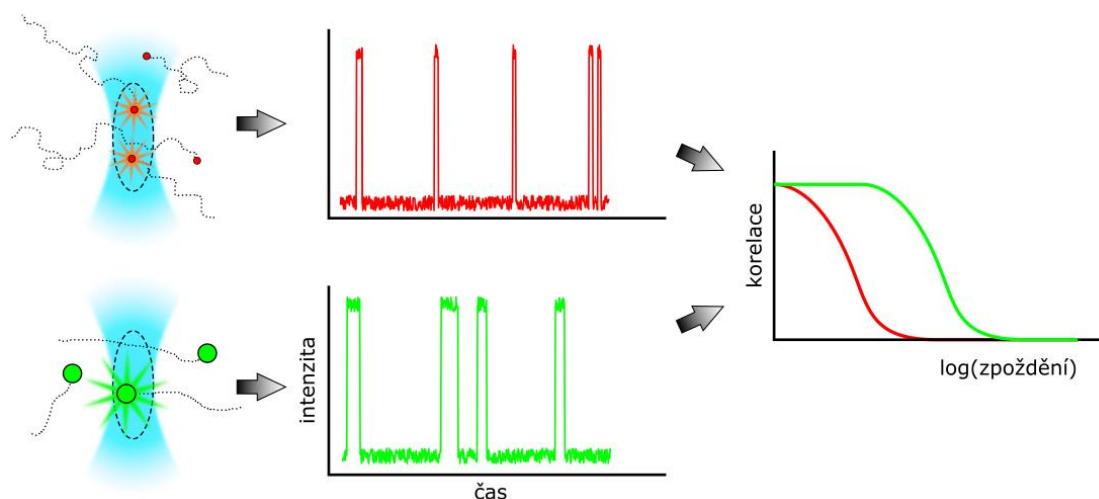
Obrázek 3.2: Princip konfokálního mikroskopu od firmy PicoQuant, převzato a upraveno z [15].

3.3 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie je metoda, která umožňuje pozorovat procesy na úrovni molekul prostřednictvím konfokálního mikroskopu. Je založena na statistické analýze časových fluktuací intenzity fluorescence, které jsou detekovány z ohniska objektivu uvnitř vzorku. Tyto fluktuace jsou výsledkem některých dynamických procesů – difúzní pohyb částic dovnitř a ven z malého detekovaného objemu, který je definován ohniskem laserového paprsku a konfokální štěrbínou. Tento pozorovaný objem činí 0,3 – 1,0 femtolitr. [16; 17]

Pozorovaný objem má tvar elipsoidu, rozprostírajícího se podél optické osy. Koncentraci fluoroforu je nutné stanovit na takovou hodnotu, aby bylo v detekovaném objemu přítomno jen několik molekul. Náhodná difúze fluoroforů vede k časově

závislým změnám v počtu molekul barviva v objemu (fluktuacím). Délka těchto fluktuací závisí na rychlosti difúze částic. Pokud částice projde detekčním objemem rychle, je zaznamenán krátký světelný pulz, pokud se na své trajektorii napříč detekčním objemem pohybuje pomaleji, je zaznamenán delší pulz fluorescence. Korelační analýzou fluktuací intenzity fluorescence je tudíž možné určit rychlost difúze, tj. difúzní koeficient fluorescentní částice. Za standardních podmínek fluorofor nepodléhá „photobleaching“ během setrvání v detekovaném objemu. Často se ovšem vyskytuje přechod barviva do tripletního stavu, ve kterém molekula není schopna vyzářit foton. Molekula nachází v pozorovaném objemu, ale nesvítí. [16; 17; 18]



Obrázek 3.3: Princip metody FCS – zcela vlevo je zobrazen pozorovaný objem, ve kterém difundují detekované molekuly, uprostřed jsou zobrazeny fluktuace intenzity, vpravo je uvedena výsledná autokorelační funkce vypočtená právě z fluktuací intenzity. Použito se svolením autora D. Pánka

Základní informace o molekulách jsou získány analyzováním rychlostí a amplitud intenzity fluktuací. Tato teorie je založena na Poissonově statistice. Pro náhodné události může být počet fluoroforů v objemu popsán Poissonovým rozdělením [18]

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (3.1)$$

kde $P(n, N)$ je pravděpodobnost výskytu n fluoroforů v objemu, N je průměrný počet molekul v objemu. Změna počtu molekul v detekovaném objemu má za následek změnu intenzity fluorescence, která bude fluktuovat v závislosti na difúzi fluoroforů (rychlejší difúze odpovídá rychlejším změnám intenzity a naopak). Statistickou analýzou intenzity lze určit amplitudu a frekvenci distribuce fluktuací. Pokud je difúze pomalá, tak intenzita v čase $F(t)$ se bude podobat intenzitě s časovým zpožděním $F(t+\tau)$, bude-li difúze rychlá, budou se tyto intervaly lišit. V FCS je počítána korelace mezi $F(t)$ a $F(t+\tau)$ signály, které jsou vůči sobě časově zpožděné o τ . Výsledky autokorelační funkce obsahují informace o difúzním koeficientu a počtu molekul v pozorovaném objemu. Je důležité mít na paměti, že korelační čas τ nesouvisí s dobou života fluorescence. Důležitým parametrem

je amplituda autokorelační funkce, která popisuje průměrný počet pozorovaných molekul. [18]

3.3.1 Autokorelační funkce

Časové fluktuace fluorescence poskytují informace o kinetice základních procesů a jsou studovány korelační analýzou. Autokorelační funkce zobrazuje souvislost intenzity fluorescence v určitém čase s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě. Jsou určeny různě veliké časové intervaly v signálu, pro které je vypočtena autokorelační funkce

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} \quad (3.2)$$

kde $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu v čase, $F(t)$ intenzitu fluorescence a δ okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int F(t) dt \quad (3.3)$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3.4)$$

V literatuře je také uvedena odchylka od průměrného fluorescenčního signálu v čase t , pokud jsou dodrženy podmínky uvedené v literatuře [17]

$$\delta F(t) = \int W(r) \delta(\eta C(r, t)) dr \quad (3.5)$$

kde integrujeme přes detekční objem. C je lokální koncentrace částic, η parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, určuje počet fotonů detekovaných z jedné částice za jednu sekundu, $W(r)$ udává prostorové rozlišení emitovaného světla. [17; 18]

Autokorelační funkce je fitována teoretickým modelem. Pro prostou difúzi, u které je předpokládán Gaussovský tvar detekovaného objemu, platí následující teoretický tvar autokorelační funkce

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D})} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (3.6)$$

kde N je počet molekul, τ_D je difúzní čas, r_0 je rozměr detekovaného objemu ve směru osy x a z_0 ve směru osy z . [17]

3.3.2 Parametry fitu

Výsledky byly fitovány teoreticky vypočtenou funkcí z nastavených a známých parametrů mikroskopu a vzorku. Model fitu byl zvolen Prostá difúze, který je určen k analyzování difúze barviva v rozpouštědle. Fit je obvykle vypočten z několika parametrů, které jsou uvedeny v tabulce. [19; 20]

Tabulka 3.1: Popis a výpočet parametrů fitu.

| Parametr fitu | Význam parametru | Výpočet |
|------------------------------|---|---|
| $V_{eff}(\text{fl})$ | konfokální objem | nastaveno při kalibraci mikroskopu |
| $\rho ()$ | Příspěvek difundujících částic | $\sum_{i=1}^n \rho_i = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (3.7)$ |
| $\tau_{diff}(\text{ms})$ | Difúzní čas – průměrná doba výskytu jedné molekuly v konfokálním objemu | $\tau_{diff} = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (3.8)$ |
| $\kappa ()$ | Poměr axiálního a laterálního rozměru konfokálního objemu | $\kappa = \frac{z_0}{w_0} \quad (3.9)$ |
| $N ()$ | Průměrný počet molekul v konfokálním objemu | $PN = \frac{1}{G(0)} = V_{eff} \langle C \rangle \quad (3.10)$ |
| $C (\text{nM})$ | Koncentrace difundujících částic | $\langle C \rangle = \frac{PN}{V_{eff}} \quad (3.11)$ |
| $w_0(\mu\text{m})$ | Laterální rozměr detekčního objemu | nastaveno při kalibraci mikroskopu |
| $z_0(\mu\text{m})$ | Axiální rozměr detekčního objemu | nastaveno při kalibraci mikroskopu |
| $D (\mu\text{m}^2/\text{s})$ | Difúzní koeficient - charakterizuje difúzi | $D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (3.12)$ |
| $\chi^2 ()$ | Korekční faktor | $\chi^2 = \frac{1}{\langle N \rangle G(0)} \quad (3.13)$ |

Ve vztahu 3.10 a 3.11 značí PN počet částic, $G(0)$ hodnotu autokorelační funkce v bodě 0 a $\langle N \rangle$ počet částic korigovaných na pozadí. [19; 20; 21]

3.3.3 Difúzní čas

Průměrnou dobu, po kterou se molekuly vyskytují v pozorovaném objemu vyjadřuje parametr τ_{diff} . Čím větší molekuly jsou, tím pomaleji se pohybují a jejich difúzní čas bude nabývat vyšších hodnot. Je důležité, abychom znali teoreticky vypočtenou hodnotu tohoto parametru pro měřené lipozomy k porovnání s výsledkem experimentálního měření. Lipofilní barvivo je začleněno v membráně a pohybuje se tedy stejnou rychlostí jako celé váčky. Nejprve bylo nutné odhadnout velikost laterálního poloměru detekovaného objemu zjištěním difúzního času doporučeného barviva, přičemž tato hodnota byla vypočtena softwarem při měření metodou FCS. Testovaným barvivem byl Rhodamin 6G, jehož difúzní koeficient je známý z literatury $D = 414 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [22], a pro nějž byl naměřen difúzní čas $\tau_{diff} = 56 \mu\text{s}$. Tyto hodnoty byly dosazeny do vztahu 3.8

$$\omega_0 = \sqrt{4D\tau_{diff}}$$

$$\omega_0 = \sqrt{4 \cdot 4,14 \cdot 10^{-10} \cdot 56 \cdot 10^{-6}} = 3,05 \cdot 10^{-7} \text{ m}$$

kde D je difúzní koeficient a τ_{diff} je difúzní čas. Následně byl vypočten difúzní koeficient měřených lipozomů o velikosti $r = 50 \cdot 10^{-9} \text{ m}$. Bylo dosazeno do vztahu 3.12

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

$$D = \frac{1,38 \cdot 10^{-23} \cdot 293,15}{6 \cdot \pi \cdot 1,002 \cdot 10^{-3} \cdot 50 \cdot 10^{-9}} = 4,28 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$$

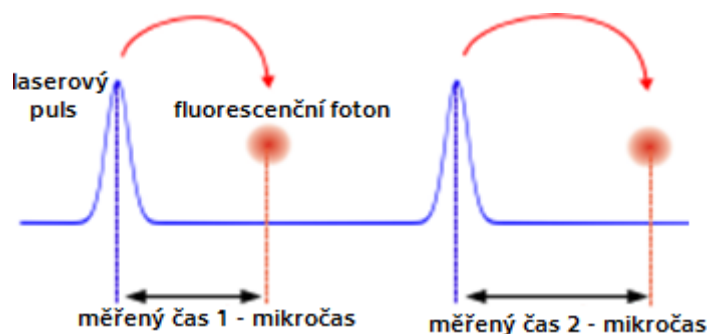
kde k je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, η je dynamická viskozita a r je poloměr měřených lipozomů. Vypočtené hodnoty rozměru ohniska w_0 a difúzní koeficient pro 100 nm částice byly dosazeny do vztahu 3.8 a mohl být vypočten odhad difúzního času měřených lipozomů.

$$\tau_{diff} = \frac{w_0^2}{4D} = \frac{(3,05 \cdot 10^{-7})^2}{4 \cdot 4,28 \cdot 10^{-12}} = 5,4 \text{ ms}$$

Toto je tedy teoretický odhad difúzního času pro 100 nm částice vypočtený na základě známého difúzního koeficientu $D = 4,28 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, nicméně naměřená hodnota difúzního času těchto lipozomů se může od teoreticky vypočtené lišit s přesností 30 %. Naměřené hodnoty se mohou pohybovat v intervalu od 3,78 do 7,02 ms.

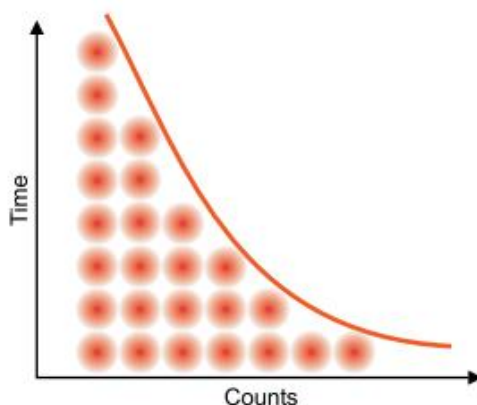
3.4 Časově korelované čítání fotonů

Tato metoda je založena na detekci jednotlivých fluorescenčních fotonů a měření doby jejich letu. Vzorek je excitován krátkými laserovými pulsy s vysokou frekvencí opakování (MHz). Emitované fotony ze vzorku jsou detekovány na fotonásobiči, který zároveň měří čas zaznamenání s ohledem na excitační puls. [23]



Obrázek 3.4: Laserový puls a následné detekování fotonu při TCSPC, převzato a upraveno z [24].

Aby bylo dostatečné množství dat k analyzování, je nutné cyklus excitace-emise několikrát opakovat. Po každé fotonové události má detektor tzv. „mrtvý“ čas, který trvá několik nanosekund, a během této doby nemohou být zpracovávány další události. Prodleva mezi dalším excitačním pulsem musí být dostatečně velká, aby detektor mohl opět registrovat fotony. Průměrná detekční rychlost detektoru by měla být 1-5 % z frekvence excitace. [24] Systémy TCSPC jsou také nastaveny na registraci pouze jednoho fotonu za budící cyklus. Na detektoru je tedy měřen časový rozdíl mezi detekovaným fotonem a korespondujícím excitačním pulsem a hodnoty jsou zaznamenávány do histogramu. [23; 24]



Obrázek 3.5: Ukázka histogramu. [24]

3.5 Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

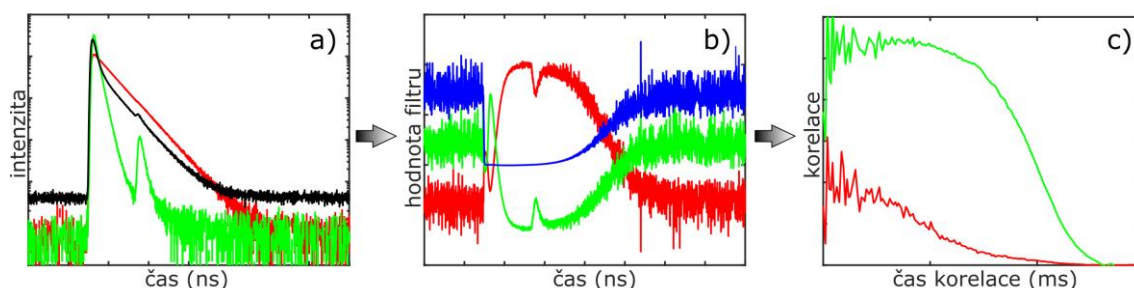
Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS) využívá kombinaci dvou metod, FCS a TCSPC. Rozlišuje jednotlivé fluorofory ve vzorku podle jejich doby života fluorescence a pro každý vypočte autokorelační funkci, popřípadě jejich kroskorelaci. Tato metoda je založena na excitaci vzorku krátkými laserovými pulsy (v případě FCS je možné excitovat kontinuálním laserem), díky kterým lze o každém fotonu získat dvě časové informace na různých časových měřítkách. První čas, tzv. „mikročas“, udává interval mezi zaznamenáním fotonu a odpovídajícím excitačním pulsem. Měří s přesností v řádu desítek pikosekund. Ze statistiky zaznamenaných

„mikročasů“ je tudíž možné získat průběh dohasínání fluorescence fluoroforu. Druhý čas („makročas“) zaznamenává dobu od začátku experimentu po detekci příchozího fotonu v řádu sto nanosekund. Mohou se v něm zobrazit difúze molekul a přechody do tripletního stavu. [17; 25]

Pokud bude vzorek označen dvěma barvivy s odlišnými dobami života fluorescence, je nutné znát dopředu průběh jejich dohasínání. Foton, který přijde brzy po laserovém pulsu bude pravděpodobněji patřit fluoroforu s kratší dobou života a naopak. Z průběhů dohasínání je pro každý foton určeno, od kterého fluoroforu pochází a je na něj aplikován příslušný statistický filtr. Filtr přiřadí každému fotonu pravděpodobnostní hodnotu, se kterou pochází od daného fluoroforu a zápornou pravděpodobnostní hodnotu filtru druhého fluoroforu (pravděpodobnost, se kterou se ve vzorku nenachází). Po aplikaci těchto filtrů jsou získány z původního vzorku dva oddělené signály, které fluktuují v čase. [17; 25]

3.5.1 Filtry

Fotony dopadající na detektor v určitém „mikročase“ (po excitovaném pulsu) jsou zaznamenávány do histogramu. Histogram tedy zobrazuje četnost detekovaných fotonů v závislosti na čase a je pro něj charakteristický tvar exponenciálního poklesu, který vyjadřuje tvar dohasínání fluorescence (přechod elektronů z excitovaného do základního stavu). [25; 26]



Obrázek 3.6: Princip FLCS analýzy – a) Dohasínání fluorescence barviva A (zelená), barviva B (červená) a vzorku obsahující obě barviva (černá), b) statistické filtry vypočtené z křivek dohasínání, c) autokorelační funkce fluorescence jednotlivých barviv. Použito se svolením autora D. Pánka.

K detekci fotonů je obvykle použita metoda TCSPC, kde je „mikročas“ uveden v jednotkách čísla TCSPC kanálu. Z průběhu dohasínání vzorku a z dohasínání jednotlivých barviv lze spočítat statistický filtr pro každý fluorofor. Uvažujme vzorek, který je značen dvěma barvivy - fluoroforem A a fluoroforem B , jejich histogramy označme $A(i)$ a $B(i)$ a normalizujeme je na jednotku plochy:

$$a(i) = \frac{A(i)}{\sum A(i)} \quad (3.14)$$

$$b(i) = \frac{B(i)}{\sum B(i)} \quad (3.15)$$

Křivka fluorescenčního rozpadu celého vzorku $Decay(i)$ může být vyjádřena jako lineární kombinace vztahů uvedených výše

$$Decay(i) = w_a \cdot a(i) + w_b \cdot b(i) \quad (3.16)$$

kde w_a a w_b představují amplitudy fotonu (počet příspěvku fotonů k barvivu A , nebo B).

