

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHOVÁNÍ HYDROFILNÍ FLUORESCENČNÍ SONDY OREGON GREEN 488 V PROSTŘEDÍ HYDROGELU

BEHAVIOUR OF HYDROPHILIC FLUORESCENT PROBE OREGON GREEN 488 IN HYDROGEL ENVIRONMENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KATA LACKO

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0938/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Kata Lacko**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801) Studijní obor:
Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) Vedoucí práce **Ing. Filip Mravec,**
Ph.D.
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Chování hydrofilní fluorescenční sondy Oregon Green 488 v prostředí hydrogelu

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na téma využití fluorescenční sondy OG 488 ve studiu biokoloidů, zvláště hydrogelů, s přihlédnutím k technice časově rozlišených emisních spekter.
- 2) Navrhnout postup pro studium lokalizace fluorescenční sondy OG 488 v prostředí biopolymerního hydrogelu.
- 3) Provedení experimentů.
- 4) Na základě získaných výsledků rozhodnout o použitelnosti OG 488 při studiu hydrogelů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kata Lacko
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiom chovaní hydrofilnej fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 v prostredie hydrogéllov. Hydrogél bol vytvorený použitím hyaluronanu sodného a CTAB (cetyltrimethylammonium bromid), ktorý je kationtový tenzid. Ako rozpúšťadlo bol použitý fyziologický roztok NaCl s koncentráciou 0,15 M. Pre charakterizáciu chovaní fluorescenčnej sondy bol použitá technika stacionárnej fluorescence a časovo rozlíšenej fluorescence. Metódou TRES (časovo rozlíšené emisné spektrá) boli preskúvané emisné spektra fluorescenčnej sondy a nájdené emisné maxima. Pomocou parametra poklesu intenzity fluorescence pri daných vlnových dĺžkach bola vytvorená dekonvolúcia emisného spektra, ktorá poskytovala informácie o dobe života a relatívnom zastúpení jednotlivých stavov fluorescenčnej sondy v roztoku. Hydrogély boli skúmané 5 dní a 1 mesiac po ich vytvorení a získané výsledky boli porovnané. Oregon Green 488 vykazoval jednu dobu života v prostredie hydrogéllov, ktorá sa pohybovala v rozmedzí 4,1–4,45 ns v čerstvom géle, a 4,1–4,6 ns v stálom géle. Emisné maximum bolo nájdené v bode 525 nm. Fluorescenčná sonda sa chová v hydrogélloch ustálene a stabilne, pravdepodobne nedochádza k reakcii medzi sondou a gélom. Nebola zaznamenaná interakcia medzi hyaluronanom a sondou.

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis is to study the behavior of a hydrophilic fluorescent probe named Oregon Green 488 in hydrogel environment. The hydrogel was created using sodium hyaluronan and CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) as a cationic surfactant. Solution of 0.15 M NaCl was used as a solvent, which provides physiologic conditions in the sample. The behavior of the fluorescent probe was characterized by steady-state and time-resolved fluorescent measurements. To obtain the emission spectra of the probe and to find the emission maximum the method named TRES (time-resolved emission spectra) was used. Fluorescence intensity decay measurements as a function of wavelengths allowed to create deconvolution of the emission spectra, which provided information about the fluorescent lifetime and the probe's states' relative representation in the solution. Hydrogels were examined 5 days and 1 month after the preparation and the results were compared. Oregon Green 488 demonstrated one fluorescent lifetime in the hydrogel environment in the range, 4,1–4,45 ns in the fresh hydrogel and 4,1–4,6 ns in the stable hydrogel. The emission maximum was obtained at 525 nm in both cases. The fluorescent probe's behavior in the hydrogel environment is stable, presumably there are no interactions occurring between the hydrogel and the probe. Furthermore, no interactions were recorded between the probe and hyaluronan.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Oregon Green 488, hydrogel, TRES, TCSPC

KEY WORDS

Oregon Green 488, hydrogel, TRES, TCSPC

LACKO, K. : Chování hydrofilní fluorescenční sondy Oregon Green 488 v prostředí hydrogelu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študentky

POĎAKOVANIE

Vyjadrujem poďakovanie vedúcemu bakalárskej práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D., a Ing. Petre Holínkovej za cenné rady, usmernenie a profesionálnu úroveň spolupráce pri vypracovaní mojej bakalárskej práce.

