VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM STABILITY VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ POMOCÍ TECHNIK FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE
STABILITY OF VESICULAR SYSTEMS USING FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Jakub Máčala**
AUTHOR

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

BRNO 2020

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1401/2019	Akademický rok:	2019/20
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie		
Student:	**Bc. Jakub Máčala**		
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace		
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace		
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**		

Název diplomové práce:

Studium stability vezikulárních systémů pomocí technik fluorescenční spektroskopie

Zadání diplomové práce:

1) Literární rešerše na studium stability vezikulárních systémů pomocí fluorescenční spektroskopie se zaměřením na techniku rezonančního přenosu energie.
2) Na základě rešerše navrhnout postupy, materiály a techniky pro studium stability vezikulárních systémů na bázi kataniontových tenzidů.
3) Na vybraném základním systému kataniontového tenzidu CTA–DS otestovat vliv stabilizujících látek.
4) Zhodnotit zvolené techniky z hlediska jejich využitelnosti ve studu těchto systémů.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

Bc. Jakub Máčala student(ka)	doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem stability a fúze kataniontových vezikulárních systémů na bázi CTA-DS pomocí Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Pro měření bylo použito metody Time-Correlated Single Photon Counting. Nejprve byly změřeny excitační a emisní spektra sond z prostředí kataniontových vezikul a byly navrhnuty donor-akceptorní páry: 5-hexadecanoylaminofluorescein s Oktadecyl Rhodaminem B, Bodipy 493/503 s Oktadecyl Rhodaminem B nebo DiI, Perylen s 5-hexadecanoylaminofluoresceinem a DiO s DiI. Poté byla provedena měření dob života vybraných párů z prostředí vezikul o různém obsahu cholesterolu za účelem sledování FRET umožněného fúzí vezikul. Bylo zjištěno, že není možné použít DiO jako donor, jelikož dochází k jeho nízké solubilizaci do vezikul. Také nebylo možné použít Bodipy, jelikož byla prokázána tvorba jeho excimerů. Při použití fluoresceinu jako donoru bylo zjištěno, že mezi jeho molekulami dochází k homo-fret, proto do systému byly přidány pouze neznačené vezikuly a tímto způsobem bylo možné fúzi detekovat, a to až na výjimky i v delším období. Také u páru perylen-fluorescein byla prokázána schopnost sledovat fúzi vezikul, ale s výjimkou systému s obsahem cholesterolu 43 mol. % pouze v krátkém časovém úseku.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Vezikulární systémy, kataniontové tenzidy, cholesterol, fúze, FRET, TCSPC, doby života

ABSTRACT

This thesis is focused on possibility of studying stability and fusion of catanionic vesicles with Förster resonance energy transfer. The mainly used technique was Time-Correlated single photon counting. Firstly, excitation and emission spectra of chosen probes were measured and donor-acceptor pairs were suggested: 5-hexadecanoylaminofluorescein with Octadecyl Rhodamine B, Bodipy 493/503 with rhodamine or DiI, perylene with fluorescein, DiO with DiI. Then, time-resolved measurements of suggested pairs from environment of catanionic vesicles with different content of cholesterol were made in order to track the FRET associated with fusion of vesicles. It was found out, that it is not possible to use DiO as a donor because of it's inefficient solubilisation into vesicles. It is also not possible for Bodipy to be used as a donor, because of it's excimer formation. In case of using fluorescein as a donor, it was found, that there is ongoing homo-fret between fluorescein molecules. Thanks to this, fusion was tracked by addition of unstained vesicles. It was also possible to track fusion in longer period of time. Also perylene-fluorescein pair was found to be capable of tracking the fusion, but with the exception of vesicles with content of cholesterol of 43 mol. %, tracking of fusion was possible only in short period of time.

KEYWORDS

Vesicular systems, catanionic surfactants, cholesterol, fusion, FRET, TCSPC, lifetime

MÁČALA, Jakub. *Studium stability vezikulárních systémů pomocí technik fluorescenční spektroskopie*. Brno, 2020. 104 stran. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123796. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

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

…..…….

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi věnoval. Rovněž bych chtěl poděkovat své konzultantce Ing. Martině Havlíkové za ochotu, čas a pomoc, kterou mi při vypracování této práce poskytla. A také bych chtěl poděkovat všem kolegům z laboratoře 2002, kteří mi nějak poradili nebo pomohli.

OBSAH

1 Úvod **7**

2 Teoretická část **8**

2.1 Fluorescence ... 8

2.1.1 Obecné principy fluorescence ... 8

2.1.2 Perrin-Jabłónskiho diagram ... 8

2.1.3 Charakteristiky fluoroforů ... 9

2.1.4 Excitační a emisní spektrum ... 10

2.1.5 Zhášení fluorescence ... 11

2.2 Försterův rezonanční přenos energie ... 15

2.2.1 Charakteristiky Försterova rezonančního přenosu energie ... 15

2.3 Fluorescenční spektroskopie ... 18

2.3.1 Instrumentace pro steady-state spektroskopii ... 19

2.3.2 Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC) ... 20

2.3.3 Využití fluorescenční technik ... 21

2.4 Fluorescenční sondy ... 21

2.4.1 Bodipy 493/503 ... 22

2.4.2 DiI, DiO ... 22

2.4.3 Octadecyl Rhodamin B chlorid ... 22

2.4.4 5-hexadecanoylaminofluorescein ... 22

2.4.5 Perylen ... 23

2.5 Tenzidy ... 23

2.5.1 Vezikulární systémy ... 23

2.5.2 SDS ... 24

2.5.3 CTAB ... 24

2.5.4 DODAC ... 25

2.6 Kataniontové vezikulární systémy ... 25

2.6.1 Parametr kritického sbalení ... 26

2.6.2 Stabilizující látky ... 26

3 Současný stav řešené problematiky **27**

3.1 Práce vypracované na Fakultě chemické ... 27

3.2 Použití Försterova přenosu energie ke studiu stability vezikulárních systémů ... 29

4 Experimentální část 34

4.1 Použité chemikálie: 34

4.2 Použité přístroje 35

4.2.1 Steady state fluorimetr FS5 35

4.2.2 TCSPC fluorimetr Fluorocube 36

4.3 Příprava vzorků 37

4.3.1 Příprava zásobního prášku IPA 37

4.3.2 Příprava zásobních roztoků v chloroformu 37

4.3.3 Příprava cIPA 37

4.3.4 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond 37

4.4 Měření excitačních a emisních spekter vybraných sond z prostředí kataniontových vezikulárních systémů 38

4.5 Měření dob života fluorescenčních sond z prostředí kataniontových vezikulárních systémů 39

5 Výsledky a diskuze 40

5.1 Měření velikosti připravených vezikulárních systémů pomocí metody dynamického rozptylu světla 40

5.2 Měření excitačních a emisních spekter používaných sond v prostředí vezikulárních systémů 44

5.3 Sledování Försterova rezonančního přenosu energie ve vezikulárních systémech pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie 45

5.3.1 Použití DiO jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách 46

5.3.2 Použití Bodipy 493/503 jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách 49

5.3.3 Použití fluoresceinu jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách 51

5.3.4 Použití perylenu jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách 81

6 Závěr 94

7 Seznam použitých zdrojů 97

8 Seznam použitých zkratek a symbolů 101

9 Přílohy 103

1 ÚVOD

Pod pojmem vezikuly označujeme částice obvykle koloidních rozměrů, mající podobu duté koule ohraničené dvouvrstevnou strukturou. Vezikuly s rozličnými strukturami a složením můžeme najít v živých buňkách, kde plní různé funkce. Z podstaty jejich struktury vyplývá, že obsahují hydrofilní i hydrofobní oblasti a jsou tedy schopné do své struktury pojmout jak hydrofilní, tak i hydrofobní látky. Jednou z nejvýznamnějších možných aplikací je použití vezikulárních systémů jako nosičů léčiv. V této oblasti je využíváno především liposomů, jejichž dvojvrstva je složena z fosfolipidů. Jejich výhodou je, že jsou tyto materiály netoxické a snadno mohou být rozloženy *in vivo*. Nevýhodou liposomů je však jejich značná cena, která omezuje jejich širší využití.

Z toho důvodu jsou vyhledávány jejich možné alternativy, z nichž jednou z nich jsou tzv. kataniontové vezikuly. Mají obdobnou strukturu jako liposomy, ale jejich dvojvrstva je tvořena kataniontovými tenzidy, jejichž cena je oproti fosfolipidům výrazně nižší. Tyto tenzidy vznikají interakcí polárních hlaviček kationaktivních a anionaktivních surfaktantů. Kataniontové vezikuly nevykazují přílišnou stabilitu ve vodném prostředí a dochází k jejich fúzi a agregaci, což vede k neschopnosti zachovat si danou velikost po delší období. Proto bývá jejich složení upraveno přídavkem dalších složek, jako je např. cholesterol nebo víceřetězcové tenzidy, které zvyšují fyzikální stabilitu membrány.

Pro studium stability koloidních systémů bývá často využito technik fluorescenční spektroskopie. Jednou z technik, pomocí které je možné studovat fúzi různých membránových systémů, je tzv. Försterův rezonanční přenos energie. Jedná se o techniku využívající nezářivého přenosu energie mezi vhodným donor-akceptorním párem molekul. Účinnost tohoto přenosu je kromě dalších faktorů závislá také na vzdálenosti mezi těmito molekulami. Při změně vzdálenosti mezi molekulami donorů a akceptorů pak dochází ke změně charakteristik donoru, jako je intenzita emise a doba života fluorescence. Pomocí sledování těchto parametrů je tedy možné tyto změny, způsobené například fúzí vezikul, které jsou donorem a akceptorem značené, sledovat.

Cílem předložené práce je studovat fúzi kataniontových vezikulárních systémů na bázi CTA-DS pomocí technik fluorescenční spektroskopie, a především Försterova rezonančního přenosu energie. Na základě rešerše byly vybrány vhodné postupy a materiály pro studium fúze těchto systémů. Bylo otestováno použití různých fluoroforů vhodných pro tvorbu donor-akceptorních párů díky překryvu emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru. Pro sledování přenosu energie bylo využito především časově rozlišené fluorescence, konkrétně metody Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Studovány byly vezikulární systémy s různým obsahem cholesterolu a byl zjišťován vliv složení na přenos energie a přeneseně tedy na fúzi vezikulárních struktur. Nakonec bylo provedeno vyhodnocení možnosti použití zvolených technik a postupů pro studium fúze kataniontových vezikulárních systémů.

Tato práce vznikla na Fakultě chemické VUT v Brně pod hlavičkou výzkumné skupiny Biokol. Práce je rovněž součástí mezinárodního grantu mezi FCH VUT a National Cheng Kung University na Taiwanu, číslo projektu Grantové agentury České republiky 19-14024J.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

2.1.1 Obecné principy fluorescence

Jev, při kterém dochází k emisi světelného záření z molekuly, která se nachází v elektronově excitovaném stavu, se nazývá luminescence. V závislosti na povaze excitovaného stavu můžeme luminescenci rozdělit na dva dílčí jevy, fluorescenci a fosforescenci. Při fluorescenci dochází k excitaci elektronu do singletového excitovaného stavu, kdy má excitovaný elektron opačný spin než párový elektron ve stavu základním. Návrat elektronu do základního stavu je tedy tzv. spinově povolený a nastává za velmi rychlé emise fotonu. Rychlost emise se obvykle pohybuje kolem 10^8 s^{-1}, doba života fluorescence pak typicky dosahuje hodnot blízkých 10 ns. Látky, u kterých může docházet k fluorescenci, nazýváme pojmem fluorofory. Může se jednat o různé aromatické molekuly, kvantové tečky, fluorescenční proteiny a další.

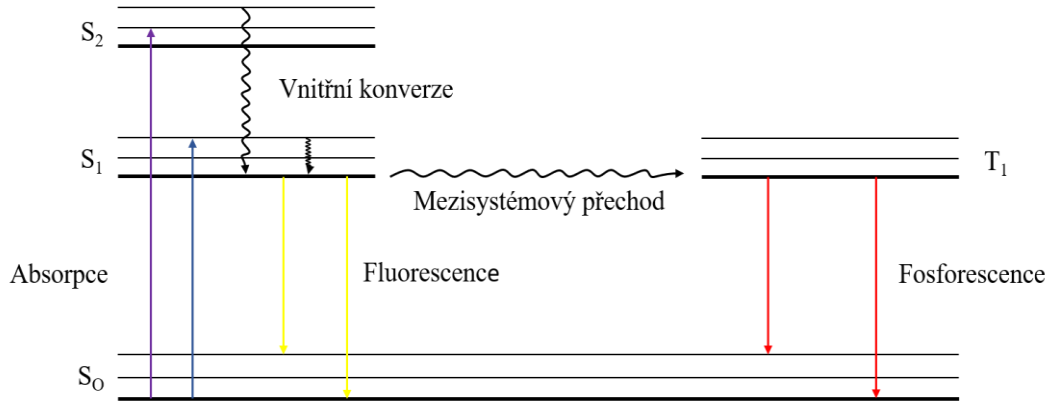
Pokud je elektron excitován do tripletového excitovaného stavu, tedy má s párovým elektronem v základní hladině stejný spin a následně dochází k emisi světelného záření právě z tohoto tripletového stavu, nazýváme tento jev pojmem fosforescence. V tomto případě se jedná o tzv. spinově zakázaný přechod na základní stav, rychlost emise je mnohem pomalejší (10^3 až 10^0 s^{-1}) a rovněž doba života fosforescence se pohybuje v rozmezí milisekund až sekund [1].

2.1.2 Perrin-Jabłónskiho diagram

Pro znázornění procesů probíhajících mezi absorpcí světelného záření fluoroforem a emisí fotonů se používá Perrin-Jabłónskiho diagram (Obr. 1). Základní singletová hladina bývá označena S_0, excitované singletové hladiny S_1, S_2 a tripletová hladina T_1. S každou elektronickou hladinou je spojeno několik hladin vibračních, na kterých fluorofor může existovat. Absorpce a emise nejčastěji probíhají u molekul nacházejících se na nejnižší možné vibrační hladině. K překonání energetického rozdílu mezi základní hladinou a prvním singletovým excitovaným stavem je potřeba značné množství energie, tudíž není možné dosáhnout excitace tepelným zářením, ale je třeba záření o vyšší energie, tedy světelného záření.

Po absorpci světla fluoroforem dochází k několika postupným procesům. Nejprve dochází k excitaci fluoroforu, nejčastěji na nějakou z vyšších vibračních hladin prvního nebo druhého excitovaného stavu S_1, S_2. Následně téměř vždy dochází k relaxaci molekuly až na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1. Tento přechod na nejnižší vibrační hladinu se nazývá vnitřní konverze a typicky probíhá během 10^{-12} s. K tomuto procesu tedy dochází před emisí, která probíhá z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu, ve které se fluorofor nachází v termální rovnováze. Přechod z excitovaného na základní stav většinou probíhá na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu. Z toho důvodu můžeme často pozorovat zrcadlovou podobnost emisního spektra s absorpčním spektrem přechodu $S_0 \rightarrow S_1$.

Dalším možným procesem, kterým mohou excitované molekuly ve stavu S_1 projít, je změna spinu na první tripletový stav T_1. Emise záření ze stavu T_1 je posunuta k vyšším vlnovým délkám a nižší energii a je nazývána fosforescence. Přechod mezi stavy S_1 a T_1 bývá označován jako mezisystémový přechod. Jelikož přechod z tripletového stavu T_1 na základní singletový stav je tzv. spinově zakázaný, rychlostní konstanta emise je o několik řádů menší, než je tomu v případě fluorescence [1][2].



Obr. 1: Perrin-Jabłónskiho diagram [1]

2.1.3 Charakteristiky fluoroforů

Nejdůležitějšími charakteristikami každé molekuly fluoroforu je kvantový výtěžek a doba života fluorescence. Kvantový výtěžek vyjadřuje poměr fotonů vyzářených molekulou fluoroforu k počtu fotonů molekulou absorbovaných. Čím blíže se kvantový výtěžek molekuly blíží hodnotě jedna, tím můžeme pozorovat zářivější emisi. Hodnota kvantového výtěžku je dána rovnicí

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \tag{2.1}$$

kde Γ značí rychlost zářivého přechodu a k_{nr} rychlost nezářivého přechodu. Jestliže rychlost nezářivých přechodů mnohem menší než rychlost zářivých přechodů, hodnota kvantového výtěžku se blíží číslu jedna. Nikdy však tohoto čísla nedosáhne díky tzv. Stokesovským ztrátám.

Dobu, kterou molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního, označujeme jako dobu života excitovaného stavu. Jedná se o průměrnou hodnotu, jelikož emise je náhodný proces a pouze několik málo molekul emituje přesně v čase t = τ. Vezmeme-li v potaz roztok fluoroforu A o koncentraci [A] v jednotkách mol/l, který je ozářen velmi krátkým světelným pulzem, tak v čase 0 dojde k excitaci určitého množství molekul A do prvního excitovaného stavu S_1. K návratu molekul na základní stav S_0 může dojít buď zářivými či nezářivými přechody, případně mezisystémovým přechodem. Rychlost, kterou dochází k vyhasínání excitovaných molekul fluoroforu, můžeme vyjádřit rovnicí:

$$-\frac{[A^*]}{\mathrm{d}t} = (k_r + k_{nr}) \cdot [\mathrm{A}^*], \tag{2.2}$$

kde $[A^*]$ značí koncentraci molekul nacházejících se v excitovaném stavu, t značí čas, k_r rychlostní konstantu zářivých přechodů a k_{nr} rychlostní konstantu přechodů nezářivých. Po integrování získáme rovnici:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right), \tag{2.3}$$

kde $[A^*]_0$ představuje koncentraci excitovaných molekul fluoroforu v čase 0 a τ_s je doba života excitovaného stavu S_1. Tato doba života τ_s je dána rovnicí:

$$\tau_s = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \tag{2.4}$$

Neuvažujeme-li nezářivé přechody, nazýváme dobu života jako vnitřní či přirozenou a její rovnice je tedy:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}, \tag{2.5}$$

kde τ_n je přirozená doba života excitovaného stavu a Γ je rychlost emise fluoroforu. Přirozená doba života může být rovněž vypočítána pomocí naměřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence dle rovnice:

$$\tau_n = \frac{\tau}{Q}. \tag{2.6}$$

Intenzitu fluorescence můžeme popsat jako množství fotonů (nejčastěji v molech) vyzářené za jednotku času (v sekundách) a pro jednotku objemu roztoku (v litrech). Intenzita i_f v čase t po excitaci krátkým světelným pulzem v čase 0 je v každém okamžiku úměrná koncentraci molekul, které zůstávají v excitovaném stavu [A^*]. Konstantou úměrnosti je zde rychlostní konstanta zářivých deexcitačních procesů k_r. Intenzitu tedy můžeme popsat rovnicí [1],[2]:

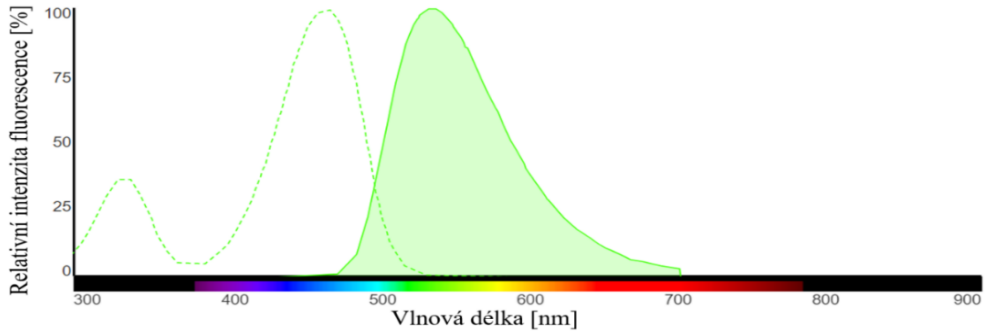
$$i_f = k_r[\mathrm{A}^*] = k_r[\mathrm{A}^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right). \tag{2.7}$$

2.1.4 Excitační a emisní spektrum

Mezi další charakteristiky každého fluoroforu patří excitační a emisní spektrum (Obr. 2). Excitační spektrum vyjadřuje, jak se mění intenzita fluorescence při jedné konkrétní vlnové délce emitovaného záření v závislosti na měnící se vlnové délce excitačního světelného záření. Excitační spektrum vykazuje jistou podobnost se spektrem absorpčním [3].

Na druhou stranu emisní spektrum nám říká, jak se mění intenzita fluorescence v závislosti na vlnové délce, pokud vzorek ozařujeme jednou neměnnou vlnovou délkou excitačního záření. Intenzita emise a tvar emisního spektra často může poskytovat cenné poznatky o zkoumaném vzorku a o prostředí, ve kterém se molekula fluoroforu vyskytuje. Můžeme získat informace například o viskozitě prostředí, polaritě, hodnotě pH, fluiditě membrán, skládání proteinů a další [4].

Z Jabłónskiho diagramu můžeme vyvodit, že energie emise je typicky nižší než energie absorpce. Proto fluorescence většinou nastává při nižších energiích, a tedy vyšších vlnových délkách. Posun emisního spektra k vyšším vlnovým délkám vůči spektru excitačnímu nazýváme Stokesův posun. Energetické ztráty mezi excitací a emisí nastávají u fluoroforů v roztoku. Příčinou je především ta skutečnost, že při absorpci záření molekulou dochází k excitaci fluoroforu na vyšší vibrační stav excitovaného stavu S_1. Následně dochází k rychlé relaxaci na nejnižší vibrační hladinu S_1, při které je část energie uvolněna. Rovněž návrat na základní energetickou hladinu probíhá typicky na některou z vyšších vibračních hladin stavu S_0 a při následné relaxaci na nejnižší vibrační hladinu je přebytečná energie uvolněna ve formě tepla. Tento posun může být u některých fluoroforů umocněn jejich reakcí například na typ rozpouštědla, vlastnosti okolního mikroprostředí či například přenos energie.



Obr. 2: Excitační a emisní spektrum fluoroforu NBD [5]

Další pravidlo, kterým se fluorescence řídí, se nazývá Kashovo pravidlo. Říká nám, že fluorescenční emisní spektrum je obecně nezávislé na excitační vlnové délce. Pokud je molekula excitována do vyššího elektronického a vibračního stavu, následuje rychlá deexcitace, při které je přebytečná energie rozptýlena a fluorofor zůstává v nejnižším vibračním stavu S_1. K tomuto kroku dochází přibližně za 10^{-12} s a pravděpodobně je výsledkem překryvu, který nastává přes velký počet stavů o téměř identické energii. Tato rychlá relaxace tedy ústí v to, že emisní spektra jsou obecně nezávislá na vlnové délce excitujícího záření. Z Kashova pravidla je odvozeno pravidlo Vavilovovo, které říká, že kvantový výtěžek fluorescence je obecně nezávislý na excitační vlnové délce [1].

2.1.5 Zhášení fluorescence

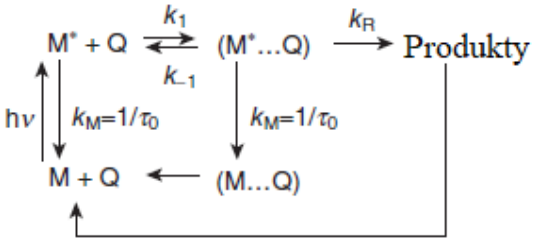
Emise fluorescence a její charakteristiky (intenzita, doba života excitovaného stavu) mohou být ovlivněny různými mechanismy. Pokud dochází ke snižování intenzity fluorescence, nazýváme tyto jevy jako zhášení. Ke zhášení může docházet pomocí několika různých procesů. Například může dojít ke srážce s atomem těžkého prvku, kdy dochází k preferování mezisystémového přechodu. Rovněž může dojít ke kolizi s paramagnetickými látkami, jako je molekula kyslíku nebo oxidu dusného. Dalšími procesy vedoucími ke zhášení fluorescence mohou být například přenos elektronu, přenos protonu, rezonanční přenos energie mezi molekulami donoru a akceptoru a rovněž tvorba excimeru a exciplexu.

Při procesu zhášení může dojít k několika případům mezimolekulární interakce mezi excitovanou molekulou fluoroforu M* a zhášečem Q. První možností je, že se zhášeč nachází ve velkém nadbytku oproti molekule a je pravděpodobné, že v průběhu excitace budou zhášeč i excitovaná molekula v takové vzdálenosti, ve které mezi nimi může docházet k dostatečné interakci. V případě, že se pravděpodobnost interakce zhášeče a excitované molekuly v dostatečné vzdálenosti rovná hodnotě menší než 1, odpovídá tento jev statickému zhášení. Pokud se pravděpodobnost rovná hodnotě 1, reakce je pseudo-prvního řádu a tento případ nastává například při fotoindukovaném přenosu protonu při excitaci molekul kyseliny ve vodném prostředí, kdy je molekula vody vždy v dostatečné vzdálenosti a může vystupovat jako akceptor protonu.

V dalším případě již molekula zhášeče není ve velkém nadbytku. Avšak přiblížení mezi molekulou fluoroforu a zhášečem není možné v průběhu doby života excitovaného stavu, například z důvodu příliš krátké doby života nebo příliš vysoké viskozity okolního média. Zhášení pak probíhá pouze pokud interakce mezi M* a Q nastávají i na větší vzdálenosti, než je kolizní vzdálenost. Jedná se tak o nezářivé přenosy energie na velké vzdálenosti, kdy molekuly od sebe mohou být až přibližně 20 nm daleko.

Rovněž je možné, že se zhášeč nenachází v systému v přebytku a jeho přiblížení k excitovanému fluoroforu je možné v průběhu doby života excitovaného stavu. Tento bimolekulární proces je následně ovlivňován difúzí látek v systému a o zhášení mluvíme jako o dynamickém. Při vysokých koncentracích zhášeče může docházet kromě dynamického zhášení i ke zhášení statickému.

Tento případ je ilustrován na Obr. 3, kde k_1 vyjadřuje difuzní rychlostní konstantu druhého řádu vytvoření páru M* a Q, které jsou od sebe v počátku oddělené, k_{-1} značí rychlostní konstantu prvního řádu pro zpětnou reakci tohoto procesu, k_R je rychlostní konstanta prvního řádu, kdy dojde při interakci mezi M* a Q k tvorbě produktů a $k_M(=1/\tau_0)$ je rychlostní konstanta vnitřní deexcitace M*. Pokud dochází pouze ke slabé interakci mezi excitovaným fluoroforem a zhášečem, tak fluroescenční charakteristiky páru M*Q zůstávají stejné jako charakteristiky M*.



Obr. 3: Schéma možných procesů dynamického zhášení [2]

Pokud se fluorescenční charakteristiky páru M*Q liší od charakteristik M* (například při vzniku exciplexu (MQ)*), je nutné zavést další rychlostní konstantu pro vnitřní deexcitaci, a to rychlostní konstantu $k_{MQ}(=1/\tau'_0)$. V případě, že je molekula zhášeče stejná jako molekula fluoroforu a dochází tedy k tzv. samozhášení bez tvorby produktů, nazýváme vzniklý komplex MM* jako excimer (excitovaný dimer). Tento komplex má vlastní spektrum i dobu života.

Z hlediska kinetiky jsou uvažovány tři možné případy:

1. $k_R >> k_1[Q], k_{-1}, 1/\tau_0$: reakce je difúzně kontrolovaná; rychlostní konstanta procesu zhášení k_Q je rovna rychlostní konstantě difúze k_1
2. $k_R << k_1[Q], k_{-1} >> 1/\tau_0$: rovnováhy v systému je dosaženo především díky tvorbě produktů
3. k_R nabývá většího nebo menšího řádu než ostatní rychlostní konstanty: k_q je menší než k_1 a může tak být zapsáno jako:

$$k_q = pk_1, \tag{2.8}$$

kde p značí pravděpodobnost (efektivitu) reakce dvojice M* a Q, která může být rovněž vyjádřena jako funkce rychlostních konstant. Pro difúzně kontrolované reakce je rychlostní konstanta procesu zhášení vždy časově závislá, jelikož závisí na vzdálenosti, ve které se nacházejí molekuly fluoroforu a zhášeče v čase excitace. Z toho důvodu fluorofor po excitaci následně vyhasíná rychleji při kratších časech [2].

2.1.5.1 Dynamické zhášení

Jako dynamické zhášení označujeme procesy, při kterých dojde ke kolizi molekuly fluoroforu v excitovaném stavu a molekuly zhášeče a k následnému přechodu excitovaného fluoroforu do základního stavu. Kvantový výtěžek fluorescence za přítomnosti zhášeče v systému je dán rovnicí:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} = \frac{k_r}{1/\tau_0 + k_q[Q]}, \tag{2.9}$$

zatímco v nepřítomnosti zhášeče kvantový výtěžek dán rovnicí:

$$\Phi_0 = k_r\tau_0 \tag{2.10}$$

Spojením rovnic (2.9) a (2.10) získáme tzv. Stern-Volmerův vztah:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1K_{SV}[Q], \tag{2.11}$$

kde I_0 a I jsou intenzity ustálené fluorescence v nepřítomnosti a přítomnosti zhášeče. K_{SV} znační Stern-Volmerovu konstantu, kdy $K_{SV} = k_q\tau_0$. Obecně bývá I_0/I vyneseno oproti koncentraci zhášeče v systému (Stern-Volmerova závislost). V případě, kdy je tato závislost lineární, udává směrnice přímky právě Stern-Volmerovu konstantu K_{SV}. Pokud je známa doba života excitovaného stavu fluoroforu v nepřítomnosti zhášeče, je možné následně dopočítat rychlostní konstantu k_q.

Následně je možné rozlišit dvě možnosti:

1. Bimolekulární proces není limitován difúzí: $k_q = pk_1$, kde p značí účinnost reakce a k_1 je rychlostní konstanta procesu difúze
2. Bimolekulární proces je limitován difúzí: k_q je stejná jako rychlostní konstanta procesu difúze k_1, která může být vyjádřena ve zjednodušené formě jako:

$$k_1 = 4\pi N_A R_c D, \tag{2.12}$$

kde R_c je vzdálenost nejbližšího možného přiblížení (v cm), D je příslušný difúzní koeficient (v jednotkách cm^2s^{-1}) a N_A se rovná Avogadrově konstantě dělené 1000. Vzdálenost nejbližšího přiblížení je obvykle vnímána jako součet poloměrů jednotlivých molekul tvořících pár fluorofor a zhášeč (R_M pro fluorofor a R_q pro zhášeč). Vzájemný difúzní koeficient tohoto páru D je součtem koeficientů translační difúze jednotlivých molekul (D_M pro fluorofor a D_q pro zhášeč) a může být vyjádřen pomocí Stokes-Einsteinova vztahu:

$$D = D_M + D_Q = \frac{k_B T}{f\pi\eta}\left(\frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_Q}\right), \tag{2.13}$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta, η značí viskozitu prostředí a f značí koeficient, který je roven 6 pro kulovité rozhraní a 4 pro ploché rozhraní.

V reálných případech je rychlostní konstanta difúze časově závislá a dochází k tzv. přechodným jevům. Pro média s nízkou viskozitou (podobnou vodě) dochází k přechodným jevům pouze za krátkých časů (méně než 100 ps) a obecně mohou být tyto jevy zanedbány. Ve vysoce viskózních systémech však již zanedbány být nemohou a fluorescenční vyhasínání tedy není monoexponencionální [2].

2.1.5.2 Statické zhášení

V případě statického zhášení je nutná existence tzv. oblasti efektivního zhášení nebo vytváření nefluoreskujících komplexů v základním stavu. V prvním případě, který předpokládá existenci oblasti efektivního zhášení, nemůže excitovaná molekula fluoroforu M* změnit po dobu života excitovaného stavu pozici vůči molekule zhášeče Q. Perrin pro tuto možnost navrhl model, ve kterém dochází k úplnému zhášení, jestliže se molekula Q nachází uvnitř oblasti (oblast efektivního zhášení) o objemu V_q, která obklopuje molekulu M. Pokud se molekula Q nachází vně této oblasti, tak nedochází k žádnému ovlivnění fluorescence fluoroforu. Z toho důvodu se intenzita emise při přídavku zhášeče do systému snižuje, zatímco vyhasínání fluorescence po pulzní excitaci je neměnné [6]. Pravděpodobnost, že *n* molekul zhášeče se nachází uvnitř objemu V_q je dána Poissonovskou distribucí:

$$P_n = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} exp(-\langle n \rangle), \tag{2.14}$$

kde $\langle n \rangle$ značí počet molekul zhášeče v objemu V_q. Pravděpodobnost, že v daném objemu se žádná molekula Q nenachází, je rovna:

$$P_0 = exp(-\langle n \rangle) = exp(-V_q N_A [Q]), \tag{2.15}$$

kde N_A značí Avogadrovu konstantu a $[Q]$ koncentraci zhášeče v jednotkách mol/l. Jelikož je intenzita emise fluorescence úměrná pravděpodobnosti P_0, tak Perrinův model vede k rovnici:

$$\frac{I_0}{I} = exp(V_q N_A [Q]). \tag{2.16}$$

Na rozdíl oproti Stern-Volmerově rovnici (2.11) není poměr I_0/I lineární, ale vykazuje vzestupné zakřivení se zvyšující se koncentrací zhášeče v systému, za nízkých koncentrací, podobně jako ve Stern-Volmerově závislosti, je trend téměř lineární. Závislost $ln(I_0/I)$ na $[Q]$ nám může poskytnout hodnotu V_q. Hodnoty $V_q N_A$ jsou obvykle v rozmezí 1–3 l/mol. Tyto hodnoty odpovídají oblasti zhášení přibližně 1 nm, která je o něco větší než vzdálenost, na které spolu mohou molekuly M a Q interagovat pomocí van der Waalsových sil.

Druhý způsob, kterým může docházet ke statickému zhášení, je vytvoření nefluoreskujícího komplexu fluoroforu a zhášeče. Oproti dynamickému zhášení nedochází ke změně doby života excitovaného stavu nezhášených fluoroforů a vyhasínání fluorescence po excitaci pulzním zářením je neměnné. Dochází však ke snížení intenzity fluorescence po přidání zhášeče do systému. Vyjádříme-li rovnovážnou konstantu tvorby komplexu mezi M a Q:

$$K_S = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \tag{2.17}$$

a vezmeme-li v potaz princip zachování hmotnosti (kde $[M_0]$ vyjadřuje absolutní koncentraci M)

$$[M_0] = [M] + [MQ] \tag{2.18}$$

získáme vyjádření frakce fluoroforů netvořících komplex se zhášečem:

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_S[Q]}. \tag{2.19}$$

Jelikož ve zředěných roztocích platí, že intenzita fluorescence je úměrná koncentraci, může být tento vztah ((2.19) přepsán jako:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{1}{1 + K_S[Q]}. \tag{2.20}$$

Stejně jako v případě Stern-Volmerovy závislosti je zde dosaženo lineárního charakteru, avšak nedochází zde ke změnám v době života excitovaného stavu, zatímco pro dynamické zhášení platí, že poměr I_0/I je úměrný poměru dob života τ_0/τ. Statické zhášení způsobené formací nefluoreskujících komplexů může být někdy prokázáno změnou v absorpčním spektru po formaci komplexu, nicméně za nepřítomnosti těchto změn bývá preferován model efektivní oblasti zhášení [2].

2.2 Försterův rezonanční přenos energie

Försterův rezonanční přenos energie (FRET), někdy nepřesně označován také jako fluorescenční přenos energie, je fyzikálním jevem, při kterém dochází k přenosu energie mezi dvěma molekulami fluoroforů, donorem nacházejícím se v excitovaném stavu a akceptorem, který je ve stavu základním. V průběhu procesu nedochází k výměně žádného fotonu, jedná se tedy o přenos nezářivý. Energie mezi donorem a akceptorem je přenášena pomocí dipól-dipólové mezimolekulární interakce. Jedná se tedy o elektrodynamický jev, který je vysvětlitelný i za pomocí klasické fyziky. Prvním nezbytným kritériem pro průběh FRET je částečný překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru. V případě akceptoru se nemusí jednat o molekulu fluoroforu. Rychlost přenosu energie závisí na několika parametrech, jako je například rozsah spektrálního překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, kvantového výtěžku molekuly donoru, relativní orientaci dipólů, mezi kterými dochází k přenosu a na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem [1].

FRET může sloužit pro studium velké škály různých dějů a procesů. Typickým příkladem je měření vzdálenosti mezi dvěma konci molekuly, čehož se využívá zejména u proteinů. Dalšími možnostmi jsou studium hybridizace nukleových kyselin, bioafinitní reakce, studium vazby mezi dvěma molekulami atp. Velké uplatnění FRET nachází rovněž v experimentech sledující molekulární interakce v různých membránách, ať už buněčných nebo uměle připravených. Lze sledovat fúzi membrán, tvorbu různých mikrodomén, výměnu membránových lipidů a další interakce mezi vezikulárními systémy. V buněčné biologii nachází uplatnění například ve studiu interakcí membránových proteinů, ve studiu připojení a fúze virových částic aj. [7].

2.2.1 Charakteristiky Försterova rezonančního přenosu energie

Pro základní popis rezonančního přenosu energie uvažujeme přenos mezi jedním donorem a jedním akceptorem, které od sebe dělí vzdálenost r. Rychlost přenosu k_T pro tento pár je dán rovnicí:

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \tag{2.21}$$

kde Q_D je kvantový výtěžek donoru v nepřítomnosti akceptoru, n je index lomu prostředí, N_A je Avogadrovo číslo, r představuje vzdálenost mezi donorem a akceptorem, τ_D je doba života fluorescence donoru v nepřítomnosti akceptoru. Pro biomolekuly ve vodném roztoku bývá za index lomu uvažována obvykle hodnota 1,4. $F_D(\lambda)$ je korigovaná intenzita fluorescence molekuly

donoru v rozmezí vlnových délek λ až $\lambda+\Delta\lambda$ s absolutní intenzitou normalizovanou k hodnotě jedna, $\varepsilon_A(\lambda)$ představuje extinkční koeficient akceptoru při vlnové délce λ (obvykle v jednotkách $M^{-1}cm^{-1}$), κ^2 popisuje relativní prostorovou orientaci přenosových dipólů molekul, mezi kterými dochází k přenosu energie. Nejčastěji uvažujeme za κ^2 hodnotu 2/3 (předpokládáme-li, že donor a akceptor se můžou volně otáčet rychlostí, který je mnohem vyšší než rychlost deexcitace donoru). Míru překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru vyjadřujeme pomocí tzv. překryvového integrálu $J(\lambda)$, který je definován jako:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda)d\lambda}. \quad (2.22)$$

Korigovaná intenzita fluorescence donoru $F_D(\lambda)$ je bezrozměrnou veličinou. Pokud extinkční koeficient $\varepsilon_A(\lambda)$ vyjádříme v jednotkách $M^{-1}cm^{-1}$ a vlnovou délku λ v nanometrech, následně můžeme vyjádřit překryvový integrál v jednotkách $M^{-1}cm^{-1}nm^4$ [1].

Rovnici (2.21) můžeme vyjádřit rovněž vyjádřit pomocí tzv. Försterovy vzdálenosti R_0. Jedná se o vzdálenost, při které je účinnost přenosu energie 50 % a polovina molekul donoru podléhá přenosu energie, zatímco druhá polovina je deexcitována zářivými a nezářivými přechody. Rovnice má podobu:

$$R_0^6 = \frac{9000(ln10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4}\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda. \quad (2.23)$$

Pomocí výše uvedené rovnice je možné vypočítat hodnotu R_0 ze spektrálních vlastností páru donor-akceptor a z kvantového výtěžku donoru. Za předpokladu, že vlnovou délku uvažujeme v jednotkách nm a $F_D(\lambda)$ je tedy v jednotkách $M^{-1}cm^{-1}nm^4$, můžeme rovnici (2.23) zjednodušit na tvar [1]:

$$R_0 = 0{,}211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6}. \quad (2.24)$$

Pokud známe hodnotu R_0, můžeme následně vypočítat rychlost přenosu energie dle rovnice [9]:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6. \quad (2.25)$$

V případě, že rychlost přenosu energie dosahuje mnohem vyšších hodnot než rychlost vyhasínání, přenos energie bude účinný. V opačném případě bude k přenosu energie v průběhu doby života excitovaného stavu docházet pouze v malé míře a FRET bude neúčinný.