Definujme si také funkce $f_a(i)$ a $f_b(i)$ s následujícím chováním

$$w_a = \langle \sum f_a(i) \cdot Decay(i) \rangle \quad (3.17)$$

$$w_b = \langle \sum f_b(i) \cdot Decay(i) \rangle \quad (3.18)$$

kde hranaté závorky značí průměrnou hodnotu nekonečného množství měření. Zároveň tyto funkce musí minimalizovat relativní chybu

$$\langle (\sum f_a(i) \cdot Decay(i) - W_a)^2 \rangle \quad (3.19)$$

$$\langle (\sum f_b(i) \cdot Decay(i) - W_b)^2 \rangle \quad (3.20)$$

Obě funkce lze použít jako statistické filtry, které jsou aplikovány na obsah všech TCSPC histogramů. Tyto funkce je možné vypočítat z $Decay(i)$ nebo z rozpadu vzorků. Použitím $f_a(i)$ a $f_b(i)$ je možné statisticky oddělit příspěvky intenzit od fluoroforu A a B pro každý foton. Tyto filtry rozhodují, který foton a s jakou váhou patří danému fluoroforu. [25; 26]

4 Experimentální metody

4.1 Použité přístroje

4.1.1 Fluorescenční mikroskop ConfoCor 2

Hlavní část měřicí aparatury představuje fluorescenční mikroskop ConfoCor 2 od firmy Zeiss. Mikroskop je založen na technologii konfokální mikroskopie. Zdrojem světla je laserový paprsek, který je ovládán pulzní diodou od firmy PicoQuant. Svazek je veden do mikroskopu prostřednictvím optického vlákna. Následně dochází k fokuzaci přes objektiv do velmi malého difrakčního objemu. Molekuly v tomto místě jsou excitovány a následně emitují fluorescenční záření, které prochází stejným objektivem jako laserový excitační paprsek. Za objektivem je umístěn dělič paprsků, který odděluje odražené laserové světlo od fluorescence. Emitované světlo následně prochází přes pinhole a nakonec je zaznamenáno na detektoru, který představuje lavinová fotodioda. Pozice vzorku je kontrolována přesným motorizovaným systémem s přesností na 1 μm . [28]

Součástí mikroskopu je také objektiv C-Apochromat od firmy Zeiss. Jedná se o apochromatický objektiv s korigovanou chromatickou vadou, který dokáže nasměrovat všechny paprsky světla do jednoho bodu. Objektiv má 40x zvětšení a numerická apertura je 1,2 (účinná světelnost). Je určen pro vodní imerzi, což znamená, že prostor mezi spodním dnem měřicí komůrky a objektivem je vyplněn vodou. [29]

Mikroskop je vybaven pulzním laserem, který má vlnovou délku 475 nm. Maximální výstupní výkon je 20 mW. Laserový paprsek pocházející z excitační jednotky je nasměrován do objektivu pomocí filtru, který obsahuje 3 optické moduly. Prvním modulem je excitační filtr, který vybírá pouze paprsky s odpovídající excitační vlnovou délkou. Další modul představuje dělič paprsků, který odfiltruje krátké excitační vlny, pocházející ze směru, kde je umístěn vzorek. Posledním modulem je emisní filtr, který odklání záření krátkých vlnových délek, které nepochází ze vzorku a napomáhá nasměrování fluorescence na detektor. [28]

Objektiv a následující optické elementy koncentrují záření do objemu, který má být detekován v definovaném bodě podél optické osy. Pinhole (kruhová apertura) definuje a limituje objem, který je detekován. Průměr pinhole je nastaven softwarem. [28]

K detekci fluorescence čítáním jednotlivých fotonů je použita lavinová fotodioda (Single-Photon Avalanche Diode, SPAD). Dalším důležitým parametrem je krátký takzvaný „mrtvý“ čas, kdy není schopna zaznamenat příchozí fotony (rozlišení je minimálně 10^6 fotonů za sekundu). Vysoká citlivost detektoru umožňuje detekci fluorescence z jednotlivých molekul s vysokým rozlišením. [28]

Vzorek je před měřením umístěn do kyvety. Jsou použity dělené kyvety LabTek Chamber (Nunc) s osmi komůrkami o objemu 0,5 mL. Nastavení držáku do nejlepší pozice může být provedeno manuálně nebo lze použít automatické měření umístění, kdy software vypočte nejlepší polohu výstupní pinhole nejprve ve směru osy x, následně v ose y a poté v ose z a znovu zpětně přepočítává nastavení umístění ve všech směrech, počínaje osou x (tento postup je proveden několikrát, dokud vypočtené rozměry nejsou optimální). [28]

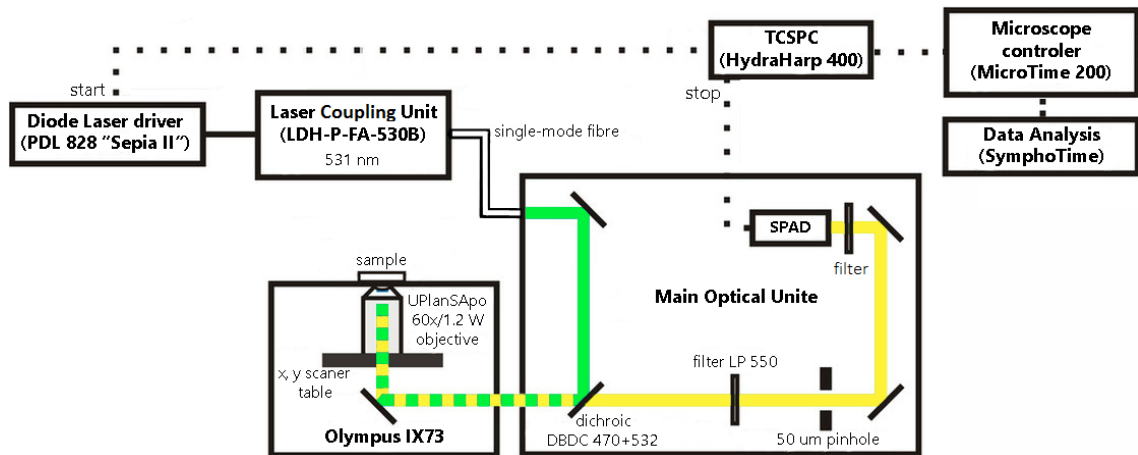
Před měřením je nutné nejprve inicializovat motory, následně nastavit objektiv do správné vzdálenosti od vzorku (musí se objevit dvě „problesknutí“, po kterých se objektiv přiblíží ke vzorku o dalších 200 μm), zvolit velikost pinhole (40 μm) a spustit automatické vypočítávání nejvhodnější polohy pinhole. [28]



Obrázek 4.1: Ukázka měřicí aparatury mikroskopu ConfoCor 2

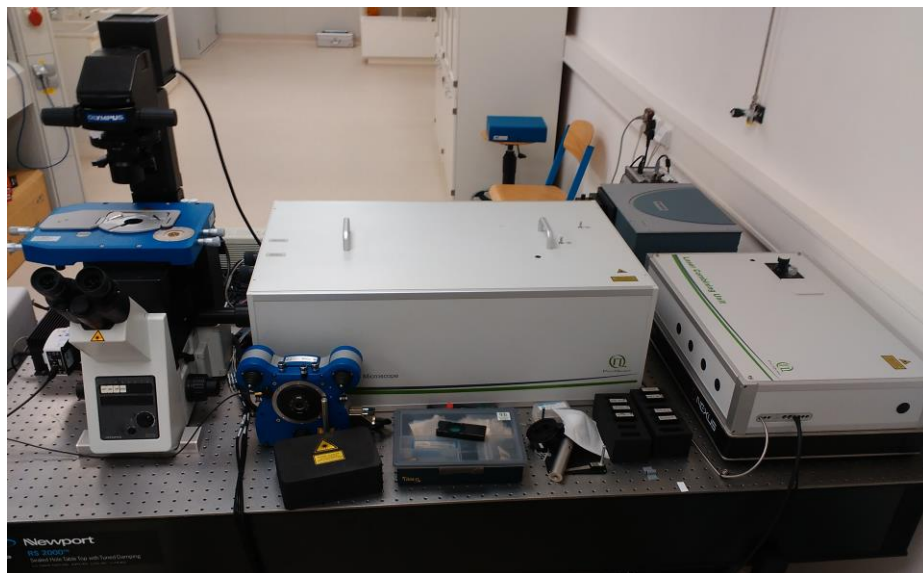
4.1.2 Konfokální mikroskop MicroTime 200

Excitační světlo (kolimovaný laserový paprsek) je odraženo dichroickým zrcadlem do objektivu, který zaměřuje paprsek do malého detekovaného objemu uvnitř vzorku. Fluorescence pocházející ze vzorku je shromážděna stejným objektivem a prochází skrz dichroické zrcátko a emisní filtr. Následně je fokusována (tubusem čoček) do konfokální pinhole (clonky), která zabraňuje průchodu fluorescence z jiné než zaostřovací roviny na detektor. Toto nastavení zajišťuje, že zachycená emise fluorescence je pouze z malého detekovaného objemu uvnitř vzorku. [14; 30]



Obrázek 4.2: Schéma popisující princip konfokálního mikroskopu

Konfokální systém je reprezentován laserem a dvěma identickými SPAD moduly. Celá sestava vyniká detekčním subsystémem s jednofotonovou citlivostí a schopností měřit časové průběhy s rozlišením v řádu desítek pikosekund. Zpracování naměřených dat je prováděno v softwaru SymPhoTime 64. [31]



Obrázek 4.3: Ukázka měřicí aparatury mikroskopu MicroTime 200

4.2 Příprava vzorku

4.2.1 Příprava vzorků

Použité chemikálie

- KH_2PO_4 *kyselá složka*
- Na_2HPO_4 *zásaditá složka*
- NaCl
- Nenabité lipidy POPC od firmy Avanti Polar Lipids, $M = 760 \text{ g/mol}$
- Negativně nabité lipidy DOPS od firmy Avanti Polar Lipids, $M = 810 \text{ g/mol}$
- CHCl_3 , $M = 119 \text{ g/mol}$
- CH_3OH , $M = 32 \text{ g/mol}$

Značení lipozomů (fluorescenční barviva)

- DiO, $M = 881 \text{ g/mol}$
- AlexaFluor 488, $M = 643 \text{ g/mol}$
- DiI, $M = 934 \text{ g/mol}$
- Rhodamin B, $M = 479 \text{ g/mol}$
- Rhodamin 6G, $M = 479 \text{ g/mol}$

Lipofilní barviva DiO a DiI, které byly použity na značení membrány, obsahují lipidové řetězce, které jsou hydrofobní a jsou tudíž během přípravy lipozomů zakomponovány do membrány.

U hydrofilních fluoroforů AlexaFluor 488, Rhodamin B a Rhodamin 6G se předpokládá, že volně difundují ve vodném prostředí uvnitř lipozomu. Nicméně experimenty prezentované v této práci prokázaly, že Rhodamin B a Rhodamin 6G vykazují nežádoucí interakci s membránou a jsou pro splnění cíle práce (monitorování úniku hydrofilního barviva z lipozomů) nevhodné. Finální experiment, testování stability, byl tudíž prováděn s barvivem AlexaFluor 488, který nevykazoval žádnou interakci detekovatelnou pomocí FCS.

Příprava pufru

Pufr byl připraven rozpuštěním 8 g chloridu sodného, 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 1,27 g hydrogenfosforečnanu sodného v 1 litru. Koncentrace pufru tudíž byla 10 mM a hodnota pH byla 7,2, což bylo ověřené pH metrem UB-5 od firmy Denver Instrument. Z tohoto množství bylo odebráno 70 mL, ke kterému bylo přidáno 1,7 mL 0,02% roztoku chelatačního činidla EDTA. Výsledná koncentrace činidla v 71,7 mL pufru byla 5 μM . Tento pufr byl použit k přípravě lipozomů se zapouzdřeným hydrofilním barvivem. Pro dialýzu takto značených lipozomů byl použit 2x zředěný pufr o koncentraci 5 mM. Do výsledného množství, přibližně dvou litrů, bylo

přidáno 20 mL 0,02% chelatačního činidla EDTA, které bylo použito z důvodu omezení agregace lipozomů a podporování výskytu monodisperzních částic ve vzorku.

Příprava fluorescenčně značených lipozomů

K přípravě vzorku byl použit roztok neutrálně nabitých lipidů POPC v chloroformu o koncentraci 33 mM. Dále byly použity negativně nabitě lipidy DOPS, které byly rozpuštěny ve směsi metanolu a chloroformu. Koncentrace lipidů DOPS v tomto roztoku byla 21 mM.

Prvním bodem byl výpočet množství molekul lipidů, které tvoří jeden lipozom, pokud známe velikost poloměru $r = 5 \cdot 10^{-8}$ m a obsah jednoho lipidu $S_{lip} = 60 \cdot (10^{-10})^2$ m (za předpokladu kruhového tvaru lipozomu). Množství molekul lipidů v jednom lipozomu je dáno vzorcem

$$k = \frac{S_{vez}}{S_{lip}} = \frac{4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot 2}{S_{lip}} = \frac{4 \cdot \pi \cdot (5 \cdot 10^{-8})^2 \cdot 2}{60 \cdot (10^{-10})^2} = 104\,720 \quad (4.1)$$

Jeden lipozom tedy obsahuje přibližně 100 000 lipidů. Testováním několika molekul barviva na 1 lipozom bylo zjištěno, že vhodné množství poměru molekul lipofilního barviva a lipidů je 5:100 000. Je důležité, aby byl poměr patřičně zvolený kvůli množství fotonů dopadajících na detektor. Žádoucí je co nejmenší počet fluoroforů na zachování dostatečně vysokého signálu (přibližně 10-100 kcps při použitém nastavení systému).

Z výše uvedených zásobních roztoků lipidů byly připraveny lipozomy ze směsi nabitých lipidů DOPS a neutrálně nabitých lipidů POPC v různých poměrech. Na základě údajů z literatury byly zvoleny poměry látkového množství 2:1 (POPC:DOPS), 3:1 (POPC:DOPS) a 4:1 (POPC:DOPS). Výsledné koncentrace lipidů a barviva jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Koncentrace složek ve směsi po přidání 1 mL pufru.

| Poměr lipidů | Koncentrace lipidů POPC (mM) | Koncentrace lipidů DOPS (mM) | Koncentrace barviva DiO (μM) |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2:1 | 0,413 | 0,210 | 0,030 |
| 3:1 | 0,413 | 0,142 | 0,028 |
| 4:1 | 0,413 | 0,105 | 0,026 |

Jednotlivé vzorky ve zkumavkách byly umístěny do digestoře k odpaření, které probíhalo přibližně 2 hodiny. Následně byly vloženy na 15 minut do exsikátoru k dosušení. Poté zbyl pouze film suchých lipidů na stěnách zkumavek.

Do každé zkumavky obsahující suché lipidy byl přidán 1 mL pufru, jehož příprava je uvedena výše. V případě značení lipozomů hydrofilním barvivem, obsahoval tento pufr AlexaFluor 488 o koncentraci 25 μM . Vodný roztok byl promíchán na vortexu, čímž byly vytvořeny multilamelární lipozomy o různých velikostech. K přípravě unilamelárních lipozomů o průměrné velikosti 100 nm, byl vzorek 25krát protlačen (tam a zpět) v extrudéru (Mini-Extruder Set, Avanti Polar Lipids, Inc.) přes polykarbonátovou membránu (Whatman) s póry o velikosti 100 nm.

V případě značení hydrofilním barvivem bylo ještě nutné ze vzorků dialýzou odstranit barvivo, které nebylo začleněno do vodného prostředí uvnitř lipozomů. Vzorky byly injektovány do dialyzačních kazet (Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes, Thermo Scientific), které byly uloženy s plováčky do kádinek obsahující čistý pufr o koncentraci 5 mM, jehož příprava je popsána výše k promývání po dobu 72 hodin. Během této doby byl pufr v kádince 2x vyměněn za nový.

Obdobným postupem byly připraveny vzorky značené lipofilním barvivem DiO a hydrofilními barvivy Rhodamin B a Rhodamin 6G pro experimenty prováděné na systému MicroTime 200 s excitací na 531 nm.

4.3 Postup měření

Před samotným měřením je nutné proměřit nejprve standard, tedy barvivo o známé koncentraci se známým průběhem autokorelační funkce. Tento úkon je nutný k ověření správného nastavení všech komponent mikroskopu. Po dokončení kontroly je každý vzorek vložen pipetou do jedné jamky v komůrce a celá nádobka je umístěna nad objektiv s vodní imerzí (na jeho povrchu je kapka destilované vody). Fokus objektivu je umístěn přibližně 200 μm nad dno komůrky. K měření byl použit objektiv 40x zvětšení s vodní imerzí od firmy Zeiss.

Naměřená data lipozomů značených dvěma barvivy (během pozorování sedmidenní stability) byla vyhodnocena metodou FLCS pomocí software SymPhoTime 64. Nejdříve byly na základě křivek dohasínání fluorescence naměřených pro obě barviva (AF, DiO) zvláště vypočteny statistické filtry, které byly použity pro výpočet dílčích autokorelačních funkcí pro jednotlivá barviva z měření na vzorku obsahující lipozomy značené oběma barvivy.

Mezi jednotlivými měřeními sedmidenní stability byly všechny vzorky uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Před samotným měřením byly vystaveny pokojové teplotě na 15 minut.

4.4 Zpracování dat

Ke zpracování naměřených dat byl použit software SymPhoTime 64 (PicoQuant), provedl výpočet autokorelačních křivek a našel fit podle modelové funkce dané vzorcem

$$G(\tau) = \sum_{i=1}^{n_{diff}} \frac{\rho_i}{\left[1 + \left[\frac{\tau}{\tau_{Di}}\right]\right] \left[1 + \left[\frac{\tau}{\tau_{Di}K^2}\right]^{0.5}\right]} \quad (4.2)$$

kde n_{diff} je počet druhů difundujících částic s difúzním časem τ_{Di} , ρ_i je amplituda parciální korelační funkce. Jedná se tedy o variantu vzorce 3.6 zohledňující možnost, že v roztoku difundují částice s různými difúzními časy. Kromě prosté difúze lze také použít modelovou funkci uvažující přechod excitovaného barviva do tripletního stavu během doby, kdy se nachází v detekčním objemu. [32] Výsledné křivky autokorelační funkce a fitu byly vyexportovány do textového formátu a vyneseny do grafů v prostředí MATLAB. V případě měření na systému ConforCor 2 byly pomocí skriptu v MATLAB vyneseny dílčí autokorelační křivky vypočtené z deseti úseků naměřeného průběhu intenzity fluorescence, abychom posoudili, zda se měření v jednotlivých úsecích od sebe vzájemně liší, což je také jedno z měřítek reprodukovatelnosti výsledků.