OBSAH

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 2.1 | Fotoluminiscencia | 9 |
| 2.1.1 | Jabloňského diagram | 9 |
| 2.2 | Fluorescencia | 11 |
| 2.2.1 | Princípy a pravidlá fluorescence | 11 |
| 2.3 | Fluorescenčné sondy | 12 |
| 2.3.1 | Oregon Green 488 | 12 |
| 2.4 | Fluorescenčná spektroskopia | 12 |
| 2.4.1 | Ustálená fluorescenčná spektroskopia | 13 |
| 2.4.2 | Časovo korelačná fluorescenčná spektroskopia | 14 |
| 2.4.2.1 | Pulzné fluorimetre – metóda TCSPC | 14 |
| 2.4.2.2 | Doba života fluorofóru, jej definícia | 15 |
| 2.4.2.3 | Analýza dát TCSPC | 16 |
| 2.4.3 | Časovo rozlíšené emisné spektrá | 17 |
| 2.4.3.1 | Časovo rozlíšené emisné spektrá a TCSPC | 19 |
| 2.5 | Asociatívne koloidy | 20 |
| 2.5.1 | Vplyv štruktúry molekuly povrchovo aktívnej látky na adsorpciu a štruktúra tenzidov | 20 |
| 2.5.2 | Vznik micel | 21 |
| 2.5.2.1 | CTAB | 25 |
| 2.6 | Kyselina hyaluronová | 25 |
| 2.6.1 | Všeobecná charakteristika | 25 |
| 2.1.1 | Aplikácia kyseliny hyaluronovej | 26 |
| 2.1.2 | Interakcia medzi hyaluronanom a kationovými tenzidmi | 27 |
| 3 | SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY | 28 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 31 |
| 4.1 | Použité chemikálie | 31 |
| 4.2 | Prístroje a vybavenie | 31 |
| 4.2.1 | Fluorolog – Luminiscenčný spektrometer | 31 |
| 4.2.2 | Fluorocube – Spektrofluorimeter na princípe TCSPC | 31 |
| 4.2.3 | Použité programy | 32 |
| 4.3 | Metódy | 32 |
| 4.3.1 | Príprava zásobných roztokov | 32 |
| 4.3.2 | Príprava vzoriek | 33 |
| 4.3.3 | Nastavenie prístroja podľa požiadaviek | 34 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 35 |
| 5.1.1 | Oregon Green 488 vo vodnom roztoku | 35 |
| 5.1.2 | Oregon Green 488 v micelárnom roztoku | 37 |
| 5.1.3 | Oregon Green 488 v géle | 40 |
| 5.1.3.1 | Oregon Green 488 v čerstvom géle | 40 |
| 5.1.3.2 | Oregon Green 488 v stálom géle | 42 |

| | |
|---|-----------|
| ZÁVER..... | 45 |
| POUŽITÁ LITERATÚRA | 47 |
| ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV | 52 |
| PRÍLOHY | 54 |

1 ÚVOD

Charakterizácia hydrogélrov je dôležitou časťou makromolekulárnej chémie. Hydrogély majú hydrofilný charakter a majú potenciál byť biokompatibilné. Tieto výnimočné vlastnosti zaujali vedcov, a preto boli tieto biomateriály a ich chovanie študované už mnoho rokov [1].

Už v roku 1980 boli tieto gély používané na ošetrovanie popálenín [2]. Hydrogély na báze prírodných a syntetických polymérov boli aj naďalej používané napríklad pre zapuzdrenie buniek, v poslednej dobe sa tieto hydrogély stali atraktívnymi pre nové oblasti tkanivového inžinierstva, napríklad ako matrica pre opravu a regeneráciu širokej škály tkanív a orgánov. Hydrogély určené pre použitie v tkanivovom inžinierstve môžu obsahovať póry dostatočne veľké pre prijatie živých buniek, alebo môžu byť navrhnuté tak, aby sa rozpustili alebo degradovali pri uvoľňovaní rastových faktorov a pri vytváraní pórov, do ktorých môžu preniknúť živé bunky a rozmnožovať sa. Podstatnou nevýhodou hydrogélrov je ich nízka mechanická pevnosť, čo predstavuje značné ťažkosti pri manipulácii. Problémy súvisiace so sterilizáciou sú tiež veľmi ťažko riešiteľné. Je zrejmé, že sú významné výhody a nevýhody použitia hydrogélrov tkanivového inžinierstva. Tieto problémy musia byť prekonané, predtým ako budú hydrogély praktické a užitočné v tejto vzrušujúcej oblasti [1, 2].