Účinnost přenosu energie E můžeme definovat jako frakci fotonů, která je po absorbování donorem přenesena na akceptor. Účinnost přenosu můžeme vypočítat dle vztahu:

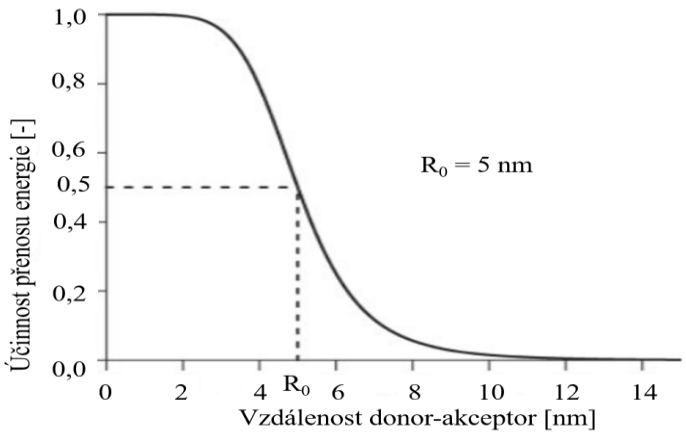
$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)}, \quad (2.26)$$

který je vyjádřením poměru rychlosti přenosu k celkovému vyhasínání molekuly donoru v přítomnosti molekuly akceptoru. Vezmeme-li do úvahy vyjádření rychlosti přenosu v rovnici (2.25), můžeme účinnost přenosu vyjádřit jako:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}. \quad (2.27)$$

Z této rovnice je možné usoudit, že v případě, kdy je vzdálenost donoru a akceptoru v okolí hodnoty R_0, je účinnost přenosu na vzdálenosti velmi významně závislá (viz. Obr. 4). Pokud například vzdálenost D-A klesne pod hodnotu R_0, účinnost přenosu rychle stoupá až k hodnotě

1 (pro $r = 0{,}1R_0$ se účinnost blíží k číslu 0,999999 a emise donoru není téměř pozorovatelná). Oproti tomu, pro vzdálenosti větší než R_0, účinnost přenosu energie strmě klesá (pro $r = 2R_0$ je účinnost 1,54 %). Lze říct, že pro měření vzdáleností pomocí FRET je vhodný interval od $r = 0{,}5R_0$ až $r = 2R_0$.



Obr. 4: Závislost účinnosti přenosu energie na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem [8].

Pro měření účinnosti přenosu energie se obvykle používají dvě metody. První z nich je za použití steady-state spektroskopie, kdy je pro výpočet použito relativní intenzity fluorescence donoru za absence akceptoru (F_D) a v přítomnosti akceptoru (F_{DA}):

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}. \tag{2.28}$$

Druhou možností je využití časově rozlišené fluorescence:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \tag{2.29}$$

kde τ_{DA} vyjadřuje dobu života fluorescence molekuly donoru v přítomnosti akceptoru a τ_D dobu života donoru v nepřítomnosti akceptoru [1], [9].

Při použití časově rozlišené fluorescence je však nutné vzít v potaz, že ne všechny molekuly používané pro FRET mají monoexponenciální vyhasínání excitovaného stavu. V případech, kdy nastává multiexponenciální vyhasínání fluoroforu, můžeme průměrný čas vyhasínání vyjádřit jako aproximaci dle rovnice:

$$\tau_{průměr} = \sum_i \alpha_i \cdot \tau_i, \tag{2.30}$$

kde τ_i představuje čas vyhasínání i-té složky a α_i příslušný váhový faktor složky. V přítomnosti akceptoru můžeme rovněž pozorovat multiexponenciální rychlost vyhasínání, pokud je možné pozorovat různé vzdálenosti mezi páry donoru a akceptoru. Jestliže v experimentu sledujeme pouze jeden pár donoru a akceptoru, může tato situace nastat dochází-li k rychlým fluktuacím ve vzdálenosti sledovaných molekul [8].

2.3 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopii můžeme obecně rozdělit na dvě hlavní skupiny měření: měření v ustáleném stavu, tzv. steady-state, a časově rozlišené měření, tzv. time-resolved. Při steady-state spektroskopii se využívá konstantního ozařování vzorku světelným paprskem a je detekována a snímána intenzita fluorescence a excitační či emisní spektrum. Lze říci, že měření v ustáleném stavu je vlastně průměr časově rozlišených jevů vyhasínání intenzity fluorescence molekuly fluoroforu. Vyhasínání intenzity fluorescence pro fluorofor mající jednu dobu života je dáno následující rovnicí:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \tag{2.31}$$

kde I_0 představuje intenzitu v čase $t = 0$, který nastává ihned po excitačním světelném pulzu. Následně je možné definovat intenzitu steady-state fluorescence I_{ss}, v závislosti na době života fluoroforu, dle rovnice:

$$I_{SS} = \int_O^\infty I_0 e^{-t/\tau} dt = I_0 \tau. \tag{2.32}$$

Hodnotu I_0 ovlivňuje množství faktorů, jako například koncentrace fluoroforu a rovněž několik instrumentálních parametrů.

Pro měření časově rozlišených dějů je možné využít dvou možností, časové domény a frekvenční domény. Při využití časové domény je vzorek excitován krátkým světelným pulzem, tato technika bývá někdy rovněž nazývána jako pulzní fluorimetrie. Délka tohoto pulzu bývá obecně mnohem kratší než doba vyhasínání fluorescence vzorku. Časově závislá intenzita fluorescence je snímána ihned po excitačním pulzu a čas vyhasínání τ je vypočítán ze směrnice závislosti $log\ I(t)$ na t, případně z času, za který intenzita fluorescence klesne na $1/e$ oproti výchozí intenzitě fluorescence v čase $t = 0$. V případě, kdy je fluorofor excitován nekonečně ostrým pulzem světla (tzv. δ-funkce), následuje přechod počáteční populace molekul (n_0) do excitovaného stavu. K vyhasínání populace excitovaných molekul dochází rychlostí $\Gamma + k_{nr}$ dle vztahu:

$$\frac{\mathrm{d}n(t)}{\mathrm{d}t} = (\Gamma + k_{nr})n(t), \tag{2.33}$$

kde $n(t)$ představuje množství excitovaných molekul v čase t po excitaci, Γ představuje rychlost emise a k_{nr} rychlost nezářivého vyhasínání. Emise je náhodný děj a všechny excitované molekuly mohou v určitém časovém rozmezí emitovat se stejnou pravděpodobností. Z toho důvodu probíhá vyhasínání populace molekul v excitovaném stavu exponenciální závislostí:

$$n(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right). \tag{2.34}$$

Při měření však obvykle není výhodné brát v potaz počet excitovaných molekul, ale intenzitu fluorescence, která je úměrná $n(t)$. Proto můžeme rovnici (2.33) vyjádřit jako časově závislou intenzitu $I(t)$. Pokud nahradíme v rovnici (2.33) počet molekul právě intenzitou, dostaneme po integrování obvyklou rovnici pro monoexponenciální vyhasínání:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \tag{2.35}$$

kde I_0 je intenzita emise v čase 0. Doba života τ je převrácenou hodnotou absolutní rychlosti vyhasínání, $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$. Převrácená hodnota doby života je obecně součet rychlostí všech procesů, kterými dochází k vyhasínání excitovaného stavu. Dobu života fluorescence můžeme

vyjádřit ze směrnice závislosti log *I(t)* na čase *t*, častěji však z proložení získaných dat předpokládanými modely vyhasínání.

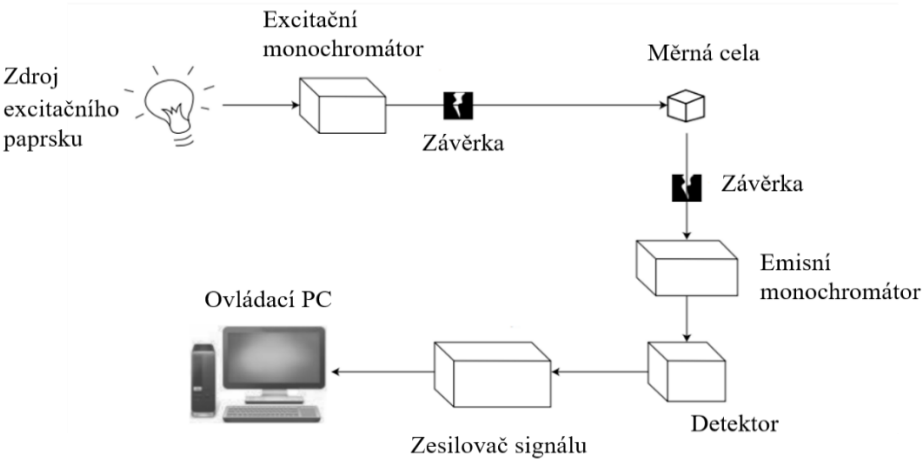
Doba života je průměrnou hodnotou času, po který je molekula fluoroforu v excitovaném stavu po ozáření molekul excitačním paprskem. Pokud zprůměrujeme hodnotu *t* přes vyhasínání intenzity, můžeme průměrný čas molekuly v excitovaném stavu <*t*> vypočítat z rovnice:

$$< t >= \frac{\int_0^\infty tI(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} = \frac{\int_0^\infty texp\left(-\frac{t}{\tau}\right)dt}{\int_0^\infty \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)dt}. \quad (2.36)$$

Jmenovatel této rovnice je roven τ. Integrací rovnice bychom získali hodnotu čitatele jako τ^2. Proto pro monoexponenciální vyhasínání je průměrný čas, který fluorofor zůstane v excitovaném stavu, roven době života. To však neplatí pro složitější případy, například pro multiexponenciální nebo neexponenciální vyhasínání. Je důležité zmínit, že doba života je statistickým průměrem a jednotlivé molekuly emitují po dobu vyhasínání náhodně, fluorofory tedy neemitují všechny najednou v čase odpovídající době života, ale velká část z nich emituje velmi brzo po excitaci, zatímco některé molekuly emitují v čase mnohem větším, než je doba života. Časová distribuce emitovaných fotonů je vyhasínání intenzity fluorescence [1].

2.3.1 Instrumentace pro steady-state spektroskopii

Pro měření fluorescence v steady-state módu bývá použito přístroje zvaného spektrofluorometr (Obr. 5). Tyto přístroje mají zdroj budícího (excitačního) záření v ultrafialové a viditelné oblasti světelného spektra. Pro steady-state měření se nejčastěji používají vysokotlaké výbojky, obvyklá je xenonová výbojka, která disponuje velkou intenzitou světelného záření ve vlnových délkách nad 250 nm. Záření prochází excitačním monochromátorem, pomocí kterého je vybrána požadovaná vlnová délka. Monochromátory bývají obvykle opatřeny štěrbinami s nastavitelnou šířkou, které ovlivňují množství prošlého světla a rozlišení. Následně záření prochází měřící celou se vzorkem, obvykle bývá použito křemenných kyvet. Nejčastěji v kolmém směru k excitačnímu záření bývá snímána emise fluorescence, záření rovněž nejprve projde emisním monochromátorem a následně dopadá na detektor, nejčastěji fotonásobič [10].

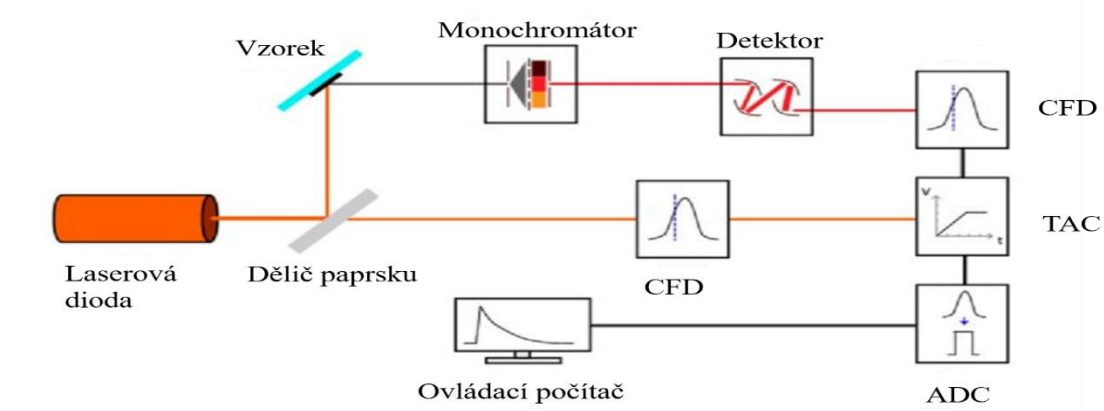


Obr. 5: Schéma steady-state fluorimetru [11]

2.3.2 Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC)

TCSPC (časově-korelované sčítání fotonů) je jednou z nejčastěji používaných metod pro měření v časové doméně. Princip této metody je založen na tom, že pravděpodobnost detekce jednotlivých fotonů v čase *t* po ozáření fluoroforu excitačním pulzem je úměrná intenzitě fluorescence v tomto stejném časovém okamžiku. Dochází k detekci jednotlivých fotonů po excitačním pulzu a je sestrojena vyhasínací křivka fluorescence. Jako zdroj světla bývají použity pikosekundové nebo femtosekundové lasery, často však bývají využity levnější varianty, například pulzní laserové diody (LD) a světlo-emitující diody (LED). Jako detektory bývají použity fotonásobičové trubice. Schéma přístroje pro TCSPC měření je zobrazeno na Obr. 6.

Měření začíná vysláním excitačního světelného pulzu, který excituje vzorek. S tímto pulzem je spojen elektronický signál, který prochází přes diskriminátor (constant function discriminator, CFD), který přesně měří čas příchodu pulzu. Následně signál přechází na převodník, který převádí čas na amplitudu (time-to-amplitude converter, TAC). TAC generuje stoupající napětí, které lineárně roste s časem. V druhém kanálu je současně zachycen pulz tvořený dopadajícím fotonem. Čas příchodu pulzu je opět přesně měřen pomocí CFD, které vyšle signál, který zastaví stoupající napětí. V okamžiku zastavení je tedy napětí v TAC úměrné časovému zpoždění (Δt) mezi excitačním pulzem a detekcí fotonu emitovaného fluoroforem. Pokud je to nutné, tak je napětí zesíleno v zesilovači (programmable gain amplifier, PGA) a převedeno na číselnou hodnotu pomocí analogově-digitálního převodníku (analog-to-digital converter, ADC). Pro omezení chybovosti měření může být signál jen v určitém omezeném rozpětí napětí. Pokud je signál mimo toto povolené rozpětí, dochází k eliminaci této události v diskriminátoru (window discriminator, WD). Napětí přeměněno na digitální hodnotu je uloženo jako jednotlivá událost, která s sebou nese hodnotu změřeného časového zpoždění. Celý tento proces je mnohokrát opakován pomocí pulzního světelného zdroje, aby bylo možno sestavit histogram událostí (vyhasínání) v daných časových zpožděních. Na ose x histogramu jsou vyneseny hodnoty časových rozdílů a na ose y počty fotonů detekované pro určitý časový rozdíl. V metodě TCSPC však není možné detekovat fotony pro každý excitační puls, rychlost detekce se pohybuje kolem 1 detekovaného fotonu na 100 excitačních pulzů, toto omezení rychlosti je způsobeno tím, že současná detekční elektronika není schopna detekovat více fotonů pro pulz při nanosekundových dobách života. Tzv. mrtvý čas, ve kterém elektronika není schopna detekovat další foton, se u starších zařízení pohybuje kolem 10 mikrosekund, u současných přístrojů kolem 120 nanosekund. V případě, že je nutná dekonvoluce, musíme změřit funkci odezvy přístroje (instrument response function, IRF). Tato funkce je odezvou přístroje na vzorek, který má nulovou dobu života a představuje časový profil excitačního pulzu. Získáme ji pomocí měření odezvy zředěného roztoku s velkým rozptylem, typicky bývá použit koloidní křemík (Ludox), nastavení měření je ponecháno stejné jako u vzorku. Získaná data představují nejkratší časový profil, který může být přístrojem zaznamenán, šířka IRF je ovlivněna charakteristikami použitého detektoru a elektroniky [1], [2].



Obr. 6: Zjednodušené schéma časově rozlišeného fluorimetru pro TCSPC měření [12].

2.3.3 Využití fluorescenční technik

Fluorescenční spektroskopie je velmi rozšířená technika využitelná v mnoha odvětvích chemie a biologie, ať už ve vědecké, nebo výrobní sféře. V závislosti na konkrétní technice a použitých fluoroforech můžeme získat informace o velké řadě jevů na molekulární úrovni, například interakce molekul solventu s fluoroforem, rotační difúze biomolekul, měření velikosti biomolekul, změny v jejich konformaci či ve vaznosti. Pomocí rozmanité nabídky fluorescenčních sond můžeme sledovat mikroprostředí různých systémů a můžeme získávat informace například o pH, polaritě, viskozitě aj. Rovněž je možné sledovat vlastnosti a změny různých membránových systémů, fluiditu membrán, jejich uspořádání a stabilitu. Pomocí fluorescenční mikroskopie je možné sledovat například jednotlivé buňky či organely a změny, které u těchto biologických systémů nastávají v závislosti na různé podměty [1].

2.4 Fluorescenční sondy

Jako fluorescenční sondy označujeme zpravidla tzv. vnější fluorofory, které se přirozeně nevyskytují ve vzorku a jsou přidávány pro sledování určitých vlastností systému. Obvykle se jedná o organické molekuly absorbující i emitující ve viditelné oblasti světla. Často obsahují ve své struktuře různé funkční skupiny, jako například amino skupinu, karboxylovou skupinu, karbonyl, hydroxyl, nitro skupinu apod. Obsažené funkční skupiny mohou ovlivňovat některé důležité vlastnosti sond, jako například intenzitu emitovaného záření, posun absorpčního či emisního spektra, rozpustnost aj.[13]. Pomocí fluorescenčních sond lze sledovat širokou škálu vlastností studovaného systému. Je možné sledovat parametry jako jsou polarita, viskozita, pH, přítomnost a koncentrace různých iontů a molekul a další. Časté je rovněž studium stability a uspořádání membrán či sledování různých biochemických dějů probíhajících v buňkách. V kombinaci s fluorescenční mikroskopií jich bývá využito k zobrazování buněčných a tkáňových struktur. Pro navázání na cílové místo studovaného systému bývá využito zejména nekovalentních interakcí [2].

2.4.1 Bodipy 493/503

Bodipy 493/503, strukturním názvem 4,4-Diuoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora3a,4a-diaza-s-indacen, patří mezi skupinu tzv. nepolárních Bodipy sond. Tato skupina se vyznačuje absorpcí a emisí ve vyšších vlnových délkách a rovněž malým Stokesovým posunem. Extinkční koeficienty obvykle dosahují hodnot přes 80 000 $cm^{-1}M^{-1}$. Typický je rovněž vysoký kvantový výtěžek, který není ovlivněn přítomností vody a také vysoká fotostabilita. Díky nízké molekulové hmotnosti (262 Da) vykazuje Bodipy 493/503 relativně vysokou difúzi v membránových systémech. Této sondy bývá často použito pro značení neutrálních lipidů, olejů a dalších nepolárních sloučenin [14].

2.4.2 DiI, DiO

DiI (strukturním názvem 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) i DiO (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate) patří mezi skupinu dialkylcarbocyaninů a patří mezi nejpoužívanější membránové sondy. Spektrální vlastnosti dialkylcarbocyaninových sond nejsou ovlivněny délkou jejich alkylových řetězců, ale typem heteroatomu uvnitř kruhového systému a rovněž délkou můstku spojujícího obě kruhové části molekuly. Excitační maximum DiI se pohybuje u hodnoty 550 nm a emisní maximum u hodnoty 557 nm. Pro DiO je excitační maximum 489 nm a emisní maximum 505 nm. Důležitou vlastností carbocyaninových fluoroforů jsou jejich vysoké molární extinkční koeficienty. Oproti tomu kvantové výtěžky dosahují pouze nízkých hodnot, pro DiI v methanolu kvantový výtěžek činí přibližně 0,07 a v amfifilních solventech, jako je například oktanol, se tato hodnota přibližně ztrojnásobí. Fluorescence z vodného prostředí je pouze nízká. Doba života excitovaného stavu těchto fluoroforů v lipofilním prostředí je krátká, její hodnota se pohybuje kolem 1 ns, celkové vyhasínání fluorescence je multiexponenciálního charakteru. [14].

2.4.3 Octadecyl Rhodamin B chlorid

Octadecyl Rhodamin B chlorid je amfifilním analogem Rhodaminu B, obsahuje postranní alkylový řetězec s délkou 18 uhlíkových atomů. Bývá využíván pro studium buněčných i umělých membránových struktur, například liposomů. Při značení membrán obvykle dochází k začlenění amfifilní části molekuly do membrány, zatímco polární část molekuly zůstává na povrchu membránové struktury. Pro studium fúze membrán bývá využito amfifilního Rhodaminu B jako akceptoru pro Försterův rezonanční přenos energie, jako donor bývá využit například 5-hexadecanoylaminofluorescein. Někdy bývá pro studium fúze membrán použito i faktu, že při vysoké koncentraci sondy dochází k jejímu samozhášení a fluorescence může být opět obnovena po zředění. Excitační maximum činí 556 nm, emisní maximum 578 nm (pro methanol jako rozpouštědlo) [14][15].

2.4.4 5-hexadecanoylaminofluorescein

Sonda 5-hexadecanoylaminofluorescein patří mezi amfifilní deriváty jedné z nejpoužívanějších sond vůbec, fluoresceinu. Nepolární část molekuly zde tvoří řetězec tvořený 16 atomy uhlíku. Podobně jako je tomu i u jiných amfifilních sond, tak se i v tomto případě polární část molekuly nachází na rozhraní mezi hydrofilním a lipofilním prostředím, zatímco alkylový řetězec se zabuduje do lipidické vrstvy. Amfifilní fluoresceiny bývají často používány pro techniku FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) sloužící ke studiu difúze lipidických molekul, rovněž bývají použity například pro studium fúze membrán pomocí metody FRET [14].

2.4.5 Perylen

Molekula perylenu patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky. Vzhledem ke své struktuře se tedy jedná o silně hydrofobní fluorescenční sondu. Excitační maximum se nachází při hodnotě 400 nm, emisní maximum při hodnotě 445 nm (pro směs acetonitrilu s vodou v poměru 8:2). Díky své hydrofobní struktuře bývá často využíván pro studium membránových struktur [16].

2.5 Tenzidy

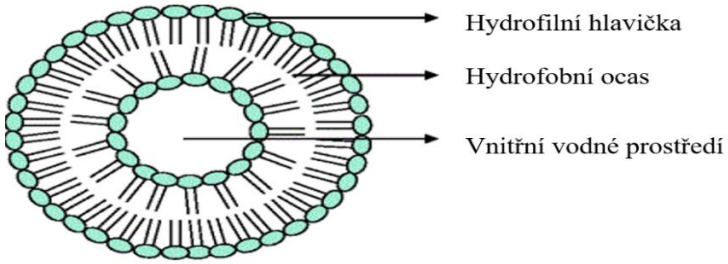
Tenzidy, jinak označovány také jako surfaktanty jsou tzv. povrchově aktivními látkami (PAL). Jejich společnou vlastností je schopnost absorbovat se na povrchy a rozhraní mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi [17]. Hnací silou pro absorpci tenzidu na mezifázové rozhraní je snaha systému snížit volnou energii hranice fází. Mezifázovou volnou energií na jednotku povrchu, někdy nazývanou rovněž povrchové napětí, rozumíme práci potřebnou pro rozšíření rozhraní. V případě, že se na rozhraní mezi fázemi nacházejí molekuly povrchově aktivních látek, je povrchové napětí sníženo [18]. Čím hustěji jsou tenzidy na mezifázovém rozhraní sbaleny, tím více dochází ke snížení mezifázového napětí. Obecně lze říct, že čím silnější je tendence látky hromadit se na rozhraních, tím lépe působí jako tenzid. Množství tenzidu obsaženého na rozhraní závisí na jeho struktuře a na povaze okolních fází. Účinný surfaktant by neměl mít dobrou rozpustnost v celé jednotlivé fázi. Další důležitou vlastností tenzidů je jejich schopnost formovat v roztoku agregáty, nazývané micely. Tvorba micel může být považována za alternativní proces k adsorpci na mezifázové rozhraní, omezení kontaktu hydrofobních skupin s vodou vede ke snížení volné energie celého systému. Koncentrace tenzidu, při které začíná docházet k tvorbě micel, bývá označována jako tzv. kritická micelární koncentrace (CMC) a je důležitou charakteristikou každého surfaktantu [19].

Všechny molekuly tenzidů se vyznačují amfifilní povahou. To znamená, že molekula tenzidu se skládá ze dvou částí, z nichž jedna je rozpustná v určitém rozpouštědle (lyofilní část) a druhá je nerozpustná (lyofobní část). Pokud je rozpouštědlem voda, označujeme lyofilní část jako hydrofilní hlavičku a lyofobní část jako hydrofobní ocas [18]. V micele je hydrofobní část orientovaná směrem dovnitř micelární struktury a hydrofilní část je orientovaná směrem ven, k rozpouštědlu. Hydrofobní ocas molekuly může být lineární nebo rozvětvené povahy. Stupeň větvení řetězce, jeho délka a umístění hydrofilní hlavičky jsou vlastnosti, které mohou významně ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti tenzidu [19]. Tenzidy můžeme dělit podle povahy jejich hydrofilní hlavičky, která může být buď kationaktivní, anionaktivní, neionogenní nebo zwitterionová [20].

2.5.1 Vezikulární systémy

Jako vezikuly nazýváme systémy, které jsou tvořeny z jedné nebo více zakřivených dvojvrstevných membrán uspořádaných do duté sférické částice (Obr. 7). Tato membránová dvojvrstva obklopuje vnitřní vodnou mikrofázi a odděluje ji od vnějšího disperzního prostředí. Na vnějším i vnitřním povrchu částice se nacházejí polární hydrofilní skupiny, které omezují styk hydrofobních uhlíkatých řetězců s vodou. Podle geometrie částice rozeznáváme několik typů vezikul. Částice tvořené jedinou dvojvrstvou nazýváme unilamelární, částice tvořené několika soustřednými dvojvrstvami jsou multilamelární vezikly. Rozměry veziklů se pohybují obvykle v rozmezí od několika desítek nanometrů až do desítek či výjimečně stovek mikrometrů. V případě, že jsou dvojvrstvy tvořeny molekulami fosfolipidů, nazýváme tyto částice jako

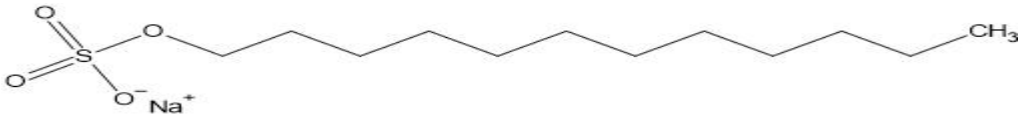
liposomy. Příprava vezikulárních systémů může být provedena několika způsoby, například dispergací a kondenzací, ale ve vhodném uspořádání rovněž samovolným rozpouštěním. Výhoda vezikulárních systémů oproti micelám spočívá v možnosti enkapsulovat mnohem větší množství hydrofilních látek. Právě díky možnosti enkapsulovat velké množství rozličných látek se vezikuly často využívají například jako nosiče pro distribuci léčiv nebo pro kosmetické aplikace [18].



Obr. 7: Schéma vezikulární částice [21]

2.5.2 SDS

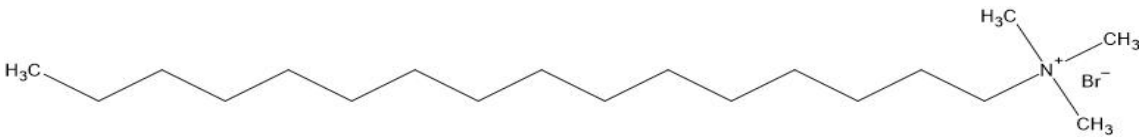
Dodecylsulfát sodný (SDS) patří mezi anionaktivní tenzidy. Patří mezi obvyklé složky domácích čistících prostředků, šampónů a zubních past. Uhlovodíkový řetězec molekuly SDS je tvořen dvanácti atomy uhlíku, polární hlavička je tvořena sulfátovou skupinou. V laboratorní praxi bývá využíván pro solubilizaci bílkovin či například pro separaci proteinů pomocí elektroforetické techniky PAGE-SDS [22][23].



Obr. 8: Struktura SDS [24]

2.5.3 CTAB

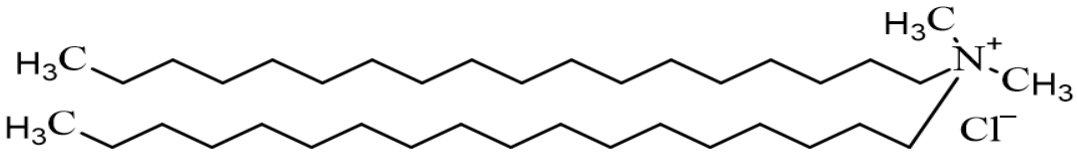
Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) patří mezi skupinu kationaktivních tenzidů, jedná se o kvartérní amoniovou sůl. Jeho nepolární uhlíkatý řetězec je tvořen 16 atomy uhlíku, polární hlavička je tvořena amoniovým kationtem se třemi metylovými skupinami. CTAB vykazuje antiseptické účinky, je například složkou topického antiseptického přípravku Cetrimid. V laboratorní praxi bývá CTAB využito pro izolaci vysokomolekulární DNA především z rostlinných vzorků, pro srážení nukleových kyselin, jako činidla v potenciometrických titracích a tak dále [25][26].



Obr. 9: Struktura CTAB [27]

2.5.4 DODAC

Dioktadecyldimethylammonium chlorid patří mezi dvouřetězcové povrchově aktivní látky, jedná se o kladně nabitý tenzid. Ve své struktuře obsahuje dva uhlíkaté řetězce s délkou osmnácti uhlíkových atomů. Ve vodném prostředí má nad teplotou fázového přechodu mezi gelovou strukturou a strukturou tekutého krystalu schopnost samouspořádávat se do struktur velkých unilamelárních vezikul (large unilamellar vesicles, LUV). Nevýhodou je jeho relativně nízká rozpustnost ve vodě [28].



Obr. 10: Struktura DODAC [29]

2.6 Kataniontové vezikulární systémy

Pod pojmem kataniontové vezikulární systémy si můžeme představit liposomům podobné částice, které jsou připravené ze směsi kationaktivních a anionaktivních tenzidů, které spolu interagují pomocí elektrostatických sil mezi jejich polárními hlavičkami. Typicky bývají použity alkylamonium alkyl sulfáty nebo sulfonáty. Pokud jsou odstraněny z roztoku protiionty, nazýváme zbylý podíl IPA (ion pair amphiphile). Obecně lze říci, že IPA jsou tvořeny pomocí interakcí mezi dvěma opačně nabitými jednořetězcovými tenzidy, které jsou použity ve stejném molárním poměru a můžou být považovány za pseudo-dvojřetězcový tenzid. Parametr kritického sbalení, používaný pro odhadnutí struktury agregátů povrchově aktivních látek ve vodném prostředí, nabývá pro IPA větších hodnot než pro prekurzory tvořící micely. Nastává tak z toho důvodu, že pro IPA dochází ke zmenšení efektivního povrchu hydrofilní hlavičky, a proto je pro IPA upřednostňováno uspořádání do dvojvrstevných vezikulárních systémů. Nevýhodou vezikul připravených z IPA je však často nízká fyzikální stabilita, důsledkem čehož dochází často k fúzi nebo agregaci částic a není zachována dlouhodobá stabilní velikost vezikul. Z toho důvodu byly vyvinuty různé postupy pro možné zvýšení stability kataniontových vezikulárních systémů. Pro zvýšení těsnosti membránové dvojvrstvy byly vyvinuty víceřetězcové IPA. Další možností je přidání cholesterolu nebo alkoholů s dlouhým uhlíkatým řetězcem pro ovlivnění interakcí mezi dvojvrstvami a molekulové sbalení. Pro ovlivnění vzájemných interakcí mezi vezikulami mohou být navíc přidávány iontové tenzidy, které zvýší elektrostatické odpuzování mezi částicemi. Rovněž je možné snížit dielektrickou konstantu rozpouštědla přidáním alkoholů s krátkým uhlovodíkovým řetězcem, což může rovněž přispět k fyzikální stabilitě kataniontových vezikulárních systémů. Kataniontové vezikulární systémy mají potenciál nahradit liposomy sloužící jako nosiče léčiv nebo DNA. Jejich hlavní výhodou je, že tenzidy jsou oproti fosfolipidům, ze kterých jsou připraveny liposomy, mnohem levnější [30][31].

2.6.1 Parametr kritického sbalení

Jak již bylo zmíněno výše, charakter vznikajícího agregátu povrchově aktivních molekul závisí na parametru kritického sbalení P_c:

$$P_c = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \tag{2.37}$$

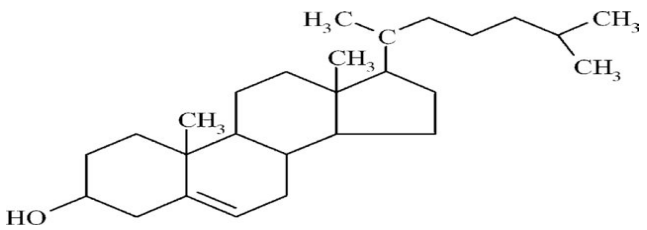
kde a_0 značí minimální povrch, který na rozhraní zaujímá hydrofilní hlavička, v značí objem a l_c délku maximálně nataženého uhlovodíkového řetězce v kapalném prostředí. Pokud hodnota kritického parametru sbalení povrchově aktivní látky dosahuje $P_c \leq 0{,}33$, dojde k vytvoření sférických micel. Pro hodnoty $0{,}33 \leq P_c \leq$ dochází k tvorbě cylindrických nebo diskovitých micel. K vytvoření vezikulárních útvarů dochází, pokud se hodnota P_c nachází v rozmezí od 0,5 do 1, v případě planárních dvojvrstev se hodnota P_c rovná 1. Při hodnotách vyšších než 1 dochází ke vzniku invertních micel [31]. Tvorba vezikul z IPA může být zdůvodněna tím, že efektivní povrch hydrofilní hlavičky na rozhraní v případě IPA je menší, než by byl pro každý tenzid zvlášť, a to z důvodu elektrostatického přitahování mezi hlavičkami a redukci jejich hydratace [31] [32].

2.6.2 Stabilizující látky

Vezikulární systémy, připravené pouze z kataniontových tenzidů bez dalších složek, vykazují velmi nízkou fyzikální stabilitu. Z toho důvodu je nutné, pomocí přídavku dalších látek, upravit intra-vezikulární a inter-vezikulární interakce, které by vedly ke zvýšení stability vezikul. Pro tyto účely mohou být přidány látky, jako například nabitý tenzid (např. DODAC, viz kapitola 2.5.4) nebo cholesterol. U těchto látek již byl prokázán stabilizující efekt [33].

2.6.2.1 Cholesterol

Cholesterol je organická sloučenina patřící do skupiny steroidů. Jeho struktura se vyznačuje čtyřmi spojenými uhlovodíkovými kruhy a polární hydroxylovou skupinou na jedné straně struktury a rozvětveným řetězcem tvořeným osmi uhlíkovými atomy na straně druhé. Část molekuly s uhlovodíkovými kruhy se vyznačuje značnou rigiditou, zatímco uhlovodíkový řetězec je flexibilní a můžeme u něj pozorovat tzv. trans-gauche izomerizaci. Podobnou konformační změnu můžeme pozorovat u hydrofobních ocasů fosfolipidových molekul začleněných do dvojvrstevné struktury. Hydroxylová skupina je jedinou polární částí molekuly cholesterolu. Zbytek molekuly je silně hydrofobní a z toho důvodu se lehce začleňuje do lipidových struktur, kde ovlivňuje fluiditu a dynamiku okolních lipidových řetězců. Molekuly cholesterolu tedy do velké míry ovlivňují fyzikální vlastnosti membrán a rovněž ovlivňují procesy štěpení a fúze. Cholesterol můžeme najít ve všech savčích buňkách. Jeho syntéza probíhá přes několik enzymatických mezikroků v endoplazmatickém retikulu a následně je pomocí Golgiho aparátu transportován k plazmatické membráně, kde je jeho koncentrace ze všech buněčných struktur nejvyšší [34].



Obr. 11: Struktura cholesterolu [35]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Práce vypracované na Fakultě chemické

Petra Holínková se ve své disertační práci zabývala pokročilými fluorescenčními technikami ve výzkumu micelárních koloidů, kdy jednou z technik byl zvolen Försterův rezonanční přenos energie. Pro svou práci použila tenzidy septonex a CTAB. Jako donor-akceptorní pár pro přenos energie byl použit perylen jako donor a fluorescein jako akceptor, kdy perylen je lokalizován v hydrofobním jádru micely a fluorescein interaguje s micelárním povrchem. Pro sledování přenosu energie bylo použito stacionárního i časově rozlišeného měření fluorescence. Byl sledován vliv koncentrace akceptoru na účinnost přenosu energie, byla sledována závislost FRET na čase, které uplyne od přidání akceptoru. Pro donor-akceptorový pár byla definována hodnota Försterova poloměru. Do systému byl rovněž přidáván polyelektrolyt hyaluronan a byl sledován vliv jeho přídavku na probíhající přenos energie.

Pro sledování vlivu, který bude mít na probíhající přenos energie koncentrace akceptoru, byla z korigovaných emisních spekter použita intenzita emise při 441 nm, která odpovídá maximu prvnímu píku emise perylenu, jelikož zde dochází k minimálnímu ovlivnění emisí molekuly fluoresceinu. Z výsledků je patrné, že se zvyšující se koncentrací akceptoru v systému dochází k poklesu intenzity fluorescence donoru. Byla sestrojena Stern-Volmerova a Perrinova závislost zhášení na koncentraci fluoresceinu v systému pro koncentrační řadu s oběma použitými tenzidy. Ze závislostí bylo zjištěno, že molekuly donoru a akceptoru jsou spolu seskupeny a nacházejí se ve stejném uzavřeném prostředí, jedná se o tzv. caged systém. V případě intramicelárního FRET to znamená, že molekula perylenu je obsažena v hydrofobním jádře a fluorescein interaguje s povrchem micely. Z výsledků stacionárních měření bylo rovněž zjištěno, že se mezi micelárními systémy tvořenými CTAB a septonexem liší hodnota poměru intenzit fluorescence I_0/I, která byla pro vzorek s nejvyšší koncentrací akceptoru asi třiapůlkrát vyšší v případě systému tvořeného CTAB než v systému tvořeném septonexem. Po vyloučení všech možných ostatních faktorů bylo předpovězeno, že je tomu tak pravděpodobně z důvodu vhodnější orientace přechodových momentů fluoroforů v CTAB oproti septonexu.

Podobné rozdíly byly potvrzeny i pomocí časově rozlišeného měření. V systémech bez přítomnosti akceptoru byla zjištěna jedna doba života perylenu odpovídající pro systémy s CTAB $\tau_{D,CTAB}$ = (5,74 ± 0,02) ns a pro systémy založené na septonexu $\tau_{D,SPTX}$ = (5,77 ± 0,02) ns. V systémech obsahujících i akceptor byly jak pro CTAB, tak i pro septonex nalezeny dvě doby života. Kratší doba života τ_{DA} se pohybovala mezi hodnotami 0,5 a 1,3 ns. Tato kratší doba života přísluší molekulám perylenu u kterých dochází ke zhášení fluorescence vlivem přenosu energie. Delší doba odpovídá nezhášeným molekulám perylenu. Ze získaných dob života a odpovídajících amplitud byla následně vypočtena účinnost přenosu energie a vázaná frakce N_{DA} v systému. Bylo zjištěno, že pro oba systémy nabývá účinnost přenosu energie stejných hodnot. Díky tomu lze předpokládat, že vzdálenost mezi molekulami donoru a akceptoru je pro systémy tvořené CTAB i septonexem stejná. Hodnota vázané frakce však mezi systémy dosahuje rozdílných hodnot, v případě micel tvořených CTAB vzniká větší množství párů donor-akceptor, než je tomu v případě micel tvořených septonexem.