5 Výsledky

Měření difúze malých unilamelárních lipozomů probíhalo na dvou mikroskopech. Nejprve na konfokálním mikroskopu MicroTime 200. K pozorování byla použita dostupná barviva vhodná pro excitaci zeleným laserem s vlnovou délkou 531 nm - lipofilní barvivo DiI a hydrofilní barviva Rhodamin B a Rhodamin 6G. Po zjištění nežádoucích interakcí mezi oběma hydrofilními barvivy a fosfolipidovou membránou, které je prezentováno v sekci 5.2, bylo rozhodnuto stabilitu značených lipozomů testovat na starším fluorescenčním mikroskopu ConfoCor 2 (Karl Zeiss). Změna měřicí aparatury nastala z důvodu nedostatku času pro nákup a testování dalších barviv excitovatelných vlnovou délkou 531 nm. Systém ConfoCor 2 je vybaven laserem s excitační vlnovou délkou 475 nm, tudíž mohla být použita jiná, dříve vyzkoušená barviva. Pro potvrzení jejich použitelnosti bylo na tomto mikroskopu nejprve testováno hydrofilní barvivo AlexaFluor 488, následně lipofilní barvivo DiO. Vzhledem k příznivým výsledkům testu, zejména pak absence interakce mezi hydrofilním barvivem AlexaFluor 488 a lipozomy, mohlo být měření sedmidenní stability uskutečněno na mikroskopu ConfoCor2.

Podle protokolu uvedeného v sekci 4.2 byly připraveny 3 vzorky s různými poměry negativně nabitých a neutrálně nabitých lipidů. Všechny byly značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem. Dále byly připraveny také 3 vzorky se stejným složením, které byly značeny pouze hydrofilním barvivem zapouzdřeným uvnitř. Měření probíhalo po dobu 7 dní. Po uplynutí jednoho týdne od začátku měření byl do vzorků přidán detergent, který způsobil destrukci lipozomů. Pro ilustraci je zde uveden i tento extrém. Následně je tato kapitola doplněna také o výsledky, které zobrazují nevhodné zvolení chemikálií a nežádoucí interakce.

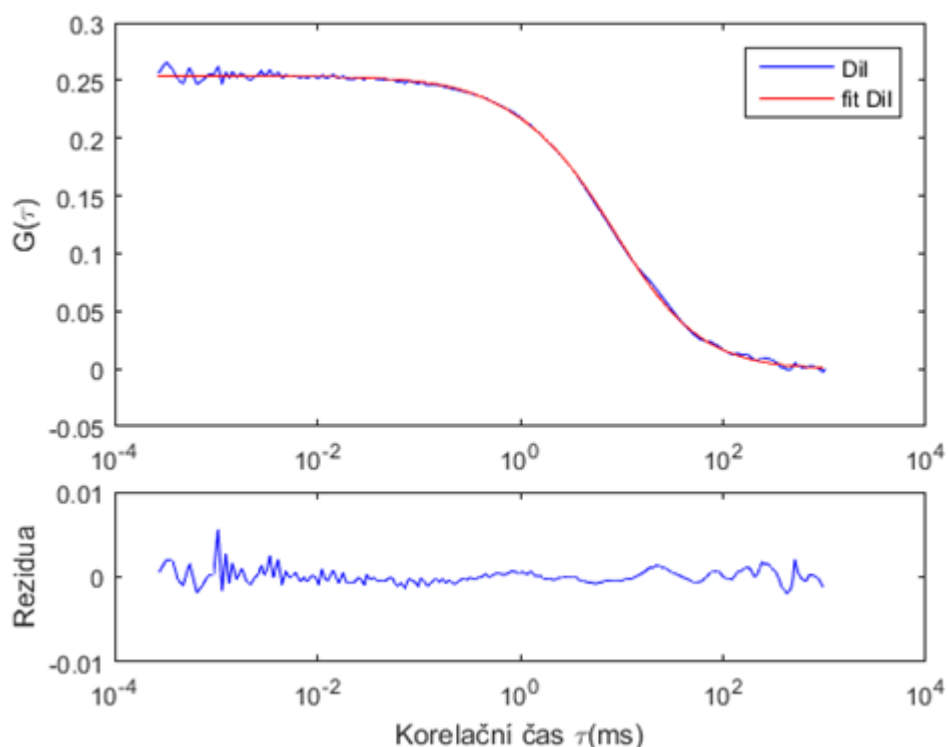
5.1 Lipozomy značené lipofilním barvivem DiI

Tato měření byla prováděna z důvodu ověření postupu přípravy lipozomů a optimalizování podmínek FCS měření. Dále je také křivka dohasínání fluorescence DiI nezbytná pro statistickou analýzu FLCS dat.

Výkon laseru byl nastaven na 99 %, opakovací frekvence laserových pulsů byla 20 MHz, světelný výkon laseru byl nastaven na 3,1 μ W a doba záznamu byla 180 sekund.

Tabulka 5.1: Parametry fitu barviva DiI v membráně lipozomů.

| Parametr fitování | Vypočtené hodnoty fitu |
|----------------------------------|------------------------|
| V_{eff} (fl) | 1,106 |
| ρ () | 0,254 |
| τ_{diff} (ms) | 8,490 |
| κ () | 6,122 |
| N () | 4,155 |
| C (nM) | 6,238 |
| w_0 (μm) | 0,319 |
| z_0 (μm) | 1,953 |
| D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | 3,000 |



Obrázek 5.1: Autokorelační funkce fluorescence barviva DiI v membráně lipozomů.

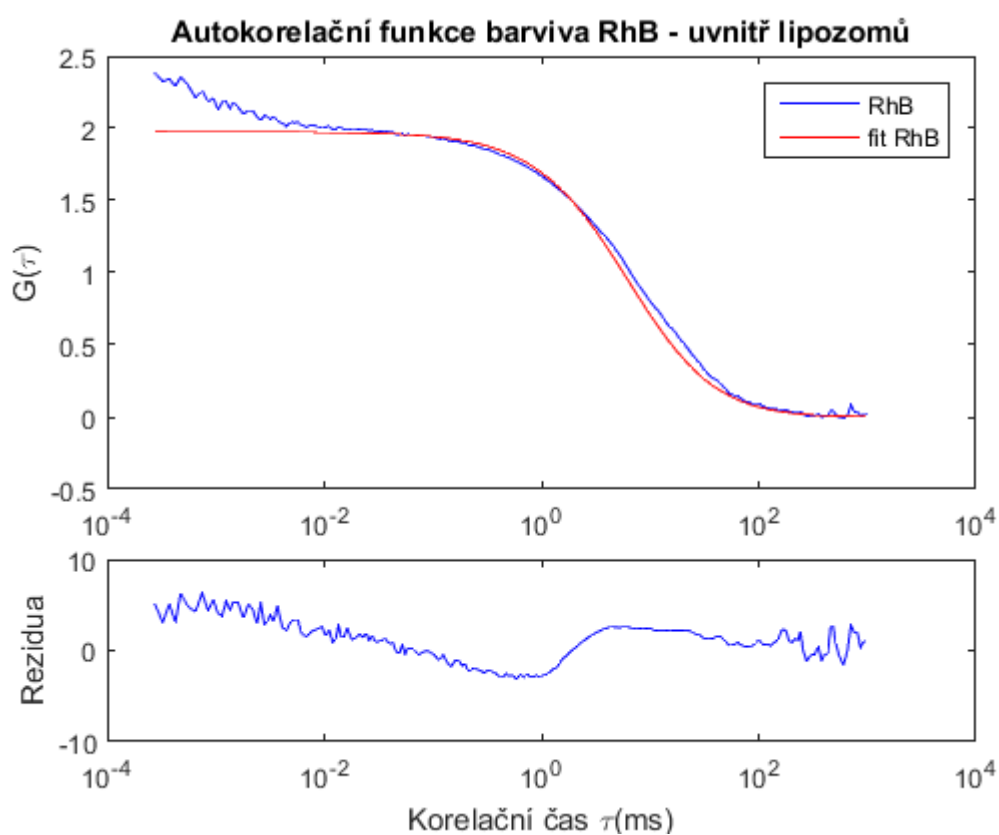
5.2 Lipozomy značené hydrofilním barvivem Rhodamin B a Rhodamin 6G

Prvním testovaným hydrofilním barvivem byl Rhodamin B. Jsou zde uvedeny vypočtené parametry fitu a autokorelační funkce pro samotné, volně rozptýlené barvivo a pro barvivo, které bylo zapouzdřené uvnitř lipozomů.

Měření bylo provedeno na mikroskopu MicroTime 200. Byl použit imerzní objektiv 60x zvětšující s vodní imerzí a filtr BP (pásmová propust) 575/50 nm.

Tabulka 5.2: Vypočtené parametry fitu pro RhB uvnitř lipozomů

| Parametr fitování | Vypočtené hodnoty fitu pro RhB uvnitř lipozomů |
|----------------------------------|--|
| V_{eff} (fl) | 0,898 |
| ρ () | 1,975 |
| τ_{diff} (ms) | 6,500 |
| κ () | 2,760 |
| N () | 0,506 |
| C (nM) | 0,936 |
| w_0 (μm) | 0,388 |
| z_0 (μm) | 1,070 |
| D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | 5,800 |



Obrázek 5.2: Průběh autokorelační funkce a rezidua barviva RhB zapouzdřeného uvnitř lipozomů

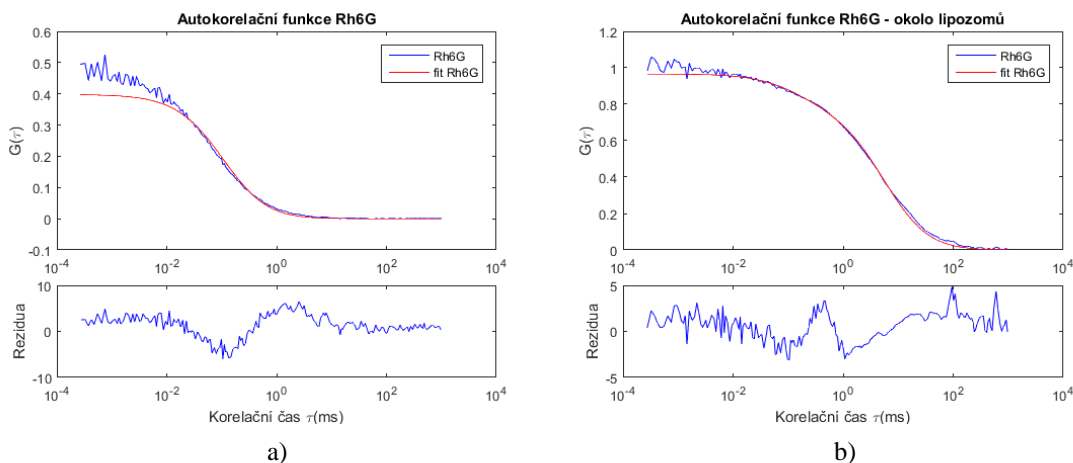
Doba života fluorescence Rhodaminu B je poměrně krátká (asi 1,7 ns), pro použití v kombinaci s DiI tedy není RhB příliš vhodný, neboť pro FLCs je výhodné, když se doby života fluorescence sledovaných barviv liší co nejvíce. Vhodnou volbou je například Rhodamin 6G, hojně využívané barvivo s dobou života 4 ns. Nejprve byly porovnány výsledky měření volně difundujícího barviva Rhodamin 6G ve vodném roztoku s výsledky autokorelační funkce fluorescence vzorku obsahující jak nezačleněné lipozomy, tak (nezapouzdřený) Rhodamin 6G.

Měření bylo provedeno na mikroskopu MicroTime 200. Na všechna měření byl použit objektiv 60x zvětšující s vodní imerzí a filtr BP (pásmová propust) 575/50 nm. K fitu autokorelační funkce byl použit model pro prostou difúzi, tj. bez zohlednění vlivu přechodu barviva do tripletního stavu.

Výkon laseru byl nastaven na 99 %, opakovací frekvence laserových pulsů byla 20 MHz, světelný výkon laseru byl nastaven na 3,1 μW a doba záznamu byla 400 sekund.

Tabulka 5.3: Parametry fitu volného barviva Rh6G v roztoku a uvnitř lipozomu.

| Parametr fitování | Vypočtené hodnoty fitu pro samotný Rh6G | Vypočtené hodnoty fitu pro Rh6G okolo lipozomů |
|----------------------------------|--|---|
| V_{eff} (fl) | 0,898 | 0,898 |
| ρ () | 0,398 | 0,787 |
| τ_{diff} (ms) | 0,110 | 5,800 |
| κ () | 2,760 | 2,760 |
| N () | 2,510 | 1,035 |
| C (nM) | 4,640 | 1,910 |
| w_0 (μm) | 0,388 | 0,388 |
| z_0 (μm) | 1,070 | 1,070 |
| D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | 343,0 | 6,500 |



Obrázek 5.3: Porovnání průběhů autokorelační funkce a zobrazená rezidua, a) Rh6G ve vodě, b) Rh6G ve vzorku obsahující neznačené lipozomy

Jak je patrné z pozorování obou grafů v obrázku 5.3, přítomnost lipozomů měla značný vliv na tvar autokorelační funkce. V případě absence interakce barviva s lipozomy by byl difúzní čas pro Rhodamin 6G shodný pro oba vzorky. Vzhledem k tomu, že jak Rhodamin 6G, tak Rhodamin B (není zde ukázáno) vykazovaly silnou afinitu k lipozomům, bylo do experimentálního plánu zařazeno testování vlivu pH na tuto interakci. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v následující sekci.

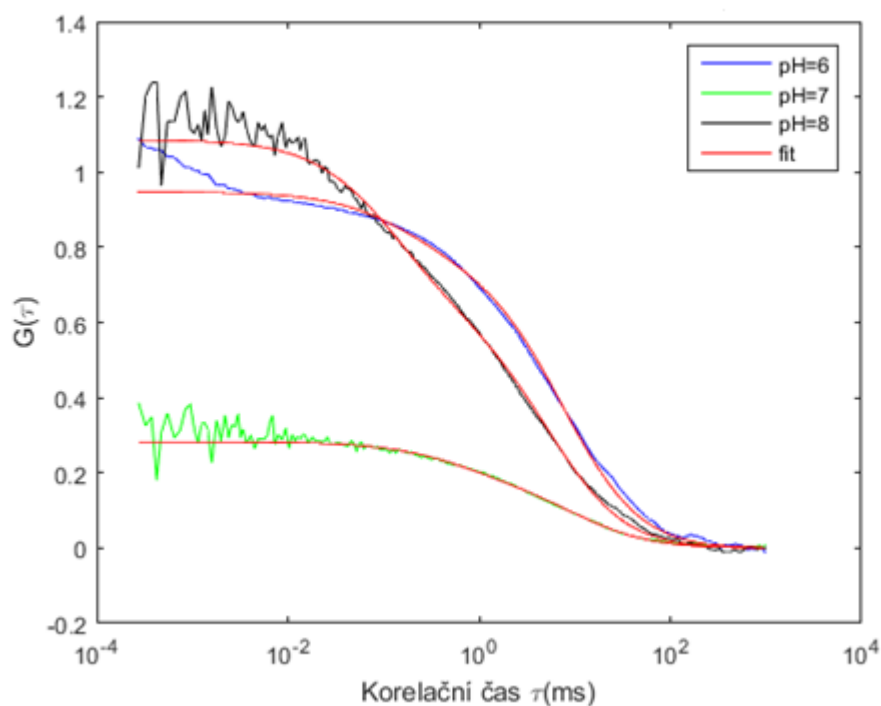
5.3 Vliv pH na interakci barviva s lipozomy

Vzhledem k tomu, že interakce Rhodaminu B a 6G s membránou je podle předpokladu elektrostatického charakteru, bylo experimentálně testováno, zda a jaký má pH pufru vliv na tuto interakci. Byly testovány pufrы o pH 6 a 8, přičemž okolo lipozomů volně difundovalo barvivo Rh6G. Naměřené autokorelační funkce byly aproximovány matematickým modelem pro prostou difúzi dvěma difúzními časy z důvodu předpokládané interakce částic barviva s lipidovou membránou. Jedním příspěvkem bylo volně difundující barvivo (kratší difúzní čas), druhým bylo barvivo asociované s membránou, které tudíž sleduje difúzní pohyb lipozomů.

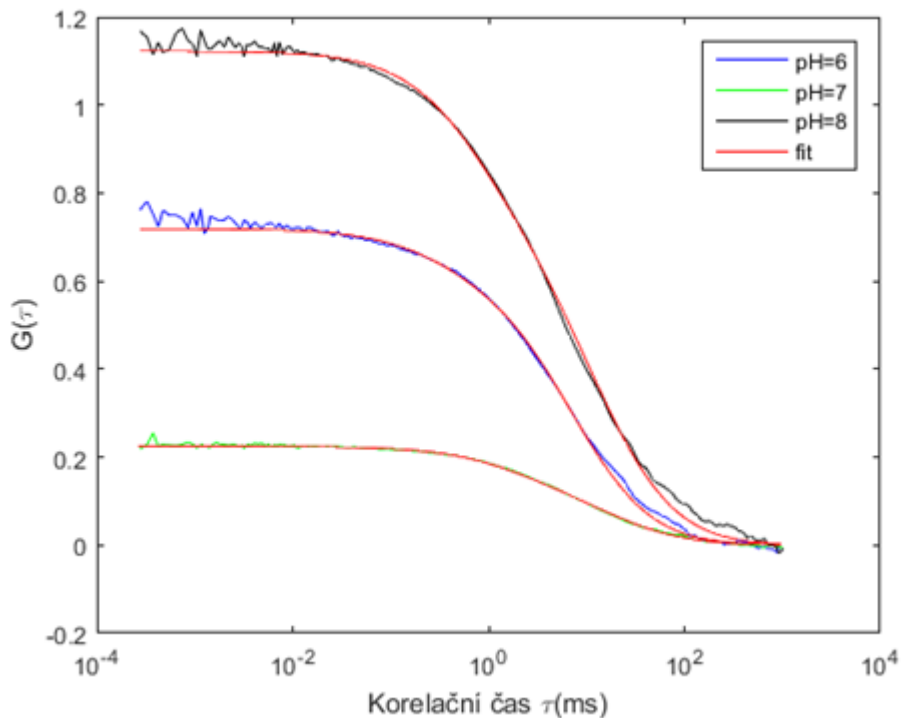
Měření bylo provedeno na mikroskopu MicroTime 200. Na všechna měření byl použit objektiv 60x zvětšující s vodní imerzí a filtr BP (pásmová propust) 575/50 nm. Světelný výkon laseru byl nastaven na 3,1 μ W, doba měření byla 300 sekund a opakovací frekvence pulzů byla 20 MHz.