Pro studium vlivu přídavku hyaluronanu do kationtového micelárního systému byly použity opakující se časově rozlišená měření, mezi kterými bylo přidáno do vzorku určité množství roztoku hyaluronanu. Následně byly vyhodnoceny doby života a příslušné amplitudy odpovídající

zhášeným a nezhášeným molekulám perylenu a byla vypočtena účinnost přenosu energie a vázaná frakce párů donor-akceptor. Bylo zjištěno, že pro oba systémy dochází se zvyšující se koncentrací hyaluronanu v systému k prodlužování doby života patřící molekulám zhášeného perylenu a k nárůstu příslušné amplitudy. Dochází tak tedy ke snížení účinnosti přenosu energie spolu se zvyšujícím se množstvím hyaluronanu v systému a současně se zvyšuje hodnota vázané frakce párů donor-akceptor. Z těchto zjištění vyplývá, že dochází ke zvětšování vzdálenosti mezi donory a akceptory v systému a rovněž dochází k nárůstu počtu párů donor-akceptor. Pro zjištěné výsledky jsou možné dvě vysvětlení. První z možností je to, že dochází k fúzi několika micel do jedné větší micely. Druhým možným vysvětlením je vznik tzv. struktury perlového náhrdelníku, kdy dochází k vytváření agregátů micelárního typu na řetězci polyelektrolytu. V obou možných případech by mělo docházet ke zvýšení pravděpodobnosti tvorby donor-akceptorového páru ve vzdálenosti vhodné k proběhnutí přenosu energie a zároveň by se měla vzdálenost mezi molekulami donoru a akceptoru zvětšit [36].

David Janča se ve své diplomové práci zabýval FRET v prostředí hydrogelové matrice. Pro měření bylo použito prostředí 0,15 M NaCl, hydrogely byly tvořeny záporně nabitým polyelektrolytem hyaluronanem a kladně nabitým tenzidem septonexem. Byly zvoleny dva donor-akceptorové páry, konkrétně perylen s fluoresceinem a perylen s DiO. Nejprve bylo provedeno měření páru perylen-fluorescein v prostředí 0,15 M NaCl, kdy bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací akceptoru ve vzorku dochází ke zvyšování intenzity FRET. Pro pár perylen-DiO bylo provedeno měření v micelárním roztoku tvořeném septonexem v prostředí 0,15 M NaCl. Bylo zjištěno, že DiO i při vyšších koncentracích tenzidu vykazuje špatnou rozpustnost a dochází k jeho usazování.

Hlavní součástí experimentální práce bylo pozorování přenosu energie v hydrogelech. Pro oba donor-akceptorové páry bylo potvrzeno, že v prostředí hydrogelové matrice dochází k přenosu energie. V případě použití fluoresceinu jako akceptoru bylo zjištěno, že přídavek hyaluronanu indukuje vznik dvou populací zhášeného perylenu, které mají velmi rozdílné doby života. Rovněž došlo ke snížení účinnosti přenosu energie se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu. Oproti roztoku však došlo k výraznému zvýšení intenzity FRET. Hydrogely s DiO jako akceptorem vykazují vysokou účinnost FRET. Při použití vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu pak následně dochází k jejímu mírnému snížení. Intenzita přenosu energie v gelech s vyšší molekulovou hmotností klesá. Výjimkou je gel s 200 mM koncentrací septonexu, kdy naopak dochází ke zvýšení. Z výsledků je možno usoudit, že dochází mezi micelami k výměně obsahu, jelikož perylen i DiO byly zvlášť solubilizovány v micelách a až poté smíchány, nicméně k přenosu energie docházelo. S větší molekulovou hmotností hyaluronanu dochází ke zvětšení velikosti micel, což vyúsťuje ke snížení účinnosti FRET v důsledku nárůstu vzdálenosti mezi donor-akceptorními páry. Druhou možností vysvětlující snížení účinnosti přenosu energie je změna orientačního faktoru v důsledku změny rigidity prostředí. Dvě populace dob života perylenu v přítomnosti fluoresceinu jako akceptoru mohou znamenat, že se v systému vyskytují micely dvojího typu. Mohlo by se jednat o menší micely a micely větší, které jsou vázány na řetězec hyaluronanu. Možná je rovněž fúze menších micel v micely větší [37].

3.2 Použití Försterova přenosu energie ke studiu stability vezikulárních systémů

Rafael B. Lira a spol. se ve svém článku zabývali fúzí membrán liposomálních částic s opačnými náboji v systému bez proteinů. Fúze byla zkoumána mezi kationtovými velkými unilamelárními liposomy (LUV, large unilamellar vesicles) a aniontovou obří vezikulou (GUV, giant unilamellar vesicles). Tyto částice byli složeny z různých molárních poměrů palmitoyloleoylfosfatidylcholinu (POPC), palmitoyloleoylfosfatidylglycerolu (POPG) a 1,2-dioleoyl-3-trumethylamonium propanu (DOTAP). Pomocí optické mikroskopie a mikrofluidních technik bylo zjištěno, že liposomy se velmi silně vážou k GUV tvořené pouze POPC nebo s malou molární frakcí (do 10 mol%) POPG v procesu, ve kterém hraje roli především hemifúze a zvýšení membránového napětí, obvykle následované k roztrhnutí GUV. Avšak pro GUV tvořených nejméně 20 mol% frakcí POPG dochází k rychlé a účinné fúzi LUV, což vyúsťuje ve velký nárůst povrchu GUV. Pro hemifúzi i fúzi platí, že k nim dochází bez úniku jejich vnitřního prostředí. Účinnost fúze je definována pomocí přenosu lipidických molekul z liposomů na GUV pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Jako donor pro přenos energie bylo použito NBD-PE, jako akceptor DPPE-Rhodamin. Použité LUV se skládaly z DOTAP/DOPE/sondy v poměru 1:1:0,1 a GUV byly připraveny především z POPC se zvyšující se frakcí POPG. Pro většinu měření byly použity LUV značené akceptorem a GUV značené donorem. Pozorování GUV následně vedlo k rozlišení různých fází procesů fúze vezikul, a to nasedání LUV, hemifúzi a kompletní fúzi. Tyto procesy od sebe mohly být rozlišeny jak změnami v morfologii GUV, tak především sledováním změn účinnosti přenosu energie mezi donorem a akceptorem. V případě, kdy dojde pouze k nasednutí LUV, dojde k deformaci GUV v závislosti na elektrostatických interakcích, zároveň však nedojde k žádné nebo minimální změně v účinnosti přenosu energie. V případě hemifúze dochází k tomu, že do vnější vrstvy GUV jsou přeneseny molekuly akceptoru a dojde k malé, nicméně detekovatelné změně přenosu energie. V případě úplné fúze vezikul dochází k přenosu velkého množství lipidů z LUV na GUV, což vede ke zvýšení povrchu a následným změnám v přenosu energie, které jsou velmi výrazné z důvodu přítomnosti velkého množství molekul akceptoru. Pro sledování fúze bylo využito jak měření intenzity fluorescence, tak sledování doby života pomocí FLIM-FRET techniky (měření bylo prováděno pomocí konfokálního mikroskopu), kdy byla sledována změna doby života fluorescence donoru před přidáním vezikul s akceptorem a po jejich přidání. Následně byly vyhodnoceny změny v účinnosti přenosu energie, které korespondovaly s procesy probíhajícími mezi vezikulami a vedoucími až k jejich fúzi [38].

Ve svém článku se **Hana Robson Marsden a spol.** zabývali navržením lipidovaných oligopeptidů plnících funkci modelů tzv. SNARE proteinů (SNARE = soluble NSF attachment protein receptor). Tyto proteiny mohou indukovat svou vzájemnou interakcí fúzi buněčných membrán například s různými transportními vezikulami. Pro studium těchto dějů byly navrženy modelové molekuly lipidovaných oligopeptidů LPE a LPK, které vykazují funkční vlastnosti SNARE proteinů. V této práci je interakci mezi LPE a LPK použita k vzájemnému přiblížení liposomů, které byly složeny z DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholinu, DOPE (1,2-dioleyol-sn-glycero-3-phosphatidylethanolaminu) a cholesterolu (CH) v molárním poměru DOPC/DOPE/CH 50:25:25 mol. %. Pro zjištění, zdali interakce mezi LPE a LPK může poskytnout dostatečnou hnací sílu pro přiblížení a fúzi liposomů, byla provedena fluorescenční měření. Účinnost míchání liposomálních lipidů byla určena pomocí rezonančního přenosu energie. Do liposomů obsahujících LPK byly inkorporovány fluorescenční sondy nitrobenzofuran (NBD) plnící funkci donoru a lissamine rhodamin (LR) plnící funkci akceptoru). V tomto systému

byla pozorována velká účinnost přenosu energie díky krátké vzdálenosti mezi donorem a akceptorem. Po smíchání s liposomy obsahujícími LPE došlo ke zvýšení emise donoru NBD v důsledku zvětšení vzdálenosti mezi donorem akceptorem, jelikož došlo k fúzi (nebo minimálně k hemifúzi) liposomů s LPE s liposomy s LPK a povrchová hustota donor-akceptorních párů v membráně se tím snížila. Pro studium fúze liposomů pomocí FRET bylo použito měření intenzity pomocí fluorimetru FS920 (Edinburgh Instruments), při měřeních byla sledována emise donoru NBD [39].

Ana Rita O. Rodrigues se se svým týmem zabývala přípravou magnetických liposomů na bázi nikl-ferritových nanočástic s možným využitím pro medicínské aplikace. Po přípravě byly vytvořené nanočástice pokryty lipidickou dvojvrstvou za tvorby tzv. suchých magnetických liposomů (dry magnetic liposomes, DLMs) nebo byly enkapsulovány do liposomů za tvorby vodných magnetoliposomů (aqueous magnetoliposomes, AMLs). Pro přípravu DLMs bylo použito dvou vrstev fosfolipidu 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerolu (DOPG), pro přípravu liposomů použitých pro enkapsulaci nanočástic a tvorbu AMLs bylo využito phosphatidylcholinu izolovaného z vaječného žloutku (Egg-PC). Tvorba dvojvrstvy u DMLs byla potvrzena pomocí rezonančního přenosu energie, kdy značený lipid NBD-C_{12}-HPC, použitý jako donor, byl včleněn do vnější lipidové vrstvy a další značený lipid Rhodamin-B-DOPE, použitý jako akceptor, byl inkorporován do vnitřní lipidové vrstvy. Následným měřením přenosu energie mezi donorem a akceptorem byla zjištěna jejich vzdálenost, která se v měřeném systému rovnala 3 nm. Pro studium nespecifických interakcí těchto magnetoliposomových částic s biologickými membránami byl použit modelový systém s využitím obřích unilamelárních vezikulárních částic (GUV). Pomocí FRET bylo zkoumáno, jestli dochází k fúzi magnetoliposomů s GUV. Pro ALMs bylo použito NBD-C_{12}-HPC jako donoru a nilské červeni jako akceptoru. Účinnost přenosu energie byla zjištěna z poměru intenzity emise fluorescence donoru v přítomnosti a nepřítomnosti molekuly akceptoru, pro měření byl použit fluorimetr Fluorolog 3. Pozorovány byly dva emisní pásy, první s maximem o vlnové délce maxima 550 nm odpovídající emisi donoru a druhý o vlnové délce maxima 630 nm odpovídající akceptoru, který je závislý na přenosu energie z excitovaných molekul NBD. Po interakci magnetických částic s GUV docházelo ke zvýšení intenzity fluorescence donoru, tedy k poklesu účinnosti přenosu energie, což je vysvětleno fúzí GUV a magnetoliposomů a tedy zvětšením vzdálenosti mezi molekulami donoru a akceptoru. Podobné měření bylo použito i pro DMLs částice, avšak jako akceptoru bylo využito fluoroforu Rhodamin-B-Dope. Bylo dosaženo obdobných výsledků. Lze tedy říci, že oba typy připravených magnetických liposomů mohou být použity jako nosiče pro hydrofilní i hydrofobní léčiva s možností uvolnění léčiv při fúzi těchto nosičů s buněčnou membránou [40].

Pierre Karam a spol. se ve své práci zabývali interakcemi mezi záporně nabitými, amfifilními polyphenylene ethylene polymery (PPE) s liposomy připravenými ze záporně nabitých, kladně nabitých nebo zwitterionových lipidů. Připraveny byly PPE se 7 a 49 opakujícími se jednotkami a s bočním řetězcem zakončeným karboxylovou skupinou. Jako záporně nabitý lipid byl použit DOPA, jako kladně nabitý lipid DOTAP a zwitterionový DOPC. Změřená emisní spektra PPE se 7 a 49 opakujícími se jednotkami ukázala, že se polymer začleňuje mezi kladně nabité lipidy a vyskytuje se zde jako volný řetězec, se záporně nabitými lipidy žádná interakce zjištěna nebyla. Při interakci se zwitterionovými lipidy bylo zjištěno, že většina polymerních molekul zůstává v agregovaném stavu a pouze malá frakce se začleňuje mezi lipidy. Pomocí titračních metod bylo zjištěno, že nasycení zwitterionové membrány polymery PPE nastává přibližně při molárním poměru polymerních jednotek k molekulám lipidů asi 0,05. Pro kladně nabité lipidy tato hodnota činí přibližně 0,1 a nad touto hodnotou došlo k vysrážení liposomů. Pro objasnění příčiny

vysrážení byla použita metoda Försterova rezonančního přenosu energie. Při přípravě byla do liposomů jako donor inkorporována fluorescenční sonda DiI s emisí v zelené oblasti viditelného spektra a fluorescenční sonda DiD s emisí v červené oblasti jako akceptor. Sondy byly přidány k připraveným liposomům o velikosti 200 nm v průměru v koncentraci 2 mol. %. Následně bylo smícháno stejné množství liposomů značených DiI s liposomy značenými DiD, aby výsledná koncentrace lipidů ve vzorku činila 10^{-5} M. Následně byly snímány emisní spektra při excitaci DiI vlnovou délkou 520 nm, a to ihned po smíchání, po 30 minutách a po 60 minutách z toho důvodu, aby byly zjištěny změny ve fluorescenci vzorku v nepřítomnosti PPE. Následně bylo přidáno PPE v množství odpovídajícímu poměru PPE k lipidům 0,05. Získané výsledky indikují, že především pro PPE s delším řetězcem dochází k interakcím, které vedou k hemifúzi nebo k fúzi liposomů založených na kladně nabitých lipidech. Z dosažených výsledků lze předpokládat, že fúze je výsledkem destabilizace membrány liposomů a nastává především při použití polymerů s delším řetězcem, které způsobují větší deformaci membrány než polymery s řetězcem kratším [41].

Itsuro Tomatsu a kolektiv se ve své práci zabývali vlivem pegylace na fúzi liposomů zprostředkovanou pomocí proteinových molekul. Navázali na práci skupiny pod vedením Hany Robson Marsden (viz. [39]). I v této práci byly použity analogy SNARE proteinů LPE a LPK, které jsou schopné navodit fúzi membránových struktur. Studované liposomy byly tvořeny z DOPC, DOPE a cholesterolu. Na povrch těchto liposomů poté byly připojeny krátké řetězce PEG. Bylo zjištěno, že v systémech neobsahujících PEG dochází k fúzi liposomů mezi částicemi s komplementárními proteiny, zatímco v systémech s PEG připojeným na povrch liposomů je fúzi bráněno. Pro studium fúze bylo použito Försterova rezonančního přenosu energie mezi molekulami lipidů s připojenými fluorofory. Jako donor byl použit DOPE-NBD a jako akceptor DOPE-LR (DOPE-lissamine rhodamin). Všechna měření probíhala při laboratorní teplotě za použití křemenné kyvety, použit byl spektrofluorometr LS50B (Perkin Elmer). Postupováno bylo tak, že byl smíchán 1 ml liposomů značených fluorofory a 1 ml neznačených liposomů. Následně byla kontinuálně snímána intenzita fluorescence NBD při 530 nm po dobu 3000 s. Probíhající fúze liposomů se projevovala zvyšováním intenzity emise donoru NBD, jelikož docházelo ke zvyšování vzdálenosti mezi molekulami donorů a akceptorů v membráně, a tedy ke snížení účinnosti FRET. Poté byl přidán Triton X-100, který způsobil lýzi všech liposomů, aby mohla být kvantifikována maximální hodnota fluorescence. Hodnoty získané po přidání Tritonu X-100 byly násobeny hodnotou 1,82, která zahrnuje efekt Tritonu X-100 na fluorescenci NBD a rovněž efekt zředění systému přídavkem. Pomocí FRET bylo dokázáno, že liposomy s PEG na povrchu nemají sklon k fúzi zprostředkované peptidy, zatímco liposomy bez PEG fúzi podstupovaly. Bylo zjištěno, že u vzorku s PEG dochází k inhibici tvorby komplexů mezi použitými proteiny a k nasedání liposomů na sebe, tudíž fúzi je zabráněno již na začátku procesu. K zabránění tohoto procesu stačí méně než 2 mol. % pegylovaných lipidů ve vzorku. Výsledky byly podpořeny daty z DLS a ze spektroskopie cirkulárního dichroismu [42].

Tým **Yury S. Tarahovskyho** se zabýval phosphatidylcholinovými liposomy a jejich agregací a fúzí závislou na vápenatých iontech a indukovanou flavonoidy s dvoumocným železem. Použity byly flavonoidy quercetin, taxifolin, catechin, morin, rutin a phloretin. Zkoumány byly unilamelární liposomy o velikosti 100 nm tvořené 1-palmitoyl-2-oleoylglycero-3-phosphatidylcholinem. Pro komplexy quercetinu, taxifolinu, catechinu a morinu s dvojmocným železem bylo zjištěno, že mají schopnost zvýšit rozptyl světla v suspenzi používaných liposomů. Při použití phloretinu nebyla žádná změna zjištěna, jelikož tento flavonoid nemá schopnost interagovat s železem. Podobně tomu bylo u rutinu, který je hydrofilní, a tedy nemá schopnost ovlivňovat lipidovou dvojvrstvu Pomocí metody FRET byla prokázána výměna lipidů mezi

liposomy interagujícími s komplexy flavonoid-železo a vápníkem. Bylo použito sondy NBD-PE jako donoru a Rhodaminu-PE jako akceptoru. Excitační vlnová délka činila 500 nm, emise donoru byla snímána při 537 nm a emise akceptoru při 590 nm. Aby mohl být rozsah fúze definován pomocí procentuální změny emise vzorku, byl přidán do systému na konci měření triton X100 způsobující lýzy liposomálních částic, která vede k maximálnímu nárůstu přenosu energie. Jelikož z měření dynamického rozptylu světla bylo zjištěno, že nejmarkantnější změny v systému nastávají po přidání vápenatých iontů, byla právě po provedení tohoto kroku snímána fluorescence. Emise NBD-PE se po přidání vápenatých iontů postupně zvyšovala, zatímco emise akceptoru Rhodamin-PE pomalu klesala, z čehož lze vyvodit, že docházelo ke snížení účinnosti FRET. K tomu docházelo pravděpodobně díky výměně lipidů mezi značenými a neznačenými liposomy, díky čemuž se snížila hustota fluorescenčních sond ve dvojvrstvě, a následné fúzi liposomů. Výsledky získané pomocí metody FRET byly následně podpořeny i tzv. freeze-fracture elektronovou mikroskopií, kdy na získaných snímcích byla zřetelná přítomnost velkých (tzv. giant) liposomů, které vznikly fúzí zkoumaných malých liposomů [43].

Sofia Trier se ve svém článku věnovala fúzi pH-citlivých liposomů. Ve své práci použila pH-citlivé liposomy složené z kyseliny olejové a DOPE fosfolipidů a studovala jejich fúzi s obří unilamelární vezikulou obsahující ve své struktuře 5 nebo 10 mol. % kladně nabitých lipidických molekul. Fúze byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie a rovněž pomocí sledování míchání lipidů mezi vezikulami skrze Försterův rezonanční přenos energie. Jako donor pro přenos energie byl zvolen NBD-DOPE a jako akceptor Rho-DOPE. Pro měření fluorescence a zobrazování liposomů bylo použito fluorescenčního konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 AOBS opatřeným 100× olejovým objektivem. NBD bylo excitováno vlnovou délkou 458 nm a emise byla snímána v rozmezí 470–550 nm. Rhodamin B byl excitován vlnovou délkou 561 nm a emise byla snímána v rozmezí 600–700 nm (nebyla měřena v emisním maximu, aby došlo k odfiltrování emise NBD). Pro kvantifikaci fluorescenčního signálu v GUV byl napsán program v programovacím prostředí Python. Bylo zjištěno, množství fúzních procesů, do kterých se zapojila 1 GUV se za 30 minut při pokojové teplotě rovná přibližně 100 na 100 μm^2 pro GUV s 5 mol. % kladně nabitých lipidů a 200 na 100 μm^2 pro GUV s 10 mol% kladných lipidů. Bylo potvrzeno, že fúze je závislá na pH a je podporována elektrostatickým přitahováním mezi vezikulami. Rovněž byla provedena měření s pomocí calceinu pro vizualizaci a kvantifikaci přenosu vnitřního vodného obsahu vezikul při fúzi [44].

Coline Jumeaux se se svým týmem zabýval věnoval možnosti selektivní detekce biomarkerů pomocí DNA–zprostředkované liposomální fúze. Konkrétně se jednalo o detekci chřipkového mikroRNA biomarkeru miR29a. Využili způsobu indukce fúze liposomů pomocí hybridizace molekul DNA začleněných do struktury membrány. Do liposomů byla začleněna dvouřetězcová DNA pomocí konců nesoucích molekulu cholesterolu, při přiblížení liposomů s řetězci DNA schopnými hybridizace došlo k vytvoření struktury podobné zipu, která vede k přiblížení liposomů a jejich následné fúzi. K detekci chřipkové mikroRNA biomarkeru bylo postupováno tak, že na část liposomů značených fluoroforem DiD a nesoucích molekulu DNA ds–A/B byl právě k DNA připojen další krátký nukleotidový řetězec s vlásenkou, který zabraňoval hybridizaci s řetězcem DNA ds-C/D, které nesly liposomy značené sondou DiI. Úsek DNA s vlásenkou tedy zabraňoval hybridizaci a následné fúzi liposomů. Nicméně vlásenka rovněž obsahovala oblast, která je komplementární k mikroRNA biomarkeru miR29a a v případě, že došlo k hybridizaci mezi těmito komplementárními úseky, tak nastalo uvolnění vlásenky z ds-A/B DNA a došlo k hybridizaci mezi řetězci A/B a C/D a následnému přiblížení a fúzi liposomů. Jelikož byly liposomy značeny fluorofory DiI a DiD, které jsou schopny tvořit FRET donor-akceptorový pár, tak po fúzi liposomů došlo ke zvýšení účinnosti FRET, díky čemuž byla

detekována přítomnost biomarkeru mikroDNA ve vzorku. Liposomy byly připraveny z DOPC/DOPE/cholesterolu v poměru 50:25:25 a obsahovaly 2 mol% DiD nebo DiI. Měření byla uskutečněna pomocí microplate čtečky SpectraMax M5 při 25 °C, excitační vlnová délka byla 530 nm a emisní vlnová délka pro DiI 570 nm a pro DiD 670 nm. Další použitou metodou byla fluorescenční korelační mikroskopie, kdy bylo použito děliče paprsku pro oddělení emise z DiI a DiD. Při využití mikroskopie bylo možné používat menší množství vzorku za vyšší citlivosti měření [45].

Podobně jako Coline Jumeaux ([45]) ve své práci postupoval i tým **Federico Mazura**, který se zabýval detekcí metalloproteinasy MMP–7 pomocí peptidy-zprostředkované liposomální fúze. Enzym MMP–7 bývá ve větším množství exprimován při některých nádorových a dalších onemocněních, a proto bývá považován za klinicky relevantní biomarker těchto onemocnění. Při způsobu detekce pomocí liposomální fúze je využito krátkých proteinových řetězců JR2EC a JR2KC ukotvených na povrch liposomů, které mohou vzájemně vytvořit strukturu zvanou superhelix (coiled–coil), čímž dojde k vzájemnému přiblížení liposomů a k jejich fúzi, která je detekována pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Liposomy obsahující JR2EC jsou značeny fluoroforem DiI a liposomy obsahující JR2KC jsou značeny pomocí fluoroforu DiD. V případě, že dojde k fúzi liposomů, tak se dostanou oba fluorofory do potřebné vzdálenosti k průběhu FRET a je detekováno zvýšení intenzity emise akceptory v důsledku přenosu energie mezi donor–akceptorovým párem. Pokud je ve vzorku přítomen enzym MMP-7, dochází k rozštěpení peptidu MMP–7, čímž je zabráněno vytvoření superhelixu, a tedy i fúzi liposomů. V tomto případě pak nedochází k FRET a nenastává zvýšení emise akceptoru [46].

Prasenjit Mondal se se svou skupinou věnoval studiu rozdílu dynamických procesů mezi liposomy a buněčnými systémy. Jejich motivací bylo imitovat adhezivní procesy mezi buňkami, které jsou značně komplexní a komplikované díky složitým intracelulárním a intra-membránovým interakcím, pomocí modelu založeného na liposomech. Byly použity liposomy, z nichž část byla značena pomocí fluoresceinu (použit byl amfifilní Fluorescein-DHPE) a část pomocí TRITC (tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát). Interakce mezi liposomy byla zprostředkována pomocí interakce mezi biotinem a neutravidinem. Ke sledování procesů adheze mezi značenými liposomy byl použit Förstерův rezonanční přenos energie, kdy fluorescein vystupoval jako donor a TRITC jako akceptor. Všechna fluorescenční měření byla provedena pomocí konfokálního mikroskopu Mikroskopu MicroTime 200 (PicoQuant). Spektra byla snímána pomocí mikroskopu osazeného detektorem tzv. electron multiplying charged-coupled device (EMCCD) připojeným ke spektrografu (ANDOR Technology). Paralelní a kolmá složka vyhasínání fluorescence byla snímána za magického úhlu pomocí dvou detektorů (Micro Photon Device, MPD). Pro excitaci donoru byl použit 488 nm laser a pro excitaci akceptoru 561 nm laser. Emise byla pro donor snímána při 522 nm a pro akceptor při 580 nm. Pro snímání odezvy přístroje (instrument response function, IRF) byla použita 470 nm laserová dioda. Bylo zjištěno, že dochází k přenosu energie, a to jak dle snížení doby života donoru, tak zvýšení doby života akceptoru. Rovněž byly zjištěny fluktuace v emisi akceptoru, které jsou pravděpodobně způsobeny strukturními oscilacemi způsobenými při připojení dvou membrán pomocí flexibilní interakce mezi biotinem a neutravidinem. Výsledky získané při studiu liposomů byly porovnány s *in vitro* systémem živých buněk, konkrétně CHO buňkami (Chinese Hamster Ovary cells). Pro buňky bylo použito CPM (7-diethylamino-3-(4-maleimido-phenyl)-4-methylcoumarin) jako donor a nilská červeň jako akceptor. Procesy mezi buněčnými membránami byly rovněž sledovány pomocí rezonančního přenosu energie a bylo zjištěno, že intenzita emise akceptoru rovněž osciluje, avšak v kratších časových intervalech, což značí, že u buněk dochází k většímu množství různých procesů způsobených proteinovými komplexy buněčné membrány [47].

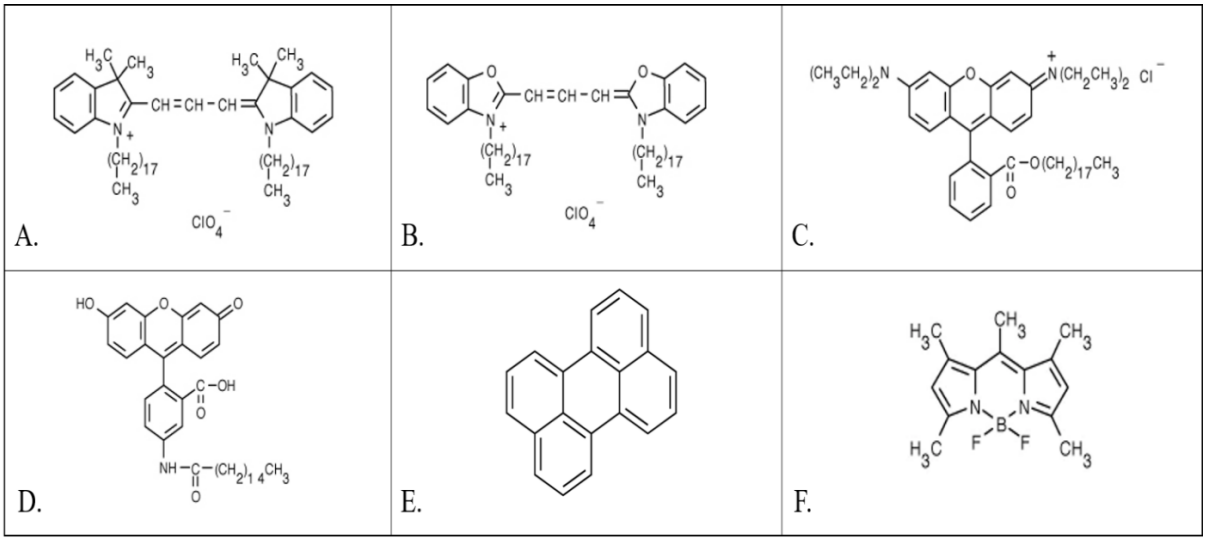
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce je díky získaným teoretickým poznatkům a na základě literární rešerše zpracované v kapitole 3 navrhnout a ověřit vhodný postup pro studium fúze kladně nabitých kataniontových vezikulárních tenzidů založených na CTA-DS. Zvolenou metodou je Försterův rezonanční přenos energie. Na základě teoretických poznatků a rešerše bylo zvoleno několik fluorescenčních sond, které by mohly sloužit jako donor či akceptor pro FRET. Kvůli charakteru zkoumaného systému byly zvoleny amfifilní sondy schopné se začlenit do dvojvrstvy kataniontových vezikul. Nejprve bylo nutné proměřit excitační a emisní spektra zvolených sond a vybrat vhodné donor-akceptorové páry, které splňují pravidlo překryvu emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru. Poté byly provedeny měření v časové doméně pomocí TCSPC fluorimetru, kdy byla sledována doba života fluorescence donoru v nepřítomnosti a přítomnosti molekuly akceptoru. Měření byla provedena na systémech s různým obsahem cholesterolu, který má schopnost zvyšovat stabilitu připravovaných kataniontových vezikul. Zkoumány byly rovněž různé postupy značení kataniontových vezikul pomocí zvolených fluoroforů a byly sledovány změny v rezonančním přenosu energie v čase. Postup přípravy kataniontových vezikul byl navržen na základě několika článku kolegů ze spolupracující Taiwanské univerzity, kteří se touto přípravou zabývají, viz. [33], [48], [49].

4.1 Použité chemikálie:

DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorát)
Mw = 933,8793 g/mol; CAS: 41085-99-8; Č. šarže: BCCB3796 ; ThermoFisher Scientific
DiO (3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorát)
Mw = 881,7173 g/mol; CAS: 34215-57-1; Č. šarže: MKCG8669; ThermoFisher Scientific
Oktadecyl Rhodamin B Chlorid
Mw = 731,4999 g/mol; CAS: 65603-19-2; Č. šarže: BCBX6016; ThermoFisher Scientific
5-Hexadecanoylaminofluorescein
Mw = 585,738 g/mol; CAS: 73024-80-3; Č. šarže: 2138363; ThermoFisher Scientific
Perylen
Mw = 252,31 g/mol; CAS: 198-55-0; Č. šarže: 384079/1; Fluka
BODIPY™ 493/503
Mw = 262,1085 g/mol; CAS: 121207-31-6; Č. šarže: MKCH0728; ThermoFisher Scientific
CTAB
Mw = 365, 45 g/mol; CAS: 57-09-0; Č. šarže: 102092494; Sigma Aldrich
SDS
Mw = 288,38 g/mol; CAS: 151-21-3; Č. šarže: 101923757; Sigma Aldrich
DODAC
Mw = 586,64 g/mol; CAS: 107-64-2; Č. šarže: 10147338; Alfa Aesar

Cholesterol
Mw = 386,65 g/mol; CAS: 57-88-5; Č. šarže: BCBK3087V; Sigma Aldrich
Aceton
CAS: 67-64-1; č. šarže: PP/2019/05816; Lach-Ner, s. r. o.
Chloroform
CAS: 67-66-3; č. šarže: 2107210716; Penta
Dimethylsulfoxid
CAS: 67-68-5; č. šarže: BCBM7864V; Fluka Analytical
Deionizovaná voda
Systém ELGA



Obr. 12: Použité fluorescenční sondy: A. DiI; B. DiO; C. Oktadecyl Rhodamin B Chlorid; D. 5-HexaaminodecanoylFluorescein; E. Perylen, F. Bodipy 493/503

4.2 Použité přístroje

4.2.1 Steady state fluorimetr FS5

Pro měření excitačních a emisních ustálených spekter byl používán fluorometr FS5 od výrobce Edinburgh Instruments. Jako zdroj excitačního záření u tohoto přístroje slouží xenonová výbojka o výkonu 150 W, spektrální rozsah pro měření excitačních skenů je 230–1000 nm a pro emisní skeny 230–870 nm. Monochromátory jsou typu Czerny-Turner a jak excitační, tak i emisní monochromátor obsahují plně automatizované optické filtry. Jako emisní detektor slouží fotonásobič R928P se spektrálním rozsahem 200–870 nm. Jako referenční detektor slouží křemíková fotodioda. Přístroj disponuje excitačními a emisními štěrbinami s možnou šířkou 0-30 nm. Fluorimetr FS5 je ovládá pomocí programu Fluoracle dodávaného výrobcem.

4.2.2 TCSPC fluorimetr Fluorocube

Pro časově rozlišená měření byl použit spectrofluorometr Fluorofocube (Horiba) pracující v módu TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting). Jako zdroje budícího záření zde slouží jednoduše vyměnitelné NanoLED diody o různých vlnových délkách a šířkách pulzu. Diody pracují na frekvenci 1 MHz. Záření emitované vzorkem prochází přes monochromátor typu Seya-Namioka a dopadá na detektor s pikosekundovým časovým rozlišením. Pro ovlivnění intenzity záření dopadajícího na detektor slouží emisní štěrbina, jejíž šířka může být nastavena v rozmezí 1–32 nm, případně mohou být do optické dráhy vloženy filtry snižující intenzitu záření. Možné je rovněž nastavit polarizaci excitačního či emisního záření. Pro měření byly použity křemenné kyvety. Přístroj je ovládán pomocí programu Datastation a získaná data jsou analyzována v programu DAS6.

Program DAS6 vyhodnocuje získané vyhasínací křivky pomocí metody tzv. nejmenších lineárních čtverců. Pro zjištění doby života fluorescence program dokáže proložit získanou vyhasínací křivku 1 až 5 exponenciálními funkcemi. Obecně má tato exponenciální funkce následující tvar:

$$F(t) = A + B_i exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right), \tag{4.1}$$

kde t vyjadřuje čas, A značí korekční parametr, B značí tzv. předexponenciální funkci, která souvisí s množstvím dané emitující látky ve vyhodnocovaném vzorku a τ je příslušná doba života.

Aby byla zjištěna správnost proložení naměřených dat zvoleným modelem, bývá vyhodnocen rovněž parametr χ^2. Ten lze získat z rovnice:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \sum_{k=1}^{n} \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_C(t_k)]^2 \\ &= \sum_{k=1}^{n} \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \end{aligned} \tag{4.2}$$

kde $N(t_k)$ značí naměřená data vyhasínání fluorescence, $N_c(t_k)$ příslušný použitý model, číslo n, přes které je sčítáno, vyjadřuje počet datových bodů (kanálů) použitých pro konkrétní měření a σ_k vyjadřuje standardní odchylku každého datového bodu. Nicméně není příliš vhodné používat hodnoty χ^2, jelikož hodnoty tohoto parametru záleží na množství datových bodů. Z toho vyplývá, že pro soubory dat s vyšším počtem datových bodů by χ^2 dosahovalo vyšších hodnot. Pro tyto důvody je tedy lepší využít redukované hodnoty χ^2, která je dána rovnicí:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu}, \tag{4.3}$$

kde n je počet datových bodů, p je počet parametrů volnosti a ν je počet stupňů volnosti. Pro TCSPC měření je typické, že počet datových bodů je mnohem vyšší než počet parametrů, takže $(n - p)$ je přibližně rovno n. Jestliže dochází pouze k náhodným chybám, tak se hodnota χ_R^2 blíží hodnotě 1. Nastává tak z toho důvodu, že průměrná hodnota χ^2 pro datový bod se rovná přibližně jedné a typické množství datových bodů je mnohem větší než počet parametrů. Pokud by proložení dat použitým modelem nebylo správné, hodnoty χ^2 a χ_R^2 by byly mnohem vyšší než pro výskyt pouze náhodných chyb. Zjednodušeně lze tedy říci, že pro ověření správnosti proložení získaných experimentálních dat je nutné sledovat, jestli se hodnota redukovaného parametru χ_R^2 blíží hodnotě jedna [1][36].

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava zásobního prášku IPA

Bylo naváženo příslušné množství CTAB (7,289 g) tak, aby výsledná koncentrace tenzidu činila 20 mM. Navážené množství bylo následně zalito 1 l deionizované vody. Obdobně byl připraven i roztok tenzidu SDS, kdy výsledná koncentrace činila opět 20 mM (navážka 5,7676 g). Roztoky byly poté ponechány do dalšího dne na magnetické míchačce. Dalšího dne byly zásobní roztoky tenzidů smíchány v poměru 1:1, kdy došlo k vysrážení tenzidů a vzniku roztoku IPA. Výsledný roztok byl opět den ponechán na magnetické míchačce. Poté byl roztok IPA centrifugován 10 minut při 3500 ot/min. Po centrifugaci byla sraženina filtrována na Büchnerově nálevce za sníženého tlaku. Přítomné protiionty byly odstraněny deionizovanou vodou. Promytý prášek IPA byl ponechán 3 až 4 dny v sušárně při 50 °C.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků v chloroformu

Pro přípravu kladně nabitých kataniontových vezikul je nejdříve nutné připravit zásobní roztok IPA a kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC v chloroformu. Byl připraven zásobní roztok DODAC i IPA, aby jeho výsledná koncentrace v pipetovaném množství činila 0,12 M. Vypočtená navážka pak byla zalita příslušným objemem chloroformu.

4.3.3 Příprava cIPA

Ke stabilizaci kataniontových vezikul je nutná přítomnost cholesterolu. Pro vzorky obsahující cholesterol bylo odváženo vypočtené množství cholesterolu dle požadované koncentrace v systému do čisté pyrexky. Výsledné koncentrace cholesterolu v roztoku činila 22, 33, 43, 53 mol. %. Poté byly k cholesterolu přidány zásobní roztoky IPA a DODAC v poměru 9:1, tedy 900 µl roztoku IPA v chloroformu a 100 µl roztoku DODAC v chloroformu. V některých případech bylo v tomto kroku do pyrexky přidáno i vypočítané množství zásobního roztoku fluoroforu (přímé značení vezikul). Následně jsou do pyrexky přidány skleněné kuličky tak, aby pokrývaly celý povrch dna. Směs byla promíchána na vortexu a následně byla ponechána v digestoři do dalšího dne, aby došlo k odpaření rozpouštědla. Poté byla provedena rehydratace 60 ml deionizované vody a roztok byl zvortexován. Dalším krokem byla dispergace tyčovým dispergátorem (Bandelin SONOPULS UW 3200 se sondou VS 70 T), dosažená energie činila 25 kJ při amplitudě 50 %.