Tabulka 5.4: Teoretické hodnoty fitu barviva Rh6G v pufrách v různých pH.

| Parametr fitování | Vypočtené hodnoty fitu pro Rh6G pH = 6 | | Vypočtené hodnoty fitu pro Rh6G pH = 7 | | Vypočtené hodnoty fitu pro Rh6G pH = 8 | |
|----------------------------|--|-------|--|-------|--|-------|
| | POPC | DOPS | POPC | DOPS | POPC | DOPS |
| V_{eff} (fl) | 0,898 | 0,898 | 0,898 | 0,898 | 0,898 | 0,898 |
| ρ_1 (°) | 0,174 | 0,107 | 0,101 | 0,092 | 0,452 | 0,399 |
| ρ_2 (°) | 0,773 | 0,611 | 0,181 | 0,132 | 0,634 | 0,723 |
| τ_{diff1} (ms) | 0,180 | 0,360 | 0,640 | 2,100 | 0,130 | 0,849 |
| τ_{diff2} (ms) | 7,900 | 7,600 | 11,00 | 19,00 | 5,600 | 14,00 |
| κ (°) | 2,760 | 2,760 | 2,760 | 2,760 | 2,760 | 2,760 |
| N (°) | 1,060 | 1,390 | 3,540 | 4,460 | 0,921 | 0,891 |
| C (nM) | 1,950 | 2,570 | 6,550 | 8,240 | 1,700 | 1,650 |
| w_0 (μm) | 0,388 | 0,388 | 0,388 | 0,388 | 0,388 | 0,388 |
| z_0 (μm) | 1,070 | 1,070 | 1,070 | 1,070 | 1,070 | 1,070 |
| D_1 (μm ² /s) | 205,0 | 106,0 | 58,00 | 18,00 | 290,0 | 44,00 |
| D_2 (μm ² /s) | 4,700 | 5,000 | 3,500 | 2,000 | 6,700 | 2,800 |



Obrázek 5.4: Autokorelační funkce fluorescence barviva Rh6G ve vzorku obsahující lipozomy připravené z lipidů POPC v různém pH.

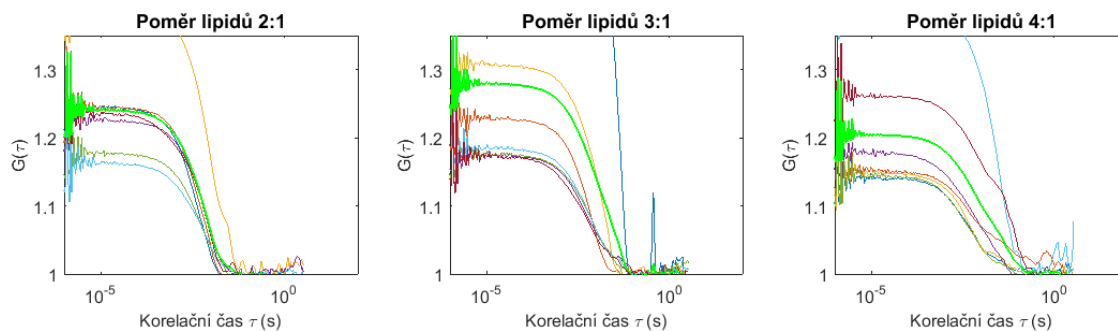


Obrázek 5.5: Autokorelační funkce fluorescence barviva Rh6G ve vzorku obsahující lipozomy připravené z lipidů DOPS v různém pH.

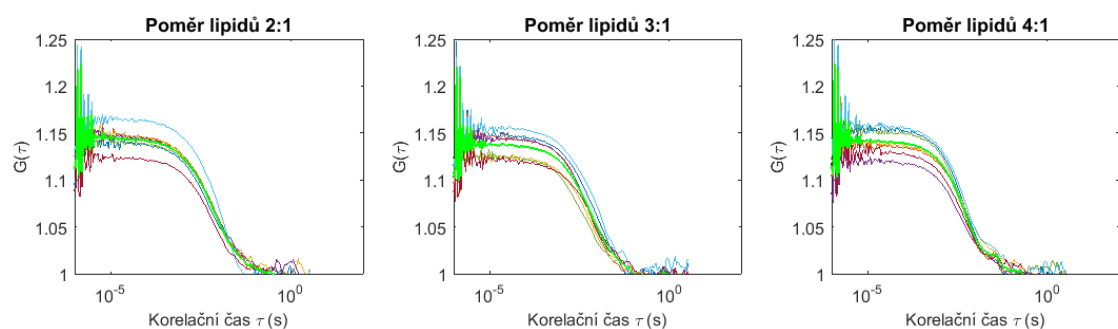
5.4 Vliv chelatačního činidla EDTA na přípravu lipozomů

Hydrofilní barvivo AlexaFluor 488 na rozdíl od Rhodaminových barviv nevykazovalo žádnou interakci s lipozomy (data neuvedena). Nicméně stále nebylo dosaženo optimálních výsledků ve smyslu reprodukovatelné přípravy monodisperzních lipozomů. Před samotným sledováním několikadenní stability vzorku bylo nejprve nutné optimalizovat proces přípravy. Jedním z důležitých parametrů se ukázala být koncentrace chelatačního činidla v pufru během přípravy lipozomů.

V experimentu byly porovnány autokorelační funkce naměřené s lipozomy značenými pouze lipofilním barvivem DiO na systému ConfoCor 2 s excitační vlnovou délkou 475 nm, které byly připraveny totožným způsobem a liší se množstvím přidaného činidla EDTA do pufru před přípravou. Z celkového naměřeného průběhu intenzity fluorescence bylo vypočteno 10 parciálních autokorelačních funkcí, z nichž každá je vypočtena z jednoho úseku o délce 1/10 z celkové doby měření. Pro monodisperzní vzorek (obsahující pouze lipozomy o jedné velikosti, tj. bez agregátů) by se parciální korelační funkce překrývaly. Průměr těchto parciálních korelací (v grafech na obr. 5.7 je vynesena zelenou čarou) tedy představuje autokorelační funkci vypočtenou z celého měření.



Obrázek 5.6: Koncentrace EDTA v pufru 2 μM



Obrázek 5.7: Koncentrace EDTA v pufru 5 μM

5.5 Stabilita fluorescenčně značených lipozomů

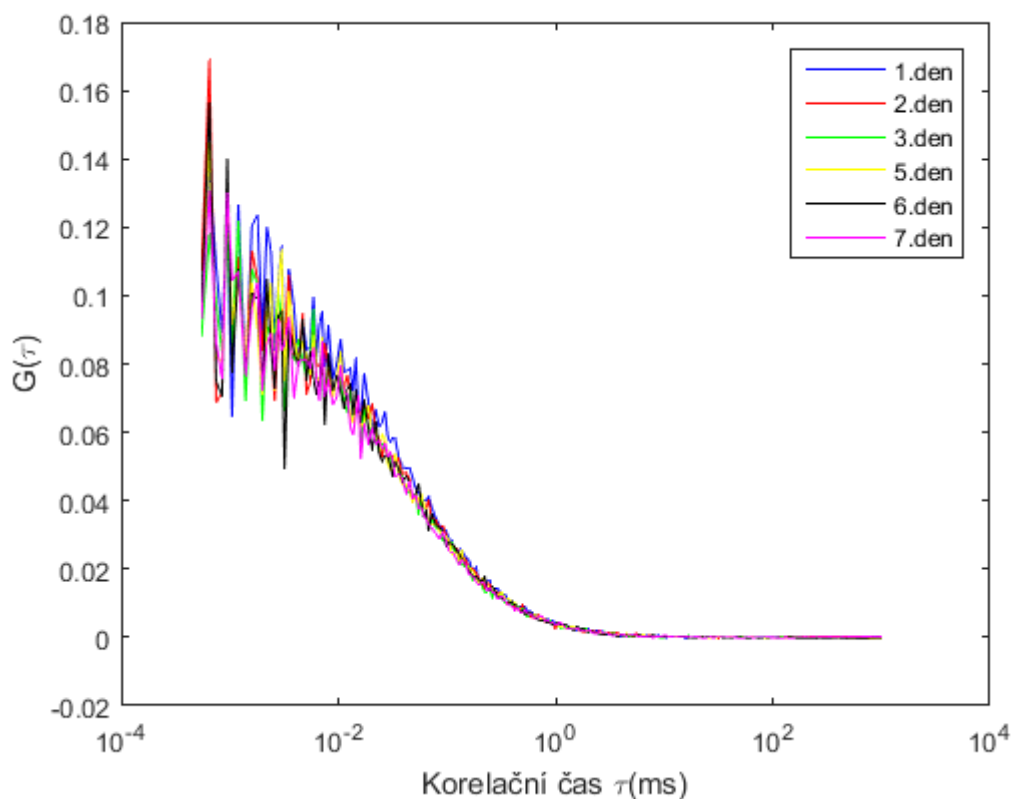
Po optimalizaci přípravy fluorescenčně značených lipozomů a podmínek měření bylo možné provést samotné několikadenní měření za účelem zjistit stabilitu připraveného vzorku z hlediska reprodukovatelnosti výsledků FCS analýzy. Byly připraveny dva typy vzorků: a) lipozomy složené z DOPS a POPC v různých poměrech a obsahující hydrofilní barvivo AlexaFluor 488 uzavřené ve vnitřním prostoru, b) lipozomy o stejném lipidovém složení, ale značené zároveň lipofilním barvivem DiO a hydrofilním barvivem AlexaFluor 488, opět uzavřené ve vnitřním prostoru lipozomů. Vzorky značené pouze hydrofilním barvivem byly připraveny za účelem monitorování případného postupného úniku barviva ven z váčků. Zároveň mohou sloužit pro porovnání s druhým typem vzorku, neboť lze očekávat, že u něj bude hydrofilní barvivo unikat z lipozomů ve stejné míře. U lipozomů značených dvěma barvivy lze díky přítomnosti barviva, vázaného na membránu sledovat případné fúzování či úbytek lipozomů.

Před každým měřením byl nejprve změřen standardní vzorek, tedy barvivo AlexaFluor 488 ve vodném roztoku. Překrýváním autokorelačních křivek z každého měření bylo ověřeno totožné nastavení aparatury mikroskopu po několikadenní měření.

Vzorky připravené postupem popsaném v sekci 4.2 a určené k měření sedmidenní stability byly mezi jednotlivými měřeními uchovávány v lednici, pouze před samotným měřením byly vystaveny pokojové teplotě na 15 minut.

Tabulka 5.5: Parametry fitu barviva AlexaFluor 488 ve vodě – bez lipozomů

| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff} (ms) | 0,060 | 0,062 | 0,061 | 0,063 | 0,064 | 0,062 |
| ρ () | 0,097 | 0,090 | 0,088 | 0,088 | 0,086 | 0,085 |
| χ^2 () | 2,087 | 3,092 | 1,762 | 2,390 | 2,397 | 2,123 |

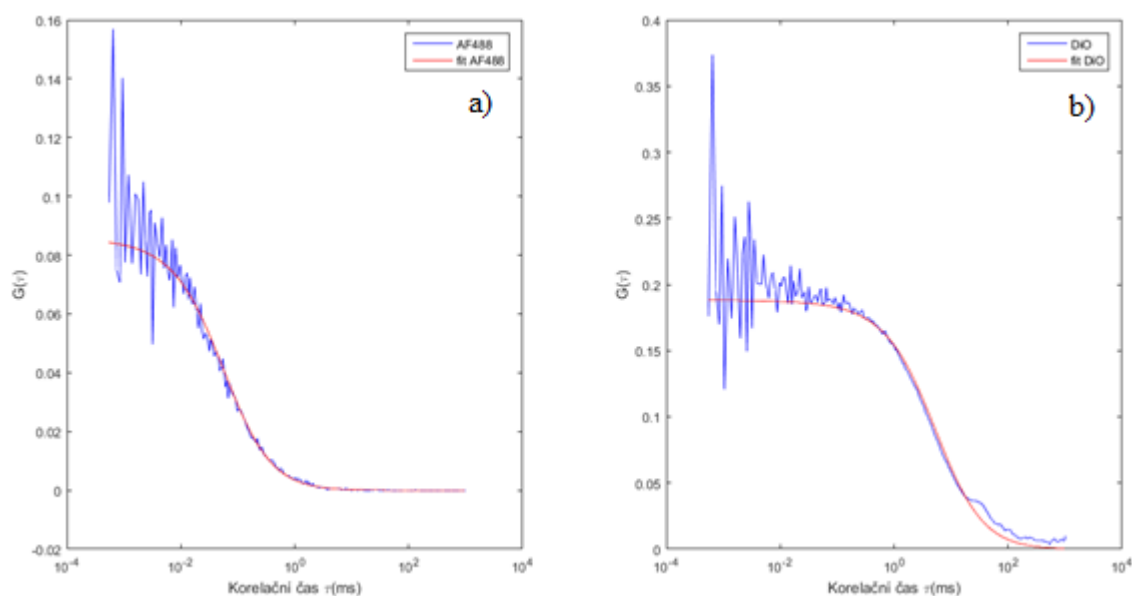


Obrázek 5.8: Referenční měření - autokorelační funkce fluorescence barviva AlexaFluor 488 ve vodě – porovnání autokorelační funkce v průběhu sedmi dnů

Před provedením hlavního experimentu byly naměřeny lipozomy značené pouze lipofilním barvivem DiO (měřeno 21.4.), protože křivka dohasínání fluorescence DiO je nezbytná pro statistickou analýzu FLCS dat. V tabulce 5.6 jsou uvedeny parametry fitu barviva AlexaFluor ve vodném roztoku (měřeno 10.5.) a lipozomů značených lipofilním barvivem DiO. Na grafu 5.9 jsou porovnány autokorelační funkce fluorescence pro oba vzorky.

Tabulka 5.6: Fit autokorelační funkce pro AF488 ve vodě a DiO v membráně

| Parametr fitování | Vypočtené hodnoty fitu barviva AlexaFluor 488 ve vodě | Vypočtené hodnoty fitu lipozomů značených barvivem DiO |
|----------------------------------|---|--|
| V_{eff} (fl) | 1,269 | 1,269 |
| ρ () | 0,086 | 0,188 |
| τ_{diff} (ms) | 0,064 | 6,030 |
| κ () | 8,323 | 8,323 |
| N () | 11,63 | 5,309 |
| C (nM) | 15,22 | 6,947 |
| w_0 (μm) | 0,301 | 0,301 |
| z_0 (μm) | 2,509 | 2,509 |
| D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | 355,0 | 3,800 |



Obrázek 5.9: Fit autokorelační funkce, a) barvivo AlexaFluor 488 ve vodě, b) lipozomy značené barvivem DiO, parametry uvedeny v tabulce 5.6

5.5.1 Vzorky značeny pouze hydrofilním barvivem

Předpokládáme, že lipozomy připravené postupem popsáním v 4.2 obsahují kromě barviva zapouzdřeného uvnitř i volně difundující molekuly barviva vně lipozomů, a to z důvodu nedokonalého promytí v dialyzační kazetě. Přitom jsme dále předpokládali, že s postupem času bude barvivo nacházející se ve vnitřním prostoru lipozomů postupně uvolňováno a podíl volně difundujícího barviva se bude ve sledovaném časovém rozmezí

zvětšovat. Z tohoto důvodu byl na naměřená data aplikován model fitu pro prostou difúzi se dvěma komponentami.

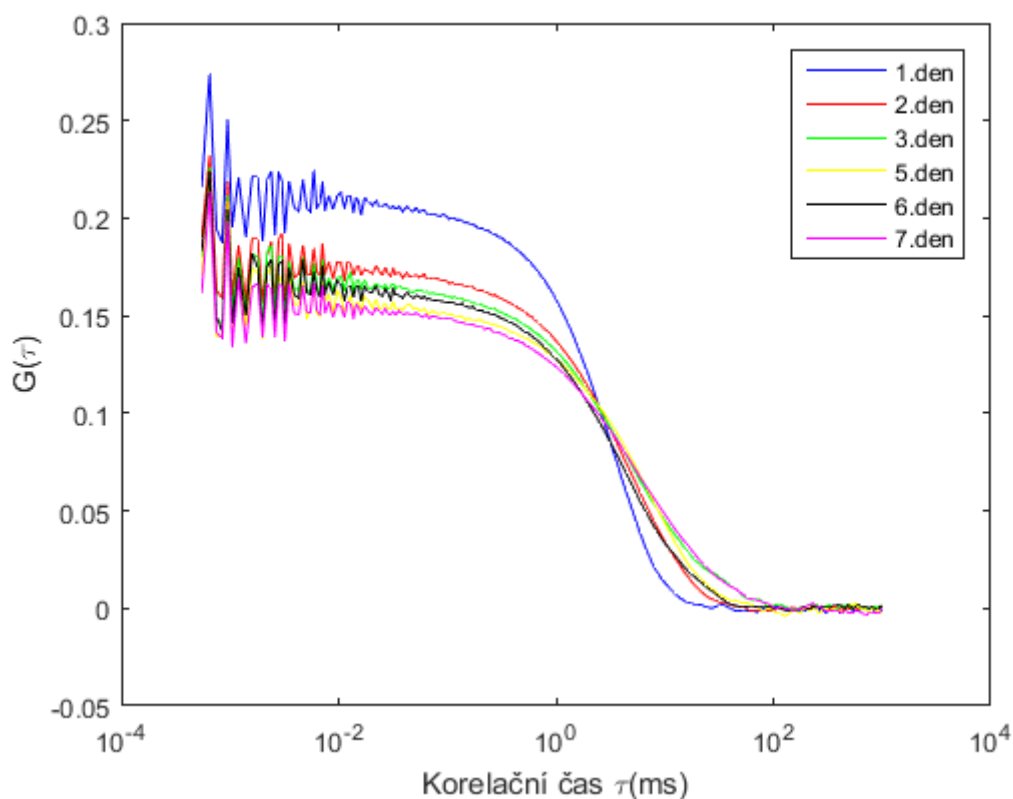
Intenzita laseru byla nastavena na 3,5. Doba záznamu byla 200 s. Intenzita fluorescence při měření je zaznamenána v tabulce 5.7.

Tabulka 5.7: Hodnoty intenzity fluorescence při měření

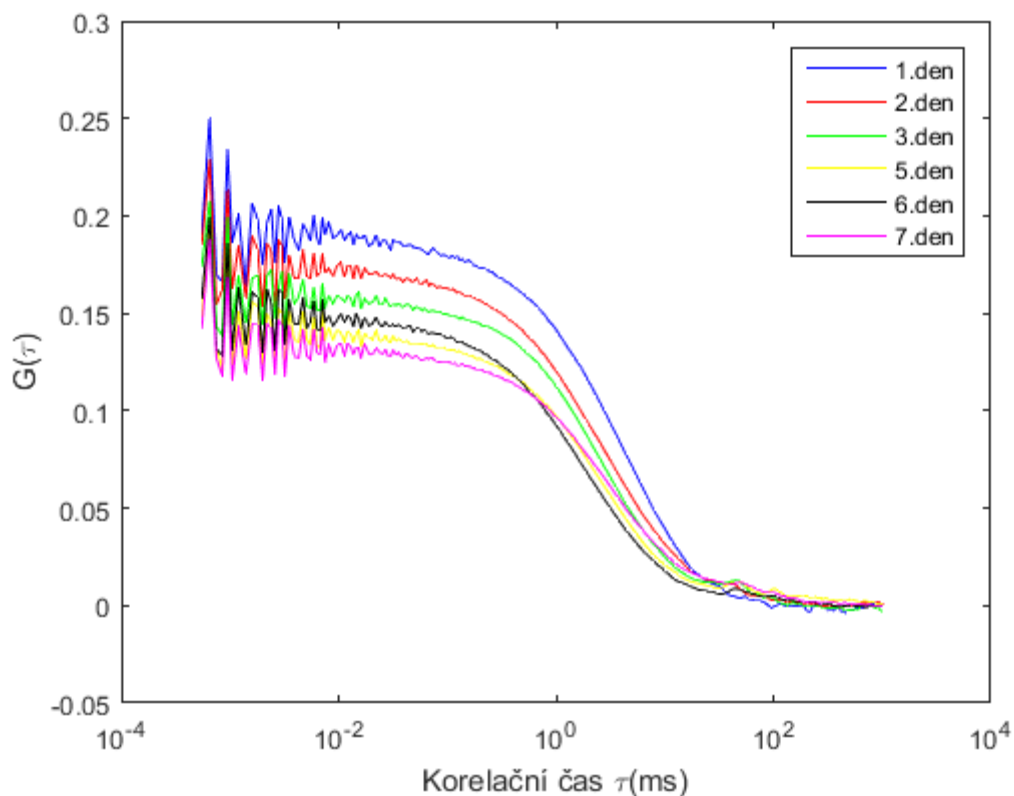
| Poměr lipidů (POPC:DOPS) | 1.měření (kcps) | 2.měření (kcps) | 3.měření (kcps) | 4.měření (kcps) | 5.měření (kcps) | 6.měření (kcps) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2:1 | 70 | 70 | 80 | 80 | 85 | 80 |
| 3:1 | 55 | 60 | 60 | 65 | 70 | 70 |
| 4:1 | 50 | 65 | 65 | 75 | 70 | 75 |

Tabulka 5.8: Parametry fitu AF488 - poměr lipidů 2:1 (POPC:DOPS)

| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| τ_{diff1} (ms) | 2,970 | 4,245 | 4,530 | 5,709 | 4,041 | 5,280 |
| τ_{diff2} (ms) | 2,910 | 4,240 | 4,790 | 5,707 | 4,044 | 5,310 |
| ρ_1 () | 0,207 | 0,175 | 0,001 | 0,057 | 0,100 | 0,010 |
| ρ_2 () | 0,010 | 0,001 | 0,166 | 0,100 | 0,066 | 0,144 |
| χ^2 () | 69,27 | 37,51 | 12,39 | 16,87 | 32,01 | 12,33 |

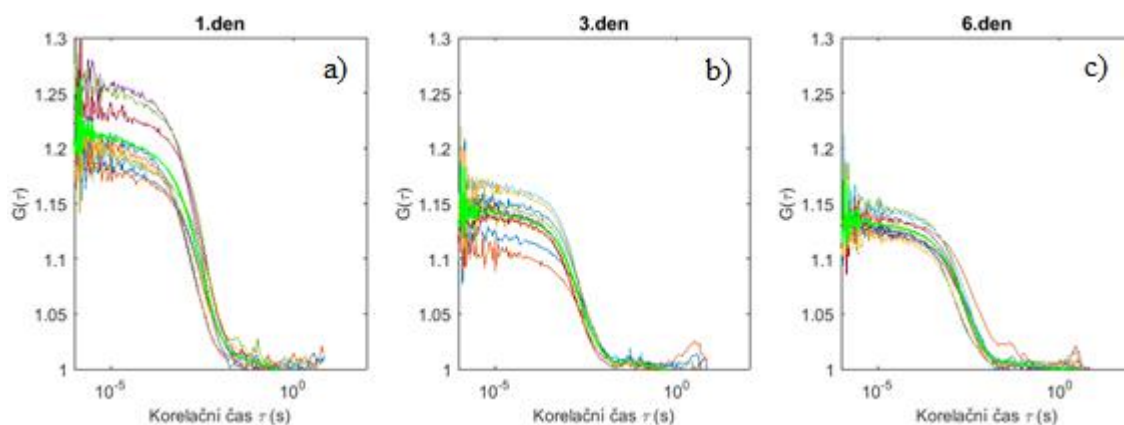


Obrázek 5.10: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 2:1 (POPC:DOPS)



Obrázek 5.11: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS)

Na následujícím obrázku je zobrazena stabilita vzorku v průběhu jednoho měření. Celková doba měření byla rozdělena do deseti stejně dlouhých úseků a z každého byla vypočtena autokorelační funkce.



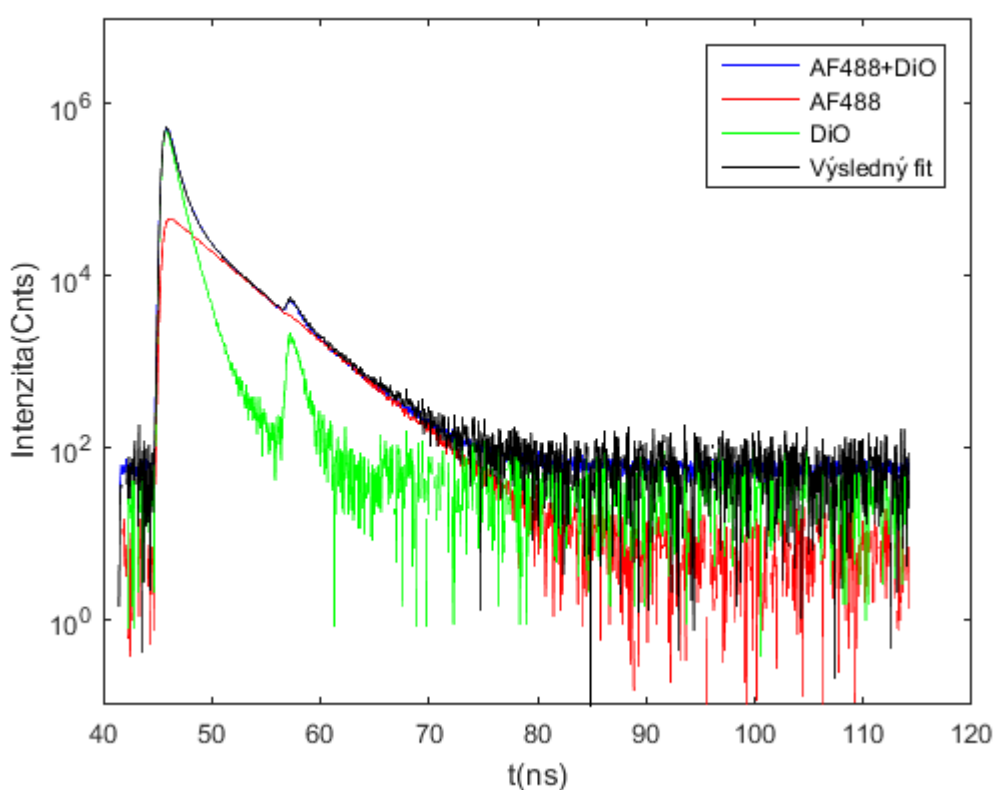
Obrázek 5.12: Stabilita během jednoho měření vyjádřena autokorelační funkcí – poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS), a) měření 1.den, b) měření 3.den, c) měření 6.den

5.5.2 Vzorčky značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem

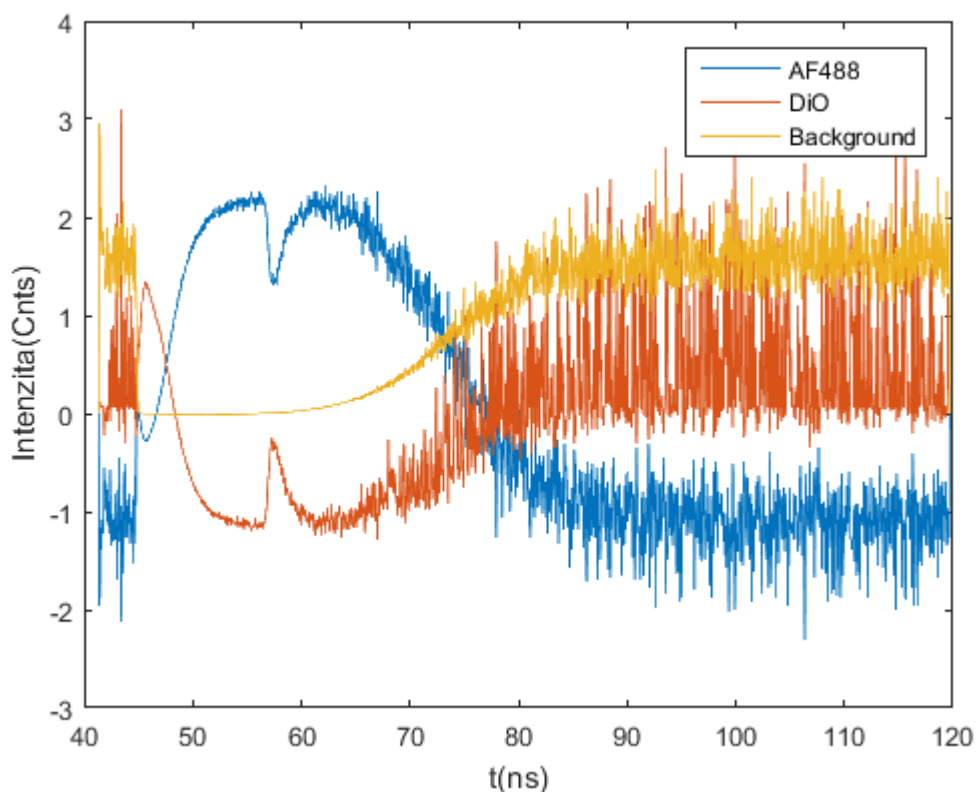
Intenzita laseru byla nastavena na 3,5. Doba záznamu byla 120 s. Intenzita fluorescence při měření je zaznamenána v tabulce 5.9.

Tabulka 5.9: Hodnoty intenzity fluorescence při měření

| Poměr lipidů (POPC:DOPS) | 1.měření (kcps) | 2.měření (kcps) | 3.měření (kcps) | 4.měření (kcps) | 5.měření (kcps) | 6.měření (kcps) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2:1 | 180 | 200 | 200 | 220 | 265 | 275 |
| 3:1 | 125 | 160 | 150 | 165 | 165 | 170 |
| 4:1 | 115 | 150 | 140 | 155 | 160 | 165 |



Obrázek 5.13: Křivky dohasínání fluorescence naměřené pro lipozomy značené zároveň hydrofilní AlexaFluor 488 a lipofilním DiO (modrá), samotná AlexaFluor488 ve vodě (červená), lipozomy značené pouze DiO (zelená) a fit (černá), který je aritmetickým součtem křivek dohasínání naměřených pro jednotlivá barviva. Na základě parametrů tohoto fitu jsou následně vypočteny statistické filtry pro FLCS analýzu.



Obrázek 5.14: Ukázka vypočtených statistických filtrů, na jejichž základě dochází k přiřazení detekovaných fotonů danému barvivu

Před zpracováním byla provedena kalibrace, která spočívá ve výpočtu parametrů detekčního objemu na základě naměřeného difúzního času barviva se známým difúzním koeficientem (se standardním vzorkem). Reprezentativní parametry pro kalibraci získané pro systém ConfoCor 2 na základě autokorelačních křivek pro barvivo AlexaFluor 488 jsou uvedeny v tab. 5.10.

Tabulka 5.10: Parametry detekovaného objemu

| | |
|-------------------------|-------|
| V_{eff} (fl) | 1,267 |
| z_0 (μm) | 2,503 |
| w_0 (μm) | 0,301 |
| κ () | 8,304 |

Hodnoty fitu barviva DiO:

Tabulka 5.11: Parametry fitu DiO – poměr lipidů 2:1 (POPC:DOPS)

| DiO | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| τ_{diff} (ms) | 4,760 | 4,850 | 3,600 | 1,670 | 0,625 | 5,600 |
| ρ () | 0,161 | 0,127 | 0,145 | 0,137 | 0,135 | 0,067 |
| χ^2 () | 41,09 | 70,44 | 54,14 | 46,43 | 56,20 | 86,86 |

Tabulka 5.12: Parametry fitu DiO – poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS)

| DiO | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff} (ms) | 4,350 | 4,680 | 5,010 | 4,900 | 3,560 | 4,250 |
| ρ () | 0,248 | 0,181 | 0,203 | 0,174 | 0,192 | 0,164 |
| χ^2 () | 18,57 | 53,12 | 25,13 | 25,97 | 40,94 | 29,68 |

Tabulka 5.13: Parametry fitu DiO – poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS)

| DiO | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff} (ms) | 3,880 | 6,720 | 5,390 | 4,450 | 3,460 | 5,280 |
| ρ () | 0,264 | 0,195 | 0,207 | 0,156 | 0,196 | 0,149 |
| χ^2 () | 27,28 | 37,26 | 38,43 | 66,07 | 35,28 | 19,70 |

Hodnoty fitu barviva AF488:

Tabulka 5.14: Parametry fitu AF488 – poměr lipidů 2:1 (POPC:DOPS)

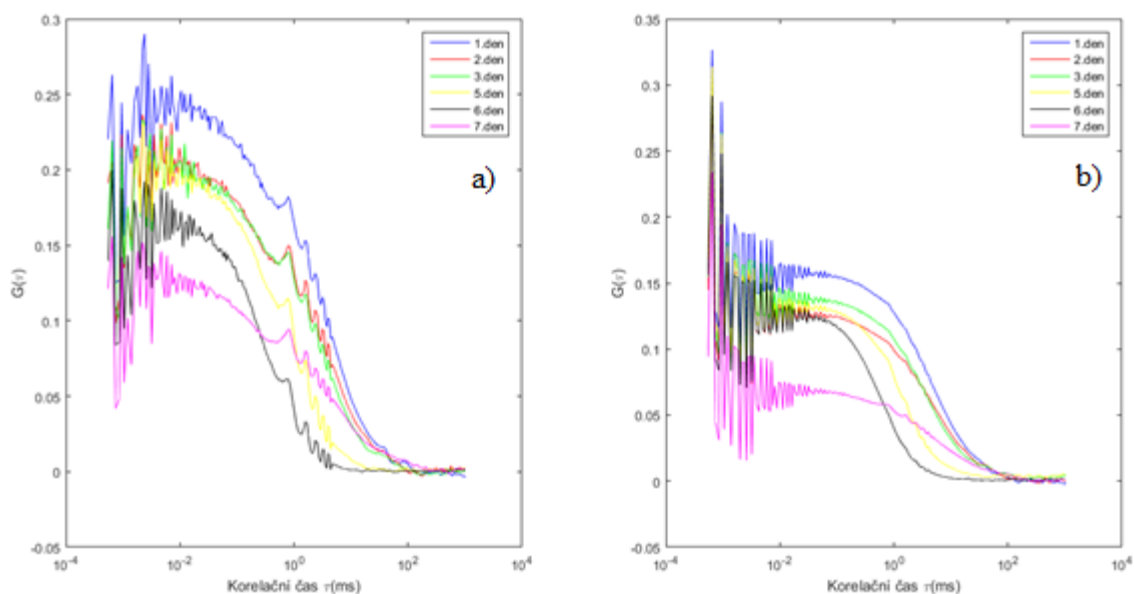
| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff1} (ms) | 4,510 | 4,700 | 3,190 | 0,870 | 0,330 | 5,700 |
| τ_{diff2} (ms) | 0,094 | 0,080 | 0,069 | 0,023 | 0,330 | 0,030 |
| ρ_1 () | 0,199 | 0,160 | 0,170 | 0,188 | 0,010 | 0,100 |
| ρ_2 () | 0,051 | 0,056 | 0,035 | 0,023 | 0,167 | 0,037 |
| χ^2 () | 6,894 | 16,38 | 7,294 | 8,306 | 13,52 | 17,86 |

Tabulka 5.15: Parametry fitu AF488 - poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS)