4.3.4 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

Pro možnost přípravy vzorků IPA s fluorescenčními sondami byly nejprve připraveny zásobní roztoky používaných fluorescenčních sond. Jako rozpouštědla byly použity aceton a dimethylsulfoxid. Dvě rozpouštědla byla zvolena z toho důvodu, že dopředu nebylo zřejmé, v kterém rozpouštědle se krystaly fluorescenčních sond rozpustí a rovněž které rozpouštědlo bude vhodnější pro solubilizaci sond do vezikulárních systémů. Bylo postupováno tak, že bylo odváženo vypočtené množství sondy v pevné formě (prášek) a následně bylo přidáno 5 ml rozpouštědla. Koncentrace zásobních roztoků a volba rozpouštědla pro přípravu vzorků jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab. 1: Použité fluorescenční sondy a koncentrace jejich zásobních roztoků

Fluorescenční sonda	Koncentrace roztoku v acetonu [10^{-4} g/mol]	Koncentrace v DMSO [10^{-4} g/mol]	Používaný roztok pro přípravu vzorků
Bodipy	8,39	9,92	Aceton
C_{18}-Rhodamin B	5,53	5,03	Aceton
C_{16}-Fluorescein	X	2,22	Aceton
Perylen	4,28	X	Aceton
DiI	4,76	4,76	DMSO
DiO	4,54	4,76	DMSO

4.4 Měření excitačních a emisních spekter vybraných sond z prostředí kataniontových vezikulárních systémů

Pro měření excitačních a emisních spekter sond inkorporovaných ve vezikulárních částicích bylo využito systému cIPA (IPA obsahující i kladný tenzid DODAC) s obsahem 43 mol. % cholesterolu. V případě použití sond rozpuštěných v acetonu (viz. Tab. 1) bylo nejprve do čisté vialky napipetováno takové množství zásobního roztoku sondy, aby výsledná koncentrace v 5 ml roztoku činila $5 \cdot 10^{-7}$ M a aceton byl následně odpařen. Poté bylo přidáno 5 ml roztoku cIPA. Vialka byla zavřena, promíchána na vortexu a umístěna minimálně do dalšího dne na třepačku, aby proběhla solubilizace sondy do vezikul. V případě sond rozpuštěných v DMSO bylo potřebné množství sondy napipetováno do vialky s roztokem cIPA, směs byla promíchána na vortexu a rovněž byla minimálně do dalšího dne na třepačce.

Měření excitační a emisních spekter bylo provedeno na spektrofluorometru FS5 (Edinburgh Instruments). Měření byla provedena při laboratorní teplotě a použita byla křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm. Přístroj FS5 byl ovládán pomocí programu Fluoracle a data byla vyhodnocena v programu Microsoft Excel. Nastavení měření pro vzorky obsahující vybrané sondy je uvedeno v následující tabulce:

Tab. 2: Nastavení přístroje FS5 pro měření excitačních a emisních spekter

Sonda	rozsah emisního skenu	rozsah excitačního skenu	emisní vlnová délka	excitační vlnová délka	štěrbiny excitační/emisní	integrační čas
Bodipy	490-600	400-520	525	480	1,7/1,7	0,2
Rhodamin	555-650	500-585	595	535	2,0/2,0	0,2
Perylen	430-600	300-455	465	420	1,5/1,5	0,2
Fluorescein	490-600	400-525	535	480	1,5/1,5	0,2
DiI	545-650	450-575	585	535	2,5/2,5	0,2
DiO	485-600	400-510	520	475	2,2/2,2	0,2

4.5 Měření dob života fluorescenčních sond z prostředí kataniontových vezikulárních systémů

Pro časově rozlišená měření byl použit spectrofluorometr Fluorocube (Horiba) pracující v módu TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting). Vzorky pro časově rozlišená měření byly připraveny podobně jako pro měření excitačních a emisních spekter. Nicméně při prvotních měřeních bylo zjištěno, že je ve velké míře detekován především rozptyl světla a výsledky jsou zkresleny a z toho důvodu bylo přistoupeno k úpravě vzorků, kdy byla koncentrace fluorescenčních sond postupně zvýšena až na hodnotu 10^{-4} M. Při takto vysoké koncentraci však bylo zjištěno, že v případě použití fluorescenčních sond rozpuštěných v acetonu nedochází ke kompletní solubilizaci sond do vezikul a po odpaření rozpouštědla, přidání roztoku cIPA a dnu míchání na třepačce zůstává stále značná část sondy usazena na stěnách vialky. Proto byly tyto vzorky ještě sonifikovány po dobu jedné hodiny při teplotě 40 °C, aby došlo k podpoření solubilizace. Následně byly pomocí přístroje Fluorocube změřeny doby života fluorescence vzorků s obsahem fluorescenčních sond plnících funkci donoru, použita byla křemenná kyveta. Při každém měření byla muset být rovněž změřena odezva excitační diody, která byla následně použita při vyhodnocení vyhasínací křivky. Toto měření bylo provedeno tak, že do kyvety byl nalit roztok koloidního křemíku (LUDOX) a byla proměřena odezva při stejném nastavení přístroje, při kterém byly měřeny vyhasínací křivky fluorescenčních sond.

Poté byly ke vzorkům obsahujícím molekuly donoru přidány vezikuly značené akceptorem (případně pro některé měření neznačené vezikuly). Donor-akceptorní páry byly vybrány na základě výsledků měření excitačních a emisních spekter pomocí steady-state měření. Použity byly roztoky vezikul s koncentrací sond 10^{-4} M a bylo smícháno stejné množství roztoku značeného donorem se stejným množstvím roztoku značeného akceptorem. Následně byl vzorek promíchán a byly opět proměřeny vyhasínací křivky donorů při stejném nastavení přístroje, které bylo použito při absenci akceptorů. Vyhasínací křivky byly vyhodnoceny pomocí programu DAS 6 a bylo sledováno, jak se mění doba života donoru v přítomnosti akceptoru a rovněž jak se mění relativní zastoupení různě emitujících složek ve vzorku. V případě použití cIPA o obsahu cholesterolu 23 mol. % a 33 mol. %, jejichž roztoky jsou do velké míry zakalené, bylo nutné před každým měřením vzorky sonifikovat (aby při měření nedocházelo k příliš velkému rozptylu světla, který by zkresloval výsledky) při mírně zvýšené teplotě (40 °C) tak dlouho, dokud nedošlo k odkalení vzorku. Nastavení přístroje Fluorocube pro jednotlivá měření je uvedeno v následující tabulce (Tab. 3), excitační a emisní maxima byla zjištěna pomocí steady-state měření excitačních a emisních spekter používaných sond z prostředí kataniontových vezikul.

Tab. 3: Nastavení přístroje Fluorocube pro měření dob života fluorescence použitých sond

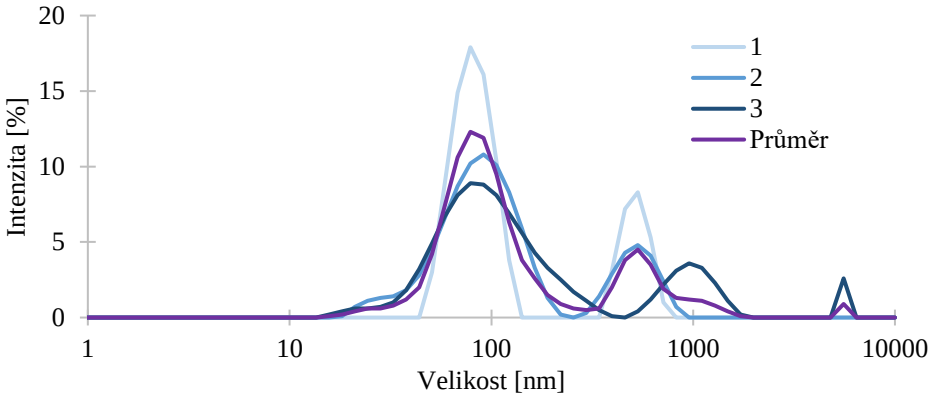
Fluorescenční sonda	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]	TAC [ns]	Sync. delay [ns]	Polarizace ex. monochromátoru [°]	Polarizace em. monochromátoru [°]
Bodipy	467	507	100	50	0	54,75
Fluorescein	508	520	50	0	0	54,75
DiO	467	505	50	0	0	54,75
Perylen	389	452	100	50	0	54,75

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Měření velikosti připravených vezikulárních systémů pomocí metody dynamického rozptylu světla

Jako doplňková metoda bylo zvoleno měření dynamického rozptylu světla (DLS), který nám poskytuje hodnoty velikosti připravených vezikulárních systémů a rovněž zeta potenciál, který podává informace o elektrostatické stabilitě systému, kdy nestabilní systémy se vyznačují hodnotou zeta potenciálu v rozmezí od −30 mV až do 30 mV. Měření byla provedena při teplotě 25 °C na přístroji ZetaSizer Nano ZS od výrobce Malvern Instruments. Byly měřeny všechny připravené roztoky kataniontových vezikulárních systémů s obsahem cholesterou 23, 33, 43 a 53 mol. %. Vzorky, u kterých to bylo možné, byly měřeny opakovaně, aby byla ověřena jejich stabilita v delším časovém období.

V případě systému CTA-DS s obsahem cholesterolu 23 mol. %, u kterého lze okem spatřit zřetelné zakalení jeho roztoku, bylo provedeno pouze jedno měření, jelikož mezi jednotlivými skeny (každé měření se skládá ze 3 skenů, ze kterých je následně vypočítána průměrná hodnota) byly zjištěny relativně vysoké rozdíly ve velikosti a rovněž průměrná velikost nabývala poměrně vysoké hodnoty 272 ± 49 nm. Závislost intenzity na velikosti částic je zobrazena na následujícím Obr. 13.



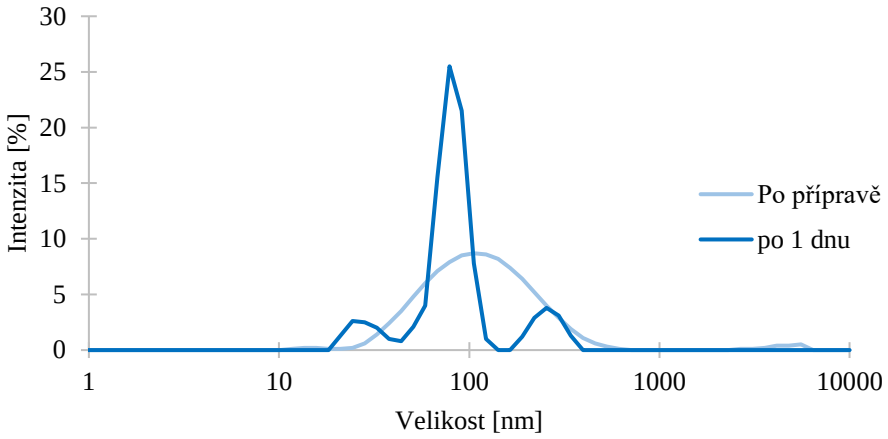
Obr. 13: Závislost intenzity na průměrné velikosti částic pro vzorek CTA-DS s obsahem cholesterolu 23 mol. %, čísla označují jednotlivé skeny

Při měření zeta potenciálu bylo provedeno pět měření, ze kterých byl následně vypočítán průměr. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4 . Z výsledků je patrné, že hodnota zeta potenciálu se pohybuje mírně nad hranicí, pod kterou jsou měřené systémy považovány za elektrostaticky nestabilní.

Tab. 4: Hodnoty zeta potenciálu pro systém CTA-DS o obsahu 23 mol. % cholesterolu

Číslo měření	1	2	3	4	5	Průměr	Odchylka
Zeta potenciál [mV]	34,7	378	41,2	44,1	30,2	37,6	5,4

V případě systému cIPA CTA-DS s obsahem cholesterolu 33 mol. % bylo rovněž možné v roztoku vezikul pozorovat zřetelný zákal, avšak v menší míře, než tomu bylo v předchozím případě. Pro tento systém byly provedeny měření v den přípravy a následující den. Při prvním měření byla změřena průměrná velikost částic 96,1 ± 1,1 nm. Zjištěný zeta potenciál dosahoval hodnot 57,5 ± 5,9 mV, což je hodnota mimo oblast elektrostatické nestability. Měření následující den přineslo značně odlišné výsledky. Pro velikost částic byla naměřena hodnota 759,3 ± 444 nm. Je zde tedy viditelný citelný nárůst velikosti a rovněž je z hodnoty odchylky patrné, že mezi jednotlivými skeny, které byly následně zprůměrovány, jsou velmi výrazné rozdíly v hodnotách velikosti částic. Změřený zeta potenciál dosahoval hodnoty 40,7 ± 3 mV, došlo tedy k posunu blíže k nestabilní oblasti. Tento systém tedy lze z delšího časového hlediska považovat za nestabilní. Hodnoty zeta potenciálu uvedeny v Tab. 5.



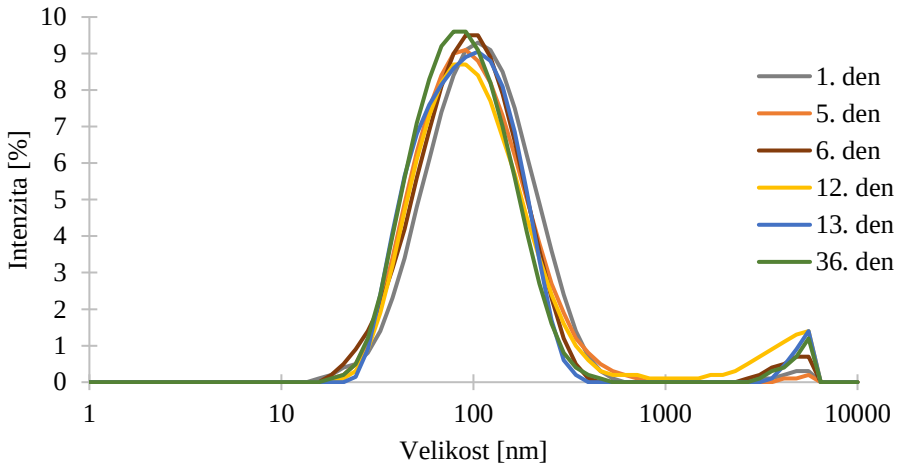
Obr. 14: Závislost intenzity na průměrné velikosti částic pro systém CTA-DS s obsahem cholesterolu 33 mol. %

Tab. 5: Hodnoty zeta potenciálu pro systém CTA-DS s obsahem cholesterolu 33 mol. %, den přípravy roztoku je označen jako den 1

Čas [den]	Zeta potenciál [mV]
1	57,5 ± 5,9
2	40,7 ± 3,0

Jiná situace nastala v případě systému cIPA CTA-DS s obsahem cholesterolu 43 mol. %. Při tomto složení by se již mělo jednat o poměrně stabilní systém, jak bylo popsáno v literatuře ([33]). Toto tvrzení podporuje i vizuální vzhled roztoku, kdy již není patrný znatelný zákal, ale pouze mírné mléčné zabarvení. Pro tento systém byla provedena měření DLS a zeta potenciálu v den přípravy a následně po 5, 6, 12, 13 a 36 dnech (viz. Obr. 15). V den přípravy byla změřena průměrná velikost připravených vezikul na 90,8 ± 0,4 nm. Hodnota zeta potenciálu činila 56,8 ± 7 mV, což je hodnota značící elektrostatickou stabilitu vzorku. Pro všechna další měření velikosti pomocí DLS, s výjimkou měření 13. den, byly zjištěny obdobné hodnoty, jejichž rozptyl vzhledem k prvnímu dni měření činil méně než 10 nm. Při měření 13. den byla zaznamenána výrazně vyšší velikost, a to konkrétně 179,1 ± 123,3 nm. Tento výkyv je způsoben tím, že ve dvou

ze tří měření vzorku, z kterých se pak vypočítává průměrná hodnota velikosti, byly zjištěny mnohem vyšší hodnoty velikosti. Zjištěné hodnoty pro jednotlivá měření činí 120,7 nm, 95,8 nm a 320,7 nm. Je patrné, že především třetí hodnota značně vybočuje a lze tedy předpokládat, že ve vzorku se mohly nacházet nečistoty nebo došlo ke vzniku agregátů nebo sraženin. Jelikož při dalším měření 36. den se již průměrná hodnota velikosti vezikul vrátila zpět na hodnotu 83,8 nm, nebyl na předešlý výkyv brán velký zřetel a lze opravdu předpokládat, že došlo k chybnému měření. Hodnoty zeta potenciálu byly pro všechna měření mimo nestabilní oblast a nedocházelo k příliš velkým výkyvům hodnot. Ze získaných výsledků lze usoudit, že systém CTA-DS dosahuje poměrně vysoké stability, a to i v delším časovém období. Hodnoty průměrné velikosti částic a zeta potenciálu pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 6.



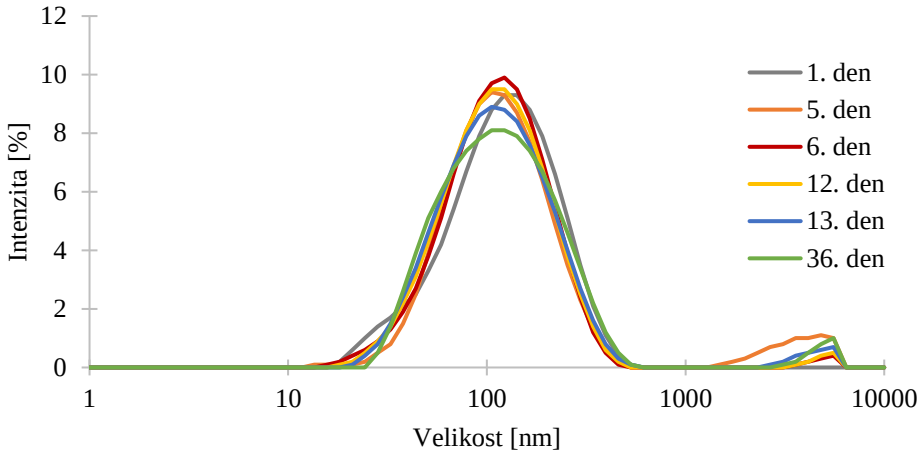
Obr. 15: Závislost intenzity na průměrné velikosti částic pro systém CTA-DS s obsahem 43 mol. % cholesterolu

Tab. 6: Hodnoty průměrné velikosti částic a zeta potenciálu pro systém CTA-DS s obsahem 43 mol. % cholesterolu

Čas [den]	1	5	6	12	13	36
Průměrná velikost [nm]	90,8 ± 0,4	83,6 ± 0,4	84,7 ± 1,6	91,5 ± 1,2	179,1 ± 123,3	83,8 ± 2,4
Zeta potenciál [mV]	56,8 ± 7,0	55,1 ± 2,0	50,8 ± 11,9	42,9 ± 0,5	44,1 ± 4,2	50,9 ± 1,9

Obdobných výsledků bylo dosaženo i pro systém s nejvyšším obsahem cholesterolu, tedy CTA-DS s obsahem cholesterolu 53 mol. %. V den přípravy byla průměrná velikost částic pomocí DLS změřena na 98,2 ± 0,2 nm. Zeta potenciál se nacházel mimo nestabilní oblast a jeho hodnota činila 55,7 ± 7,1 mV. Následně byla měření obdobně jako v případě systému s obsahem cholesterolu 43 mol. % provedena po 5, 6, 12, 13 a 36 dnech (viz. Obr. 16). Pro všechna měření v tomto časovém intervalu se hodnoty průměrné velikosti částic pohybovaly bez výraznějších výkyvů kolem hodnoty 100 nm. Rovněž hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly v elektrostaticky stabilní oblasti kolem hodnoty přibližně 55 mV. Obdobně jako v předchozím případě lze tedy říct, že systém CTA-DS s obsahem 53 mol. % cholesterolu je stabilní a nedochází k výraznější tvorbě

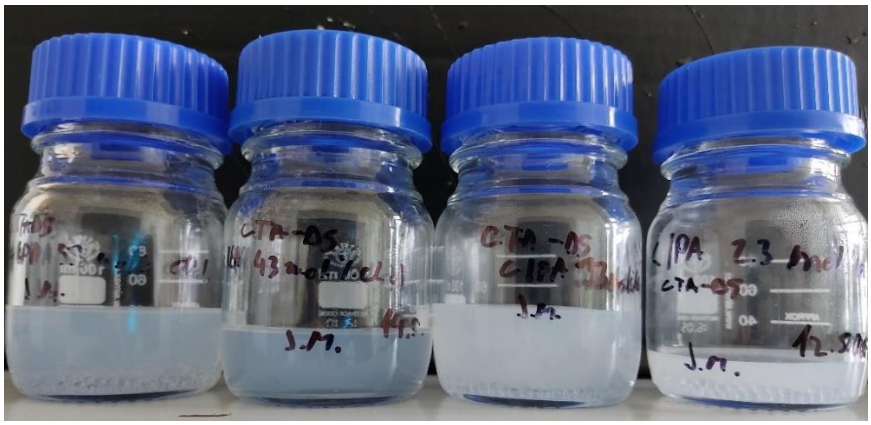
sraženin či agregátů, a to i v delším časovém období. Hodnoty průměrné velikosti částic a zeta potenciálu jsou uvedeny v Tab. 7. Všechny měřené roztoky můžeme vidět na Obr. 17, kde je patrný viditelný rozdíl v míře zakalení roztoku.



Obr. 16: Závislost intenzity na průměrné velikosti částic pro systém CTA-DS s obsahem 53 mol. % cholesterolu

Tab. 7: Hodnoty průměrné velikosti částic a zeta potenciálu pro systém CTA-DS s obsahem 53 mol. % cholesterolu

Čas [den]	1	5	6	12	13	36
Průměrná velikost [nm]	98,2 ± 0,2	103,9 ± 2,8	97,1 ± 1,3	97,4 ± 0,1	98,2 ± 0,7	101,6 ± 2,5
Zeta potenciál [mV]	55,7 ± 7,1	54,3 ± 6,1	52,9 ± 7,3	58,5 ± 8,2	52,2 ± 8,3	61,9 ± 1,1

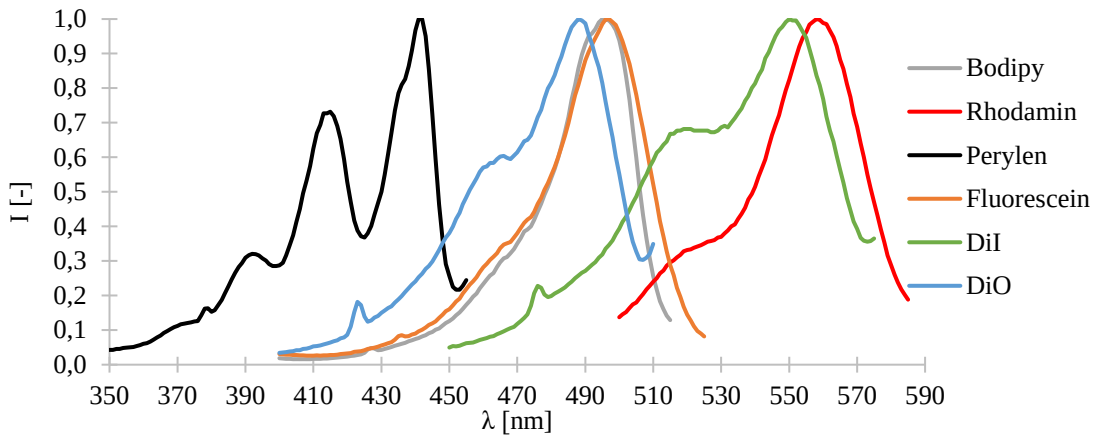


Obr. 17: Studované roztoky kataniontových vezikul CTA-DS s různým obsahem cholesterolu, obsahem cholesterolu zleva 53, 43, 33 a 23 mol. %

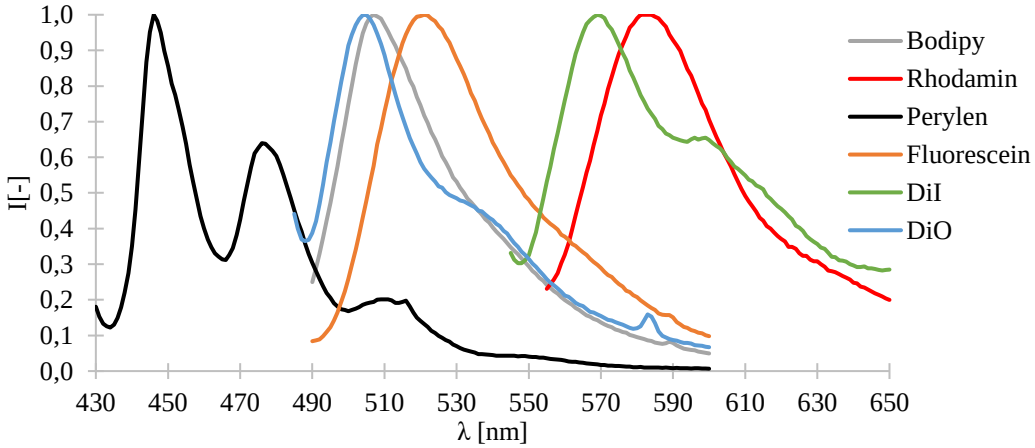
5.2 Měření excitačních a emisních spekter používaných sond v prostředí vezikulárních systémů

Prvním nezbytným krokem předcházejícím časově rozlišená měření je změření excitačních a emisních skenů vybraných fluorescenčních sond. Získání excitačních a emisních skenů je důležité z několika důvodů. Prvním z nich je ověření, jestli dojde k solubilizaci vybraných amfifilních sond do struktury kataniontových vezikulárních systémů. Dalším důvodem je ověření, že vybrané kombinace použitých sond zamýšlené pro studium rezonančního přenosu energie splňují pravidlo překryvu emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru. Rovněž je nutné zjistit excitační a emisní maxima sond, aby mohl být vybrán vhodný excitační zdroj (dioda) a mohl být nastaven emisní monochromátor při měření na časově-rozlišeném fluorometru.

Pro měření charakteristik fluoroforů z prostředí vezikulárních systémů byl vybrán systém CTA-DS obsahující kladný tenzid DODAC a 43 mol. % cholesterolu. Byla tedy proměřena níže uvedená excitační (Obr. 18) a emisní spektra (Obr. 19) vybraných fluoroforů z prostředí tohoto systému. Získaná spektra byla normalizována na maximální hodnotu emise rovnající se 1 (intenzita emise v každém bodu skenu byla podělena hodnotou intenzity emise v excitačním nebo emisním maximu).

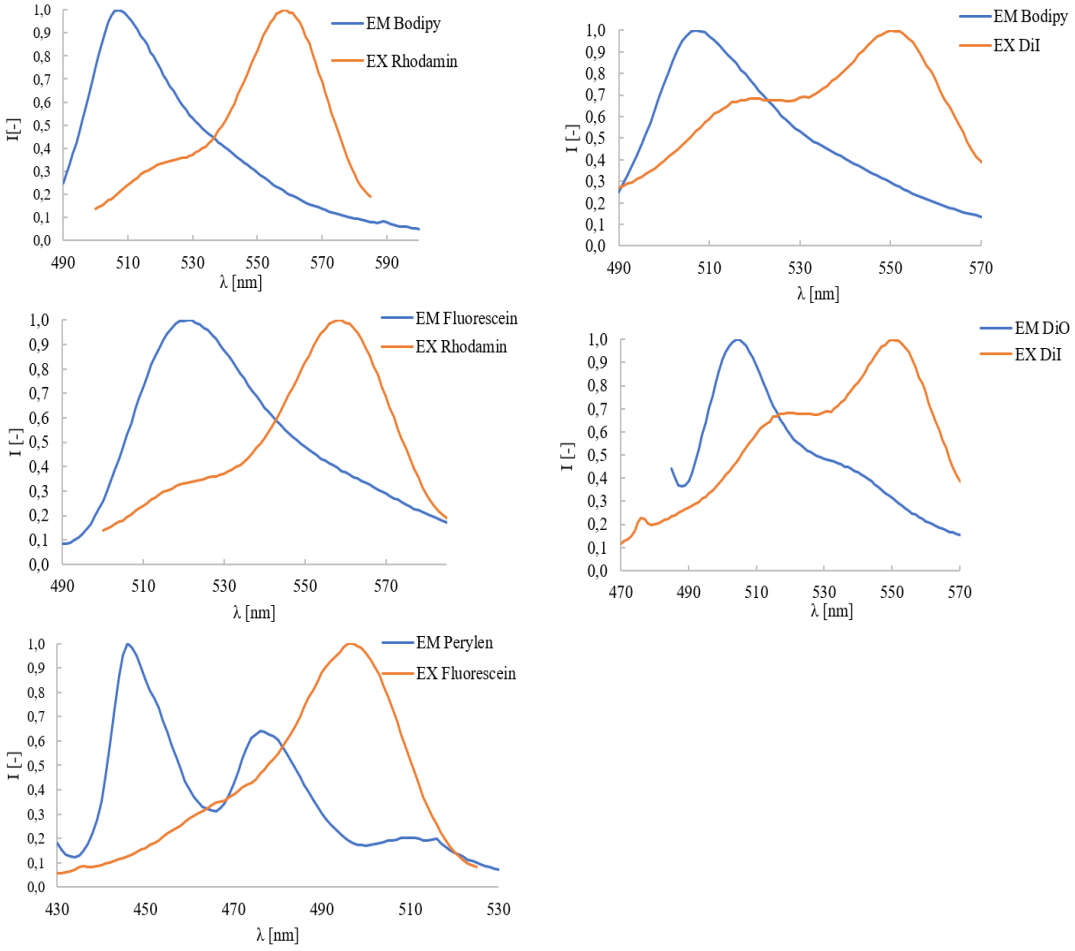


Obr. 18: Excitační spektra vybraných fluoroforů z prostředí vezikulárních systémů



Obr. 19: Emisní spektra vybraných fluoroforů z prostředí vezikulárních systémů

Ze získaných excitační a emisních spekter bylo následně možné vybrat vhodné páry tvořící donor a akceptor pro rezonanční přenos energie, a to podle hlavní podmínky, kdy se musí emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru alespoň částečně překrývat. Bylo zjištěno, že tuto podmínku splňuje pět možných kombinací donorů a akceptorů. Možnými donor-akceptorními páry jsou: Bodipy-Rhodamin, Bodipy-DiI, DiO-DiI, Fluorescein-Rhodamin a Perylen-Fluorescein. Spektrální překryvy mezi molekulami donoru a akceptoru ve zmíněných párech jsou zobrazeny na Obr. 20.



Obr. 20: Spektrální překryvy emisního spektra donoru (modrá barva) a excitačního spektra akceptoru (oranžová barva)

5.3 Sledování Försterova rezonančního přenosu energie ve vezikulárních systémech pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie

Pro studium fúze vezikulárních systémů na bázi kataniontových tenzidů byla zvolena časově rozlišená fluorescenční měření, jelikož oproti měření ustálené fluorescence, která je založena na sledování intenzity záření emitovaného fluoroforem, zde odpadá například vliv koncentrace fluoroforu a s tím spojených vnitřních filtračních efektů a dalších jevů na výsledky měření. Pro donor-akceptorové páry, zvolené pomocí měření excitačních a emisních spekter dostupných

fluorescenčních sond a zabudované do vezikulárních systému o různém obsahu cholesterolu, byla zaznamenávána doba života fluorescence pomocí přístroje Fluorocube. Zjištěné změny v době života molekul donoru pak vypovídají o rezonančním přenosu energie mezi molekulami donorů a akceptorů zabudovaných ve strukturách vezikul. Získané vyhasínací křivky fluorescence donoru byly vyhodnoceny pomocí programu DAS 6. Pomocí tohoto programu byla vyhasínací křivka proložena exponenciální funkcí a byl získán takový počet dob života a jejich příslušné relativní zastoupení tak, aby parametr χ_R^2, který vyjadřuje správnost proložení získaných experimentálních dat zvoleným modelem dosahoval hodnot, které se budou co nejvíce blížit hodnotě jedna (ideálně v rozmezí 0,8 až 1,2). V potaz mohly být brány však pouze výsledky, při jejichž vyhodnocení nedošlo k zisku příliš vysokých, nebo naopak záporných relativních amplitud, které vyjadřují zastoupení dané emitující složky ve vzorku (součet všech relativních amplitud se musí rovnat 100 % a jejich hodnoty nesmějí být záporné). Dalším kritériem, podle kterého byla posuzována správnost proložení experimentálních dat pomocí exponenciální funkce byly hodnoty tzv. vážených reziduí. Z tohoto pohledu je správné proložení dat doprovázeno náhodným rozložením vážených reziduí kolem osy *x* bez výraznějších odchylek vzhledem ke kladným nebo záporným hodnotám.

Studovány byly kataniontové kladně nabité vezikulární systémy CTA-DS s obsahem cholesterolu 23, 33, 43 a 53 mol. %, aby bylo možné určit, zdali se se změnou obsahu cholesterolu, který ovlivňuje stabilitu studovaných vezikul, mění i účinnost rezonančního přenosu energie a tím pádem dochází v rozdílné míře i k fúzi vezikul.

5.3.1 Použití DiO jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách

První ze zvolených fluoroforů, které byly použity jako donor při značení kataniontových vezikul, byla sonda DiO. Pomocí změřených excitačních a emisních spekter uvažovaných fluoroforů byl jako vhodný akceptor pro rezonanční přenos energie z DiO zvolen fluorofor DiI, jelikož v tomto páru je splněna podmínka překryvu emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru. Nejprve byly pomocí DiO o koncentraci 10^{-4} M značeny kataniontové vezikulární systémy CTA-DS o obsahu 23 mol. % cholesterolu. Následně byla pomocí TCSPC měření získána vyhasínací křivka DiO z tohoto prostředí a pomocí proložení exponenciální funkcí byly získány doby života a jejich příslušné relativní amplitudy. Aby byla získána hodnota parametru χ_R^2 co nejblíže hodnotě 1 a rovněž vážená rezidua byla co nejvíc náhodně rozprostřena kolem osy *x*, bylo z vyhasínací křivky vyhodnoceno 5 dob života, hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8. Nicméně i tak hodnota χ_R^2 činila 1,968 a proložení exponenciální funkcí v tomto případě není příliš přesné. Ze získaných dob života molekulám DiO přísluší pravděpodobně hodnota 1,011 ns s příslušnou relativní amplitudou 21,81 %. Tato doba života tvoří tedy poměrně malou část z emitujících frakcí měřeného vzorku. Největší zastoupení mají poměrně velmi krátké doby života, průměrná doba života fluorescence tohoto vzorku činí 0,099 ns. Z těchto získaných dat je možné usoudit, že výsledky jsou do velké míry ovlivněny rozptylem, který se vyznačuje právě velmi krátkými dobami života, a to i přes fakt, že vzorek byl sonifikován při teplotě 40 °C, dokud nezmizel zákal, který je pro roztoky kataniontových vezikul s nižším obsahem cholesterolu (23 a 33 mol. %) typický. Pravděpodobně tedy nedošlo k dostatečné solubilizaci molekul DiO do vezikulární dvojvrstvy a intenzita emise je velmi slabá. Z tohoto důvodu nebylo u tohoto vzorku přistoupeno k přidávání vezikul značených DiI, jelikož výsledky by byly velmi nepřesné.

Tab. 8: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem DiO z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. %, τ_{avg} znační průměrnou dobu života vzorku

	DiO	τ [ns]	B [%]
5 dob života		0,425	20,56
	χ_R^2 = 1,968	1,011	21,81
		0,048	45,07
		2,585	6,14
		16,407	6,42
	τ_{avg} [ns]	0,099	

V případě vzorků cIPA s obsahem cholesterolu 33 mol. % značených pomocí DiO bylo opět pomocí proložení získaných experimentálních dat exponenciální funkcí získáno pět dob života (viz. Tab. 9). Stejně jako v předchozím případě se výsledcích velkou měrou projevuje rozptyl světla, a to i přes to, že díky sonifikaci byl eliminován zákal roztoku. Zdá se tedy, že i zde opět dochází pouze ve velmi malé míře k solubilizaci molekul DiO do struktury vezikul a intenzita emise DiO je tedy velmi nízká. Díky těmto získaným výsledkům opět nebyly přidány vezikuly značené donorem DiI.

Tab. 9: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem DiO z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 33 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

	DiO	τ [ns]	B [%]
5 dob života		0,244	19,61
	χ_R^2 = 2,528	0,844	9,74
		2,469	4,83
		16,036	14,47
		0,054	51,36
	τ_{avg} [ns]	0,096	

Obdobných výsledků bylo dosaženo i pro vyšší obsahy cholesterolu v systému. V případě vezikul s obsahem cholesterolu 43 mol. % byly pro změřenou vyhasínací křivku DiO vyhodnoceny pomocí proložení exponenciální funkcí čtyři doby života. Objevuje se zde komponenta s dobou života 1,631 ns a příslušnou relativní amplitudou 14,68 %, která by mohla patřit molekulám DiO, avšak opět zde převažují především krátké komponenty způsobené pravděpodobně rozptylem v důsledku nedostatečné solubilizace DiO do vezikul. Průměrná doba života vzorku má hodnotu 0,232 ns. Hodnota parametru χ_R^2 činí 4,768, což značí, že experimentální data nejsou příliš správně proložena. Avšak v tomto případě nebylo možné proložit takovou exponenciální funkcí, aby byla získána pátá doba života, jelikož díky slabému výpočetnímu výkonu ovládacího počítače program DAS 6 nedokázal vyhodnotit další dobu života a došlo k chybě a vypnutí programu. Vyhodnocené doby života a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem DiO z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

	DiO	τ [ns]	B [%]
4 doby života		0,498	26,50
	χ_R^2 = 4,768	1,631	14,68
		14,909	23,53
		0,096	35,29
	τ_{avg} [ns]	0,232	

Pro vezikuly s obsahem cholesterolu 53 mol. % bylo opět dosaženo obdobných výsledků. Pro DiO obsažené v tomto systému byly vyhodnoceny tři doby života. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 11. Molekulám DiO zde připadá pravděpodobně doba života 0,921 ns s relativní amplitudou 33,48 %. Dále je zde přítomná doba života 14,329 ns s příslušnou relativní amplitudou 28,06 % a doba života 0,109 ns s relativní amplitudou 38,47 %. Tato krátká komponenta je způsobená rozptylem světla. Průměrná doba života vzorku byla vyhodnocena na 0,256 ns. Hodnota parametru χ_R^2 činí 5,292 a lze tedy usoudit, že proložení dat není příliš přesné, avšak při použití vyššího počtu parametrů, které by vedly k zisku vyššího počtu dob života, byly následně získány negativní relativní amplitudy, tudíž tyto výsledky nemohly být použity. I v tomto případě je s největší pravděpodobností problémem nedostatečná solubilizace molekul DiO do struktur vezikulárních dvojvrstev.

Tab. 11: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem DiO z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 53 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

	DiO	τ [ns]	B [%]
3 doby života		0,921	33,48
	χ_R^2 = 5,292	14,329	28,06
		0,109	38,47
	τ_{avg} [ns]	0,256	

Ze získaných výsledků je patrné, že pro námi studované systémy kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů nebude možné použít DiO jako donor pro studium fúze vezikul pomocí rezonančního přenosu energie. Bylo zjištěno, že bez ohledu na množství cholesterolu zakomponovaného do struktury vezikul, nedochází k dostatečné solubilizaci molekul DiO do struktur vezikulárních dvojvrstev a fluorofor vykazuje nízkou intenzitu fluorescence (ve vodném prostředí téměř neemituje), a proto můžeme ve vyhodnocených dobách života pozorovat převahu emitujících frakcí s velmi krátkou dobou života, která je způsobena rozptylem. Solubilizaci molekul DiO se nepodařilo zefektivnit ani sonifikací při zvýšené teplotě, ani prodloužením doby, po kterou byl roztok ponechán na třepačce.

5.3.2 Použití Bodipy 493/503 jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách

Další zvolenou molekulou, která by potenciálně mohla sloužit jako donor pro přenos energie ve vezikulárních systémech, byl fluorofor Bodipy 493/503 (čísla značí přibližné excitační a emisní maxima sondy, jedná se o označení výrobcem). Pomocí steady-state měření bylo zjištěno, že při použití Bodipy jako donoru při rezonančním přenosu energie by byly vhodnými akceptory DiI a Rhodamin, jelikož splňují podmínku překryvu excitačního spektra akceptoru s emisním spektrem donoru (viz. Obr. 20).

Pro vyhasínací křivku Bodipy z prostředí cIPA CTA-DS s obsahem cholesterolu 23 mol. % byly vyhodnoceny tři doby života fluorescence. Nejvíce zastoupenou je doba života 5,951 ns s příslušnou relativní amplitudou 65,80 %. Tato doba života odpovídá molekulám Bodipy. Dále je zde zastoupena doba života 1,018 ns relativní amplitudou 1,77 %, tato málo zastoupená doba života může být způsobena rozptylem nebo malou frakcí molekul Bodipy, které by byly nějakým způsobem zhášeny. Třetí zjištěná doba života má hodnotu 10,460 ns a relativní amplitudu 32,44 %. Průměrná doba života vzorku vyhodnocená pomocí programu DAS 6 má hodnotu 6,292 ns. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 12: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem Bodipy z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

	Bodipy	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,018	1,77
	χ_R^2 = 1,651	5,951	65,80
		10,460	32,44
	τ_{avg} [ns]	6,292	

Následně byl k roztoku vezikul značených Bodipy přidán roztok vezikul o stejném objemu značený pomocí Rhodaminu, výsledný roztok byl promíchán na vortexu a nechán do dalšího dne na třepačce. Poté byl sonifikován při zvýšené teplotě pro eliminaci zákalu a byla proměřena vyhasínací křivka Bodipy při stejném nastavení, jako při měření bez přítomnosti akceptoru. Následným proložením byly získány tři doby života. Doba života 0,266 ns s relativní amplitudou 0,97 % příslušející rozptylu, doba života 5,553 ns s příslušnou relativní amplitudou 48,01 %, která přísluší zhášeným molekulám Bodipy a doba života 9,508 ns s relativní amplitudou 51,02 %. Průměrná doba života byla vyhodnocena na 5,665 ns. Můžeme tedy pozorovat, že po přidání vezikul značených Rhodaminem dochází ke snížení doby života. V systému dochází k přenosu energie mezi molekulami donoru Bodipy a akceptoru Rhodaminu, což vede ke snížení doby života Bodipy. Jelikož je pro přenos energie nutné, aby byl donor ve vhodné vzdálenosti od akceptoru, muselo nejprve dojít k fúzi části vezikul značených Bodipy s vezikulami značenými pomocí Rhodaminu.

Tab. 13: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem Bodipy z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. % za přítomnosti vezikul značených pomocí Rhodaminu, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

	Bodipy	τ [ns]	B [%]
3 doby života		0,266	0,97
	χ_R^2 = 1,468	5,553	48,01
		9,508	51,02
	τ_{avg} [ns]	5,665	

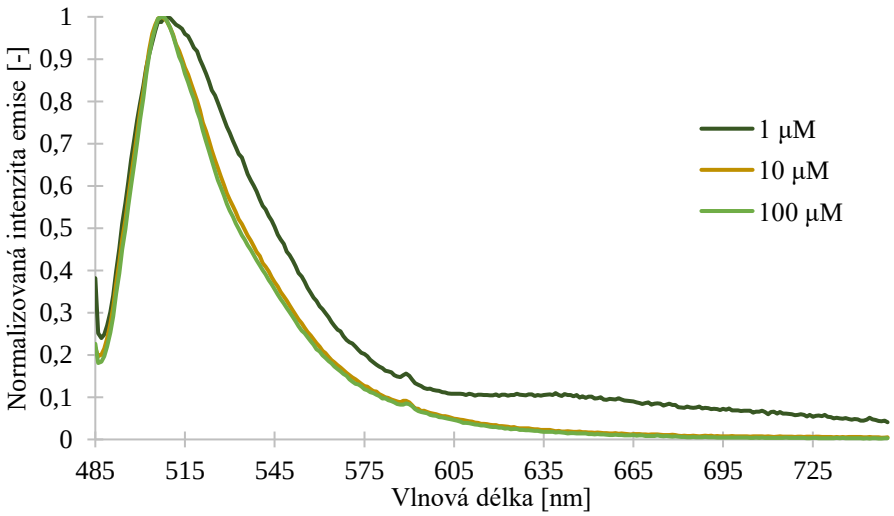
Důležité je si všimnou, že v přítomnosti i nepřítomnosti akceptoru se ve vyhodnocených dobách života objevuje doba života s poměrně dlouhou dobou života. V nepřítomnosti akceptoru se jedná o dobu života 10,460 ns s relativní amplitudou 32,43 % a v přítomnosti vezikul značených Rhodaminem je to pak doba života s hodnotou 9,508 ns a relativní amplitudou 51,02 %. Tyto delší doby života by mohly být způsobeny formací excimerů, která může mezi molekulami Bodipy probíhat. Vlastnost tvorby excimerů je pro některé fluorofory se strukturou boradiazanindacenů, mezi které Bodipy 493/503 patří, typická [49]. Excimery jsou dimerní struktury, které se tvoří v průběhu doby, po kterou je molekula v excitovaném stavu.

Pro potvrzení této teorie byly připraveny vzorky roztoku cIPA s obsahem cholesterolu 43 mol. % a různou koncentrací molekul Bodipy, aby bylo zjištěno, jestli se i při nižších koncentracích fluoroforu ve vzorku budou při vyhodnocení vyhasínacích křivek Bodipy objevovat delší doby života. Byli připraveny vzorky s koncentrací Bodipy 10^{-6} M, 10^{-5} M a 10^{-4} M a byly proměřeny jejich vyhasínací křivky. Bylo zjištěno, že pro koncentraci Bodipy 10^{-6} M je mezi vyhodnocenými dobami života doba života s hodnotou 11,506 ns a příslušnou relativní amplitudou 26,31 %. Pro koncentraci 10^{-5} M byla mezi třemi vyhodnocenými dobami života i doba s hodnotou 11,573 ns s relativní amplitudou 25,20 %. Pro nejvyšší koncentraci 10^{-4} M byly vyhodnoceny čtyři doby života a mezi nimi i doba života s hodnotou 26,675 ns a relativní amplitudou 5,38 %. Všechny vyhodnocené doby života Bodipy jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 14: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem Bodipy o různé koncentraci v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku

Koncentrace [mol/l]	10^{-6}		10^{-5}		10^{-4}	
	τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
	0,089	2,61	0,116	2,41	3,542	14,45
	6,235	71,08	6,214	72,39	0,089	2,90
	11,506	26,31	11,574	25,20	26,675	5,38
					7,053	77,27
τ_{avg} [ns]	2,328		2,889		2,101	
χ_R^2	2,008		2,022		3,116	

Z výsledků je tedy patrné, že doby života s délkou více než 10 ns se objevují i u vzorků s nižší koncentrací Bodipy a k tvorbě excimerů dochází i při nižších koncentracích sondy ve vzorku. Pro potvrzení další potvrzení, že za tyto dlouhé doby života skutečně může tvorba excimerů v průběhu excitované stavu molekul fluoroforů, byly proměřeny steady-state spektra těchto vzorků o různých koncentracích. Pokud skutečně dochází k tvorbě excimerů, tak by měl být v emisním spektru patrný pík excimeru posunutý oproti píku monomeru k vyšším vlnovým délkám.



Obr. 21: Normalizovaná emisní spektra Bodipy u různé koncentraci z prostředí kataniontových vezikul o obsahu 43 mol. % cholesterolu

Ze změřených normalizovaných emisních spekter (Obr. 21) je patrné, že pro všechny koncentrace se ve spektru nachází kromě výrazného píku monomeru i málo intenzivní pík při 589 nm, který přísluší emisi excimerů. Bylo tedy potvrzeno, že při excitaci Bodipy dochází po dobu excitovaného stavu k tvorbě dimerů. Z toho důvodu nelze Bodipy spolehlivě použít jako donor pro rezonanční přenos energie v kataniontových vezikulárních systémech, přestože bylo dokázáno, že při přidání akceptoru do systému dochází k poklesu doby života Bodipy i průměrné doby života vzorku. Nebylo by však možné rozlišit, do jaké míry probíhá přenos energie mezi monomery Bodipy a molekulami akceptorů a do jaké míry se tohoto procesu účastní excimery, které se rovněž mohou podílet na přenosu energie. Bylo by tedy prakticky nemožné jakkoliv rezonanční přenos energie kvantifikovat například z hlediska účinnosti. Rovněž tvorba excimerů může částečně přispívat ke zhášení fluorescence Bodipy.

5.3.3 Použití fluoresceinu jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách

Dalším fluoroforem, u kterého byla testována možnost jeho použití jako donoru pro rezonanční přenos energie v kataniontových vezikulárních systémech byl fluorescein. Konkrétně byl použit jeho amfifilní derivát, jehož nepolární část tvoří řetězec o délce šestnácti atomů uhlíku. Díky přítomnosti nepolárního řetězce ve struktuře tohoto fluoroforu je možná jeho inkorporace do dvojvrstvy tvořící strukturu vezikul. Pomocí steady-state měření byl jako vhodný akceptor vybrán rhodamin. Po odpaření acetonu, ve kterém byl fluorescein rozpuštěn, přidání roztoku vezikul a minimálně jednomu dnu třepání na třepačce bylo stále patrné, že na stěnách vialky zůstává značné množství fluoresceinu, u kterého nedošlo k solubilizaci do vezikul.

Proto byla pro všechny vzorky solubilizace podpořena sonifikací v ultrazvukové vodní lázni po dobu 30 minut při zvýšené teplotě 40 °C. Poté bylo možné vizuálně pozorovat, že došlo k výraznějšímu zbarvení roztoku ve vialce a k vymizení fluoresceinu usazeného na stěnách vialek.

Prvním měřený vzorek byl systém kataniontových vezikul na bázi CTA-DS s obsahem cholesterolu 43 mol. %. Pro tento vzorek byla změřena vyhasínací křivka a byly vyhodnoceny tři doby života. Nejméně zastoupená je doba života s hodnotou 0,576 ns a příslušnou relativní amplitudou 2,41 %, která přísluší rozptylu. Nejvíce zastoupená je doba života s hodnotou 4,104 ns a relativní amplitudou 89,74 %. Poslední vyhodnocená doba života má hodnotu 1,902 ns a její příslušná relativní amplituda je 7,86 %. Průměrná doba života vzorku činí 3,314 ns. Byla rovněž vypočtena průměrná doba života vzorku při zanedbání doby života způsobené rozptylem. Její hodnota činí 3,754 ns. Všechny hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 15).

Tab. 15: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescien	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,902	7,86
	$\chi_R^2 = 0,986$	4,104	89,74
		0,576	2,41
	τ_{avg} [ns]	3,314	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,754	

Pro tento vzorek tedy byly vyhodnoceny dvě doby života v řádu nanosekund. Delší doba života s hodnotou 4,104 ns odpovídá nezhášeným molekulám fluoresceinu. Kratší doba života s hodnotou 1,902 ns by mohla odpovídat zhášeným molekulám fluoresceinu, nicméně je nutné si uvědomit, že v systému nebyl v době měření přidán žádný akceptor, který by pomocí přenosu energie mohl fluorescenci fluoresceinu zhášet a rovněž není známo, že by některá ze složek kataniontových vezikul měla schopnost fluorescein zhášet. Z toho důvodu se jako možné vysvětlení těchto výsledků jeví přítomnost procesu zvaného jako homo-fret. Jedná se o variantu Försterova rezonančního přenosu energie, při které jako donor i akceptor vystupuje stejný druh molekul. Tedy v tomto případě by docházelo k přenosu energie z excitované molekuly fluoresceinu na jinou, neexcitovanou molekulu fluoresceinu, která by sloužila jako akceptor.

Pro potvrzení této hypotézy byly následně k vezikulám značeným fluoresceinem přidány neznačené vezikuly o stejném objemu roztoku a výsledný roztok byl 30 minut sonifikován při 40 °C, aby došlo k dostatečnému promíchání. V případě, kdy by došlo k fúzi vezikul značených fluoresceinem s vezikulami neznačenými, by došlo ke zvětšení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, které v případě homo-fret tvoří donor-akceptorní páry a došlo by ke snížení účinnosti přenosu energie, což by se projevilo ve zvětšení průměrné doby života vzorku a rovněž by mělo dojít ke snížení relativní amplitudy kratší doby života příslušející zhášeným molekulám fluoresceinu, respektive ke zvýšení relativní amplitudy delší doby života. Pro vyhasínací křivku vzorku s obsahem neznačených vezikul byly vyhodnoceny tři doby života, které jsou uvedené i se svými příslušnými relativními amplitudami v Tab. 16.

Tab. 16: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. % po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		2,009	1,95
	χ_R^2 = 1,164	4,173	94,34
		0,946	3,71
	τ_{avg} [ns]	3,636	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,083	

Ze získaných výsledků je patrné, že opravdu došlo ke zvýšení průměrné doby života vzorku. Vezmeme-li v potaz přepočtenou průměrnou dobu života se zanedbáním rozptylu světla, činí rozdíl mezi dobou života vzorku bez neznačených vezikul a po jejich přidání 0,329 ns. Tímto tedy bylo možné potvrdit, že skutečně dochází k přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu. Tím pádem tedy byla vyloučena možnost použití rhodaminu, jako akceptoru, jelikož by nebylo možné rozlišit, zdali změny v době života fluoresceinu přísluší k přenosu energie mezi fluoresceinem a rhodaminem, nebo jestli je jejich původem homo-fret mezi molekulami fluoresceinu. Pro zjištění, jestli k rezonančnímu přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu dochází i při jejich menších koncentracích v systému, byly připraveny vzorky s koncentrací fluoresceinu 10^{-5} M a 10^{-6} M. Bylo postupováno obdobně jako v předchozím případě. Pro koncentraci fluoresceinu 10^{-5} M jsou naměřené hodnoty uvedeny v následující tabulce.

Tab. 17: Hodnoty dob života a příslušných amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-5} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol.% před a po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

Fluorescein 10^{-5} M		Bez neznačených vezikul		Přídavek neznač. vezikul	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		2,139	9,77	2,402	7,27
		4,259	85,19	4,328	88,44
		0,448	5,03	0,415	4,29
	τ_{avg} [ns]	2,793		2,959	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,865		4,079	

Jak je patrné z vyhodnocených dob života, opět se zde objevuje kratší a delší komponenta v řádu nanosekund, kdy doba života s hodnotou 2,139 ns náleží zhášeným molekulám fluoresceinu a doba života 4,259 ns nezhášeným. Průměrná doba života vzorku před přidáním neznačených vezikul má po zanedbání rozptylu hodnotu 3,865 ns. Po přidání neznačených vezikul je patrné prodloužení dob života, a to jak zhášené či nezhášené doby života fluoresceinu, tak průměrné doby života vzorku. Po přidání neznačených vezikul vzrostla kratší doba života na 2,402 ns a delší doba života na 4,328 ns, průměrná doba života vzrostla na 4,079 ns. Rozdíl v průměrné době života před a po přidání neznačených vezikul činí 0,215 ns.

Obdobná situace nastává i pro nižší koncentraci fluoresceinu 10^{-6} M. Pro tento vzorek byly pomocí proložení exponenciální funkcí získány tři doby života a jejich relativní amplitudy, jejichž hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 18: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-6} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol.% před a po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života při zanedbání rozptylu

Fluorescein 10^{-6} M		Bez neznačených vezikul		Přídavek neznač. vezikul	
		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,458	5,60	2,105	9,77
		4,151	49,96	4,304	47,03
		0,161	44,44	0,161	43,2
	τ_{avg} [ns]	0,343		0,353	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,499		3,684	

Z výše uvedených hodnot je patrné, že po přidání neznačených vezikul dojde opět ke zvýšení dob života, pro průměrnou dobu života (při zanedbání rozptylu) se jedná o zvýšení o 0,149 ns. Lze si všimnou, že se snižující se koncentrací fluoresceinu se rozdíl v průměrné době života před a po přidání neznačených vezikul snižuje. Se snižující se koncentrací tedy dochází k tvorbě menšího počtu párů molekul fluoresceinu, které jsou od sebe ve vhodné vzdálenosti a může mezi nimi probíhat přenos energie. Nicméně již není možné dále pokračovat ve snižování koncentrace až na takovou úroveň, aby k homo-fret fluoresceinu nedocházelo a mohlo být využito rhodaminu jako donoru, jelikož již i při koncentraci 10^{-6} M se ve velké míře ve výsledcích projevuje rozptyl a dalším snížením koncentrace by došlo k dalšímu umocnění vlivu rozptylu na výsledky. Je však možné použít uvedenou metodu využívající homo-fret, kdy po přidání neznačených vezikul by se měla míra přenosu energie snížit a mělo by dojít k prodloužení dob života fluoresceinu.

Dalším měřeným vzorkem byl roztok vezikul CTA-DS o koncentraci cholesterolu 23 mol. %. Nejprve byla proměřena vyhasínací křivka fluoresceinu a byly vyhodnoceny tři doby života. Opět jako v předchozím případě byla získána delší doba života s hodnotou 3,484 ns a příslušnou relativní amplitudou 77,52 % a kratší doba života s hodnotou 1,176 ns a relativní amplitudou 18,14 %. Všechny změřené hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 19: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,176	18,14
	χ_R^2 = 0,989	3,484	77,52
		0,236	4,34
	τ_{avg} [ns]	1,751	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,539	

Následně byly ke vzorku přidány neznačené vezikuly. Po jejich přidání došlo k prodloužení obou dříve zmíněných dob života, delší má hodnotu 3,611 ns a příslušnou relativní amplitudu 64 % a kratší 1,913 ns a relativní amplitudu 26,15 %. Lze si všimnout, že oproti očekávání nedošlo ke zvětšení relativní amplitudy delší doby života, ale naopak k jejímu snížení. To může být způsobeno tím, že program DAS6 při prokládání experimentálních dat exponenciální funkcí vybírá co nejpravděpodobnější matematický model, který však ne ve všech případech musí odpovídat fyzikální realitě vzorku. Důležité však je, že dochází ke zvýšení dob života, a to i průměrné doby života vzorku (konkrétně o 0,333 ns při zanedbání rozptylu), což značí, že došlo k fúzi vezikul a ke zvětšení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, mezi kterými dochází k přenosu energie. Vyhodnocené hodnoty pro vzorek po přidání neznačených vezikul jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 20: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol.% po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života po zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,913	26,15
	χ_R^2 = 0,989	0,699	9,85
		3,611	64,00
	τ_{avg} [ns]	2,199	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,872	

Následovalo měření systému CTA-DS s obsahem cholesterolu 33 mol. %. Pro vyhasínací křivku fluoresceinu z prostředí tohoto systému byly vyhodnoceny tři doby života (viz. Tab. 21). Delší doba života 4,323 ns s příslušnou relativní amplitudou 92,82 a kratší doba života o hodnotě 2,046 ns s příslušnou relativní amplitudou 4,81 %. Průměrná doba života vzorku (po zanedbání rozptylu) činí 4,099 ns.

Tab. 21: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 33 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		2,046	4,81
	χ_R^2 = 1,480	4,323	92,82
		0,431	2,37
	τ_{avg} [ns]	3,411	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,099	

Poté byly k tomuto vzorku přidány neznačené vezikuly o stejném složení a objemu, vzorek byl po dobu 30 minut sonifikován při zvýšené teplotě 40 °C a byla opět proměřena vyhasínací křivka fluoresceinu. Došlo k prodloužení dob života ve vzorku i ke zvětšení relativních amplitudy delší doby života příslušející nezhášeným molekulám (viz. Tab. 22). Kratší doba měla po přidání

neznačených vezikul hodnotu 2,081 ns a relativní amplitudu 3,66 % a delší doba života 4,378 ns a relativní amplitudu 93,6 %. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činila v tomto případě 4,204 ns. Došlo tedy k jejímu navýšení o 0,105 ns, což poukazuje na to, že v systému docházelo k přenosu energie a díky přidání neznačených molekul a prodloužení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, způsobené jejich fúzi s vezikulami značenými, se účinnost přenosu snížila.

Tab. 22: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 33 mol.% po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života po zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		2,081	3,66
	χ_R^2 = 1,249	4,378	93,6
		0,591	2,74
	τ_{avg} [ns]	3,601	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,204	

Posledním zkoumaným systémem kationtových vezikul je systém CTA-DS s obsahem 53 mol. % cholesterolu. Pomocí proložení vyhasínací křivky tohoto vzorku exponenciální funkcí byly získány tři doby života fluorescence (viz. Tab. 23). Delší doba života má hodnotu 4,197 ns a relativní amplitudu 85,27 %, kratší doba života má hodnotu 1,764 ns a relativní amplitudu 5,42 %. Poslední doba života je způsobena rozptylem. Průměrná doba života vzorku byla při zanedbání nejkratší doby života způsobené rozptylem vypočtena na 3,877 ns.

Tab. 23: Vyhodnocené doby života a příslušné relativní amplitudy vzorku s donorem fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M v prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 53 mol. %, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\ přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,764	5,42
	χ_R^2 = 1,858	4,197	85,27
		0,155	9,31
	τ_{avg} [ns]	1,196	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,877	

Následně byl dodržen stejný postup přidání neznačených vezikul a výsledný roztok byl opět proměřen a byla získána vyhasínací křivka, jejímž proložením byly vyhodnoceny tři doby života (viz. Tab. 24). Delší doba života má hodnotu 4,262 ns a relativní amplitudu 95,9 %, kratší doba života nabývá hodnotu 2,050 ns a její relativní amplituda činí 0,83 %. Poslední doba života náleží rozptylu. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činí 4,223 ns. Opět je zde po přidání neznačených vezikul patrný nárůst jak průměrné doby života o 0,346 ns, tak jednotlivých vyhodnocených dob života vzorku a fúze vezikul tedy byla detekována.

Tab. 24: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 53 mol.% po přidání neznačených vezikul, τ_{avg} značí průměrnou dobu života vzorku, $\tau_{avg,\,přepočet}$ značí průměrnou dobu života vzorku při zanedbání rozptylu

	Fluorescein	τ [ns]	B [%]
3 doby života		2,050	0,83
	χ_R^2 = 1,166	4,262	95,90
		0,839	3,26
	τ_{avg} [ns]	3,732	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,223	

Ze získaných výsledků pro všechny studované systémy CTA-DS o různém obsahu stabilizačního činidla cholesterolu vyplývá, že ve všech případech byla pomocí rezonančního přenosu energie pozorovatelná fúze vezikul, jelikož po přidání neznačených vezikul došlo ke zvýšení dob života v důsledku zvětšení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, mezi kterými homo-fret probíhal. Ze získaných experimentálních hodnot nevyplývá žádná zřejmá souvislost mezi změnami dob života a obsahem stabilizačního činidla cholesterolu, která by mohla objasnit, jaký má právě obsah cholesterolu vliv na fúzi vezikul.

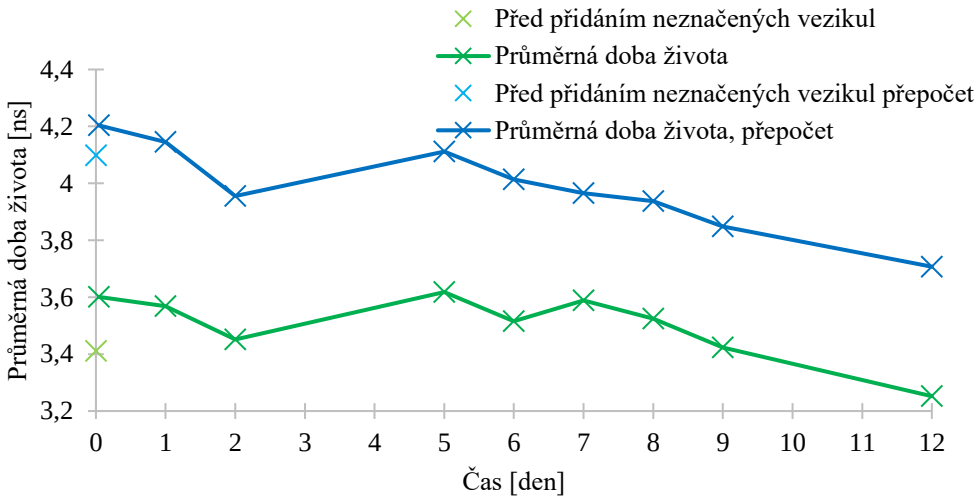
5.3.3.1 Sledování rezonančního přenosu energie v kataniontových systémech pomocí fluoresceinu v čase

Aby bylo možné definovat, jestli v průběhu delšího časového období dochází ke změnám v rezonančním přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu, což by znamenalo změny v tom, jakým způsobem dochází k fúzi vezikul v čase, byly vzorky opakovaně měřeny v řádu několika dní a byly sledovány změny v dobách života fluoresceinu. Byly měřeny všechny systémy s výjimkou CTA-DS o obsahu 23 mol. % cholesterolu, jelikož tento systém nevykazoval velkou stabilitu, a i přes opakované sonifikování docházelo k značné tvorbě sraženin, které do velké míry ovlivňovaly výsledky díky rozptylu světla. Původní předpoklad byl takový, že pokud k fúzi vezikul dochází především v blízké době po smíchání, tak by se v čase hodnoty dob života fluoresceinu (nebo průměrná doba života vzorku) již příliš měnit neměly. Nebo pokud je vezikulární systém dynamický a neustále dochází k fúzi a promíchávání vezikul, tak by v případě homo-fret fluoresceinu mělo docházet v čase k prodlužování dob života, jelikož by docházelo k fúzi značených vezikul s neznačenými a vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu by se zvětšovaly.

Nejprve byl změřen systém cIPA CTA-DS s obsahem 33 mol. % cholesterolu. Je třeba zmínit, že před každým měřením musel být vzorek krátce sonifikován, jelikož docházelo k mírné tvorbě sraženin ve vzorku, které při měření způsobovaly zvýšený rozptyl světla. Získané hodnoty průměrných dob života i časové intervaly, ve kterých byl vzorek měřen, jsou uvedeny v Tab. 25. Ze získaných dat byla následně vynesena grafická závislost hodnot průměrných dob života na čase (Obr. 22).

Tab. 25: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:1; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	12,00
τ_{avg} [ns]	3,411	3,601	3,568	3,451	3,618	3,515	3,589	3,524	3,423	3,252
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	4,099	4,204	4,145	3,955	4,112	4,041	3,965	3,937	3,848	3,707

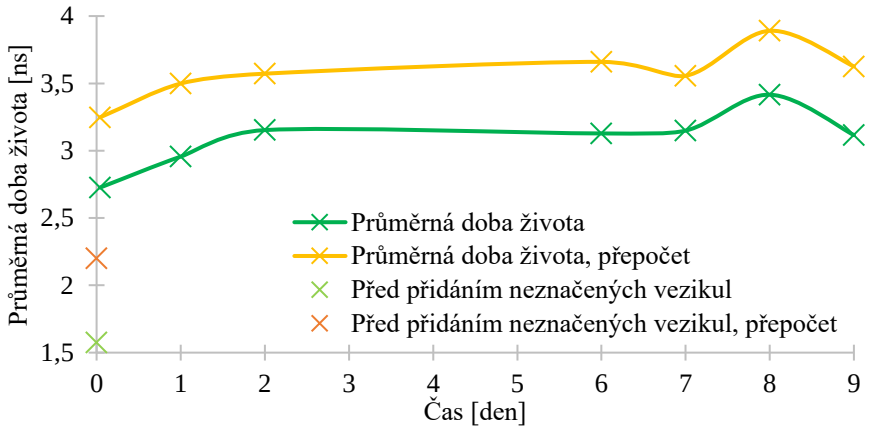


Obr. 22: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:1

Z výše uvedené závislosti je patrné, že oproti předpokladu dochází až na menší výkyvy ke snižování průměrné doby života vzorku. To by znamenalo, že s přibývajícím časem dochází ve větší míře k přenosu energie a molekuly fluoresceinu se k sobě dostávají na kratší vzdálenost, čímž dochází ke zvýšení efektivity rezonančního přenosu energie, což by vedlo k poklesu průměrné doby života vzorku. A to i navzdory tomu, že před měřením kvůli zákalu ve vzorku byla vždy provedena sonifikace, která by teoreticky měla spíše podpořit promíchávání složek v roztoku. Vzhledem k těmto výsledkům byla provedena další měření, kdy byl roztok kataniontových vezikul značených fluoresceinem smíchán s neznačenými vezikulami o čtyřnásobném a devítinásobném objemu. Také byl připraven vzorek, kdy místo neznačených vezikul bylo přidáno pouze rozpouštědlo, tedy deionizovaná voda o stejném objemu, jako vezikuly značené fluoresceinem. Změřené průměrné doby života vzorku s poměrem značených a neznačených vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 30 mol. % 1:4 jsou uvedeny v Tab. 26. Z těchto dat poté byla vytvořena grafická závislost (Obr. 23) průměrné doby života vzorku na čase od smíchání.

Tab. 26: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:4; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	6,00	7,00	8,00	9,00
τavg [ns]	1,576	2,726	2,956	3,153	3,128	3,149	3,416	3,116
τavg, přepočet [ns]	2,201	3,248	3,499	3,572	3,66	3,556	3,891	3,626

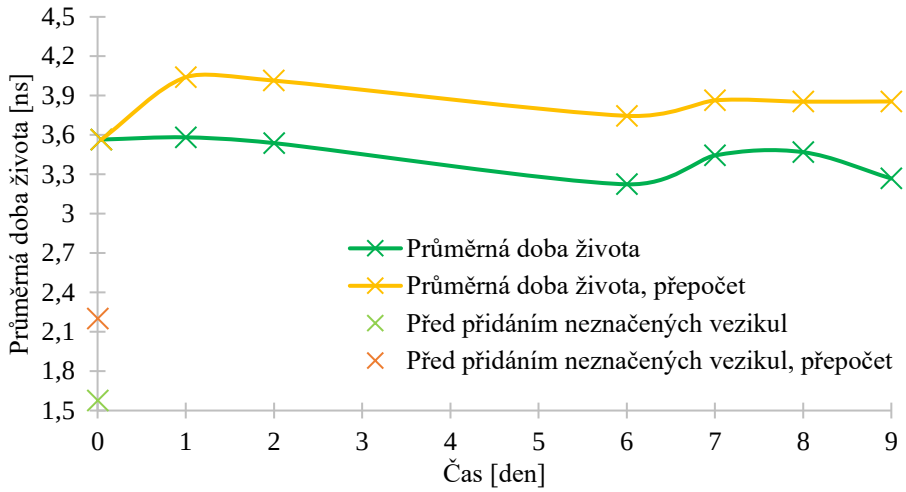


Obr. 23: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:4

Z výše uvedeného grafu je patrné, že pro tento vzorek, kdy jsou značené a neznačené vezikuly v objemovém poměru 1:4, již nedochází s časem k poklesu průměrné doby života, ale nejprve je patrný nárůst a poté, až na jednu výchylku v osmém dnu měření, jsou hodnoty přibližně stejné. Stejným postupem byla provedena měření pro další vzorek, kdy jsou značené a neznačené vezikuly CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % spolu v poměru 1:9. Hodnoty naměřených dob života jsou uvedeny v Tab. 27. Z těchto dat následně byla vytvořena grafická závislost průměrné doby života na čase od smíchání značených a neznačených vezikul, která je zobrazena na Obr. 24. V tomto případě si již lze všimnout, že s přibývajícím časem od smíchání značených a neznačených vezikul dochází ke snižování průměrné doby života, i když ve velmi mírném tempu.

Tab. 27: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:9; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	6,00	7,00	8,00	9,00
τ_{avg} [ns]	1,576	3,565	3,582	3,538	3,224	3,444	3,469	3,268
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,201	3,565	4,04	4,014	3,746	3,863	3,854	3,855



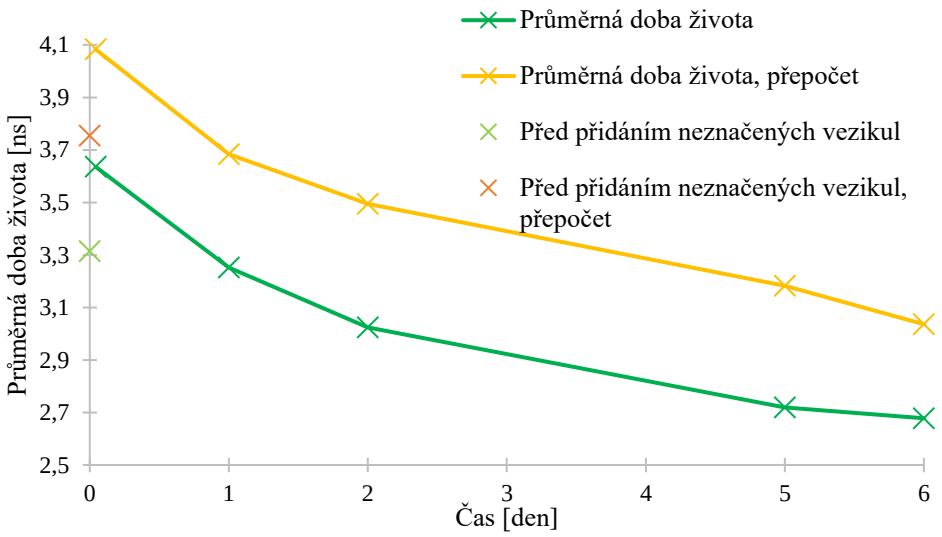
Obr. 24: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:9

Další vzorek obsahující vezikuly CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % se liší tím, že místo neznačených vezikul je přidána deionizovaná voda o stejném objemu. Zde však bylo dosaženo značně rozdílného výsledku. Nejprve po přidání vody k vezikulám došlo ke snížení průměrné doby života (při zanedbání rozptylu) z 2,201 ns na 1,199 ns, což odporuje předpokladu, že při přidání pouze rozpouštědla do systému by neměl být průběh rezonančního přenosu energie, respektive fúze vezikul ovlivněn, a to zvlášť při používání TCSPC metody, kdy měření časově rozlišené fluorescence není závislé na koncentraci fluoroforu. Po jednom dnu byly opět ve výsledcích patrné změny, kdy došlo ke zvýšení průměrné doby života na 1,375 ns. Do dalšího dne však došlo k vytvoření velkého množství sraženiny, kterou se nepodařilo odstranit ani sonifikací při zvýšené teplotě, a proto další měření již nebyla provedena.

Následovala měření systému CTA-DS s obsahem cholesterolu 43 mol. %. Bylo postupováno obdobně jako u vzorku s nižším obsahem cholesterolu, kdy byl vzorek obsahující vezikuly značené fluoresceinem i neznačené vezikuly v různém vzájemném objemovém poměru měřen po dobu několika dní. Nejprve byl měřen vzorek, kdy značené a neznačené vezikuly byly ve vzájemném poměru 1:1. Data pro všechna provedená měření jsou uvedena v Tab. 28. Následně byla pro tato data vytvořena grafická závislost uvedená na Obr. 25.

Tab. 28: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:1; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0	0,04	1	2	5	6
τ_{avg} [ns]	3,314	3,636	3,252	3,024	2,719	2,678
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,754	4,083	3,684	3,494	3,183	3,036



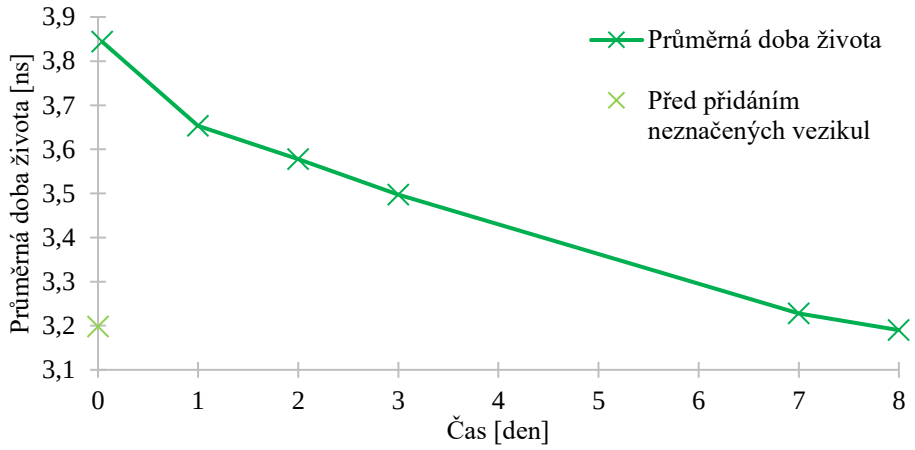
Obr. 25: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:1

Jak je patrné z výše uvedené závislosti, i pro systém kataniontových vezikul s obsahem cholesterolu 43 mol. % dochází po přidání neznačených vezikul nejprve k prodloužení průměrné doby života vzorku v důsledku fúze vezikul a z toho vyplývajícímu zvětšení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, avšak již od prvního dne po smíchání dochází oproti předpokladu k postupnému snižování průměrné doby života. Po šesti dnech od smíchání navíc došlo ke vzniku sraženiny, kterou se nepodařilo odstranit ani pomocí sonifikace za zvýšené teploty a další měření tedy již nebyla provedena.

V dalším vzorku činil poměr značených a neznačených vezikul 1:4. Při vyhodnocování naměřených dat byly pro jednotlivá měření získány pouze dvě doby života (kromě měření před přídavkem neznačených vezikul, v Tab. 29 je uvedena pro toto měření přepočítaná hodnota průměrné doby života). a nedošlo k projevu rozptylu ve výsledcích, proto průměrná doba života nebyla přepočítávána. Z těchto hodnot byla vytvořena grafická závislost uvedená na Obr. 26.

Tab. 29: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:4; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0	0,04	1	2	3	7	8
τ_{avg} [ns]	3,663	3,844	3,653	3,578	3,497	3,228	3,190



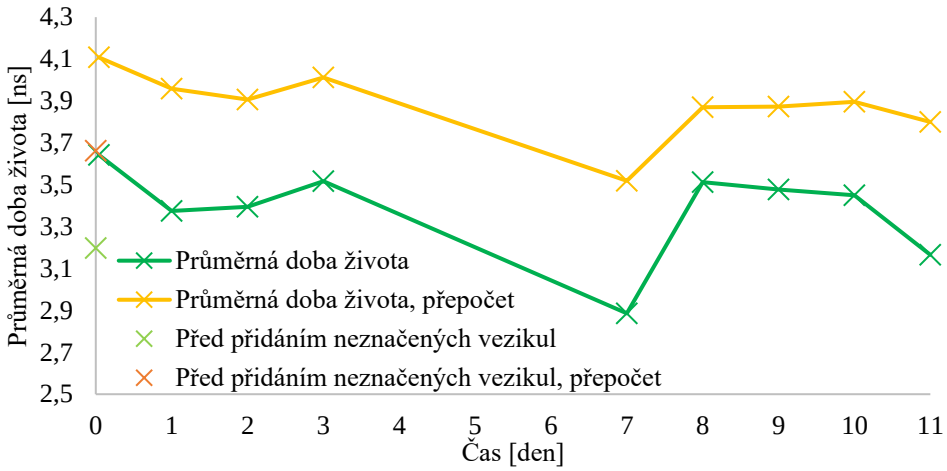
Obr. 26: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:4

Z výše uvedených dat i grafu je patrné, že vzorek s poměrem značených a neznačených vezikul 1:4 opět vykazuje takové chování, při kterém nejprve dojde po přidání neznačených vezikul k prodloužení doby života, avšak následně s přibývajícím časem dochází k jejímu postupnému snižování. Po osmém dnu došlo ve vzorku k vytvoření velkého množství sraženiny a další měření již nebyla provedena.

Podobné chování vykazoval i vzorek, který byl připraven v poměru vezikul značených a neznačených 1:9. Opět po přidání neznačených vezikul došlo nejprve k prodloužení průměrné doby života, avšak poté s velkými výchylkami docházelo k jejímu poklesu s přibývajícím časem od smíchání. Po 11 dnu opět došlo k vytvoření velkého množství sraženiny, kterou nebylo možné odstranit ani pomocí sonifikace při zvýšené teplotě. Naměřené hodnoty doby života pro tento vzorek jsou uvedeny v Tab. 30. Grafická závislost průměrné doby života na čase od smíchání je uvedena na Obr. 27.

Tab. 30: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:9; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0	0,04	1	2	3	7	8	9	10	11
τ_{avg} [ns]	3,198	3,642	3,375	3,394	3,517	2,886	3,512	3,477	3,449	3,165
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,663	4,108	3,959	3,907	4,012	3,519	3,87	3,872	3,895	3,799

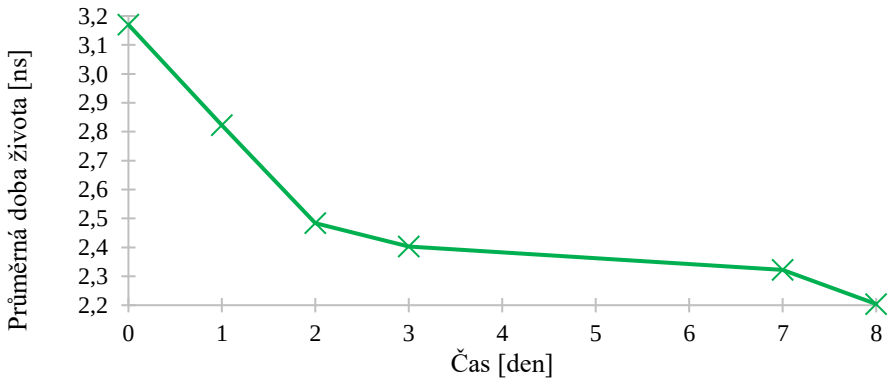


Obr. 27: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:9

V posledním vzorku obsahujícím systém CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % byly opět neznačené vezikuly nahrazeny deionizovanou vodou o. Pro tento vzorek byly při každém měření vyhodnoceny pouze dvě doby života, proto zde nemuselo být přistoupeno k přepočtům dob života za účelem omezení vlivu rozptylu na výsledky. Po osmém dnu měření došlo k vytvoření sraženiny. Vyhodnocené doby života pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 31. Grafická závislost těchto hodnot na čase je uvedena na Obr. 28. Z těch výsledků vyplývá, že opět podobně jako u vzorků s přídavkem neznačených vezikul dochází postupně s časem ke snižování průměrné doby života, což by vzhledem k teorii znamenalo, že dochází k intenzivnějšímu přenosu energie například kvůli zmenšování vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu.