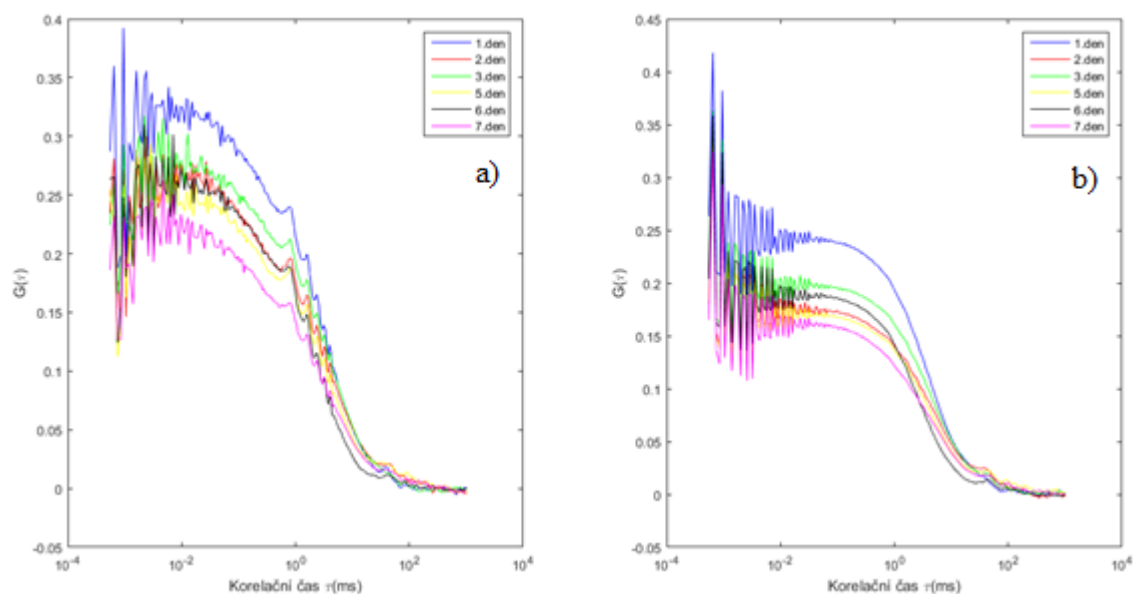
| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff1} (ms) | 0,044 | 0,163 | 0,045 | 0,060 | 0,044 | 0,107 |
| τ_{diff2} (ms) | 3,400 | 5,500 | 3,600 | 4,350 | 2,760 | 4,440 |
| ρ_1 () | 0,043 | 0,080 | 0,010 | 0,039 | 0,039 | 0,060 |
| ρ_2 () | 0,288 | 0,195 | 0,260 | 0,216 | 0,234 | 0,173 |
| χ^2 () | 9,782 | 6,565 | 10,19 | 7,056 | 11,07 | 3,892 |

Tabulka 5.16: Parametry fitu AF488 - poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS)

| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| τ_{diff1} (ms) | 0,063 | 0,080 | 0,090 | 0,090 | 0,050 | 0,090 |
| τ_{diff2} (ms) | 3,200 | 5,000 | 5,220 | 4,280 | 2,420 | 3,560 |
| ρ_1 () | 0,028 | 0,052 | 0,033 | 0,051 | 0,030 | 0,010 |
| ρ_2 () | 0,254 | 0,192 | 0,205 | 0,167 | 0,195 | 0,160 |
| χ^2 () | 5,361 | 21,73 | 3,849 | 8,989 | 13,51 | 9,568 |

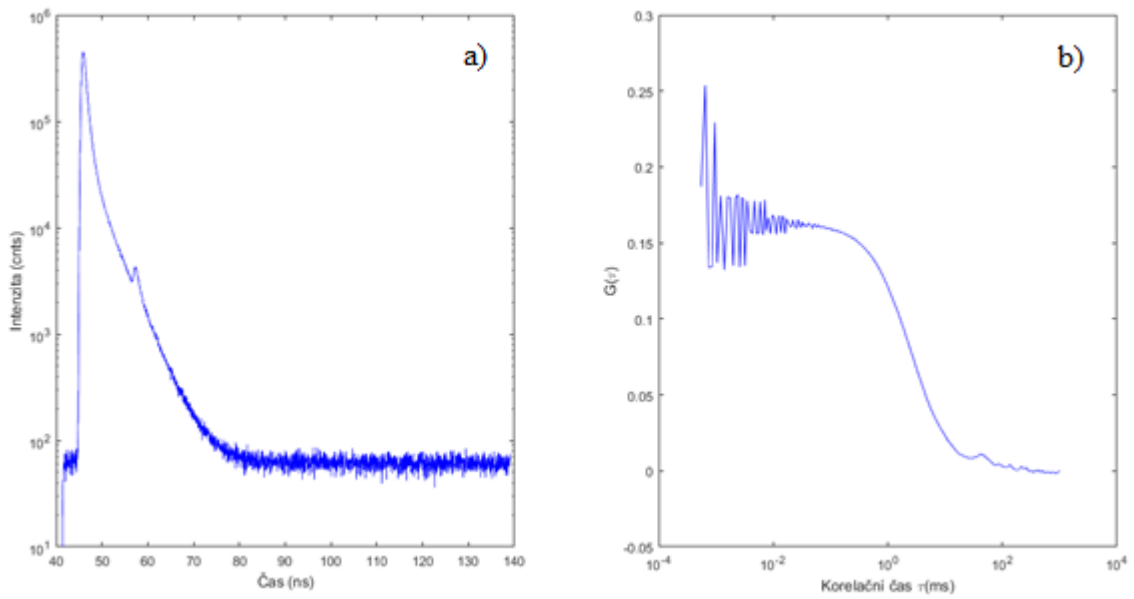


Obrázek 5.15: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 2:1 (POPC:DOPS), a) AF488, b) DiO

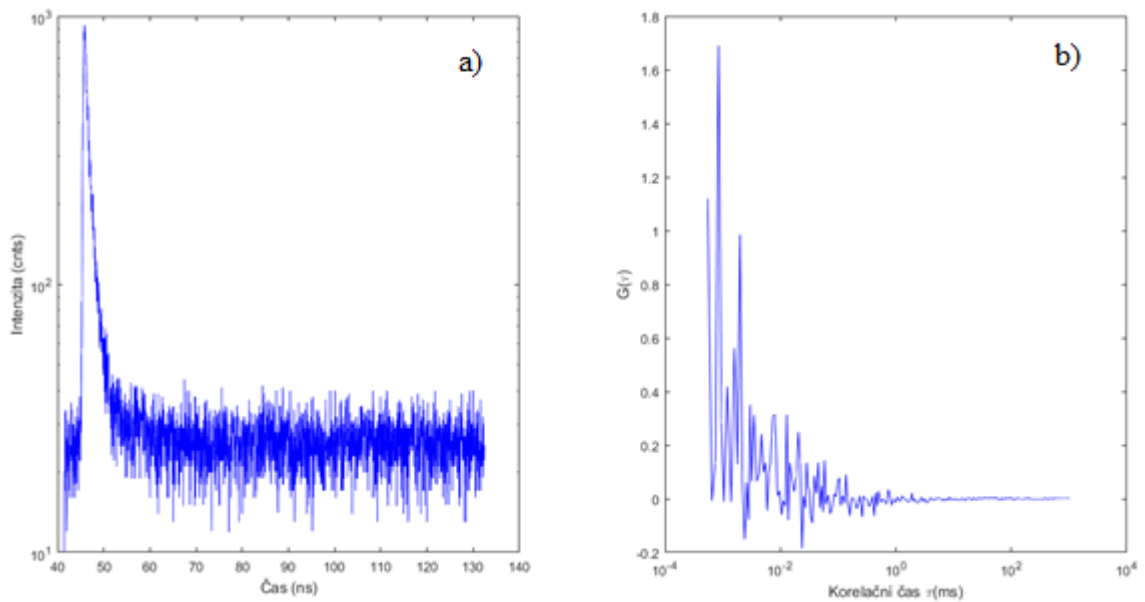


Obrázek 5.16: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS), a) AF488, b) DiO

Na konci měření byl ke každému vzorku přidán detergent Triton X, který způsobil destrukci lipozomů. Na obrázku 5.17 a 5.18 je porovnání dohasínání fluorescence vzorku před a po přidání detergentu. Také jsou zde porovnány autokorelační funkce.



Obrázek 5.17: a) Průběh dohasínání fluoroforu před přidáním detergentu (6.den),
 b) Autokorelační funkce před přidání detergentu



Obrázek 5.18: a) Průběh dohasínání fluoroforu po přidání detergentu (7.den),
 b) Autokorelační funkce po přidání detergentu

6 Diskuse

Nejprve byla pomocí FCS měřena difúze lipozomů značených lipofilním barvivem DiI. K měření byl použit systém MicroTime 200 vybavený laserem o vlnové délce 531 nm. Tato pilotní měření sloužila k prvotní optimalizaci přípravy vzorku a nalezení podmínek měření poskytující uspokojivé výsledky, které byly v souladu s předpokladem – experimentálně naměřené difúzní časy se přibližně shodovaly s teoreticky vypočtenou hodnotou pro difúzi 100 nm částic.

Poté byla metodou FLCS měřena difúze lipozomů obsahující hydrofilní barvivo Rhodamin B (respektive Rhodamin 6G) a zároveň byly značené DiI. Pokud je předpokládáno zapouzdření barviva dovnitř váčků, měly by molekuly fluoroforu sledovat difúzní pohyb samotných lipozomů, tedy korelační časy naměřené pro DiI a Rhodamin by se měly shodovat. Experimentálně zjištěná hodnota difúzního času pro Rhodamin byla 6,5 ms, což se poměrně dobře shoduje s naměřeným časem 8,5 ms pro difúzi DiI, tedy barviva obsaženého v membráně lipozomů.

Nicméně následným testem, kdy do vzorku obsahujícího neznačené lipozomy bylo přidáno volné (nezapouzdřené v lipozomech) hydrofilní barvivo Rhodamin 6G a B, bylo zjištěno, že difúzní čas barviva (5,8 ms) je mnohem delší, než by odpovídalo difúzi nevázaného barviva (146 μ s v případě Rhodaminu 6G) a shoduje se poměrně dobře s hodnotou naměřenou pro značené lipozomy. Barviva Rhodamin 6G a B tedy ve značené míře asociují s fosfolipidovou membránou, a to i při různých pH. V tomto případě by tedy nebylo možné vyhodnotit, kdy dojde k narušení membrány lipozomu a vylití zapouzdřeného objemu do okolního roztoku. Rhodaminová barviva nejsou pro splnění cíle práce vhodná.

V následujícím experimentu byl proveden test pufrů o různých pH. Změna pH by měla mít vliv na chování nabitých sloučenin. Byly testovány pufrы o pH 6 a 8 na jednotlivé typy použitých lipidů. Difúzní časy jednoho příspěvku autokorelační funkce se pohybovaly rychlostí samotného difundujícího barviva, které bylo rozptýlené okolo lipozomů. Oproti tomu hodnoty druhých příspěvků prokazují interakci s lipidovou membránou. Testované pufrы neprokázaly kvalitativní vliv na chování námi použité kombinace lipidů a hydrofilních barviv.

V oddílu 5.4 jsou popsány výsledky testu stability lipozomů připravených z pufru, který obsahoval různé koncentrace chelatačního činidla EDTA. Každý graf na obrázcích 5.6 a 5.7 znázorňuje průběh jednoho měření, které bylo rozděleno do deseti stejně dlouhých časových intervalů, přičemž z každého byla vypočtena autokorelační funkce. V jednotlivých grafech je zobrazeno 11 křivek autokorelační funkce, z nichž deset je naměřených ze vzorku a jedna (tučná výrazně zelená) je vypočtený průměr z ostatních. Z grafu lze rozpoznat chování lipozomů v řádu desítek sekund, které také do určité míry

vypovídá o jejich stabilitě i o monodisperzitě čerstvě připraveného vzorku. Na prvním obrázku jsou zobrazeny lipozomy, ve kterých byla koncentrace činidla EDTA 2 μM . Na první pohled je zřejmé, že tato koncentrace je příliš nízká na zabránění tvorby shluků. Na druhém obrázku byla koncentrace činidla 5 μM a je patrné, že toto množství podporuje ustálené chování vzorku.

V oddílu 5.5 jsou uvedeny srovnání opakovaných měření difúze značených lipozomů po dobu sedmi dnů. Testování vzorků bylo uskutečněno v ranních hodinách a mezi jednotlivými měřeními byly vzorky uchovávány v lednici.

Jako nejvíce stabilní se jeví lipozomy připravené ze směsi lipidů v poměru 3:1 (POPC:DOPS). Vyrovnanost v chování těchto lipidů byla prokázána v případě značení lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem. Z hodnot difúzních časů uvedených v tabulce 5.12 vyplývá, že po dobu sedmi dnů lipozomy difundovaly srovnatelnou rychlostí, bez viditelných výkyvů. Z toho vyplývá, že částice ve vzorku mají podobnou velikost a nevytváří shluky, hovoříme tedy o relativně monodisperzním roztoku. Další indikátor stability je zřejmý z tabulky 5.15, kde z hodnot difúzních časů τ_{diff1} a τ_{diff2} bylo po celou dobu měření možné rozeznat barvivo AF488, které se nacházelo uvnitř lipozomů nebo bylo rozptýlené okolo váčků. Hodnoty tohoto parametru pro barvivo rozptýlené okolo váčků jsou desítky mikrosekund, oproti tomu barvivo uvnitř lipozomů se průměrně vyskytuje v detekovaném objemu po dobu 4 milisekund. Vzhledem k tomu, že před měřením stability nebyla prokázána interakce mezi barvivem a fosfolipidovou membránou, vyjadřuje tato hodnota také difúzi molekul barviva ve vodném prostředí uvnitř lipozomu.

O poznání méně stabilní z hlediska reprodukovatelnosti FCS analýzy se jeví lipozomy připravené ze směsi lipidů v poměru 2:1 (POPC:DOPS). Výsledky FCS analýzy jsou srovnatelné pouze během prvních tří dnů sledování. Poté došlo ke značné změně ve tvaru i parametrech korelačních funkcí odpovídající difúzi lipofilního i hydrofilního barviva. V případě značení těchto vzorků pouze hydrofilním barvivem bylo však naopak zjištěno, že jsou relativně stabilní po dobu 7 dnů a vzhledem k tomu, že fit zaznamenává příspěvek pouze jednoho barviva (vzájemně podobné hodnoty τ_{diff1} a τ_{diff2}) byla většina barviva vně lipozomů odstraněna dialýzou během přípravy vzorku a v průběhu sledované periody nedocházelo k úniku barviva z vnitřního prostoru lipozomů.

Vyhodnocením FCS naměřených dat pro lipozomy obsahující lipidy v poměru 4:1 (POPC:DOPS) byla zjištěna stabilita vzorků, které byly značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem. Z tabulky 5.16 jsou zřejmé větší výkyvy v průměrné době, po kterou se váčky vyskytují v detekovaném objemu. To značí větší rozdíly ve velikosti lipozomů, možný vznik agregátů a zhoršenou rovnováhu vzorku. V případě výsledků barviva AF488 je průkazné, že nedošlo k uvolnění barviva do roztoku, takže je možné vzorek považovat za stabilní po celou dobu pozorování.

Na obrázcích 5.10, 5.11, 5.15 a 5.16 jsou zobrazeny autokorelační funkce z šesti měření v průběhu jednoho týdne. Jednotlivé křivky mají podobný průběh, pouze dochází ke snížení amplitudy autokorelační křivky s následujícími měřeními. Hodnotu amplitudy vyjadřuje také parametr ρ , jehož hodnoty v tabulkách mají klesající trend. U prosté difúze monodisperzních částic (např. volně difundující barvivo) platí, že čím nižší je amplituda, tím vyšší je množství difundujících částic, tedy koncentrace barviva ve vzorku. Nicméně v případech, kdy jsou ve vzorku dvě a více populací částic difundujících různou rychlostí, je interpretace parametrů složitější – poměr těchto populací závisí mimo jiné také na poměru svítivosti jednotlivých složek. V případě hydrofilního barviva difundujícího vně lipozomů jde o difúzi jednotlivých molekul, zatímco lipozomy na začátku experimentu obsahují více molekul hydrofilního barviva, tzn. pomaleji difundující částice (značené lipozomy) mají větší svítivost oproti rychleji difundujícím částicím (jednotlivé molekuly barviva). Klesající amplituda autokorelačních křivek obsahujících dvě složky tedy může značit, že zapouzdřené barvivo v průběhu několikadenního pozorování postupně uniká z vnitřku lipozomů. Je to v souladu s předchozími pozorováními [33], kdy membrána byla narušená působením antimikrobiálního peptidu, přičemž při zvyšující se koncentraci peptidu byl u autokorelační funkce hydrofilního barviva pozorován podobný trend jako v obrázku 5.10, 5.11, 5.15 a 5.16.

Matoucí je nicméně shoda trendu autokorelačních křivek získaných pro hydrofilní a lipofilní barvivo pomocí FLCS analýzy, viz např. obrázek 5.15 a) oproti b). Dále také rozdíl oproti měřením pouze s hydrofilním barvivem, obrázek 5.15 a) a obrázek 5.10, které by podle předpokladu měly dát shodné výsledky. Vzhledem k těmto nesrovnalostem je nutno zpochybnit platnost FLCS analýzy. Výhledově by bylo přínosné experimenty zopakovat, přičemž by byly připraveny a monitorovány tři typy vzorků: a) lipozomy značené hydrofilním barvivem, b) lipozomy značené pouze lipofilním barvivem, c) lipozomy značené hydrofilním i lipofilním barvivem.

Výsledky FLCS analýzy jsou diskutabilní také vzhledem k výsledkům bakalářské práce mého spolužáka Tomáše Maliny. Jeho práce se zabývá vlastnostmi detektorů pro čítání jednotlivých fotonů a mimo jiné z ní vyplývá, že systém ConfoCor 2 je vybaven detektorem, jehož časové charakteristiky mohou zavést významné artefakty do korelačních měření pomocí FLCS. Bylo by tudíž vhodné provést srovnávací experimenty také na systému MicroTime 200 poté, co bude nalezeno vhodné hydrofilní barvivo excitovatelné na 531 nm.

Oscilace na začátku grafu jsou v důsledku menšího množství fotonů, které mezi sebou mají takto krátký časový interval. Momentálně není známý původ oscilací, které se nacházejí přibližně v polovině křivek autokorelační funkce AF488 u lipozomů značených oběma barvivy získané během FLCS analýzy. Na obrázku 5.15 jsou v porovnání s obrázkem 5.16 podobné průběhy autokorelačních funkcí po dobu celého týdne, pouze při posledním měření je pozorován významnější pokles amplitudy u vzorku, který obsahoval poměr lipidů 2:1. Na obrázku 5.8 jsou zobrazeny průběhy autokorelační

funkce fluorescence barviva AlexaFluor 488 ve vodném roztoku. Překrývající průběhy autokorelační funkce během celého týdne značí stabilitu vzorku, kterou potvrzují také hodnoty difúzních časů pro samotné barvivo uvedené v tabulce 5.5, přičemž průměrná doba je 0,062 ms. Na obrázku 5.9 jsou zobrazeny fity autokorelační křivky vzorků značených fluorescenčními barvivy zvlášť. Na levém grafu jsou lipozomy značeny pouze barvivem AlexaFluor 488, na pravém je zobrazeno lipofilní barvivo DiO, které se nachází v membráně.

Na obrázku 5.12 je vyjádřena změna stability jednoho vzorku v průběhu několika dní, přičemž zaznamenávání dat ze vzorku bylo nastaveno na 200 sekund. Během týdenního pozorování byla zaznamenána rostoucí stabilita lipozomů obsahující poměr lipidů 4:1. Výsledky měření z prvního dne se v rámci jednoho měření zřetelně liší v maximální amplitudě každého vypočítaného úseku. Oproti tomu na prostředním grafu je pozorován pokles amplitudy a jednotlivé autokorelační funkce více konvergují. Tato tendence byla potvrzena měřením, které proběhlo šestý den. Na pravém grafu se autokorelační funkce fluorescence barviva AlexaFluor 488 téměř překrývají.

Po posledním měření byl ke vzorkům značeným oběma fluorescenčními barvivy přidán detergent, který způsobil destrukci lipozomů. Na obrázku 5.17 je znázorněn průběh dohasínání a autokorelační funkce fluorescence vzorku, na kterém byla měřena sedmidenní stabilita. Neexponenciální průběh dohasínání v levém grafu na obrázku 5.17 znamená, že dohasínání má dvě komponenty odpovídající DiO a AlexaFluor 488. Hladký průběh autokorelační funkce značí dostatečné množství zaznamenaných fotonů. Naopak, na obrázku 5.18 je zřejmý nedostatek získaných dat již z autokorelační funkce, což se projevilo viditelným kolísání. Průběh dohasínání potvrzuje, že signál již pochází pouze z jednoho barviva a vzhledem k poklesu signálu nastal veliký úbytek v počtu detekovaných molekul. Přidáním detergentu tedy došlo k rozkladu lipozomů.

Důležitým výsledkem této práce bylo nalezení postupu přípravy lipozomů, při kterém nevytvářejí shluky a jsou stabilní minimálně během prvotních měření. Pokud bude uvedený návod na přípravu dodržen, je možné provádět další testování vzorků, u kterých je známá několikadenní stabilita.

7 Závěr

Cílem této práce bylo připravit vzorky metodou extruze, které byly značeny lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem. Dalším cílem bylo pozorování střednědobé (sedmidenní) stability těchto vzorků a její vyhodnocení metodou FCS. Testované vzorky obsahovaly různý poměr nabitých a nenabitých fosfolipidů. Z průběhů autokorelačních funkcí a vypočtených hodnot fitu bylo zjištěno, že lipozomy tvořeny nenabitými a negativně nabitými lipidy v poměru 3:1 vykazovaly nejvyšší stabilitu z porovnávaných poměrů z hlediska postupného uvolňování hydrofilního barviva zapouzdřeného uvnitř lipozomů, a také z hlediska slučování lipozomů. Naopak vzorky obsahující poměr lipidů 2:1 byly po dobu sedmi dnů nestabilní z hlediska reprodukovatelnosti výsledků FCS analýzy.

Nejnáročnější a časově nejdelší částí bylo ověření a stabilizování způsobu přípravy, jejímž cílem bylo dosažení stabilního chování lipozomů při prvotních měření. Bylo nutné upravit koncentrace jednotlivých fluorescenčních barviv, množství lipidů tvořících lipozomy a v neposlední řadě musela být provedena řada experimentů (z nichž většina v této práci není prezentovaná) sloužících k ověření platnosti použité metodiky.

Provedené testování a závěrečný experiment má přínos především pro další zkoumání modelových fosfolipidových membrán. V této práci byla zjištěna a ověřena optimální příprava lipozomů, jejich krátkodobá stabilita zajištěná přidáním chelatačního činidla EDTA a nakonec byla vyhodnocena i jejich sedmidenní stabilita. Vzhledem k plánovanému navazujícímu zkoumání těchto vzorků značených diamantovými nanočásticemi, je jejich stabilita velmi důležitým parametrem. Na základě výsledků této práce lze předpokládat dobu, po které lze skladované vzorky použít k interakčním experimentům, platnost a reprodukovatelnost měření metodou FCS.

Seznam použité literatury

- [1] NOVÁKOVÁ, Kateřina. MODELOVÉ BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY: JEJICH CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ. *Chem. Listy* [online]. , 166-175 [cit. 2016-11-04].
- [2] HARDY, Gregory J., Rahul NAYAK a Stefan ZAUSCHER. Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2013, **18**(5), 448-458 [cit. 2016-11-28]. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.06.004. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029413000915>
- [3] TORCHILIN, V. P. a Volkmar. WEISSIG. *Liposomes: a practical approach*. 2nd ed. /. New York: Oxford University Press, c2003. ISBN 01-996-3654-0.
- [4] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0551-X.
- [5] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1), 102- [cit. 2016-11-28]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [6] *Avanti, Polar lipids, Inc.: Liposome preparation* [online]. [cit. 2016-11-28]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
- [7] LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* [online]. **16**(7), 307-321 [cit. 2016-11-28]. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01220-7. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998012207>
- [8] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Kenneth S. KRANE. *Physics*. 4th ed. New York: Wiley, c1992. ISBN 04-715-4804-9.
- [9] Fluorescence. *Photonics for healthcare and medicine* [online]. Scotland: Kirsty Scott, 2009 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <https://www.st-andrews.ac.uk/seeinglife/science/imaging/fluorescence/fluorescence>.
- [10] GOLDYS, Ewa M. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009. ISBN 978-047-0083-703.
- [11] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.

- [12] WATERS, Jennifer C. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2009, **185**(7), 1135-1148 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1083/jcb.200903097. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200903097>
- [13] Principy fluorescenční spektroskopie. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. Praha: Zdeněk Fišar, 2009 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [14] *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie: Nové metody optické mikroskopie*. Praha: Union of Czech Mathematicians and Physicists, 1996, 41(1). ISSN 0032-2423.
- [15] GMBH, PicoQuant. MicroTime 200. In: *PicoQuant* [online]. Berlín [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/microtime200_brochure.pdf
- [16] MACHÁŇ, Radek a Martin HOF. Recent Developments in Fluorescence Correlation Spectroscopy for Diffusion Measurements in Planar Lipid Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*[online]. 2010, **11**(2), 427-457 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.3390/ijms11020427. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/427/>
- [17] *Chemické listy: Fluorescenční korelační spektroskopie*. Praha: Lenka Beranová, Jana Humpolíčková, Martin Hof, 2009, (103). ISSN 1213-7103.
- [18] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [19] BUSCHMANN, Volker, Benedikt KRÄMER, Felix KOBERLING, Rainer MACDONALD a Stefan RÜTTINGER. *Application Note: Quantitative FCS: Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime 200* [online]. In: . Germany: PicoQuant, 2009, s. 8 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7351/appnote_quantfcs.pdf
- [20] PICOQUANT. *Time Correlated Single Photon Counting Wiki: Calculate and Fit FCS Traces with the FCS Script* [online]. In: . Germany: PicoQuant, 2017, s. 15 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: http://www.tcspc.com/doku.php/howto:calculate_and_fit_fcs_traces_with_the_fcs_script
- [21] PICOQUANT. *SymPhoTime Software: Typical Measurement and Data Analysis Results* [online]. In: . PicoQuant, 2008, s. 14 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: http://dimacell.fr/ADMIN_DIM/upload/nikon%20C1SI/FLIM%20picoquant.pdf

- [22] KAPUSTA, Peter. Absolute diffusion coefficients: Compilation of reference data for FCS calibration. In: *Application Note* [online]. Německo: PicoQuant, 2010, s. 2 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7353/appnote_diffusioncoefficients.pdf
- [23] BECKER, Wolfgang. Fluorescence lifetime imaging by multi-dimensional time correlated single photon counting. *Medical Photonics* [online]. 2015, **27**, 41-61 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1016/j.medpho.2015.02.001. ISSN 22138846. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213884615000027>
- [24] WAHL, Michael. *Time-Correlated Single Photon Counting* [online]. In: . [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf
- [25] KAPUSTA, Peter, Radek MACHÁŇ, Aleš BENDA a Martin HOF. Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (FLCS): Concepts, Applications and Outlook. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(12), 12890-12910 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.3390/ijms131012890. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/10/12890/>
- [26] KAPUSTA, Peter, Michael WAHL, Aleš BENDA, Martin HOF a Jörg ENDERLEIN. *FLCS-Fluorescence lifetime correlation spectroscopy* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7272/appnote_flcs.pdf
- [27] BUSCHMANN, Volker, Peter KAPUSTA, Felix KOBERLING, et al. *Fluorescence lifetime correlation spectroscopy - A powerful tool for measuring diffusion, concentrations and interactions* [online]. In: . Německo: PicoQuant, 2014, s. 22 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/webtalk_flcs.pdf
- [28] ZEISS, Carl. *Fluorescence Correlation Microscope: ConfoCor 2 - Operating Manual*. Německo, 1997.
- [29] *Carl Zeiss Microscopy: Objective data* [online]. United States [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://www.microshop.zeiss.com/index.php?s=528613984197dd&l=en&p=us&f=o&a=v&m=s&id=421767-9970-000>
- [30] MACHÁŇ, Radek. *Supported Phospholipid Bilayers and their Interactions with Proteins Studied by Ellipsometry, Atomic Force Microscopy and Confocal Fluorescence Microscopy*. Praha, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova. Vedoucí práce Prof. Martin Hof, DSc.

- [31] *PicoQuant: Fluorescence Microscopes - MicroTime 200* [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes/microtime-200-time-resolved-confocal-fluorescence-microscope-with-unique-single-molecule-sensitivity#specification>
- [32] MESETH, Ulrich, Thorsten WOHLAND, Rudolf RIGLER a Horst VOGEL. Resolution of Fluorescence Correlation Measurements. *Biophysical Journal* [online]. 1999, 76(3), 1619-1631 [cit. 2017-05-17]. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77321-2. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349599773212>
- [33] ŠINDELÁŘ, Michal. Fluorescenční korelační spektroskopie při studiu permeability lipidových membrán. Kladno, 2012. Vedoucí práce Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.

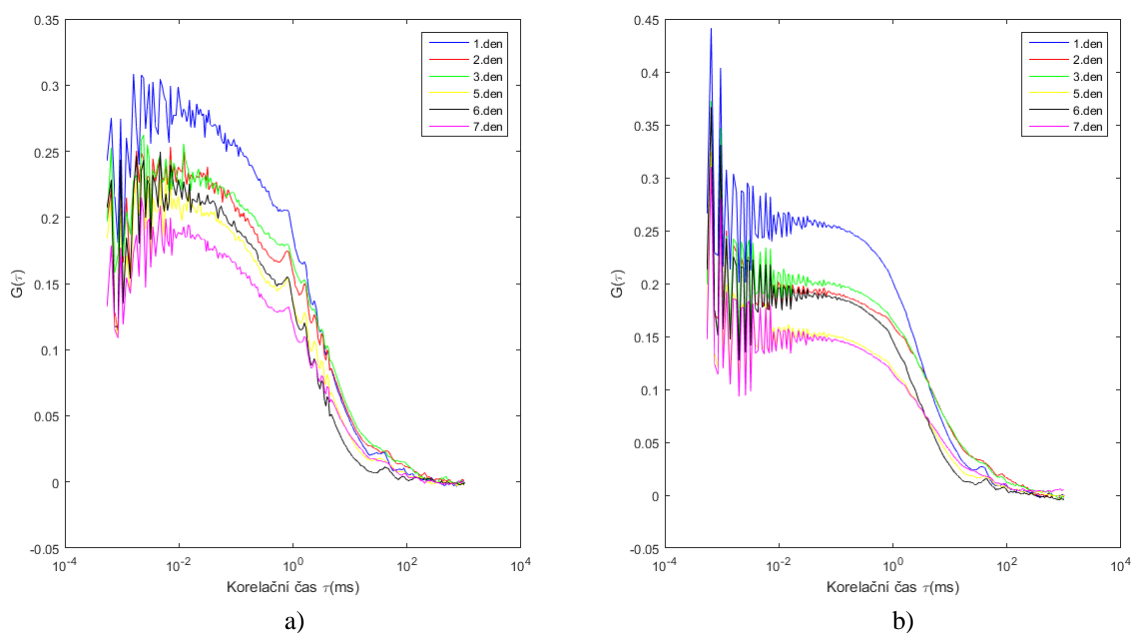
Příloha A: Výsledky měření

Tabulka č. 1: Parametry fitu AF488 – poměr lipidů 3:1 (POPC:DOPS)

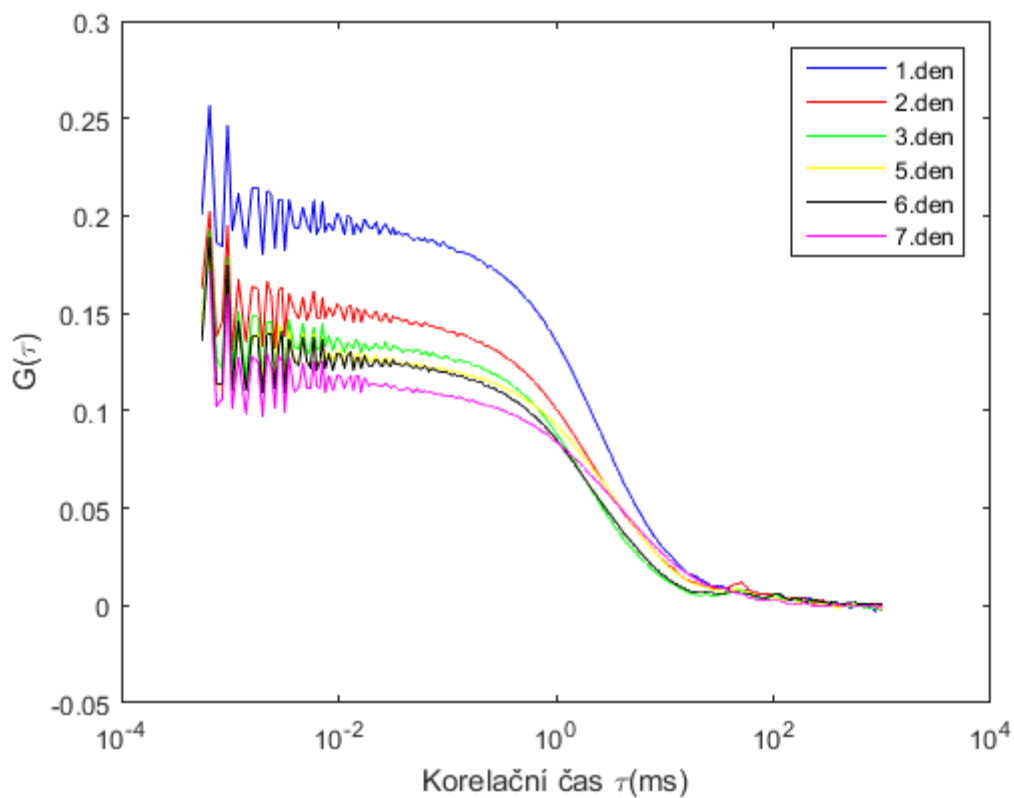
| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| τ_{diff1} (ms) | 3,670 | 3,014 | 3,000 | 5,800 | 2,620 | 13,30 |
| τ_{diff2} (ms) | 0,016 | 0,024 | 2,999 | 2,000 | 1,830 | 2,490 |
| ρ_1 () | 0,190 | 0,171 | 0,150 | 0,0417 | 0,049 | 0,033 |
| ρ_2 () | 0,001 | 0,001 | 0,010 | 0,100 | 0,100 | 0,100 |
| χ^2_1 () | 6,119 | 5,786 | 6,085 | 11,62 | 6,823 | 4,720 |

Tabulka č. 2: Parametry fitu AF488 – poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS)

| AF488 | 1.měření | 2.měření | 3.měření | 4.měření | 5.měření | 6.měření |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| τ_{diff1} (ms) | 2,640 | 0,930 | 2,126 | 3,250 | 2,500 | 0,004 |
| τ_{diff2} (ms) | 2,740 | 3,000 | 2,155 | 3,250 | 2,430 | 3,761 |
| ρ_1 () | 0,189 | 0,022 | 0,010 | 0,029 | 0,010 | 0,010 |
| ρ_2 () | 0,010 | 0,130 | 0,128 | 0,100 | 0,119 | 0,113 |
| χ^2_1 () | 3,352 | 6,358 | 13,83 | 7,416 | 8,492 | 4,414 |



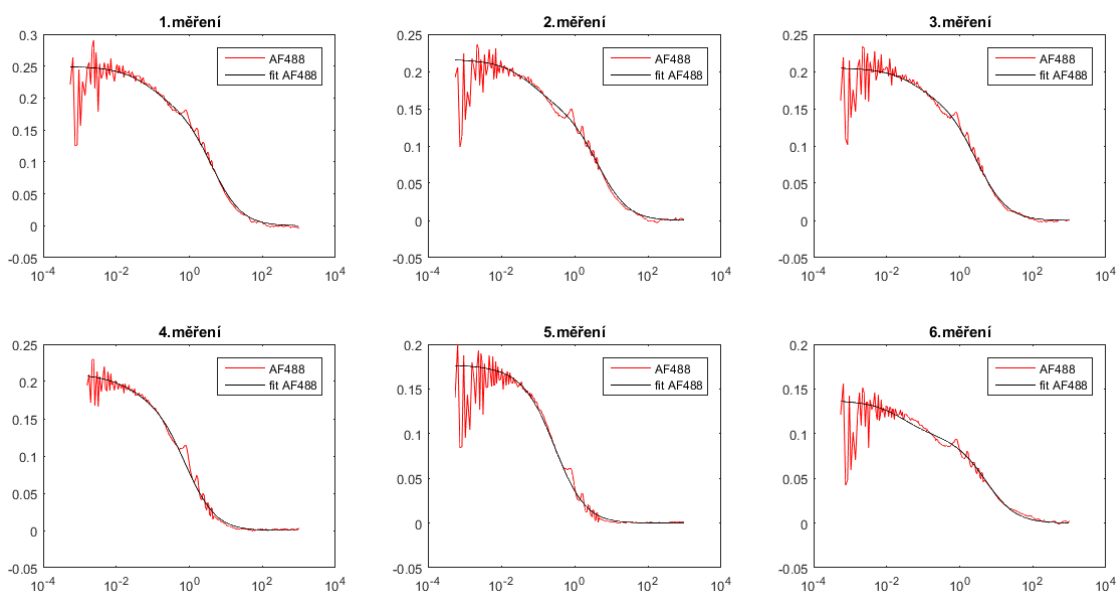
Obrázek 3.5: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS), a) AF488, b) DiO