Tab. 31: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu ze vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % po přidání deionizované vody o stejném objemu, hodnota 0 značí měření ihned po přidání vody do systému

Čas [den]	0	1	2	3	7	8
τ_{avg} [ns]	3,170	2,822	2,484	2,403	2,322	2,204

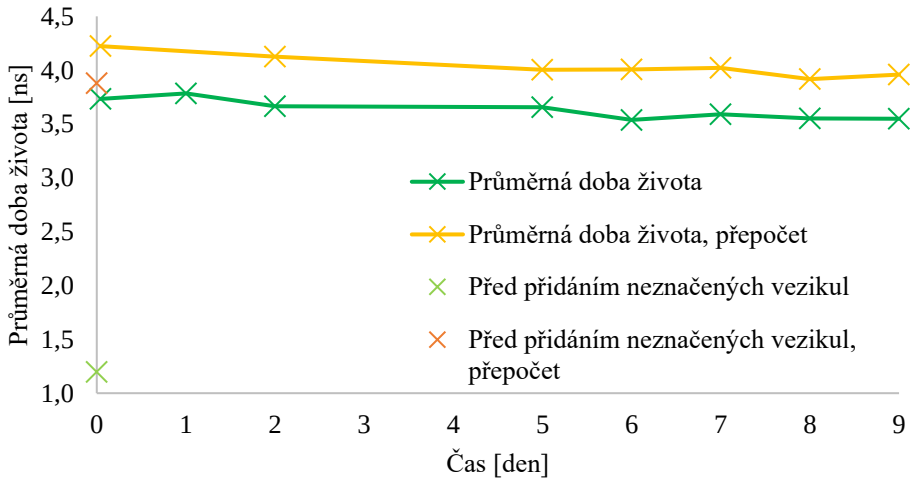


Obr. 28: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značeného fluoresceinem na čase od přidání deionizované vody o stejném objemu

Následně bylo přistoupeno k měření vzorků CTA-DS s obsahem cholesterolu 53 mol. %. Vzorky o tomto složení by rovněž podobně jako vzorky s obsahem cholesterolu 43 mol % měly vykazovat celkovou stabilitu, jak bylo prokázáno pomocí měření DLS a zeta potenciálu. Měření bylo provedeno stejně jako v předchozích případech. Nejprve byl připraven a měřen vzorek, kdy poměr značených a neznačených vezikul činil 1:1. Výsledky pro toto měření jsou uvedeny v Tab. 32 (pro měření po 1 dnu byly vyhodnoceny pouze 2 doby života a nebyl detekován rozptyl, proto výsledek pro toto měření nebyl přepočten). Graf závislosti průměrné doby života na čase od smíchání je uveden na Obr. 29. Lze si všimnout, že pro tato měření opět dochází nejprve ke zvýšení průměrné doby života po přidání neznačených vezikul v důsledku jejich fúze se značenými a z toho pramenícího prodloužení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, mezi kterými dochází k přenosu energie. Avšak poté, stejně jako v předchozích případech, dochází k postupnému snižování průměrné doby života s rostoucím časem od přidání neznačených vezikul, tento pokles je nicméně relativně velmi mírný.

Tab. 32: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:1; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00
τ_{avg} [ns]	1,196	3,732	3,784	3,666	3,656	3,538	3,589	3,552	3,549
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,877	4,223	-	4,125	4,004	4,006	4,022	3,917	3,958



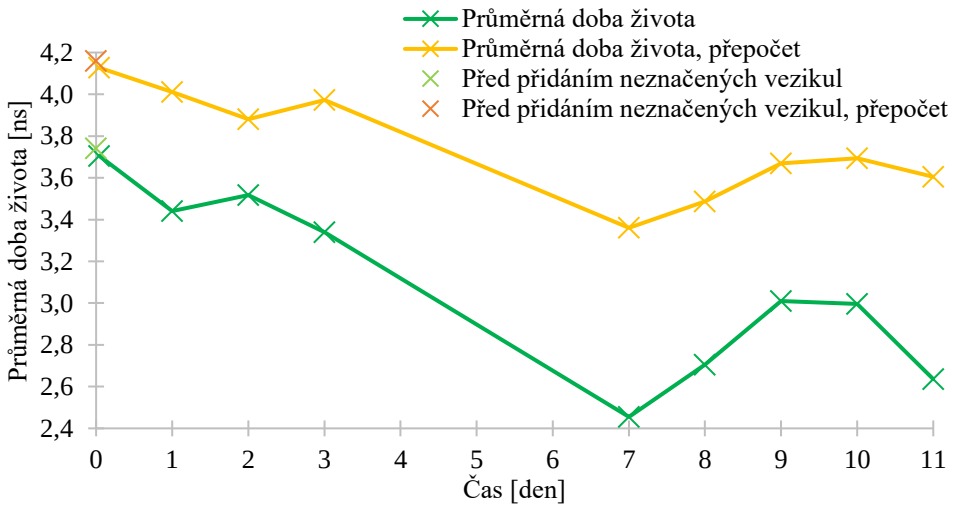
Obr. 29: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:1

Následně byl měřen vzorek, při jehož přípravě byl použit poměr vezikul značených fluoresceinem a vezikul neznačených 1:4. Postupováno bylo obdobným způsobem. Po 11 dnu měření opět došlo k vytvoření sraženiny, kterou se nepodařilo odstranit ani pomocí sonifikace. Vyhodnocené průměrné doby života pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 33. Grafická závislost průměrné doby života na čase od přidání neznačených vezikul je uvedena na Obr. 30. Z těchto výsledků je patrné, že po přídavku neznačených vezikul do systému nedošlo k prodloužení průměrné doby života vzorku. To by mohlo znamenat, že nedošlo k fúzi vezikul

značených fluoresceinem s neznačenými a nebyl by tedy ovlivněn rezonanční přenos energie mezi molekulami fluoresceinu, avšak proti tomuto závěru stojí výsledky měření předcházejícího vzorku, kdy poměr značených a neznačených vezikul činil 1:1 a kde patrně ke snížení účinnosti rezonančního přenosu energie došlo. Naopak by se právě dalo předpokládat, že při zvýšení poměru neznačených vezikul v systému by mělo dojít ve větší míře k fúzi a promíchání s vezikulami neznačenými a homo-fret mezi molekulami fluoresceinu by měl do větší míry poklesnout. Nelze však s určitostí objasnit, proč je tomu právě naopak. Jedním z možných teoretických důvodů, proč nedošlo ke zvýšení doby života po přidání neznačených vezikul, by byla tvorba shluků nebo jiných agregátů fluoresceinu, ve kterých by byly molekuly fluoresceinu mezi sebou ve vzájemné krátké vzdálenosti, díky čemuž by mezi nimi mohlo ve větší míře docházet k rezonančnímu přenosu energie a vliv fúze značených vezikul s neznačenými by tím byl kompenzován. K tvorbě těchto shluků by mohlo docházet například díky nedostatečné solubilizaci fluoresceinu do struktury vezikul nebo naopak díky vypuzování fluoresceinu z vezikul či určitému zakoncentrovávání jeho molekul. Toto vypuzování by mohlo teoreticky být způsobené formováním oblastí bohatých na cholesterol, při jejichž tvorbě by docházelo k vypuzování fluoresceinu z vezikulární struktury. Tyto oblasti bývají v případě fosfolipidových membrán označovány jako tzv. rafty [51]. Hypotézu o tvorbě agregátů bohatých na fluorescein by podporoval i fakt, že u většiny vzorků docházelo po určité době k tvorbě sraženin. Nelze to však s jistotou potvrdit, k verifikaci této hypotézy by bylo nutné provést další experimenty, jako například odfiltrovat vzniklé sraženiny a dále je analyzovat.

Tab. 33: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:4; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0	0,04	1,00	2,00	3,00	7,00	8,00	9,00	10,00	11,00
τ_{avg} [ns]	3,741	3,705	3,441	3,517	3,340	2,455	2,705	3,010	2,996	2,636
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	4,159	4,127	4,011	3,880	3,973	3,360	3,487	3,669	3,694	3,605

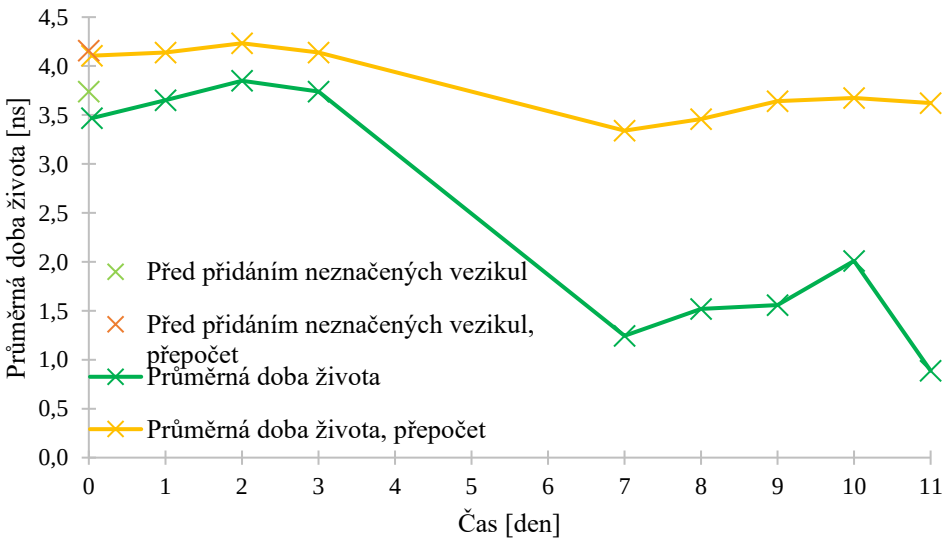


Obr. 30: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:4

Obdobná situace nastává i u dalšího vzorku, kdy poměr vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značených fluoresceinem a vezikul neznačených činí 1:9. I zde po přidání neznačených vezikul nedochází k prodloužení dob života, ale naopak ihned dochází k jejich poklesu s výjimkou měření 3. den, kdy byla vyhodnocena delší doba života než před přidáním neznačených vezikul. Nicméně poté opět nastal sestupný trend, který následně vystřídal mírný nárůst, a nakonec došlo k vytvoření velkého množství sraženiny, jako tomu bylo i u předchozího vzorku. Není možné spolehlivě určit, proč k tomuto poklesu dochází, nabízí se pouze stejná hypotéza jako v předchozím případě. Vyhodnocené průměrné doby života tohoto vzorku jsou uvedeny v Tab. 34. Grafická závislost průměrné doby života na čase od smíchání je uvedena na Obr. 31.

Tab. 34: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu z prostředí CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu na čase, kdy poměr značených a neznačených vezikul je 1:9; hodnota 0 značí měření před přídavkem neznačených vezikul, hodnota 0,04 značí první měření po přídavku (přibližně po 60 minutách)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	3,00	7,00	8,00	9,00	10,00	11,00
τ_{avg} [ns]	3,741	3,469	3,650	3,850	3,741	1,245	1,519	1,558	2,009	0,888
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	4,159	4,105	4,139	4,233	4,139	3,341	3,458	3,643	3,673	3,622

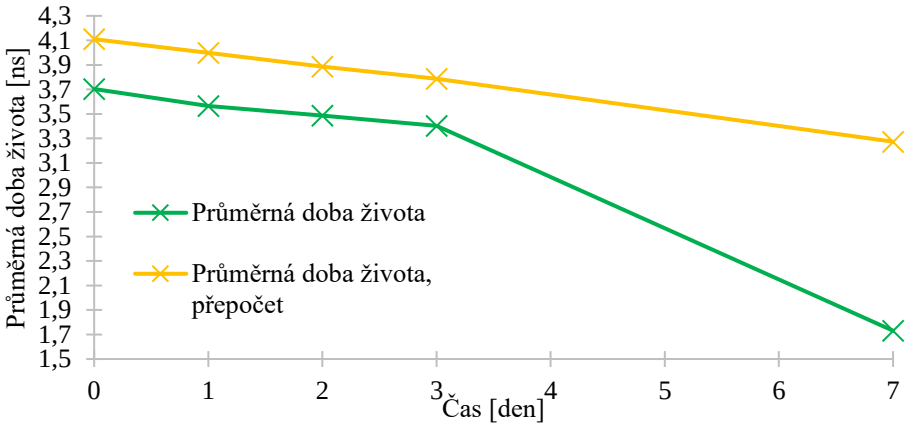


Obr. 31: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu obsahující vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v poměru 1:9

U vzorku, kde byly neznačené vezikuly nahrazeny vodou o stejném objemu, byly pozorovány obdobné výsledky, jako pro CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. %. I zde docházelo v průběhu času ke snižování průměrné doby života a následně po 7 dnu došlo k vytvoření sraženiny. Vyhodnocené průměrné doby života vzorku jsou uvedeny v následující Tab. 35. Grafická závislost pro tyto hodnoty je uvedena na Obr. 32.

Tab. 35: Hodnoty závislosti průměrné doby života fluoresceinu ze vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % po přidání deionizované vody o stejném objemu, hodnota 0 značí měření ihned po přidání vody do systému

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	3,00	7,00
τ_{avg} [ns]	3,703	3,565	3,487	3,404	1,731	3,703
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	4,110	3,998	3,886	3,785	3,273	4,110



Obr. 32: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značeného fluoresceinem na čase od přidání deionizované vody o stejném objemu

Vzhledem k faktu, že získané výsledky pro systémy s různým obsahem cholesterolu neodpovídají teoretickým předpokladům pro homo-fret, kdy bylo očekáváno, že po přidání neznačených vezikul se vlivem fúze s vezikulami značenými prodlouží vzdálenost mezi molekulami fluoresceinu a sníží se tedy účinnost přenosu energie, což vyústí v prodloužení doby života vzorku a rovněž kvůli faktu, že u většiny vzorků došlo po několika dnech k vytvoření velkého množství sraženiny, bylo přistoupeno k měření zeta potenciálu vzorku vezikul obsahující solubilizovaný fluorescein. Toto měření by mělo pomoci určit, jestli přítomnost fluoresceinu, který po rozpuštění ve vodném prostředí nese záporný náboj, nemá nepříznivý vliv na stabilitu vezikulárních systémů, což by mohlo vysvětlovat výsledky neodpovídající teoretickým předpokladům, nebo minimálně tvorbu sraženin. Pomocí pozorování pod UV lampou bylo zjištěno, že vzniklé sraženiny jsou bohaté na fluorescein, jelikož bylo i pouze okem patrné, že po ozáření jasně zeleně fluoreskují.

Pro měření zeta potenciálu byl zvolen vzorek CTA-DS o obsahu fluoresceinu 43 mol. %. Nejprve byl změřen zeta potenciál neznačených vezikul. Provedeno bylo pět měření, ze kterých byl následně vypočítán průměr, jehož hodnota činí 58,3 ± 3,9 mV. Hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 36.

Tab. 36: Hodnoty měření zeta potenciálu neznačených vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. %

Číslo měření	1	2	3	4	5	Průměr	Odchylka
Zeta potenciál [mV]	64,3	58,3	59,0	55,3	54,5	58,3	3,9

Následně byl změřen zeta potenciál vzorku, který byl připraven tak, že stejný roztok vezikul byl přidán do vialky s fluoresceinem (nejprve bylo provedeno odpaření rozpouštědla). Poté byla vialka nechána den na třepačce a následně byla před měřením zeta potenciálu provedena sonifikace při 40 °C, aby byla podpořena solubilizace fluoresceinu do vezikul. Ze získaných výsledků uvedených v Tab. 37 je patrné, že došlo k poměrně značenému poklesu zeta potenciálu, jehož průměrná hodnota činila 24,5 ± 3,7 mV. Tato hodnota se již nachází v elektrostaticky nestabilní oblasti. Došlo tedy pravděpodobně k odstínění a kompenzaci části kladného náboje vezikul, jenž je zapříčiněn kladně nabitým dvouřetězcovým tenzidem DODAC, pomocí záporně nabitého fluoresceinu, který se do vezikul inkorporoval a tím pádem došlo k poklesu elektrostatické repulze mezi kladně nabitými vezikulami.

Tab. 37: Hodnoty měření zeta potenciálu vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % s inkorporovaným fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M

Číslo měření	1	2	3	4	5	Průměr	Odchylka
Zeta potenciál [mV]	29,6	26,4	23,7	19,9	22,8	24,5	3,7

Následně byly k těmto značeným vezikulám přidány vezikuly neznačené v objemovém poměru 1:1 a opět byl proměřen zeta potenciál. Ze získaných výsledků je patrné, že došlo ke zvýšené zeta potenciálu směrem k elektrostaticky stabilní oblasti, průměrná hodnota činí 52,4 ± 4,0 mV. Výsledky pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 38.

Tab. 38: Hodnoty měření zeta potenciálu vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % s inkorporovaným fluoresceinem o koncentraci 10^{-4} M po přidání neznačených vezikul v objemovém poměru 1:1

Číslo měření	1	2	3	4	5	Průměr	Odchylka
Zeta potenciál [mV]	58,8	51,3	48,7	53,5	49,8	52,4	4,0

Vzhledem k tomuto výsledku jsou možné dvě situace. Teoreticky je možné, že ve vzorku by nyní koexistovaly neznačené vezikuly s nestabilními vezikulami značenými fluoresceinem v určité rovnováze, kdy by nedocházelo k jejich interakcím a promíchávání. Druhou možností by bylo, že mezi vezikulami dochází k fúzi, probíhá promíchávání jejich dvojvrstev a tím pádem dochází i k většímu rozvrstvení záporně nabitého fluoresceinu, čímž pádem dojde i ke zvýšení měřeného zeta potenciálu. Vezmeme-li v potaz měření rezonančního přenosu energie, tak bylo prokázáno, že u většiny vzorků dochází po přidání neznačených vezikul k vezikulám značeným fluoresceinem ke zvýšení doby života fluorescence, které je způsobeno fúzí vezikul a větším rozvrstvením fluoresceinu mezi vezikulární dvojvrstvy. Tím pádem je podpořena druhá možnost vysvětlení změny zeta potenciálu po přidání neznačených vezikul, jelikož jejich fúze byla pomocí FRET potvrzena.

Bylo provedeno ještě jedno měření zeta potenciálu, a to měření po 1 dnu po smíchání. Před tímto měřením byla rovněž provedena sonifikace při zvýšené teplotě, aby bylo podpořeno promíchání značených a neznačených vezikul. Průměrný zeta potenciál byl poté vypočítán na 42,3 ± 4,4 mV. Hodnoty jednotlivých měřeních jsou uvedeny v Tab. 39.

Tab. 39: Hodnoty měření zeta potenciálu vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % s inkorporovaným fluoresceinem o koncentraci 10−4 M po přidání neznačených vezikul v objemovém poměru 1:1; měření po 1 dnu a sonifikaci vzorku

Číslo měření	1	2	3	4	5	Průměr	Odchylka
Zeta potenciál [mV]	48,2	45,8	40,0	39,8	37,9	42,3	4,4

Je patrné, že opět došlo k poklesu zeta potenciálu směrem k nestabilní oblasti. Pravděpodobně tedy došlo k dalšímu promíchávání a více se projevil vliv záporně nabitého fluoresceinu. Teoreticky možné rovněž je, že dochází k vypuzování molekul fluoresceinu a k jejich agregaci, což následně u většiny vzorků vedlo po několika dnech k tvorbě sraženin, nicméně tuto hypotézu není možné potvrdit.

Vzhledem k výsledům sledování rezonančního přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu, kdy hodnoty často neodpovídaly teoretickým předpokladům (především v delším časovém období) a rovněž docházelo k vysrážení vzorků, byl vyzkoušen další způsob přípravy vzorků, který je včetně výsledků měření popsán v následující podkapitole.

5.3.3.2 Alternativní způsob značení vezikul fluoresceinem, přídavek sondy již v průběhy přípravy cIPA

Jelikož v předchozích měřeních bylo zjištěno, že výsledky měření rezonančního přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu z prostředí kataniontových vezikul pomocí sledování změn dob života nesouhlasí v průběhu delšího časového období s teoretickými předpoklady a rovněž dochází k vytváření sraženin ve vzorku, byl otestován i alternativní způsob značení vezikul. Při tomto způsobu je fluorescenční sonda přidávána již při přípravě kataniontových vezikul, konkrétně před rehydratací, tedy v části procesu, kdy dochází k odpaření chloroformu, ve kterém je rozpuštěno CTA-DS a dvouřetězcový tenzid DODAC. Zároveň tedy dojde k odpaření rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěna fluorescenční sonda. Následně při rehydrataci cIPA a následné dispergaci pomocí ultrazvuku dojde k inkorporaci fluorescenční sondy do struktury kataniontových vezikul. Následný postup je stejný jako u dříve uvedených měření. Nejprve je proměřena doba života fluoresceinu a následně jsou do vzorku přidány neznačené vezikuly o různém poměru vzhledem k vezikulám značeným. Poté jsou provedena další měření, a to jak ihned po smíchání vezikul, tak v delším časovém období. Není-li uvedeno jinak, jsou brány v potaz především přepočítané průměrné doby života ($\tau_{avg,přepočet}$), díky čemuž je ve velké míře zanedbán rozptyl.

Nejprve bylo provedeno měření vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. %. Pro tento vzorek značený fluoresceinem byla proměřena vyhasínací křivka a pomocí proložení exponenciální funkcí byly vyhodnoceny 3 doby života, které jsou uvedeny v Tab. 40. Delší doba života s hodnotou 3,288 ns a relativní amplitudou 49,33 % a kratší doba života s hodnotou 1,147 ns a příslušnou relativní amplitudou 17,65 %. Poslední doba života patřila rozptylu. Průměrná doba života vzorku činila 2,203 ns.

Tab. 40: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. %; použití přímého způsobu značení vezikul

	Fluorescien	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,147	17,65
	χ_R^2 = 1,190	3,288	49,33
		0,183	33,02
	τ_{avg} [ns]	0,473	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,203	

Následně byly k tomuto vzorku přidány neznačené vezikuly, a to nejprve v poměru 1:1 ke značeným. Následně byla provedena dvě měření, jedno ihned po promíchání s neznačenými vezikulami a druhé následně po 30 minutách sonifikace vzorku při zvýšené teplotě 40 °C. Z výsledků prvního měření je patrné, že dojde k prodloužení delší doby života a k nárůstu její relativní amplitudy. Průměrná doba života vzorku vzroste na 2,558 ns. To značí, že ve vzorku docházelo k fúzi značených a neznačených vezikul, k jejich promíchávání a tím pádem i k prodloužení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, což vyústilo v pokles účinnosti přenosu energie. Po provedení sonifikace došlo k dalšímu zvýšení relativní amplitudy delší komponenty a rovněž průměrná doba života vzorku vzrostla na 2,808 ns. Tento výsledek značí, že došlo k dalšímu promíchávání značených a neznačených vezikul a k ještě většímu rozprostření molekul fluoresceinu mezi vezikulární struktury. Naměřené hodnoty pro obě měření jsou uvedeny v Tab. 41.

Tab. 41: Hodnoty naměřených dob života a příslušných relativních amplitud vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % značeného pomocí přímé solubilizace fluoresceinu, měření provedena po přidání neznačených vezikul a po následné sonifikaci

Fluorescein 10^{-4} M		Po přidání neznačených vezikul		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		1,139	13,8	1,488	18,11
		3,636	58,04	3,611	72,23
		0,17	28,16	0,333	9,66
	τ_{avg} [ns]	0,517		1,635	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,558		2,808	

Měření byla následně prováděna v horizontu několika dní, aby bylo možné určit, jestli dochází k změnám v rezonančním přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu, a tedy ke změnám ve fúzi a promíchávání vezikul, v čase. Před každým měřením byl vzorek 30 minut sonifikován za zvýšené teploty 40 °C, jelikož docházelo k zakalení vzorku. Nebyl však pozorován vznik nerozpustné sraženiny, jako tomu u dříve použitého způsobu značení vezikul. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 42.

Z těchto hodnot je patrné, že v čase dochází i přes výchylky v trendu k postupnému mírnému nárůstu průměrné doby života, což značí snížení účinnosti přenosu energie mezi molekulami fluoresceinu vlivem promíchávání značených a neznačených vezikul.

Tab. 42: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	0,473	0,517	1,635	1,628	1,907	1,834	1,733	1,730	1,933
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,203	2,558	2,808	2,707	2,877	2,794	2,912	2,884	2,960

Dále byl připraven vzorek s poměrem vezikul značených fluoresceinem a vezikul neznačených 1:4. Vyhodnocené průměrné doby života vzorku jsou uvedeny v Tab. 43 . Z těchto hodnot je patrné, že došlo k výraznějšímu prodloužení doby života po přidání většího množství neznačených vezikul (oproti poměru 1:1) a došlo tedy k většímu rozvrstvení a rozředění fluoresceinu mezi vezikuly v důsledku jejich vzájemné fúze. V čase pak následně dochází v jednotlivých měřeních k mírným poklesům i vzrůstům průměrné doby života, ale celkově si trend drží přibližně stejný charakter. Zmíněné výkyvy se pohybují do hodnoty přibližně 0,1 ns, což může být ovlivněno odchylkami měření nebo vlivem rozptylu.

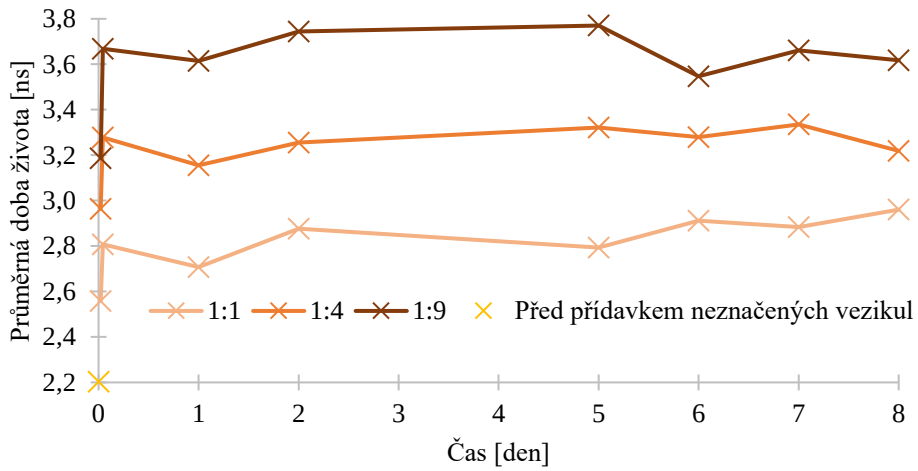
Tab. 43: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	0,473	1,461	2,367	2,328	2,62	2,611	2,582	2,447	2,136
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,203	2,964	3,278	3,156	3,255	3,322	3,279	3,335	3,219

V dalším měřeném vzorku činil poměr vezikul značených fluoresceinem a vezikul neznačených 1:9. Po přidání neznačených vezikul je patrný značný nárůst průměrné doby života na 3,187 ns, což je víc než u předchozích poměrů. Po sonifikaci opět došlo k dalšímu vzrůstu, tentokrát na hodnotu 3,668 ns. Došlo tedy k dalšímu promíchání vezikul. Jak již bylo uvedeno, pro poměr značených a neznačených vezikul 1:9 došlo k nejvyššímu nárůstu doby života, díky vyššímu počtu neznačených vezikul tedy došlo v největší míře prostřednictvím fúze k promíchání vezikul a k rozředění molekul fluoresceinu, což vedlo ke snížení přenosu energie. Tento vzorek byl opět sledován v delším časovém období. Po sonifikaci je v dalších dnech patrný mírný nárůst průměrné doby života, který je však poté následován poklesem. Celkově však trend v daném období výrazně neklesá ani neroste. Hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedena v Tab. 44. Grafická závislost průměrné doby života vzorku na čase od smíchání pro všechny sledované poměry značených a neznačených vezikul je zobrazena na Obr. 33.

Tab. 44: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	0,473	1,416	2,912	2,738	3,094	3,183	2,774	2,707	2,454
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,203	3,187	3,668	3,614	3,744	3,770	3,546	3,662	3,617



Obr. 33: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % na čase od smíchání vezikul značených fluoresceinem s vezikulami neznačenými v různém vzájemném poměru

Dalším měřeným kataniontovým systémem byl systém CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. %. Nejprve bylo provedeno měření vyhasínací křivky fluoresceinu před přídavkem neznačených vezikul. Byly vyhodnoceny tři doby života, nejvíc zastoupená byla doba života 3,547 ns s příslušnou relativní amplitudou 71,40 %. Kratší komponenta měla hodnotu 1,379 ns a relativní amplitudu 20,70 %. Poslední doba života patřila rozptylu. Průměrná doba života vzorku činila 2,621 ns. Výsledky pro toto měření jsou uvedeny v Tab. 45.

Tab. 45: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 33 mol. %; použití přímého způsobu značení vezikul

	Fluorescien	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,379	20,7
	χ_R^2 = 1,294	3,547	71,4
		0,536	7,90
	τ_{avg} [ns]	1,674	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,621	

Následně byly do vzorku přidány neznačené vezikuly o stejném složení v poměru 1:1. Poté byla opět proměřena vyhasínací křivka a byly vyhodnoceny tři doby života. Delší doba života s hodnotou 3,726 ns a relativní amplitudou 77,69 % a kratší doba života s hodnotou 1,406 ns a relativní amplitudou 16,71 %, poslední zjištěná doba života přísluší rozptylu. Lze tedy pozorovat nárůst dob života i relativní amplitudy delší nezhášené komponenty. Průměrná doba života vzorku vzrostla na 2,883 ns. Poté byla provedena sonifikace a postup měření byl opakován. Delší komponenta měla nyní hodnotu 3,779 ns a relativní amplitudu 78,19 % a kratší komponenta 1,651 ns a relativní amplitudu 16,31 %. Průměrná doba života vzorku činila 3,092 ns. Při sonifikaci tedy byla dále podpořena fúze a promíchávání vezikul. Naměřené hodnoty pro tato dvě měření jsou uvedeny v Tab. 46.

Tab. 46: Hodnoty naměřených dob života a příslušných relativních amplitud vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značeného pomocí přímé solubilizace fluoresceinu, měření provedena po přidání neznačených vezikul a po následné sonifikaci

Fluorescein 10^{-4} M		Po přidání neznačených vezikul		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		1,406	16,71	1,651	16,31
		3,726	77,69	3,779	78,19
		0,302	5,60	0,391	5,50
	τ_{avg} [ns]	1,949		2,240	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,883		3,092	

Tento vzorek byl poté měřen v delším časovém období. Vyhodnocené průměrné doby života pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 47. Z výsledků je patrné, že i přes počáteční mírný pokles je celkově trend vzestupný a pravděpodobně tak v čase dochází k dalšímu promíchávání značených a neznačených vezikul, což způsobuje snížení účinnosti přenosu energie.

Tab. 47: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	1,674	1,949	2,240	2,252	2,334	2,370	1,642	2,089	2,246
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,621	2,883	3,092	2,974	2,970	3,130	3,088	3,309	3,377

Následně byl připraven vzorek, ve kterém činil poměr vezikul značených fluoresceinem a vezikul neznačených 1:4. Po přidání neznačených vezikul vzrostla průměrná doba života vzorku na 3,291 ns. Po následné sonifikaci nastal opět nárůst průměrné doby života na hodnotu 3,628 ns. Obě tyto hodnoty jsou vyšší než pro poměr značených a neznačených vezikul 1:1. S větším

množstvím neznačených vezikul tedy podle předpokladu dochází vlivem fúze k významnějšímu promíchání vezikulárních dvojvrstev a tím pádem i k většímu rozvrstvení fluoresceinu do jejich struktur, což má za následek znatelnější pokles přenosu energie projevující se prodloužením dob života. Vzorek byl rovněž sledován v čase. Hodnoty z těchto měření jsou uvedeny v Tab. 48. Z těchto hodnot vyplývá, že v průběhu měřeného období po přidání neznačených vezikul dochází k mírnému poklesu průměrné doby života (po zanedbání rozptylu), a to pouze v rozmezí přibližně 0,1 ns. Při takto malém rozdílu nelze určit, jestli skutečně dochází ke změnám v přenosu energie, nebo je trend přibližně konstantní a výsledky jsou ovlivněny pouze odchylkami měření.

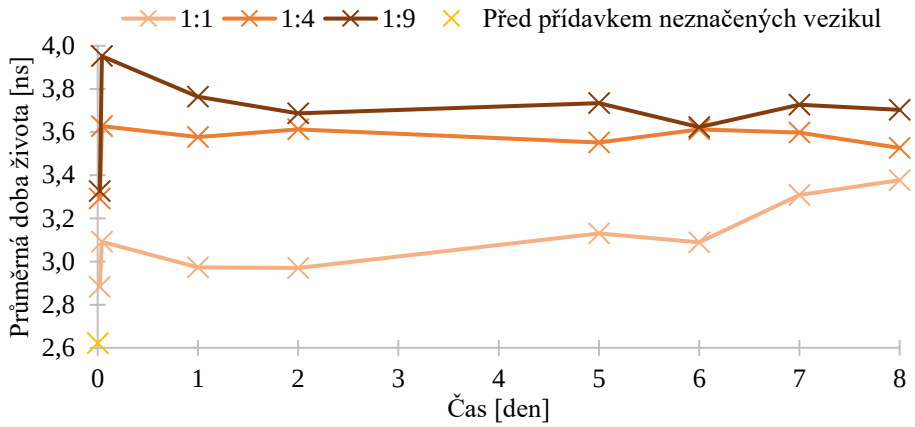
Tab. 48: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	1,674	2,556	3,050	3,093	3,093	2,885	1,292	1,865	1,223
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,621	3,291	3,628	3,578	3,612	3,552	3,613	3,597	3,526

V dalším měřeném vzorku činil podíl vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značených fluoresceinem a vezikul neznačených 1:9. Po přidání tohoto množství neznačených vezikul vzrostla průměrná doba života na 3,326 ns. Po následné sonifikaci došlo k dalšímu nárůstu průměrné doby života na 3,952 ns. Při tomto poměru, kdy je ve vzorku nejvíce neznačených vezikul, dle předpokladu dochází i k největšímu nárůstu dob života ze všech měřených vzorků o různých poměrech neznačených vezikul, jelikož dochází vlivem fúze k rozprostření fluoresceinu mezi větší množství vezikul. Hodnoty průměrných dob života měření tohoto vzorku v průběhu dalších dnů jsou uvedeny v Tab. 49. Z těchto hodnot je patrné, že v dalších dnech po sonifikaci dochází nejprve k poklesu dob života a následně dojde k relativnímu ustálení trendu. Jelikož po smíchání značených a neznačených vezikul došlo podle předpokladu teorie homo-fret ke zvýšení doby života vzorku, což i v tomto případě bylo potvrzeno, pokles doby života v delším časovém úseku od smíchání je pravděpodobně způsoben projevy nestability v systému, kdy muselo dojít například k vypuzení části molekul fluoresceinu z vezikulárních struktur a k jejich shlukování (nebyl však pozorován vznik žádné sraženiny), kdy po excitaci vzorku mezi těmito molekulami docházelo ve větší míře k přenosu energie. Grafická závislost průměrné doby života vzorku na čase od přídavku neznačených vezikul je uvedena na Obr. 34.

Tab. 49: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	1,674	2,316	3,471	3,344	3,113	3,042	0,843	0,671	0,521
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,621	3,326	3,952	3,764	3,686	3,735	3,623	3,727	3,703



Obr. 34: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % na čase od smíchání vezikul značených fluoresceinem s vezikulami neznačenými v různém vzájemném poměru

Dalším měřeným systémem je CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. %. Nejprve byla změřena vyhasínací křivka vezikul značených fluoresceinem a byly vyhodnoceny tři doby života, viz. Tab. 50. Dlouhá komponenta měla hodnotu 3,191 ns a příslušnou relativní amplitudu 59,66 ns, krátká komponenta měla hodnotu 1,348 ns a příslušnou relativní amplitudu 28,16 %, třetí zjištěná doba života příslušela rozptylu. Průměrná doba života činila 2,218 ns.

Tab. 50: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. %; použití přímého způsobu značení vezikul

	Fluorescien	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,348	28,16
	χ_R^2 = 1,180	3,191	59,66
		0,389	12,19
	τ_{avg} [ns]	1,410	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,218	

Po přidání roztoku neznačených vezikul v objemovém poměru 1:1 byly z vyhasínací křivky vyhodnoceny tři doby života. Delší komponenta měla hodnotu 3,453 ns a relativní amplitudu 54,22 %, kratší komponenta 1,543 ns a příslušnou relativní amplitudu 34,02 %. Průměrná doba života vzrostla na hodnotu 2,338 ns, je zde tedy patrné ovlivnění přenosu energie zapříčiněné fúzí neznačených a značených vezikul. Poté byla provedena sonifikace a měření bylo opakováno. Delší doba života měla nyní hodnotu 3,686 ns a relativní amplitudu 74,06 %, kratší doba života činila 1,765 ns s relativní amplitudu 19,77 %. Průměrná doba života činila 3,004 ns. Hodnoty pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 51.

Tab. 51: Hodnoty naměřených dob života a příslušných relativních amplitud vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značeného pomocí přímé solubilizace fluoresceinu, měření provedena po přidání neznačených vezikul a po následné sonifikaci

Fluorescein 10^{-4} M		Po přidání neznačených vezikul		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		1,543	34,02	1,765	19,77
		0,534	11,76	0,725	6,17
		3,453	54,22	3,686	74,06
	τ_{avg} [ns]	1,673		2,516	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	2,338		3,004	

Následně byl vzorek opět měřen v průběhu několika dnů. Vyhodnocené průměrné doby života pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 52. Nejprve je patrné, že po vzrůstu doby života způsobeném přidáním neznačených vezikul dochází v průběhu dalších dní k mírnému poklesu, který by mohl být způsoben vypuzením části molekul fluoresceinu z vezikul a jejich shluknutím, které by umožnilo účinnější přenos energie díky menší vzdálenosti mezi molekulami, avšak poté opět nastává mírný nárůst průměrné doby života pravděpodobně vlivem dalšího promíchávání a trend se dostane téměř na hodnotu doby života po počáteční sonifikaci.

Tab. 52: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	3,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
τ_{avg} [ns]	1,410	1,673	2,516	2,541	2,555	2,575	2,413	2,399	2,602	2,477	2,557
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	2,218	2,338	3,004	2,954	2,894	2,918	2,766	2,849	2,950	2,934	2,972

Další měřený vzorek obsahoval vezikuly značené fluoresceinem a vezikuly neznačené v objemovém poměru 1:4. Po přidání neznačených vezikul v tomto poměru byla pomocí vyhodnocení vyhasínací křivky získána průměrná doba života po zanedbání rozptylu 2,428 ns. Po následné sonifikaci byla zjištěna průměrná doba života 4,063 ns. Hodnoty ovlivněné rozptylem jsou pro tato měření 1,683 ns, respektive 3,609 ns. Opět tak došlo se zvětšujícím se poměrem neznačených vezikul ve vzorku k významnějšímu růstu průměrné doby života, který byl ještě umocněn sonifikací. Následně byly sledovány změny v průměrné době života vzorku v průběhu několika dní. Problémem však je, že pro některé měření byly pomocí proložení vyhasínací křivky exponenciální funkcí vyhodnoceny pouze dvě doby života. Pro tato měření nebyla vyhodnocena velmi krátká doba života patřící rozptylu, avšak zbylé dvě doby života a průměrná doba života se poměrně značně lišily od hodnot jiných měření, kdy byly díky proložení exponenciální funkcí získány tři doby života. Proto nebylo možné dát spolu tyto výsledky do jedné závislosti a bylo

rozhodnuto, že pro měření, kdy byly vyhodnoceny 3 doby života, nebude průměrná doba života přepočítávána tak, aby došlo k zanedbání rozptylu. Výsledná závislost je v tomto případě pouze orientační a může být do určité míry ovlivněna právě rozptylem. Hodnoty průměrné doby života jsou uvedeny v Tab. 53. Lze si všimnout, že v průběhu sledované doby se střídají poklesy průměrná doby života s opětovným růstem. Jelikož jsou však některé hodnoty zatíženy chybou způsobenou rozptylem, je složité z těchto výsledků vyvodit jiný závěr, než že nebylo zjištěno, že by docházelo k výraznému snižování nebo zvyšování doby života v průběhu sledovaného období a trend se v průměru drží s určitými výchylkami přibližně stejných hodnot.