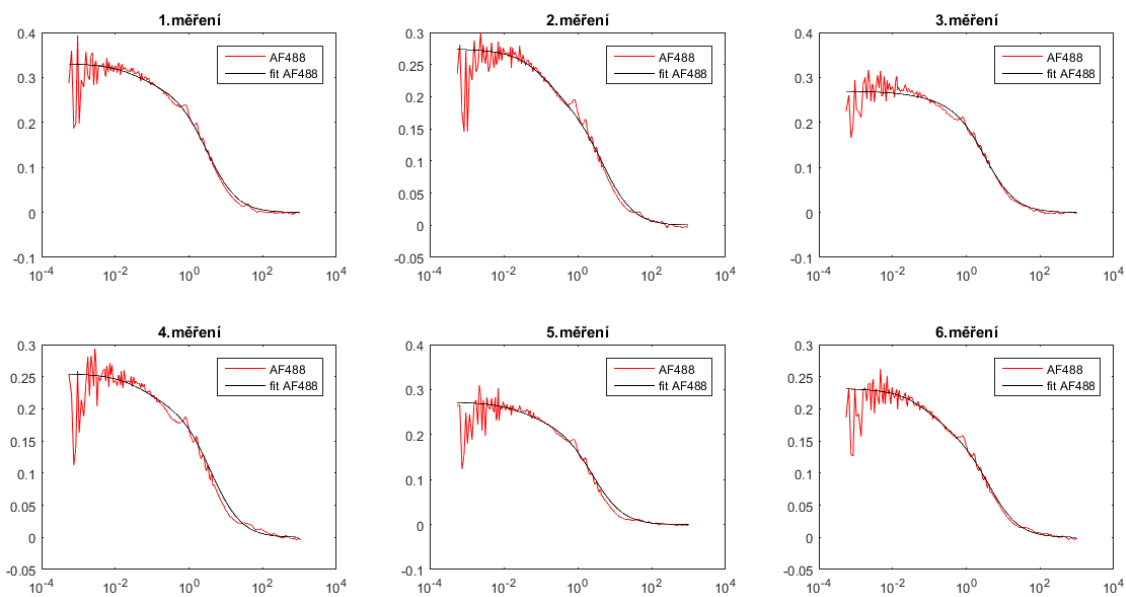
Obrázek 3.9: Změny autokorelační funkce během měření sedmidenní stability – poměr lipidů 4:1 (POPC:DOPS)

- **Fitované autokorelační funkce**

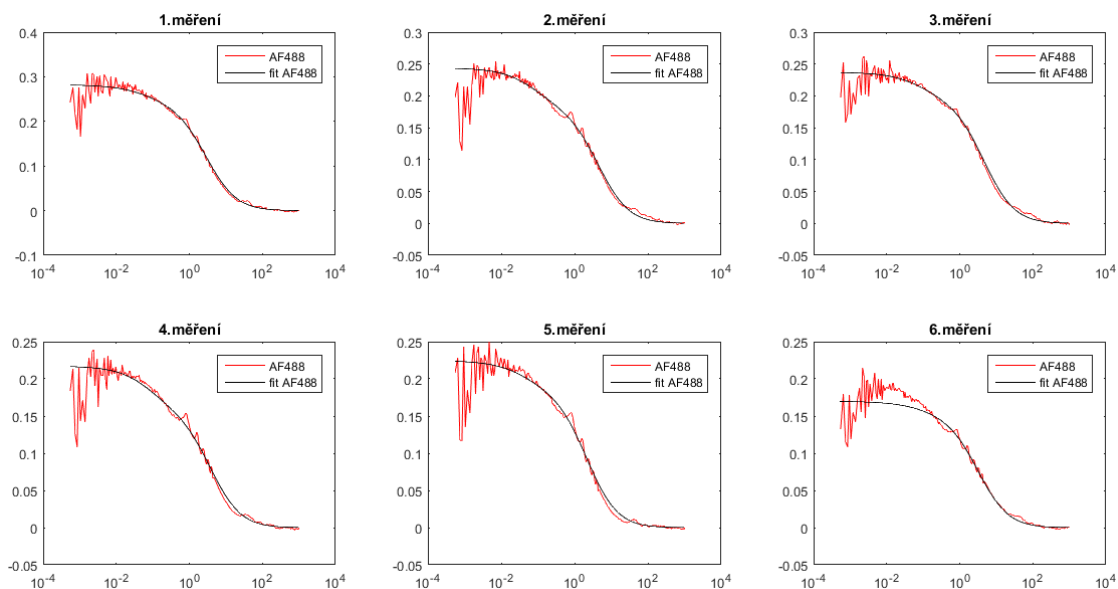
Vzorky značené lipofilním a zároveň hydrofilním barvivem



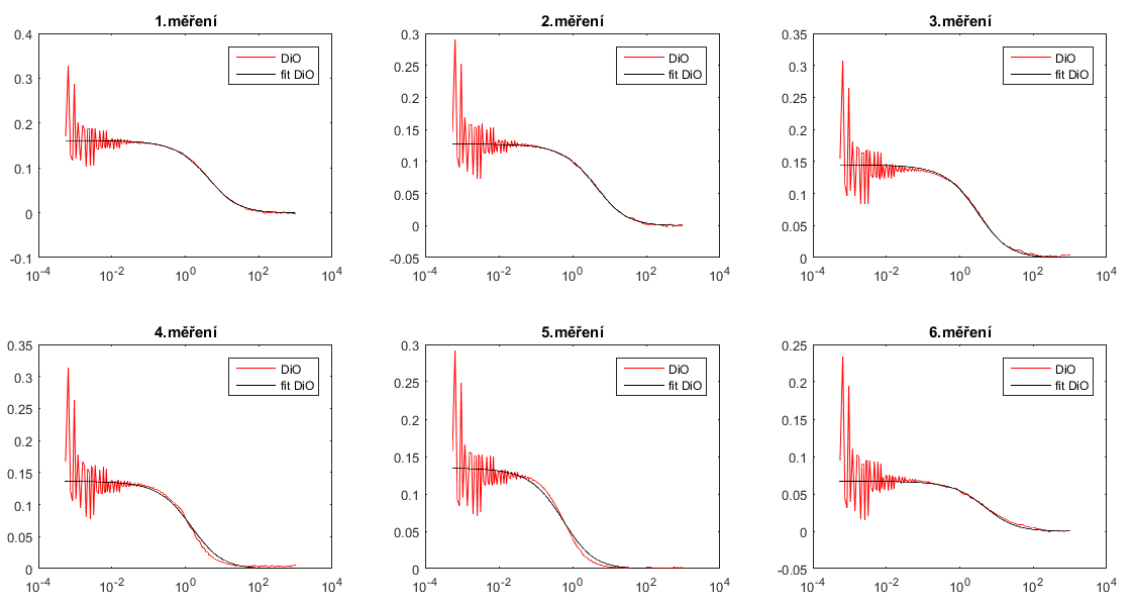
Obrázek č. 1: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 2:1



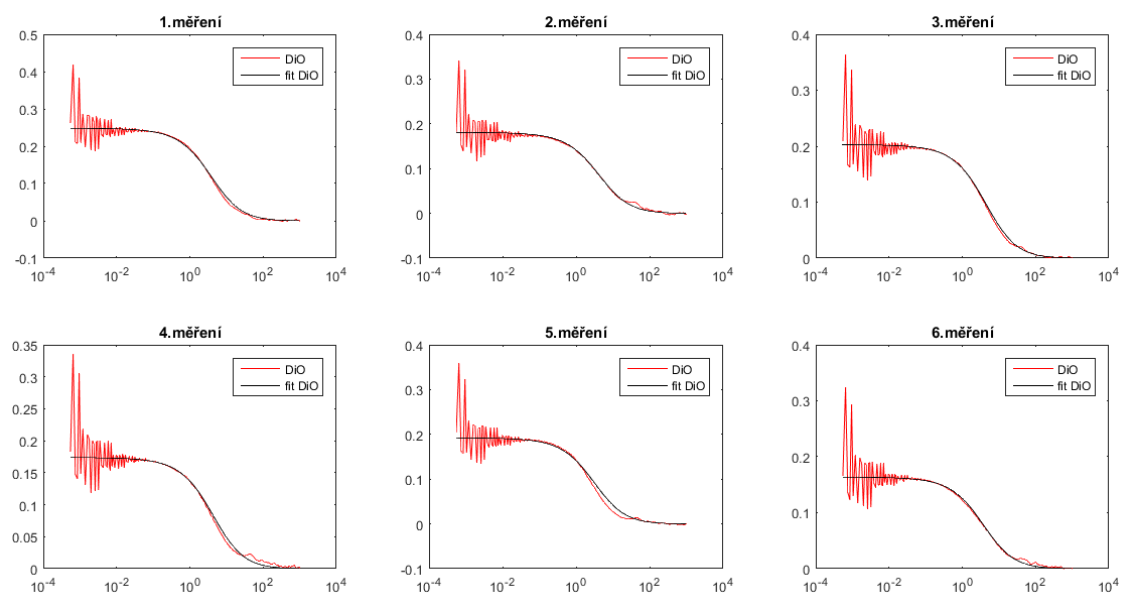
Obrázek č. 2: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 3:1



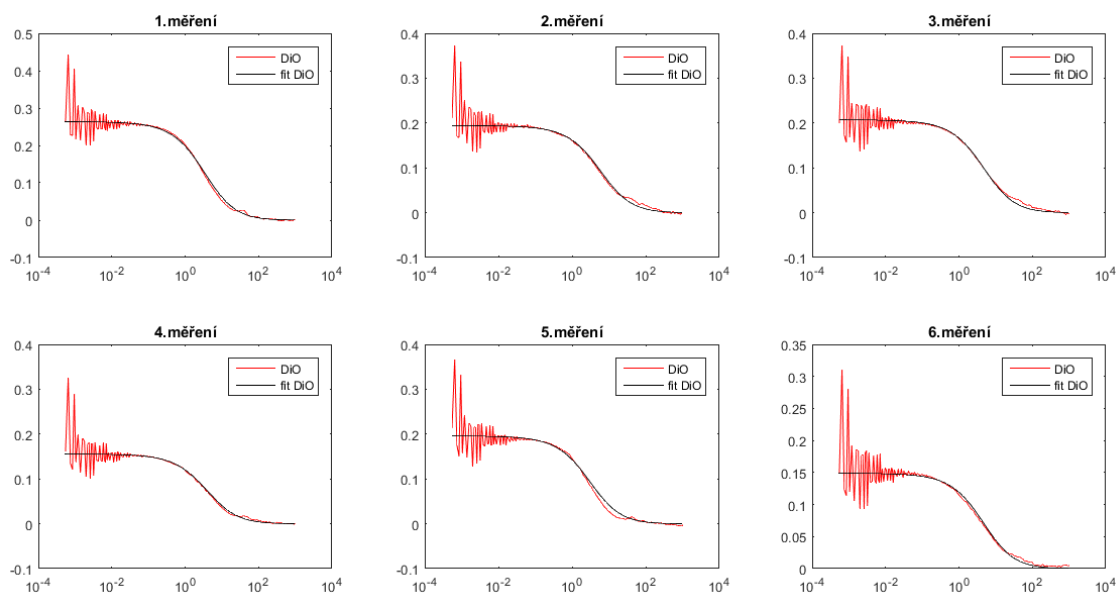
Obrázek č. 3: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 4:1



Obrázek č. 4: Autokorelační funkce a fit DiO během sedmi dnů – poměr lipidů 2:1

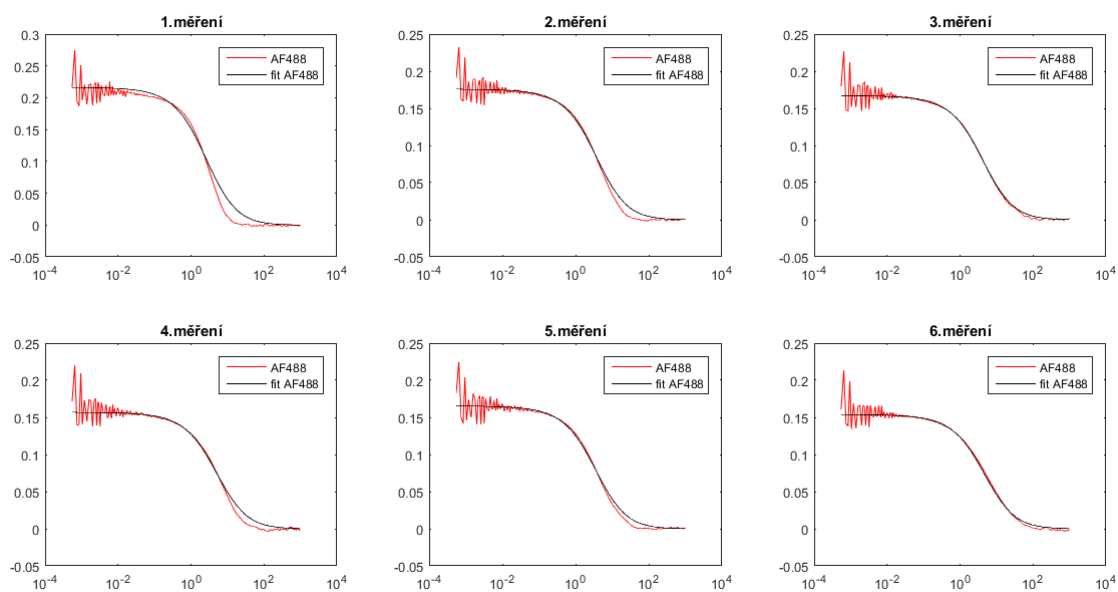


Obrázek č. 5: Autokorelační funkce a fit DiO během sedmi dnů – poměr lipidů 3:1

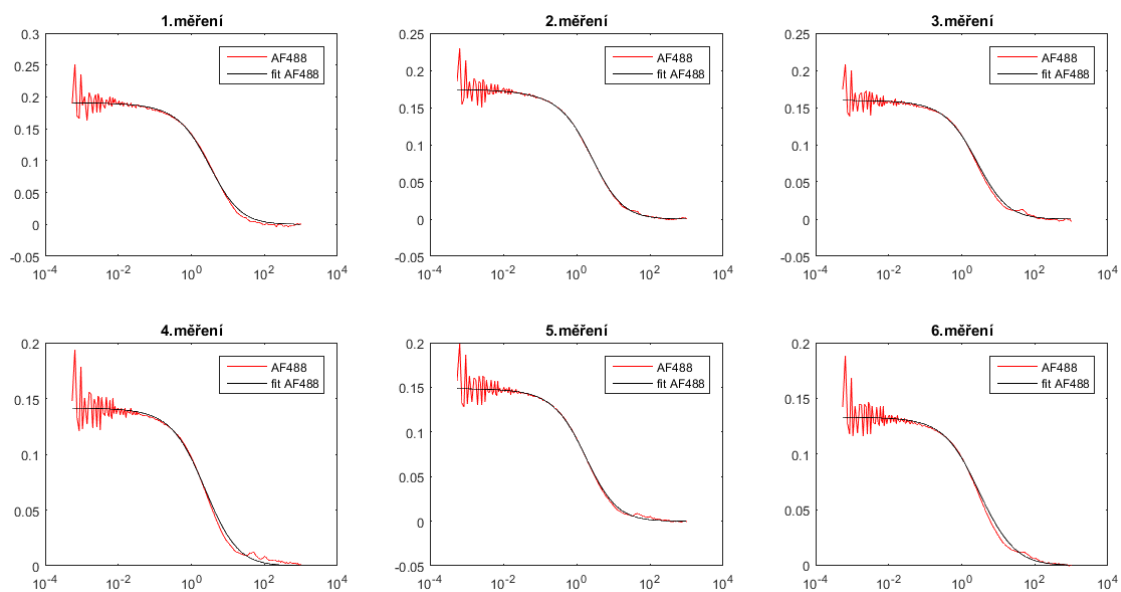


Obrázek č. 6: Autokorelační funkce a fit DiO během sedmi dnů – poměr lipidů 4:1

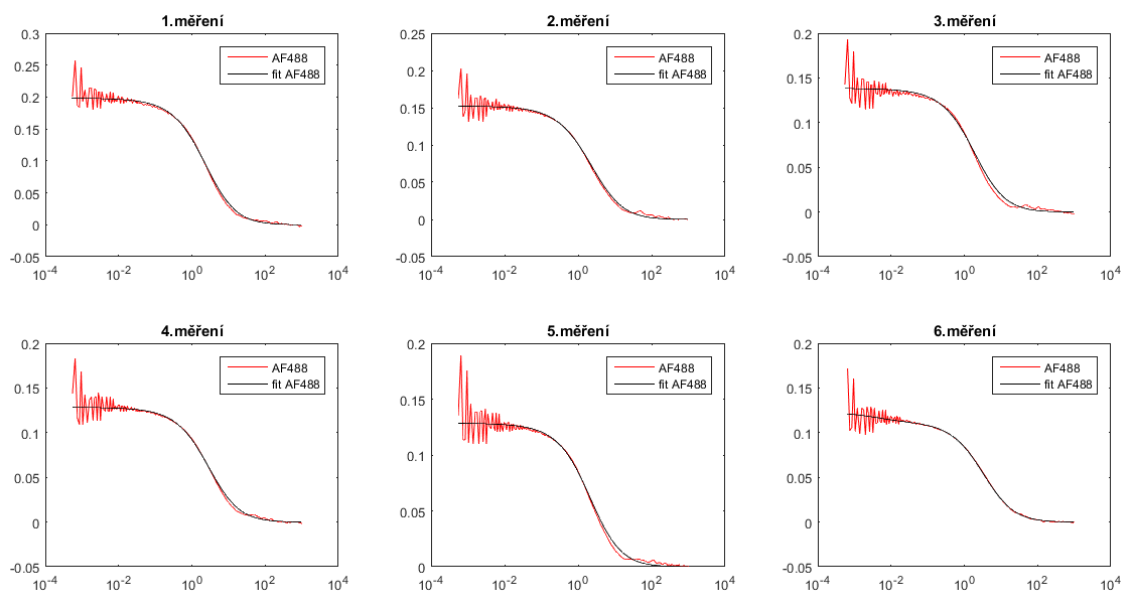
Vzorky značené pouze hydrofilním barvivem



Obrázek č. 7: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 2:1



Obrázek č. 8: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 3:1



Obrázek č. 9: Autokorelační funkce a fit AF488 během sedmi dnů – poměr lipidů 4:1