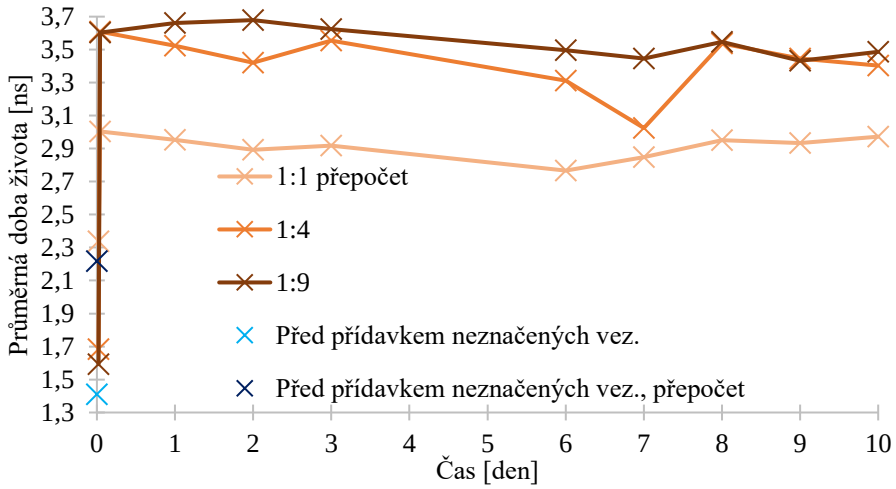
Tab. 53: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	3,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
τ_{avg} [ns]	1,410	1,683	3,609	3,523	3,421	3,554	3,312	3,025	3,537	3,446	3,404

Následovalo měření vzorku obsahujícího poměr značených a neznačených vezikul 1:9. Po přidání neznačených vezikul v tomto poměru došlo k nepatrnému prodloužení průměrné doby života po zanedbání rozptylu na 2,259 ns. Po následné sonifikaci byl tento nárust mnohem výraznější, jelikož hodnota poté činila 3,975 ns. Hodnoty ovlivněné rozptylem jsou v tomto případě 1,593 ns a 3,604 ns. Opakuje se zde tedy situace jako v předchozím případě, že sonifikací je dále podpořena fúze vezikul a díky většímu rozředění molekul fluoresceinu dochází k omezení rezonančního přenosu energie. Pro sledování změn v delším časovém úseku stejně jako u poměru 1:4 dochází k tomu, že pro některá měření jsou vyhodnoceny pouze dvě doby života. Rovněž tedy bylo postupováno stejně jako v předchozím případě tak, že pro měření s vyhodnocenými třemi dobami života nebyl jejich průměr přepočítáván. Hodnoty této závislosti jsou uvedeny v Tab. 54. Z hodnot je patrné, že v prvních dnech dochází k mírnému prodloužení průměrné doby života, pravděpodobně z důvodu dalšího promíchávání značených a neznačených vezikul, avšak poté naopak dochází k mírnému poklesu. Tento pokles může být zapříčiněn projevy nestability v systému, kdy může například vlivem tvorby oblastí bohatých na cholesterol docházet k částečnému vytlačování molekul fluoresceinu z vezikulárních struktur. Je však třeba brát na zřetel, že některé hodnoty jsou částečně zatíženy chybou, která by však neměla znamenat výrazné ovlivnění celkového trendu. Graf závislosti průměrné doby života na čase od přidání neznačených vezikul je pro všechny poměry značených a neznačených vezikul uveden na Obr. 35.

Tab. 54: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	3,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00
τ_{avg} [ns]	1,410	1,593	3,604	3,662	3,679	3,625	3,497	3,446	3,547	3,432	3,486



Obr. 35: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % na čase od smíchání vezikul značených fluoresceinem s vezikulami neznačenými v různém vzájemném poměru

Následovalo měření vzorků obsahujících systém CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. %. Pro vyhasínací křivku fluoresceinu z prostředí vezikul o tomto složení byly vyhodnoceny tři doby života, viz. Tab. 55. Dlouhá komponenta s hodnotou 3,714 ns a relativní amplitudou 79,83 %, kratší komponenta s dobou života 1,270 ns a relativní amplitudou 14,87 % a doba života náležící rozptylu. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činí 3,091 ns.

Tab. 55: Hodnoty dob života a příslušných relativních amplitud pro fluorescein o koncentraci 10^{-4} M z prostředí kataniontových vezikul o obsahu cholesterolu 53 mol. %; použití přímého způsobu značení vezikul

	Fluorescien	τ [ns]	B [%]
3 doby života		1,270	14,87
	χ_R^2 = 1,450	3,714	79,83
		0,441	5,30
	τ_{avg} [ns]	2,345	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,091	

Po přidání neznačených vezikul v poměru ke značeným 1:1 došlo ke vzrůstu doby života delší komponenty i její příslušné relativní amplitudy, hodnoty pro toto měření byly 3,920 ns s 86,47 %. Kratší komponenta měla hodnotu 1,795 ns a relativní amplitudu 9,46 %. Průměrná doba života vzorku po vzrostla na 3,510 ns. Po provedení sonifikace došlo již pouze k nepatrnému nárůstu hodnot. Doba života delší komponenty činila 3,954 ns a její relativní amplituda 87,54 %. Kratší doba života měla hodnotu 1,849 ns a relativní amplitudu 9,23 %. Průměrná doba života vzrostla nepatrně na 3,567 ns. Hodnoty pro obě tato měření jsou uvedeny v Tab. 56. Pomocí těchto měření bylo prokázáno, že dochází k fúzi neznačených vezikul s vezikulami značenými fluoresceinem. Provedení sonifikace v tomto případě další fúzi podporuje pouze velmi nepatrně, což je dáno pravděpodobně relativně vysokou stabilitou vezikul o tomto složení.

Tab. 56: Hodnoty naměřených dob života a příslušných relativních amplitud vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značeného pomocí přímé solubilizace fluoresceinu, měření provedena po přidání neznačených vezikul a po následné sonifikaci

Fluorescein 10^{-4} M		Po přidání neznačených vezikul		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		1,795	9,46	1,849	9,23
		3,920	86,47	3,954	87,54
		0,579	4,07	0,519	3,23
	τ_{avg} [ns]	2,911		2,999	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,510		3,567	

Z výsledků měření vzorku v delším časovém období několika následujících dní je patrné, že dochází k poměrně výrazným fluktuacím ve vzorku, hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 57. Tyto fluktuace odporují teorii procesu homo-fret, kdy v případě, že v systému není žádné další zhášeč, tak by v případě fúze značených a neznačených vezikul (která byla prokázána počátečním vzrůstem doby života), mělo docházet vlivem zvětšování vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu pouze k růstu doby života. Další možností je, že by došlo k vytvoření určité rovnováhy k systému, kdy by již k fúzi ve větší míře nedocházelo, což by se však projevilo přibližně konstantní hodnotou doby života po celé sledované období. Zjištěné fluktuace a snižování doby života tedy musí být způsobeno projevy určité nestability vezikul, kdy jak již bylo zmíněno, teoreticky by mohlo docházet k vytváření oblastí bohatých na cholesterol nebo k vytváření vícefázových oblastí ve struktuře vezikulárních dvojvrstev, což by mohlo způsobit vytěsnění molekul fluoresceinu z vezikul a vzájemné přiblížení části těchto molekul, mezi kterými by mohlo docházet k účinnějšímu přenosu energie a docházelo by k poklesu doby života.

Tab. 57: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	2,345	2,911	2,999	2,835	3,036	3,063	2,990	2,144	2,278
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,091	3,510	3,567	3,423	3,502	3,555	3,548	3,456	3,507

Obdobná situace nastává i pro vzorek s poměrem vezikul značených a neznačených 1:4. Po přidání neznačených vezikul vzroste průměrná doba života na 3,841 ns. Po sonifikaci došlo k mírnému nárůstu na 3,891 ns. Opět se prokázalo, že v případě systému CTA-DS s obsahem cholesterolu 53 mol. % nemá sonifikace na podpoření fúze takový vliv, jako tomu bylo u systémů s nižším obsahem cholesterolu. V průběhu dalších dnů docházelo ke značným fluktuacím v hodnotách naměřené průměrné doby života vzorku, celkově je trend spíše sestupný. Hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedena v Tab. 58.

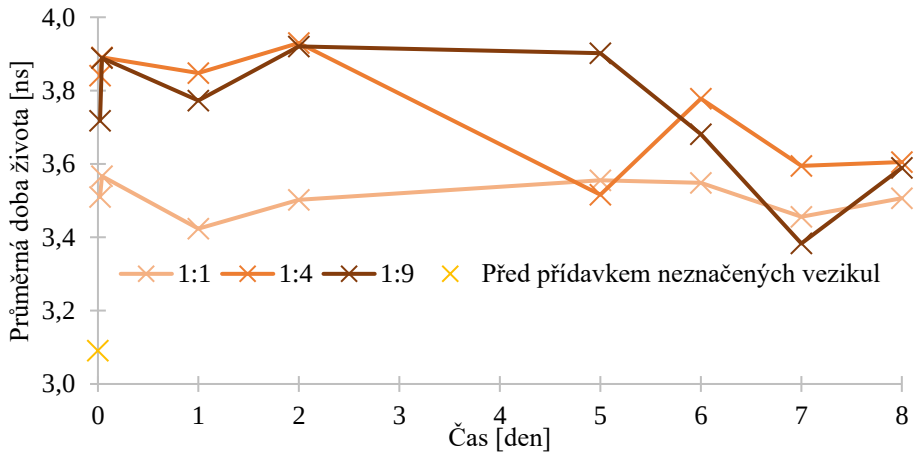
Tab. 58: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	2,345	3,176	3,394	3,456	3,468	3,516	3,256	2,064	2,276
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,091	3,841	3,891	3,848	3,930	3,516	3,778	3,595	3,605

V posledním měřeném vzorku činil poměr značených a neznačených vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % 1:9. Po přidání tohoto množství neznačených vezikul dojde k růstu průměrné doby života na 3,718 ns. Po následné sonifikaci došlo k dalšímu růstu na 3,889 ns. Prodloužení průměrné doby života po sonifikace je již znatelnější, avšak je nutné přihlédnout k velkému obsahu neznačených vezikul a v porovnání se vzorky s menším obsahem cholesterolu zde dochází k menšímu nárůstu. Z výsledků měření v průběhů dalších dnů je patrné, že opět dochází k fluktuacím v hodnotách a v průběhu sledovaného období dochází ke snížení měřené průměrné doby života. Průměrné doby života z těchto měření jsou uvedeny v Tab. 59. Grafická závislost průměrné doby života vzorku na čase od přídavku neznačených vezikul je uvedena na Obr. 36.

Tab. 59: Hodnoty průměrné doby života pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značený fluoresceinem po přidání neznačených vezikul v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření před přídavkem, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	2,345	2,345	2,909	2,579	3,353	3,323	1,134	0,593	0,809
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	3,091	3,718	3,889	3,773	3,920	3,902	3,681	3,383	3,590



Obr. 36: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % na čase od smíchání vezikul značených fluoresceinem s vezikulami neznačenými v různém vzájemném poměru

Ze všech provedených měření, kdy byly vezikuly o různém obsahu cholesterolu značeny fluoresceinem, bylo zjištěno několik důležitých faktů. Pravděpodobně nejdůležitějším poznatkem, který ovlivnil všechna další měření je, že použitý amfifilní fluorescein má schopnost tzv. homo-fret, tedy Försterova rezonančního přenosu energie mezi jedním typem molekul. Z toho důvodu nebyl do systému přidáván žádný akceptor, ale fúze vezikul byla sledována pomocí homo-fret fluoresceinu, kdy přidání neznačených vezikul k vezikulám značeným způsobí v případě fúze zvětšení vzdálenosti mezi molekulami fluoresceinu, díky čemuž dojde k poklesu přenosu energie a k zvýšení měřených dob života. Následně bylo provedeno sledování fúze vezikul pomocí FRET u systémů s různým obsahem cholesterolu. Využity byly dva způsoby značení vezikul, kdy v prvním způsobu dochází ke značení již kompletně připravených vezikul a při druhém způsobu dojde k přidání sondy již při přípravě vezikul před jejich rehydratací a dispergací. Bylo možné detekovat fúzi vezikul u systémů značených oběma způsoby. Nicméně pro první způsob, kdy byly značeny již připravené vezikuly, bylo zjištěno, že v delším časovém období dochází ke změnám v měřených dobách života, které neodpovídají teoretickým předpokladům homo-fret, proto není vhodné u vezikul značených tímto způsobem sledovat fúzi v delším časovém horizontu. Možné vysvětlení těchto výsledků bylo nastíněno. Rovněž u tohoto způsobu značení vezikul docházelo s postupujícím časem ke vzniku sraženin, což by mohlo být způsobeno elektrostatickým stíněním kladného náboje vezikul záporně nabitým fluoresceinem, čemuž by napovídalo i provedené měření zeta potenciálu.

Vhodnější se tedy zdá použití druhého způsobu značení, kdy je sonda přidávána již v průběhu přípravy vezikul. Pro všechny systémy bylo potvrzeno, že je tímto způsobem možné detekovat fúzi vezikul. Kromě CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % bylo pro všechny měřené systémy zjištěno, že v delším časovém horizontu i přes určité fluktuace nedochází k výrazným poklesům dob života, proto by tímto způsobem mohlo být možné sledovat fúzi vezikul i po delší dobu. Rovněž nebyl pozorován vznik sraženin.

5.3.4 Použití perylenu jako donoru pro přenos energie v kataniontových vezikulách

Poslední z fluorescenčních sond, které byly pro tuto práci zvoleny jako donory pro sledování fúze kataniontových vezikulárních systémů, je perylen. Jedná se o polycyklický aromatický uhlovodík, který je schopný zabudovat se do nepolárních částí membránových systémů. Excitační maximum perylenu se nachází přibližně při 440 nm, nicméně vzhledem k omezenému počtu diod sloužících jako zdroj excitačního záření byla pro TCSPC měření použita excitační dioda o vlnové délce 389 nm. Emisní maximum se nachází přibližně při 450 nm. Pomocí steady-state měření byl jako vhodný akceptor zvolen fluorescein. Vzhledem k výsledkům a pozorováním z měření vezikul značených fluoresceinem, kdy byla u vezikul značených až po kompletní přípravě zjištěna v delším časovém období fluktuace dob života a tvorba sraženin, byla pro donor-akceptorní pár perylen-fluorescein zvolena druhá metoda značení, kdy fluorescenční sonda je přidána k vezikulárním systémům již v průběhu přípravy před rehydratací a dispergací.

Nejprve byly měřeny vezikulární systémy založené na kladně nabitých vezikulách CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. %. Pro tento vzorek byla proměřena vyhasínací křivka a byly získány dvě doby života. Doba života 7,409 ns s relativní amplitudou 94,03 % patřící molekulám perylenu a doba života 0,051 ns s relativní amplitudou 5,97 %, která je způsobená rozptylem. Následně byly k vezikulám značeným perylenem přidány vezikuly značené fluoresceinem v objemovém poměru 1:1. Poté byla opět proměřena vyhasínací křivka perylenu, z které byly vyhodnoceny tři doby života Nejvíce zastoupenou byla doba života 0,02 ns s příslušnou relativní amplitudou 75,23 %, která je zapříčiněna rozptylem světla na částicích. Následuje delší

komponenta s dobou života 6,004 ns a relativní amplitudou 15,14 %, která náleží molekulám perylenu nezhášeným rezonančním přenosem energie. Třetí vyhodnocená doba života má hodnotu 1,884 ns a relativní amplitudu 9,62 %, tato doba života patří zhášeným molekulám perylenu. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činí 3,246 ns. Zjištěné výsledky indikují, že dochází k fúzi vezikul, jelikož byl zjištěn probíhající rezonanční přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem. Vzorek byl následně sonifikován po dobu 30 minut při zvýšené teplotě 40 °C a opět byla proměřena vyhasínací křivka perylenu a byly vyhodnoceny tři doby života. Kromě poklesu zastoupení rozptylu si lze všimnout, že došlo k dalšímu snížení doby života nezhášeného perylenu na 5,266 ns a průměrná doba života po zanedbání rozptylu klesla na 2,594 ns, sonifikací tedy byla dále podpořena fúze vezikul. Z hodnoty doby života perylenu za nepřítomnosti akceptoru (rozptyl byl zanedbán) a z průměrné hodnoty doby života vzorků obsahujících akceptor fluorescein byly vypočítány hodnoty účinnosti přenosu energie. Pro první měření po přídavku vezikul značených fluoresceinem byla účinnost FRET vypočítána na 56,19 %, pro druhé měření po sonifikaci vzorku na 64,98 %. Hodnoty pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 60.

Tab. 60: Vyhodnocené doby života pro vyhasínací křivku perylenu z prostředí vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % po přidání vezikul značených fluoresceinem v poměru 1:1 a po následné sonifikaci

Perylen + Fluorescein		Po přidání vezikul s fluoresceinem		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		1,884	9,62	1,710	38,61
		6,004	15,14	0,127	22,04
		0,020	75,23	5,266	39,36
	τ_{avg} [ns]	0,027		0,492	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	3,246		2,594	
	E [%]	56,18		64,98	

I u vzorků s perylenem jako donorem byly sledovány změny v naměřených dobách života po dobu několika dní. Hodnoty měření průměrných dob života a vypočítané účinnosti přenosu energie pro vzorek s poměrem vezikul značených perylenem a fluoresceinem 1:1 jsou uvedeny v Tab. 61. Bylo zjištěno, že po počátečním poklesu doby života způsobeném fúzi vezikul a průběhem rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem, dochází následně s výkyvy k nárůstu doby života a současnému poklesu účinnosti přenosu energie. Nastává zde podobná situace jako u některých měření, kdy byl ke sledování fúze používán homo-fret fluoresceinu. Dle teoretického předpokladu by totiž v tomto případě s postupem času mělo dojít k ustálení doby života, pokud by došlo k vytvoření určité rovnováhy k systému, kdy by ve větší míře nedocházelo k další fúzi vezikul, nebo by vlivem další fúze a promíchávání měla doba života klesat, jelikož by docházelo k tvorbě více donor-akceptorních párů ve vhodné vzdálenosti, ve které by docházelo k rezonančnímu přenosu energie a účinnost přenosu by se měla s časem zvyšovat. Získané výsledky však indikují, že by ve vzorku docházelo k zániku těchto párů anebo by se prodlužovala jejich vzájemná vzdálenost, což však není s ohledem na to, že probíhající fúze byla prokázána, pravděpodobné. Stejně jako v případě homo-fret lze tedy tyto výsledky přisuzovat projevům určité nestability v měřeném systému, kdy hypoteticky může docházet

k tvorbě oblastí bohatých na cholesterol a může docházet k vypuzení molekul fluoresceinu z vezikulárních struktur. Určitý vliv na výsledky rovněž může mít rozptyl světla, který se vyhodnocených výsledcích projevoval ve velké míře, jelikož excitace perylenu použitou 389 nm diodou je málo účinná.

Tab. 61: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,409	0,027	0,492	0,179	1,095	1,316	0,418	0,738	1,046
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	3,246	2,594	2,131	3,060	3,423	2,785	2,808	2,997
E [%]	-	56,187	64,982	71,242	58,697	53,798	62,416	62,104	59,547

Obdobná situace nastává i pro vzorek, který obsahoval vezikuly značené perylenem a vezikuly značené fluoresceinem v poměru 1:4. Průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie jsou uvedeny v Tab. 62. V tabulce není uvedena hodnota doby života a účinnosti ihned po smíchání, jelikož naměřený výsledek poskytoval nepřesné hodnoty. Opět nejprve došlo vlivem fúze vezikul a následného přenosu energie k poklesu doby života, který však následně s určitými výkyvy vystřídal postupný nárůst a tím pádem s postupem času došlo k poklesu účinnosti přenosu energie.

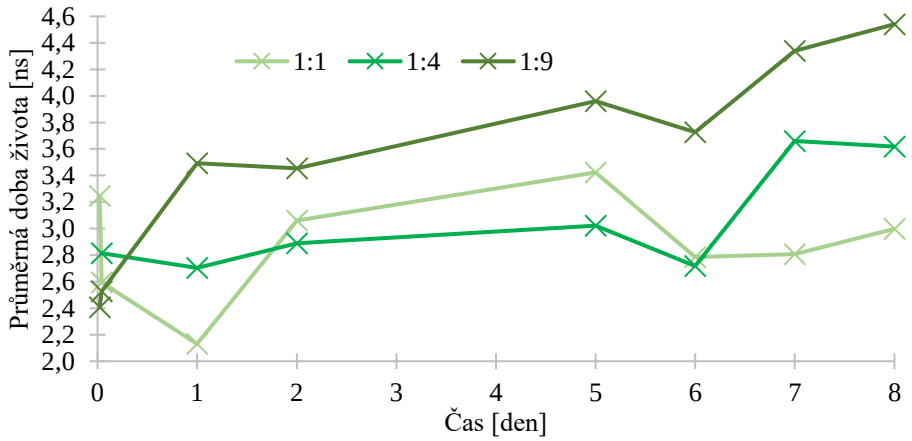
Tab. 62: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru a hodnota 0,04 po sonifikaci vzorku (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,409	0,564	0,109	0,203	0,311	0,313	0,189	0,244
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	2,814	2,703	2,890	3,021	2,717	3,660	3,617
E [%]	-	62,021	63,513	60,988	59,225	63,327	50,598	51,175

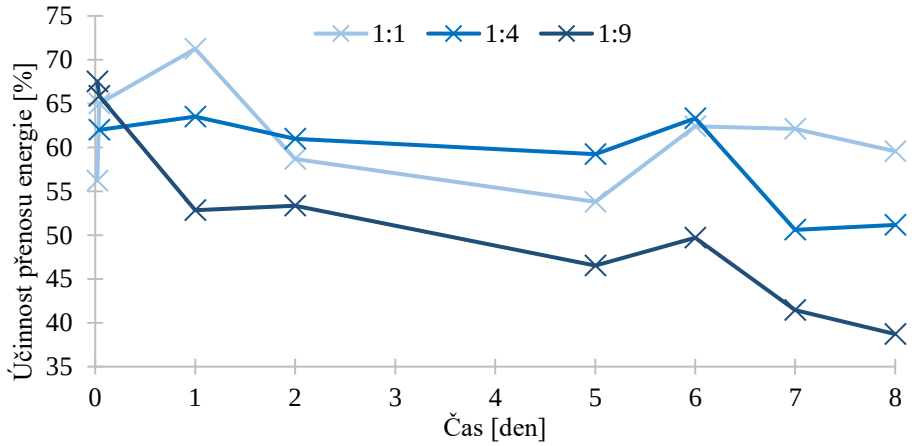
Stejně tomu bylo i v případě poměru vezikul značených perylenem a vezikul značených pomocí fluoresceinu 1:9. Výsledky pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 63. V tomto případě opět došlo po přidání vezikul značených fluoresceinem k poklesu doby života z důvodu fúze a průběhu přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem, nicméně poté docházelo k velkému nárůstu doby života a s tím spojeným poklesem účinnosti FRET. Toto chování je pravděpodobně způsobeno již dříve nastíněnou nestabilitou v systému. Závislost průměrné doby života perylenu na čase od přídavku vezikul značených akceptorem pro všechny měřené poměry je zobrazena na Obr. 37. Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem do systému pro všechny měřené vzájemné poměry je zobrazena na Obr. 38.

Tab. 63: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,002	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,409	0,044	0,116	0,123	0,177	0,500	0,266	0,262	0,358
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	2,407	2,527	3,494	3,455	3,961	3,726	4,339	4,541
E [%]	-	67,510	65,888	52,844	53,369	46,539	49,703	41,434	38,714



Obr. 37: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % značeného perylenem na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem pro všechny měřené vzájemné poměry



Obr. 38: Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem ve vzorku CTA-DS o obsahu 23 mol. % cholesterolu na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem do systému

Následně byly měřeny vzorky založené na CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. %. Pro vyhasínací křivku perylenu zde byly vyhodnoceny dvě doby života. Doba života s hodnotou 7,612 ns a relativní amplitudou 97,71 % patřící perylenu a doba života 0,237 ns s relativní amplitudou 2,29 %, která přísluší rozptylu. Poté byly přidány vezikuly značené fluoresceinem

v poměru k vezikulám značeným perylenem 1:1. Z vyhasínací křivky nyní byly vyhodnoceny tři doby života. Nejvíc zastoupená byla doba života s hodnotou 6,578 ns a relativní amplitudou 48,43 %. Kratší doba života měla hodnotu 2,102 ns a relativní amplitudu 20,86 ns, poslední doba života náležela rozptylu. Průměrná doba života činila 4,009 ns. Z těchto hodnot vyplývá, že došlo k fúzi vezikul, díky čemuž se perylen a fluorescein dostali do vzdálenosti, na které mezi nimi může probíhat přenos energie. Ten následně způsobil pokles doby života perylenu a přítomnost kratší komponenty, která patří zhášené populaci perylenu. Účinnost přenosu energie byla vypočítána na 47,34 %. Po sonifikaci došlo díky dalšímu promíchání a fúzi vezikul k dalšímu poklesu. Průměrná doba života zde činila 3,232 ns a účinnost přenosu energie byla vypočítána na 57,54 %. Hodnoty pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 64.

Tab. 64: Vyhodnocené doby života pro vyhasínací křivku perylenu z prostředí vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % po přidání vezikul značených fluoresceinem v poměru 1:1 a po následné sonifikaci

Perylen + Fluorescein		Po přidání vezikul s fluoresceinem		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		2,102	20,86	1,930	33,44
		6,578	48,43	0,117	15,96
		0,034	30,71	5,831	50,6
	τ_{avg} [ns]	0,107		0,617	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,009		3,232	
	E [%]	47,34		57,54	

Následně probíhalo měření vzorku v průběhu několika dní. Hodnoty průměrných dob života a vypočítané účinnosti přenosu energie jsou uvedeny v Tab. 65. Zde se opakuje podobná situace jako u vezikul s obsahem cholesterolu 23 mol. %. Po přidání vezikul značených fluoresceinem dochází k poklesu průměrné doby života v důsledku fúze vezikul a následnému přenosu energie mezi donor-akceptorními páry. V prvních dvou dnech dochází k dalšímu poklesu, což značí další promíchávání a tvorbu většího množství donor-akceptorních párů, nicméně poté dojde k otočení trendu a k prodloužení průměrné doby života. Opět se nabízí již dříve nastíněná teorie částečné nestability systému a vypuzení fluoresceinu z vezikul nebo jeho lokální zakoncentrování, což by snížilo počet donor-akceptorních párů.

Tab. 65: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,002	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,612	0,107	0,617	0,173	0,194	0,702	1,261	0,888	0,047
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	4,009	3,232	2,852	2,535	2,934	3,302	3,259	3,408
E [%]	-	47,339	57,545	62,528	66,696	61,455	56,615	57,19	55,233

Pro poměr vezikul značených perylenem a vezikul značených fluoresceinem 1:4 nastává téměř identická situace. Nejprve dochází ke snižování průměrné doby života a s tím spojeným nárůstem účinnosti přenosu energie, nicméně po druhém dnu měření opět došlo k postupnému zvyšování doby života. Naměřené hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie pro jednotlivé měření jsou uvedeny v Tab. 66.

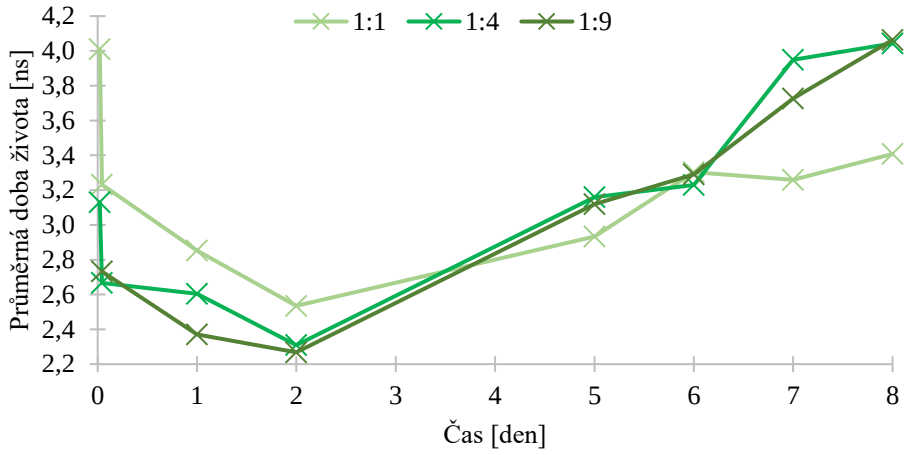
Tab. 66: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,002	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,612	0,043	0,148	0,196	0,085	0,262	0,272	0,355	0,251
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	3,130	2,667	2,605	2,309	3,159	3,229	3,950	4,043
E [%]	-	58,884	64,969	65,784	69,662	58,499	57,575	48,113	46,889

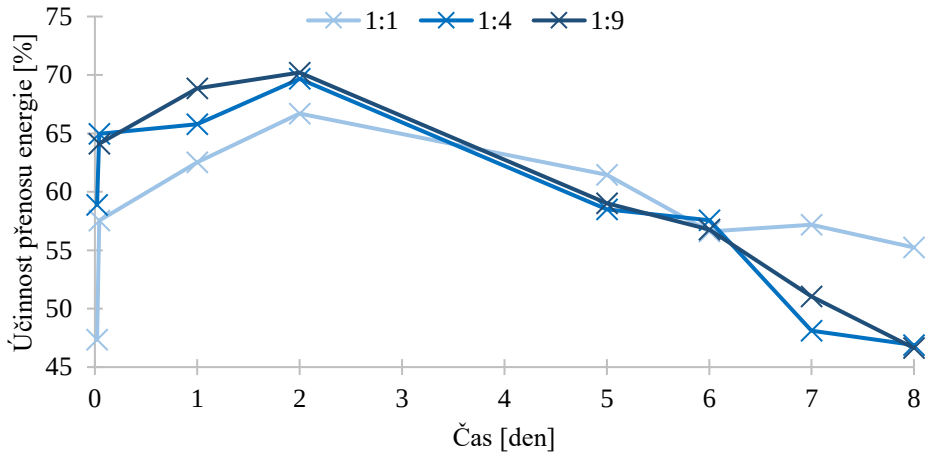
Stejný trend nastal i pro vzorek, ve kterém byl poměr vezikul značených perylenem a fluoresceinem 1:9. Dochází zde k poklesu doby života vlivem rezonančního přenosu energie umožněného fúzí vezikul, avšak po druhém dnu měření dojde k výraznému opětovnému nárůstu. Hodnoty průměrných dob života těchto měření a vypočítané účinnosti přenosu energie jsou uvedeny v Tab. 67. Grafická závislost průměrné doby života (po zanedbání rozptylu) na čase od smíchání vezikul značených perylenem s vezikulami značenými fluoresceinem je pro všechny měřené vzájemné poměry zobrazena na Obr. 39. Závislost účinnosti přenosu energie na čase od smíchání vezikul je zobrazena na Obr. 40.

Tab. 67: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	7,612	0,078	0,079	0,099	0,095	0,180	0,194	0,136
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	2,732	2,371	2,268	3,120	3,290	3,726	4,063
E [%]	-	64,108	68,847	70,204	59,010	56,778	51,049	46,624



Obr. 39: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 33 mol. % značeného perylenem na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem pro všechny měřené vzájemné poměry



Obr. 40: Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem ve vzorku CTA-DS o obsahu 33 mol. % cholesterolu na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem do systému

Dále byl měřen systém CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. %. Z vyhasínací křivky perylenu z tohoto prostředí byly vyhodnoceny dvě doby života. Doba života 8,132 ns s relativní amplitudou 96,37 % patřící molekulám perylenu a doba života 0,932 ns způsobená rozptylem světla. Poté byly do vzorku přidány vezikuly značené fluoresceinem v objemovém poměru 1:1. Z vyhasínací křivky perylenu po přídavku akceptoru byly vyhodnoceny tři doby života. Doba života s hodnotou 7,257 ns a relativní amplitudou 58,39 ns patřící nezhášeným molekulám perylenu, doba života 2,047 ns s relativní amplitudou 20,44 % patřící zhášeným molekulám perylenu a doba života 0,057 ns způsobená rozptylem. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činí 4,372 ns. Tímto poklesem doby života je i u tohoto systému prokázána fúze vezikul. Po sonifikaci byl pozorován další pokles hodnot. Delší komponenta zde měla hodnotu 6,524 ns a relativní amplitudu 48,90 % a kratší komponenta 1,920 ns a relativní amplitudu 33,19 %. Průměrná doba života činila 3,313 ns. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v Tab. 68.

Tab. 68: Vyhodnocené doby života pro vyhasínací křivku perylenu z prostředí vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % po přidání vezikul značených fluoresceinem v poměru 1:1 a po následné sonifikaci

Perylen + Fluorescein		Po přidání vezikul s fluoresceinem		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		2,047	20,44	1,920	33,19
		7,257	58,39	0,167	17,91
		0,057	21,17	6,524	48,90
	τ_{avg} [ns]	0,255		0,758	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	4,372		3,313	
	E [%]	46,233		59,263	

Na rozdíl od měřených vezikul se obsahem cholesterolu 23 a 33 mol. % v tomto případě docházelo s přibývajícím časem od smíchání k postupnému snižování měřených průměrných dob života (kromě měření 8. den). Tento sestupný trend odpovídá předpokladu, že pokud v systému bude s přibývajícím časem stále docházet k fúzi vezikul a jejich vzájemnému promíchávání, bude díky tomu docházet k tvorbě dalších donor-akceptorních párů a bude docházet ke zvyšování účinnosti přenosu energie až do doby, dokud v systému nenastane rovnováha. Naměřené hodnoty dob života a vypočítané účinnosti přenosu energie jsou uvedeny v Tab. 69.

Tab. 69: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,132	0,255	0,758	0,270	0,364	0,277	0,389	0,387	0,473
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	4,372	3,313	2,656	2,504	2,427	2,375	2,372	2,466
E [%]	-	46,233	59,263	67,337	69,213	70,160	70,791	70,835	69,679

V následujícím vzorku činil poměr vezikul značených perylenem a vezikul značených fluoresceinem 1:4. Po smíchání vezikul došlo k ještě výraznějšímu snížení dob života než v předchozím případě, delší komponenta měla hodnotu 6,546 ns a relativní amplitudu 26,74 % a kratší komponenta 1,456 ns a relativní amplitudu 20,28 %. Průměrná doba života činila 2,609 ns. Po provedení sonifikace došlo k dalšímu poklesu, delší komponenta nyní činila 4,832 ns s relativní amplitudou 24,57 % a kratší komponenta 1,324 ns s relativní amplitudou 34,47 %. Průměrná doba života po sonifikaci měla hodnotu 1,897 ns. S větším množstvím vezikul značených fluoresceinem je tedy spojen častější vznik donor-akceptorních párů po fúzi s vezikulami značenými perylenem a dochází k výraznějšímu poklesu měřené doby života. V průběhu dalších dní, kdy byla sledována průměrná doba života vzorku, docházelo obdobně jako u poměru 1:1 k jejímu postupnému snižování, což značí, že v měřeném období stále docházelo k fúzi vezikul a jejich promíchávání a tím pádem docházelo ke zvýšení účinnosti přenosu energie.

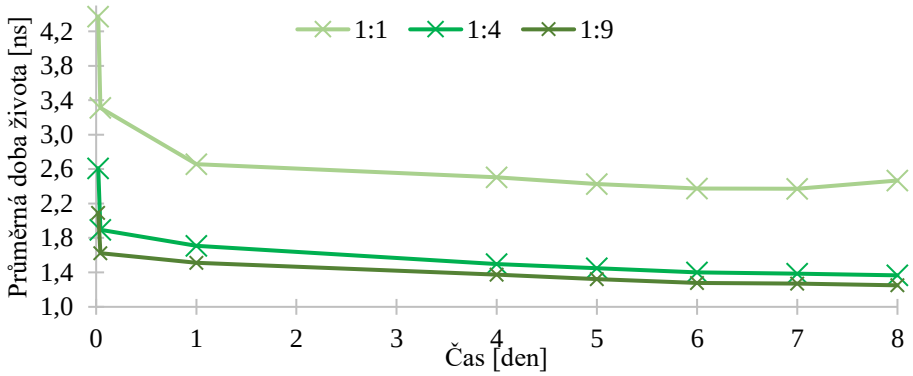
Tab. 70: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,132	0,103	0,199	0,169	0,113	0,081	0,116	0,789	0,073
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	2,609	1,897	1,707	1,496	1,447	1,400	1,384	1,366
E [%]	-	67,912	76,678	79,003	81,601	82,203	82,782	82,977	83,205

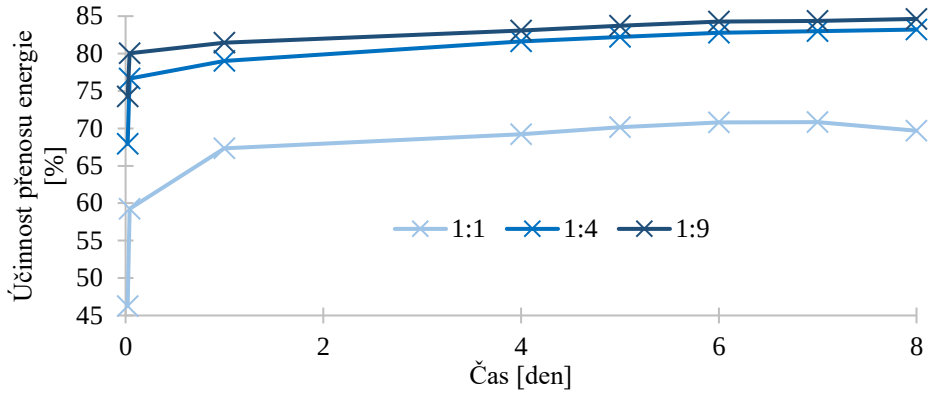
Obdobné výsledky byly získány i pro poměr vezikul značených perylenem a fluorescein 1:9. Po smíchání byly z vyhasínací křivky vyhodnoceny tři doby života. Doba života 6,141 ns s relativní amplitudou 10,99 % a doba života 1,351 ns s relativní amplitudou 13,21 %, třetí doba života náležela rozptylu. Průměrná doba života činila 2,094 ns. Po sonifikaci došlo k poklesu měřených hodnot. Delší doba života nyní činila 4,347 ns s relativní amplitudou 15,21 % a kratší doba života 1,189 ns. Průměrná doba života po sonifikaci měla hodnotu 1,623 ns. V průběhu dalších dnů i pro tento vzorek docházelo ke snižování doby života a k nárůstu účinnosti přenosu energie, jelikož stejně jako u dvou předchozích vzorků docházelo k další fúzi vezikul. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 71. Závislosti průměrné doby života, respektive účinnosti přenosu energie na čase od smíchání vezikul jsou pro všechny poměry zobrazeny na Obr. 41 a Obr. 42.

Tab. 71: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru, hodnota 0,02 po smíchání (přibližně 30 minut) a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,02	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,132	0,059	0,101	0,063	0,067	0,045	0,068	0,075	0,088
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	2,094	1,623	1,510	1,375	1,322	1,278	1,272	1,250
E [%]	-	74,255	80,041	81,432	83,095	83,737	84,280	84,359	84,628



Obr. 41: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značeného perylenem na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem pro všechny měřené vzájemné poměry



Obr. 42: Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem ve vzorku CTA-DS o obsahu 43 mol. % cholesterolu na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem do systému

Posledním měřeným systémem byl systém CTA-DS s obsahem cholesterolu 53 mol. %. Z vyhasínací křivky perylenu z tohoto prostředí byly vyhodnoceny dvě doby života. Doba života s hodnotou 8,151 ns a relativní amplitudou 70,39 % patřící molekulám perylenu a doba života 0,016 ns způsobená rozptylem. Poté byly do vzorku přidány vezikuly značené fluoresceinem v ekvivalentním množství. Z následně změřené vyhasínací křivky perylenu byly vyhodnoceny pouze dvě doby života, konkrétně doba života 6,256 ns s relativní amplitudou 72,81 %, která náleží perylenu a doba života 0,305 ns s relativní amplitudou 27,19 %, která je zapříčiněna rozptylem. Nebyla tedy detekována kratší komponenta, která by patřila zhášeným molekulám perylenu, avšak byl detekován pokles dlouhé komponenty, který indikuje, že k fúzi a přenosu energie docházelo. Nicméně po sonifikaci již byly opět detekovány tři doby života. Konkrétně 6,920 ns s relativní amplitudou 53,16 % náležící nezhášenému perylenu, doba života 2,297 ns s relativní amplitudou 23,22 % patřící zhášené populaci molekul perylenu a doba života 0,052 ns s relativní amplitudou 23,62, která je způsobena rozptylem. Průměrná doba života činila 4,293 ns. Díky sonifikaci tedy došlo k podpoření fúze a účinnějšímu promíchávání vezikulárních dvojvrstev. Výsledky pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 72.

Tab. 72: Vyhodnocené doby života pro vyhasínací křivku perylenu z prostředí vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % po přidání vezikul značených fluoresceinem v poměru 1:1 a po následné sonifikaci

Perylen + Fluorescein		Po přidání vezikul s fluoresceinem		Po sonifikaci	
3 doby života		τ [ns]	B [%]	τ [ns]	B [%]
		0,305	27,19	2,297	23,22
		6,256	72,81	6,920	53,16
		-	-	0,052	23,62
	τ_{avg} [ns]	0,993		0,210	
	$\tau_{avg,přepočet}$ [ns]	-		4,293	
	E [%]	-		47,336	

Při sledování změn měřených hodnot v čase bylo zjištěno, že pro tento vzorek dochází nejprve dle předpokladu díky probíhající fúzi vezikul ke snižování průměrné doby života, a tedy ke zvyšování účinnosti přenosu energie, nicméně po pátém dnu měření naopak došlo k mírnému

nárůstu hodnot doby života. Hodnoty pro jednotlivá měření jsou uvedeny v Tab. 73. Opět lze spekulovat o příčině, kdy jako pravděpodobná možnost se jeví již několikrát zmiňovaná nestabilita systému, kdy může docházet k zakoncentrovávání nebo vypuzování molekul fluoresceinu z vezikul, díky čemuž dojde ke snížení počtu donor-akceptorních párů perylen-fluorescein.

Tab. 73: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:1 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,151	0,210	0,160	0,062	0,073	0,187	0,281	0,191
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	4,293	4,118	3,980	3,715	4,098	4,041	4,086
E [%]	-	47,336	49,482	51,167	54,423	49,730	50,426	49,873

Obdobná situace nastává pro poměr vezikul značených perylenem a vezikul značených fluoresceinem 1:4. Měření ihned po smíchání přineslo nepřesné výsledky, nicméně po sonifikaci byla z vyhasínací křivky vyhodnocena delší komponenta o hodnotě 6,389 ns s relativní amplitudou 33,18 % a kratší komponenta 2,088 ns s relativní amplitudou 19,84 %. Průměrná doba života vzorku po zanedbání rozptylu činila 3,608 ns. V měření po 1 dnu byl zaznamenán pokles v průměrné době života vzorku, avšak v dalších dnech již naopak docházelo k pozvolnému nárůstu dob života a ke snižování účinnosti přenosu energie, viz. Tab. 74.

Tab. 74: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:4 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

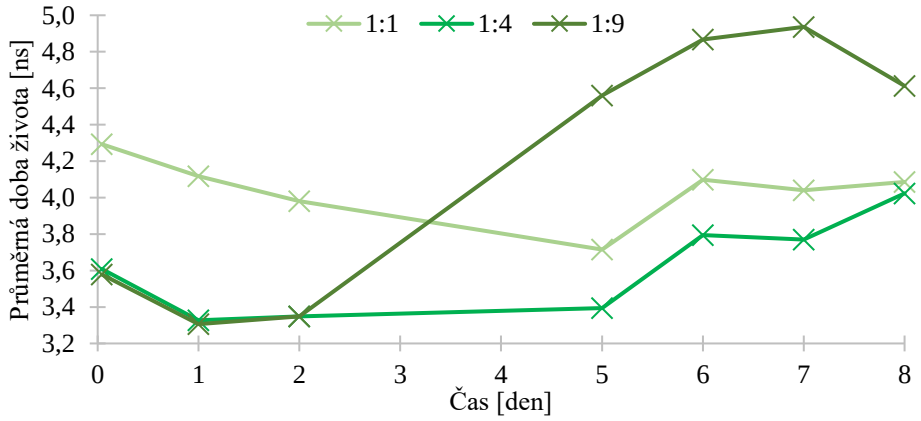
Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,151	0,076	0,104	0,061	0,061	0,003	0,129	0,078
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	3,608	3,327	3,348	3,394	3,794	3,769	4,023
E [%]	-	55,732	59,183	58,926	58,359	53,452	53,760	50,643

Podobné výsledky byly získány i pro vzorek obsahující vezikuly značené perylenem a vezikuly značené fluoresceinem v poměru 1:9. Měření ihned po vzájemném smíchání opět přineslo nepřesné výsledky. Po následné sonifikaci byly z vyhasínací křivky perylenu vyhodnoceny tři doby života. Doba života 6,346 ns s relativní amplitudou 24,00 %, doba života 2,006 ns s relativní amplitudou 13,36 % a poslední doba života 0,026 ns patřící rozptylu. Průměrná doba života po zanedbání rozptylu činila 3,578 ns. Porovnáme-li tento výsledek s předešlými měřeními, tak je patrné, že se zvyšujícím se množstvím vezikul značených akceptorem fluoresceinem dochází k většímu snížení průměrné doby života a účinnost přenosu je vyšší, jelikož je možná tvorba vyššího množství donor-akceptorních párů. V delším časovém horizontu nastává podobný trend, jako u předchozích měření. První den po smíchání je patrný

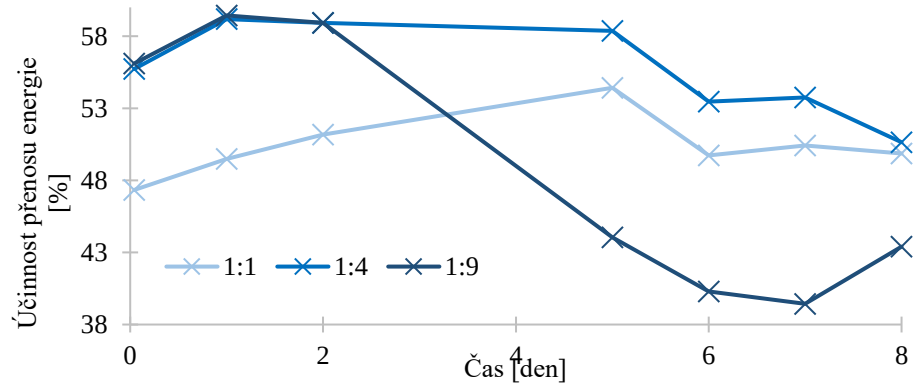
pokles průměrné doby života, nicméně poté dochází k jejímu postupnému výraznému zvyšování a až ke konci sledovaného období (po 8 dnech) dochází k opět k mírnému snížení. Hodnoty pro tato měření jsou uvedeny v Tab. 75. Grafická závislost průměrné doby života perylenu na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem pro všechny vzájemné poměry je zobrazena na Obr. 43. Závislost účinnosti přenosu energie na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem je pro všechny měřené vzájemné poměry zobrazena na Obr. 44.

Tab. 75: Hodnoty průměrné doby života a vypočítané účinnosti přenosu energie (E) pro vzorek CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % obsahující vezikuly značené perylenem a fluoresceinem v poměru 1:9 v čase od smíchání, hodnota 0 značí měření bez přítomnosti akceptoru a hodnota 0,04 měření po sonifikaci (přibližně 60 minut od smíchání)

Čas [den]	0,00	0,04	1,00	2,00	5,00	6,00	7,00	8,00
τ_{avg} [ns]	8,151	0,042	0,049	0,046	0,108	0,107	0,108	0,049
$\tau_{avg,\ přepočet}$ [ns]	-	3,578	3,306	3,348	4,560	4,867	4,936	4,613
E [%]	-	56,102	59,440	58,928	44,057	40,293	39,437	43,403

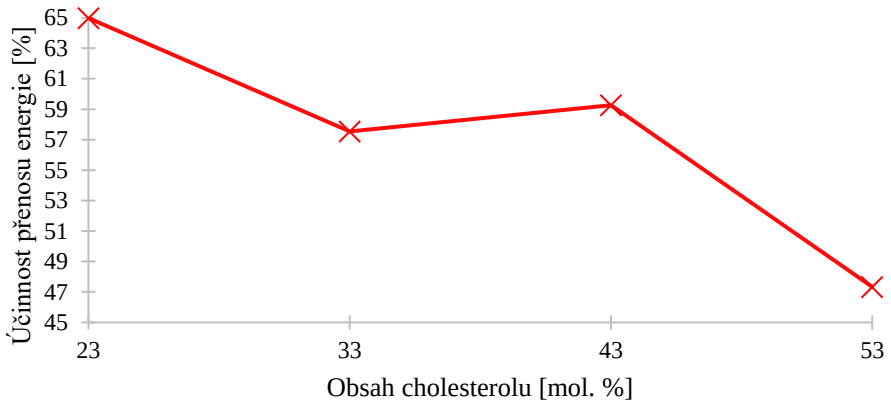


Obr. 43: Závislost průměrné doby života vzorku CTA-DS o obsahu cholesterolu 53 mol. % značeného perylenem na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem pro všechny měřené vzájemné poměry



Obr. 44: Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem ve vzorku CTA-DS o obsahu 53 mol. % cholesterolu na čase od přidání vezikul značených fluoresceinem do systému

Ze všech výsledků měření, kdy byl pro různé kataniontové systémy o různém obsahu cholesterolu použit perylen jako donor a fluorescein jako akceptor pro rezonanční přenos energie vyplývá, že při použití tohoto donor-akceptorního páru a zvoleného způsobu značení je možné pro všechny měřené systémy detekovat vzájemnou fúzi vezikul. Při všech měřeních totiž po smíchání vezikul značených perylenem s vezikulami značenými fluoresceinem došlo k poklesu měřené doby života perylenu, což značí, že došlo k fúzi vezikul a k jejich vzájemnému promíchání, které umožnilo vznik donor-akceptorního páru a následný rezonanční přenos energie mezi donorem a akceptorem. Nebyla však zjištěna souvislost mezi složením studovaného systému, tedy obsahem cholesterolu ve vezikulách, a účinností rezonančního přenosu energie. Nelze tak pomocí této metody určit, jakou stabilizační schopnost má obsah cholesterolu vzhledem k fúzi vezikul. Grafická závislost účinnosti přenosu energie na obsahu cholesterolu v systému je zobrazena na Obr. 45. Bylo však zjištěno, že pomocí této metody není vhodné sledovat fúzi studovaných kataniontových vezikulárních systémů, s výjimkou systému o obsahu 43 mol. % cholesterolu, v delším časovém období. Pro ostatní systémy totiž docházelo oproti teoretickým předpokladům založeným na teorii FRET k postupnému snižování účinnosti přenosu v čase od smíchání vezikul značených donorem a akceptorem.



Obr. 45: Závislost účinnosti rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem na obsahu cholesterolu ve studovaném kataniontovém vezikulárním systému

6 ZÁVĚR

Tato předložená diplomová práce se zabývá možností použití metod fluorescenční spektroskopie, konkrétně Försterova rezonačního přenosu energie (FRET), ve studiu fúze vezikulárních systémů založených na bázi kataniontových tenzidů s různým obsahem stabilizačního činidla cholesterolu. Použit byl kataniontový tenzid CTA-DS a byly připraveny systémy s obsahem cholesterolu 23, 33, 43 a 53 mol. %. Hlavním cílem bylo navrhnout vhodné postupy, techniky a materiály pro studium fúze kataniontových vezikul a následně otestovat jejich použitelnost pro studium připravených systémů s různým obsahem cholesterolu.

Na základě poznatků z literární rešerše byla pro sledování Försterova rezonančního přenosu energie zvolena časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, konkrétně metoda Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Dále bylo nutné zvolit vhodné fluorescenční sondy, které by splňovaly nutné teoretické požadavky pro FRET a mohly tvořit donor-akceptorní páry. Z dostupných sond byly vybrány perylen, 5-hexadecanoylaminofluorescein, Bodipy 493/503, DiO, DiI a Oktadecyl Rhodamin B Chlorid. Pomocí ustálené fluorescence byly proměřeny excitační a emisní spektra těchto vybraných fluoroforů z prostředí vezikulárních systémů a na základě teorie FRET, kdy musí být splněno pravidlo o překryvu emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru, byly pro následující měření zvoleny tyto donor-akceptorní páry: perylen-fluorescein, fluorescein-rhodamin, Bodipy-rhodamin, Bodipy-DiI a DiO-DiI.

Jako doplňující techniky byly použity metody měření dynamického rozptylu světla (DLS) a měření zeta potenciálu připravených kataniontových vezikul. Připravené kataniontové vezikuly o různém obsahu cholesterolu byly opakovaně měřeny v delším časovém období, aby byla zjištěna jejich dlouhodobá stabilita. Podle předpokladu bylo potvrzeno, že u vezikul s nižším obsahem cholesterolu, tedy 23 a 33 mol. % vlivem nestability docházelo k tvorbě silného zákalu a po 1, respektive 2 dnech již nebylo možné provádět další měření. Naopak u vezikul s obsahem cholesterolu 43 a 53 mol. % nedocházelo po celé sledované období k výraznějším výchylkám v průměrné velikosti částic měřené pomocí DLS a rovněž zeta potenciál se pohyboval po celou dobu ve stabilní oblasti.

Následně byla postupně provedena TCSPC měření připravených vezikulárních systémů založených na bázi CTA-DS s různým obsahem cholesterolu, značených pomocí vybraných fluoroforů. Nejprve bylo provedeno značení vezikul pomocí donoru DiO. Zde bylo zjištěno, že DiO pravděpodobně není schopno dostatečné solubilizace a začlenění do struktury vezikul, jelikož zjištěná intenzita emise byla velmi nízká a při vyhodnocování vyhasínacích křivek DiO ve výsledcích převažovaly velmi krátké doby života, které byly způsobeny rozptylem světla. Obdobné výsledky byly pozorovány pro všechny měřené vzorky s různým obsahem cholesterolu, solubilizaci nenapomohla ani delší doba třepání a sonifikace vzorku. Z toho důvodu lze považovat DiO za nevhodné pro zamýšlené použití.

Dalším testovaným fluoroforem s potenciálem sloužit jako donor pro rezonanční přenos energie byla sonda Bodipy 493/503. Zde bylo prokázáno, že pokud dojde ke smíchání vezikul značených pomocí donoru Bodipy s vezikulami značenými pomocí akceptoru rhodaminu, dojde následně k poklesu doby života Bodipy, což značí, že mezi vezikulami dochází k fúzi, díky čemuž se donor a akceptor dostanou vzájemně do vhodné vzdálenosti, mezi kterými může docházet k rezonančnímu přenosu energie. Nicméně při vyhodnocování vyhasínacích křivek Bodipy bylo zjištěno, že se ve výsledcích projevuje poměrně dlouhá doba života, často s délkou vyšší než 10 ns, která je pravděpodobně projevem tvorby excimerů Bodipy. Pro potvrzení této hypotézy byly proměřeny i vzorky s nižší koncentrací sondy, nicméně ve všech případech došlo k detekci

této dlouhé komponenty. Rovněž bylo proměřeno ustálené emisní spektrum sondy při různých koncentracích, ve kterém je patrná tvorba píku patřícího excimerům. Přestože tedy bylo prokázáno, že pomocí páru Bodipy-rhodamin je možné detekovat fúzi vezikul, vzhledem ke tvorbě excimerů, které ovlivňují měřené doby života, by nebylo možné rozlišit, do jaké míry jsou změny v dobách života zapříčiněny právě rezonačním přenosem energie. Z toho důvodu tedy není použití Bodipy jako donoru pro přenos energie v kataniontových systémech vhodné.

Následně byly provedeny měření vzorků, ve kterých byl jako donor pro rezonanční přenos energie použit 5-hexadecanoylaminofluorescein. Při vyhodnocování vyhasínacích křivek fluoresceinu z prostředí měřených kataniontových vezikul bylo zjištěno, že mezi vyhodnocenými dobami života jsou u všech vzorků přítomny dvě doby života v řádech nanosekund, delší s hodnotou obvykle 3,5 až 4 ns a kratší s dobou života obvykle 1,5 až 2 ns. Vzhledem k tomu, že součástí měřených vzorků nebyla žádná látka, u které by byla známá schopnost zhášet fluorescenci fluoresceinu, byla přítomnost těch dvou dob života přisouzena průběhu Försterova rezonančního přenosu energie mezi molekulami stejného druhu, tedy tzv. homo-fret. Z toho důvodu nebyl do systému přidáván akceptor, ale pro detekci fúze vezikul bylo použito přidání neznačených vezikul k vezikulám značeným fluoresceinem. Podle teoretického předpokladu by totiž při fúzi mělo dojít k promíchání vezikulárních dvojvrstev, díky čemuž by se od sebe molekuly fluoresceinu měly vzdálit a jelikož účinnost přenosu energie je závislá na vzdálenosti mezi donory a akceptory, tak by mělo dojít k jejímu poklesu. Tento pokles by pak znamenal zvýšení doby života fluoresceinu. Tento teoretický předpoklad byl ověřen a tímto způsobem došlo k detekci fúze vezikul u všech měřených systémů o různém obsahu fluoresceinu. Následně byly provedeny měření v delším časovém období pro ověření, jestli je možné touto metodou sledovat fúzi v delším časovém horizontu. Zde však bylo zjištěno, že hodnoty přestávají odpovídat teoretickým předpokladům a ve většině případů dochází s přibývajícím časem k poklesu průměrné doby života. Není jednoznačně možné určit, proč k těmto změnám dochází, nastíněno však bylo možné vysvětlení, že ve vezikulách dochází vlivem nestability k vytváření oblastí bohatých na cholesterol, což vede buď k zakoncentrovávání fluoresceinu nebo k jeho vypuzení ze struktury vezikul a následné agregaci. Rovněž byla u některých vzorků pozorována tvorba fluoreskující sraženiny.

Z toho důvodu byl vyzkoušen alternativní způsob značení vezikul pomocí fluoresceinu, kdy sonda nebyla přidávána až ke kompletně připraveným molekulám, jako tomu bylo v předchozích případech, ale byla přidávána již při přípravě vezikul před jejich rehydratací. Zde bylo zjištěno, že i přes určité fluktuace nedochází u vzorků vezikul s obsahem cholesterolu 23, 33 a 43 mol. % k výraznému poklesu průměrné doby života fluoresceinu s časem, tudíž by tímto způsobem mohla být fúze teoreticky sledována i v delším časovém horizontu. Rovněž nedocházelo ke vzniku sraženin, proto je tento způsob přípravy možné považovat za vhodnější.

Posledním testovaným donor-akceptorním párem použitým pro sledování fúze kataniontových vezikul byl pár perylen-fluorescein. Vzhledem k měřením provedeným s fluoresceinem byl v tomto případě použit pouze způsob značení s přidáním sondy již při přípravě vezikul. Pomocí tohoto donor-akceptorního páru byla pro všechny studované systémy o různém obsahu cholesterolu prokázána schopnost detekce fúze vezikul, jelikož ve všech případech docházelo po smíchání vezikul značených perylenem a vezikul značených fluoresceinem k poklesu doby života perylenu, což indikuje průběh přenosu energie. Opět byla provedena měření vzorků v delším časovém období a bylo zjištěno, že s výjimkou systému CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. %, opět dochází v průběhu delšího časového období k nárůstům dob života, které neodpovídají teoretickým předpokladům rezonančního přenosu energie. V měřeném systému

tedy opět musí docházet vlivem nestability například k zakoncentrovávání fluoresceinu nebo k jeho vypuzení z vezikulárních struktur, avšak jedná se pouze o navrženou hypotézu. Proto (s výjimkou systému s obsahem cholesterolu 43 mol. %) není vhodné pomocí měření s donor-akceptorním párem perylen-fluorescein sledovat fúzi vezikul v delším časovém horizontu. Rovněž nebyla prokázána přímá souvislost mezi obsahem cholesterolu v systému a účinností rezonančního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem, nelze tak ze získaných výsledků odvodit vliv obsahu cholesterolu na vzájemnou fúzi vezikul.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0-387-31278-1.

[2] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. Molecular fluorescence: principles and applications. Second edition. Chichester, England: Wiley-VCH Verlag, [2012]. ISBN 978-3-527-32837-6.

[3] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofysikální chemie*. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0791-1.

[4] JAMESON, David M. *Introduction to fluorescence*. Boca Raton, [2014]. ISBN 14-398-0604-7.

[5] Fluorescence SpectraViewer. In: *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2019-11-09]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html

[6] ALBANI, J.R. Fluorescence Quenching. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and* Fluorescence *Studies*. Elsevier, 2004, 2004, , 141-192. DOI: 10.1016/B978-044451449-3/50004-6. ISBN 9780444514493. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444514493500046

[7] CLEGG, Robert M. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995, **6**(1), 103-110. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80016-6. ISSN 09581669. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0958166995800166

[8] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles*. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-31669-4.

[9] WU, P.G. a L. BRAND. Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Analytical Biochemistry*. 1994, **218**(1), 1-13. DOI: 10.1006/abio.1994.1134. ISSN 00032697. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269784711341

[10] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. Praha 2: Psychiatrická klinika 1. lékařská fakulta UK, 2003 [cit. 2019-11-08]. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm

[11] MUNJANJA, Basil a Edmond SANGANYADO. UV–Visible Absorption, Fluorescence, and Chemiluminescence Spectroscopy. *Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set*. CRC Press, 2015, 2015-06-10, , Vol II-575-Vol II-589. DOI: 10.1201/b18668-73. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné také z: http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18668-73

[12] HARRISON, Sam. *Exploring and Exploiting Charge-Carrier Confinement in Semiconductor Nanostructures* [online]. Lancaster, 2016 [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/314236894_Exploring_and_Exploiting_Charge-Carrier_Confinement_in_Semiconductor_Nanostructures. Disertace. Lancaster University.

[13] OLIVEIRA, Elisabete, Emilia BÉRTOLO, Cristina NÚÑEZ, et al. Green and Red Fluorescent Dyes for Translational Applications in Imaging and Sensing Analytes: A Dual-Color Flag. *ChemistryOpen*. 2018, **7**(1), 9-52. DOI: 10.1002/open.201700135. ISSN 21911363. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/open.201700135

[14] Molecular Probes™ Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies [online]. 11. Life Technologies, 2010 [cit. 2020-03-19]. ISBN 0982927916. Dostupné z: http://dp.univr.it/~laudanna/LCTST/styled-21/downloads-4/files/Molecular%20Probes%20Handbook%20-

%20A%20Guide%20to%20Fluorescent%20Probes%20and%20Labeling%20Technologies%2011th%20Edition%20(2010).pdf

[15] Octadecyl Rhodamine B Chloride (R18). Biotium [online]. Freemont, CA [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: https://biotium.com/product/octadecyl-rhodamine-b-chloride-r18/

[16] Perylene. Merck [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2020 [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p11204?lang=en®ion=CZ

[17] PICHLER, Jiří. Technologie základních organických látek, tenzidy, barviva a pigmenty. Brno: Univerzita J. E. Purkyně, 1988.

[18] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie* makromolekulárních *a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.

[19] HOLMBERG, Krister. Surfactans *and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.

[20] DE, Sourav, Susanta MALIK, Aniruddha GHOSH, Rumpa SAHA a Bidyut SAHA. A review on natural surfactants. *RSC Advances*. 2015, **5**(81), 65757-65767. DOI: 10.1039/C5RA11101C. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA11101C

[21] SWAMINATHAN, Janani a Carsten EHRHARDT. *Controlled pulmonary drug delivery* [online]. New York: Springer, c2011 [cit. 2019-11-16]. Advances in delivery science and technology. ISBN 978-1-4419-9745-6.

[22] ARSLAN, Ayla, Eylem TOPKAYA, Deniz BINGÖL a Sevil VELI. Removal of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate from aqueous solutions by O 3 /UV/H 2 O 2 advanced oxidation process: Process optimization with response surface methodology approach. *Sustainable Environment Research*. 2018, **28**(2), 65-71. DOI: 10.1016/j.serj.2017.11.002. ISSN 24682039. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468203917301449

[23] Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), C12. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28312#/28312

[24] Sodium Dodecyl Sulfate. In: *PubChem* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate

[25] Cetyltrimethylammonium Bromide. *MP Biomedicals* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: https://eu.mpbio.com/0219502905-cetyltrimethylammonium-bromide-cf

[26] Cetrimonium bromide. *PubChem* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cetrimonium-bromide

[27] CTAB. In: *Web Scientific* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: https://www.webscientific.co.uk/product/ctab/

[28] KUMAR, Arun, Gurpreet KAUR, Ganga Ram CHAUDHARY a S.K. MEHTA. Aggregation behavior of Dioctadecyldimethylammonium chloride in mixed cationic surfactant system. *Journal of Molecular Liquids*. 2014, **198**, 37-43. DOI: 10.1016/j.molliq.2014.06.033. ISSN 01677322. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732214002980

[29] Dimethyldioctadecylammonium chloride. *Merck* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/40167?lang=en®ion=CZ

[30] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 2014, **292**(3), 589-597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00396-013-3104-9

[31] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG, Chien-Hsiang CHANG, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir*. 2005, **21**(14), 6179-6184. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la047207g

[32] KHALIL, Rabah A. a Al-hakam A. ZARARI. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*. 2014, **318**, 85-89. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.01.046. ISSN 01694332. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433214000749

[33] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2018, **92**, 29-35. DOI: 10.1016/j.jtice.2018.02.013. ISSN 18761070. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107018300993

[34] YANG, Sung-Tae, Alex J.B. KREUTZBERGER, Jinwoo LEE, Volker KIESSLING a Lukas K. TAMM. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016, **199**, 136-143. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003. ISSN 00093084. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000930841630055X

[35] RACZYŃSKI, P., A. DAWID, A. PIĘTEK, Z. GBURSKI a Lukas K. TAMM. Reorienatational dynamics of cholesterol molecules in thin film surrounded carbon nanotube: Molecular dynamics simulations. *Journal of* Molecular *Structure*. 2006, **792-793**, 216-220. DOI: 10.1016/j.molstruc.2006.01.064. ISSN 00222860. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286006002134

[36] HOLÍNKOVÁ, P. Pokročilé fluorescenční techniky ve výzkumu micelárních systémů a jejich interakcí s biopolymery. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 132 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

[37] JANČA, D. Rezonanční přenos energie v prostředí hydrogelové matrice. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

[38] LIRA, Rafael B., Tom ROBINSON, Rumiana DIMOVA a Karin A. RISKE. Highly Efficient Protein-free Membrane Fusion: A Giant Vesicle Study. *Biophysical Journal*. 2019, **116**(1), 79-91. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.3128. ISSN 00063495. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349518344503

[39] ROBSON MARSDEN, Hana, Nina A. ELBERS, Paul H. H. BOMANS, Nico A. J. M. SOMMERDIJK a Alexander KROS. A Reduced SNARE Model for Membrane Fusion. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009, **48**(13), 2330-2333. DOI: 10.1002/anie.200804493. ISSN 14337851. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200804493

[40] RODRIGUES, Ana Rita O., I. T. GOMES, Bernardo G. ALMEIDA, J. P. ARAÚJO, Elisabete M. S. CASTANHEIRA a Paulo J. G. COUTINHO. Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015, **17**(27), 18011-18021. DOI: 10.1039/C5CP01894C. ISSN 1463-9076. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CP01894C

[41] KARAM, Pierre, Amani A. HARIRI, Christina F. CALVER, Xiaoyong ZHAO, Kirk S. SCHANZE a Gonzalo COSA. Interaction of Anionic Phenylene Ethynylene Polymers with Lipids: From Membrane Embedding to Liposome Fusion. *Langmuir*. 2014, **30**(35), 10704-10711. DOI: 10.1021/la502572u. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la502572u

[42] TOMATSU, Itsuro, Hana Robson MARSDEN, Martin RABE, Frank VERSLUIS, Tingting ZHENG, Harshal ZOPE a Alexander KROS. Influence of pegylation on peptide-mediated

liposome fusion. *Journal of Materials Chemistry*. 2011, **21**(47). DOI: 10.1039/c1jm11722j. ISSN 0959-9428. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c1jm11722j

[43] TARAHOVSKY, Yury S., Elena A. YAGOLNIK, Eugeny N. MUZAFAROV, Bolatbek S. ABDRASILOV a Yuri A. KIM. Calcium-dependent aggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes induced by complexes of flavonoids with divalent iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012, **1818**(3), 695-702. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.12.001. ISSN 00052736. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273611004287

[44] TRIER, Sofie, Jonas R. HENRIKSEN a Thomas L. ANDRESEN. Membrane fusion of pH-sensitive liposomes – a quantitative study using giant unilamellar vesicles. *Soft Matter*. 2011, **7**(19). DOI: 10.1039/c1sm05818e. ISSN 1744-683X. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c1sm05818e

[45] JUMEAUX, Coline, Olov WAHLSTEN, Stephan BLOCK, Eunjung KIM, Rona CHANDRAWATI, Philip D. HOWES, Fredrik HÖÖK a Molly M. STEVENS. MicroRNA Detection by DNA-Mediated Liposome Fusion. *ChemBioChem*. 2018, **19**(5), 434-438. DOI: 10.1002/cbic.201700592. ISSN 14394227. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201700592

[46] MAZUR, Federico a Rona CHANDRAWATI. Peptide-Mediated Liposome Fusion as a Tool for the Detection of Matrix Metalloproteinases. *Advanced Biosystems*. 2019, **3**(5). DOI: 10.1002/adbi.201800330. ISSN 2366-7478. Dostupné také z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adbi.201800330

[47] MONDAL, Prasenjit, Rajdeep CHOWDHURY, Somen NANDI, Md. Asif AMIN, Kankan BHATTACHARYYA a Surajit GHOSH. Probing Deviation of Adhered Membrane Dynamics between Reconstituted Liposome and Cellular System. *Chemistry – An Asian Journal*. 2019, **14**(24), 4616-4624. DOI: 10.1002/asia.201900588. ISSN 1861-4728. Dostupné také z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/asia.201900588

[48] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 2014, **292**(3), 589-597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00396-013-3104-9

[49] LEE, Chen-Hsuan, Yu-Min YANG, Chien-Hsiang CHANG, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhancing physical stability of positively charged catanionic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid and Polymer Science*. 2014, **292**(10), 2519-2527. DOI: 10.1007/s00396-014-3285-x. ISSN 0303-402X. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00396-014-3285-x

[50] SAKI, Neslihan, Tarik DINC a Engin U. AKKAYA. Excimer emission and energy transfer in cofacial boradiazaindacene (BODIPY) dimers built on a xanthene scaffold. *Tetrahedron*. 2006, **62**(11), 2721-2725. DOI: 10.1016/j.tet.2005.12.021. ISSN 00404020. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402005021848

[51] RAO, Madan a Satyajit MAYOR. Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005, **1746**(3), 221-233. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2005.08.002. ISSN 01674889. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488905001667

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

SEZNAM ZKRATEK

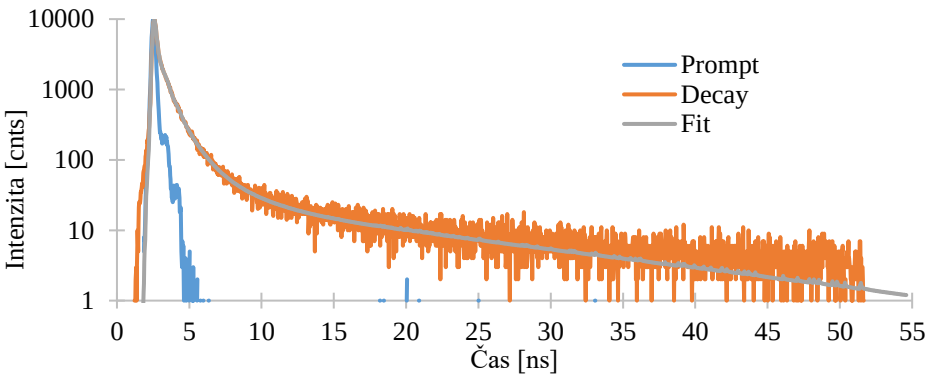
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
LED	Light emitting diode
CFD	Constant function discriminator
TAC	Time-to-Amplitude converter
PGA	Programmable gain amplifier
ADC	Analog-to-Digital converter
WD	Window discriminator
IRF	Instrument Response Function
PAL	Povrchově aktivní látky
CMC	Kritická micelární koncentrace (Critical micellar concentracion)
SDS	Dodecylsulfát sodný
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
DODAC	Dioktadecyldimethylammonium chlorid
IPA	Ion-pair amphiphile
cIPA	Kladně nabité kataniontové vezikuly
DLS	Dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)

SEZNAM SYMBOLŮ

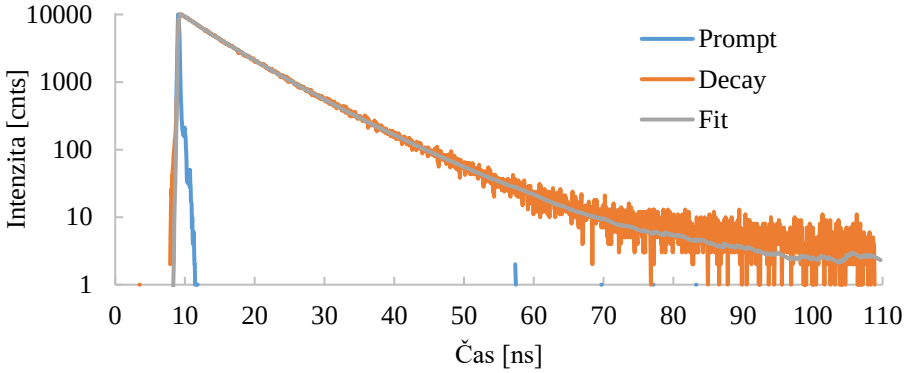
S_0	Základní singletová hladina
S_1, S_2	První a druhá excitovaná singletová hladina
T_1	Excitovaná tripletová hladina
Γ	Rychlost zářivého přechodu
k_r	Rychlostní konstanta zářivého přechodu
k_{nr}	Rychlostní konstanta nezářivého přechodu
τ	Doba života
t	Čas
$[A]$	Koncentrace fluoroforu A

$[A^*]$	Koncentrace excitovaného fluoroforu A
$[A^*]_0$	Koncentrace fluoroforu A v excitovaném stavu v čase 0
i_f	Intenzita fluorescence
(MQ)	Exciplex
MM^*	Excimer
Φ	Kvantový výtěžek
K_{SV}	Stern-Volmerova konstanta
N_A	Avogadrova konstanta
D	Difúzní koeficient
K_B	Boltzmanova konstanta
η	Viskozita
k_t	Rychlost rezonančního přenosu energie
Q_D	Kvantový výtěžek donoru v nepřítomnosti akceptoru
λ	Vlnová délka
K^2	Orientační faktor
R_0	Försterova vzdálenost
E	Účinnost rezonančního přenosu energie
I_{SS}	Intenzita steady-state emise
P_C	Parametr kritického sbalení
A	Korekční parametr
B	Předexponenciální funkce
n	Počet kanálů
χ_R^2	Redukovaná správnost proložení dat
$F(t)$	Obecný tvar exponenciální funkce
$N(t_k)$	Naměřená data vyhasínání fluorescence
$N_c(t_k)$	Použitý matematický model
σ_k	Standardní odchylka
ν	Počet stupňů volnosti

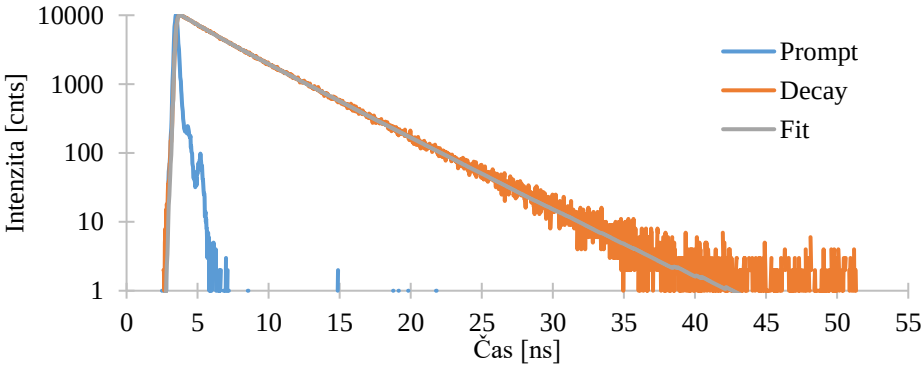
9 PŘÍLOHY



Obrázek 46: Vyhasínací křivka DiO z prostředí kataninontových vezikul o obsahu cholesterolu 23 mol. %; Prompt značí odezvu excitačního zdroje, Decay značí vyhasínací křivku a Fit představuje proložení pomocí exponenciální funkce

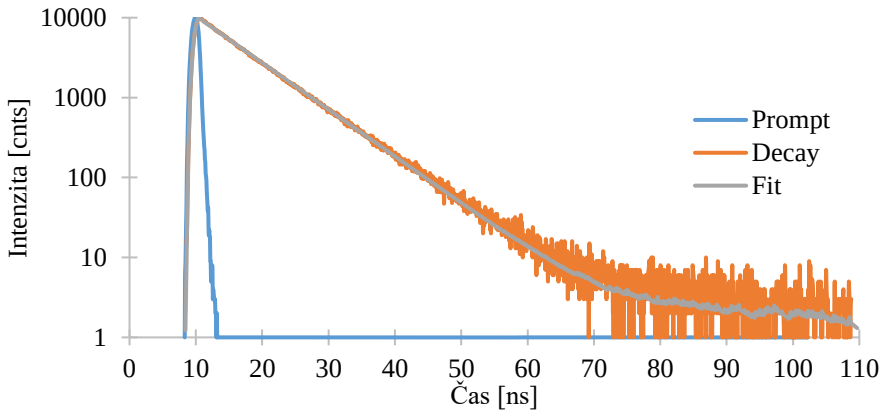


Obrázek 47: Vyhasínací křivka Bodipy z prostředí kataninontových vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. %; Prompt značí odezvu excitačního zdroje, Decay značí vyhasínací křivku a Fit představuje proložení pomocí exponenciální funkce

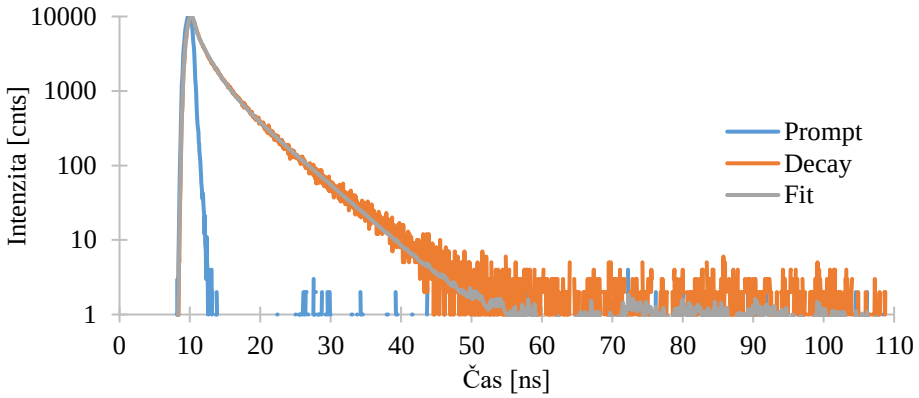


Obrázek 48: Vyhasínací křivka fluoresceinu z prostředí kataninontových vezikul o obsahu cholesterolu 43 mol. %; Prompt značí odezvu excitačního zdroje, Decay značí vyhasínací křivku a Fit představuje proložení pomocí exponenciální funkce

Obrázek 49: Vzorky CTA-DS o obsahu cholesterolu 43 mol. % značené fluoresceinem, ozářené pod UV lampou; vlevo vzorek vzniklý smícháním značených a neznačených vezikul v poměru 1:4, vpravo v poměru 1:9



Obrázek 50: Vyhasínací křivka perylenu z prostředí kataniontových vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. %



Obrázek 51: Vyhasínací křivka perylenu z prostředí kataniontových vezikul CTA-DS o obsahu cholesterolu 23 mol. % po přidání vezikul značených fluoresceinem a následné sonifikaci