Hydrogély citlivé na prostredie majú obrovský potenciál v rôznych aplikáciách. V tele sa nachádzajú niektoré premenné životného prostredia, ako je nízke pH a zvýšené teploty. A preto pH citlivé a/alebo teplotne citlivé hydrogély môžu byť použité pre lokálne špecifické a kontrolné dodávanie liečiv. Hydrogély, ktoré sú citlivé na špecifické molekuly, ako je napríklad glukóza alebo antigény, môžu byť použité ako biosenzory a systémy podávania liekov. Hydrogély citlivé na svetlo, citlivé na tlak a elektro-citlivé majú tiež potenciál pre použitie pri aplikácii liekov. Každopádne, praktické aplikácie vyžadujú značné zlepšenie vlastností hydrogélrov [3, 4].

Za účelom rozvoja a zlepšenia kvality hydrogélrov je nevyhnutné, aby sme získali čonajviac informácií o správaní, štruktúre a vlastnostiach hydrogélrov. Fluorescenčná spektroskopia je práve jednou z používaných techník pri skúmaní micelárnych systémov. Táto metóda je dostatočne citlivá a presná, poskytuje spoľahlivé informácie o skúmaných systémoch, avšak vo výskume hydrogélrov sa táto metodika nepoužíva tak často. Aby fluorescenčná spektroskopia bola efektívna, je nutné použiť vhodnú fluorescenčnú sondu. Pri voľbe tejto sondy je dôležité vziať do úvahy, čo je cieľom meraní, ktorú časť hydrogélrov chceme skúmať (napríklad hydrofilnú alebo hydrofóbnu časť), pri akej vlnovej dĺžke budeme merať a pod. Podľa týchto parametrov sa dá zvoliť vhodná fluorescenčná sonda.

Táto práca sa zameriava na štúdium chovania hydrofilnej fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 v prostredí hydrogélrov. Cieľom mojej práce je poskytovať čo najviac informácií o tejto hydrofilnej fluorescenčnej sonde a pomocou získaných údajov posúdiť mieru vhodnosti tejto sondy pri použití štúdia hydrogélrov.

Skúmaný hydrogél bol vytvorený z katióntového tenzidu CTAB (cetyltrimethylammonium bromid) a z hyaluronanu, čo je záporne nabitý polymér. Hyaluronan sa ľahko viaže na špecifické receptory, ktoré sú prítomné napríklad v nádorových bunkách a takto poskytuje

priamy kontakt s cieľovými bunkami. Tenzid, ktorý má amfifilný charakter sa naviaže na reťazec hyaluronanu a zároveň vytvorí hydrofóbnú doménu, v ktorej sa dané liečivo rozpustí. Micely tenzidu sa asociujú na reťazec hyaluronanu a vzniká hydrogél, ktorý by mohol byť biokompatibilný.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fotoluminiscencia

Luminiscencia je v poslednej dobe dominantnou metodikou, ktorú značne využíva napríklad biotechnológia, prietoková cytometria, medicínska diagnostika, DNA sekvenčné procesy, genetická analýza, forenzná chémia. Fluorescenčná detekcia je vysoko citlivá metóda, vďaka ktorej už nie je potreba používať drahé a nebezpečné rádioaktívne látky pre biochemickú analýzu [5].

Fotoluminiscencia je luminiscencia vyvolaná svetelným žiarením, pričom osvetlená molekula sa dostane do excitovaného elektrónového stavu. Látka s takouto formou môže získanú energiu po určitom čase a pri priaznivých podmienkach vyžiariť ako luminiscenciu. Tieto luminiskujúce látky sa nazývajú luminofory. Vlnová dĺžka emitovaného žiarenia je odlišná od vlnovej dĺžky absorbovaného žiarenia [6].

Luminiscencia sa rozdeľuje podľa toho, akým zdrojom bola vyvolaná excitácia. Napríklad, ak je luminiscencia vyvolaná elektrickým javom, hovoríme o elektroluminiscencii, chemoluminiscencia vznikla pôsobením chemickej reakcie. Termoluminiscencia, radioluminiscencia, bioluminiscencia, sonoluminiscencia hrajú tiež dôležitú rolu v praxi. Pri fotoluminiscencii môže byť zdrojom excitácie ultrafialové žiarenie, infračervené žiarenie alebo viditeľné svetlo [5, 6].

V skratke môžeme fotoluminiscenciu definovať takto: vplyvom absorpcie primárneho žiarenia pri vhodnej vlnovej dĺžke dochádza k excitácii molekuly, potom nasleduje deexcitácia, ktorá je spojená s emisiou sekundárneho žiarenia. Podľa typu sekundárneho, čiže emitovaného žiarenia rozdeľujeme luminiscenciu na fluorescenciu, fosforescenciu a na oneskorenú fluorescenciu [5, 7].

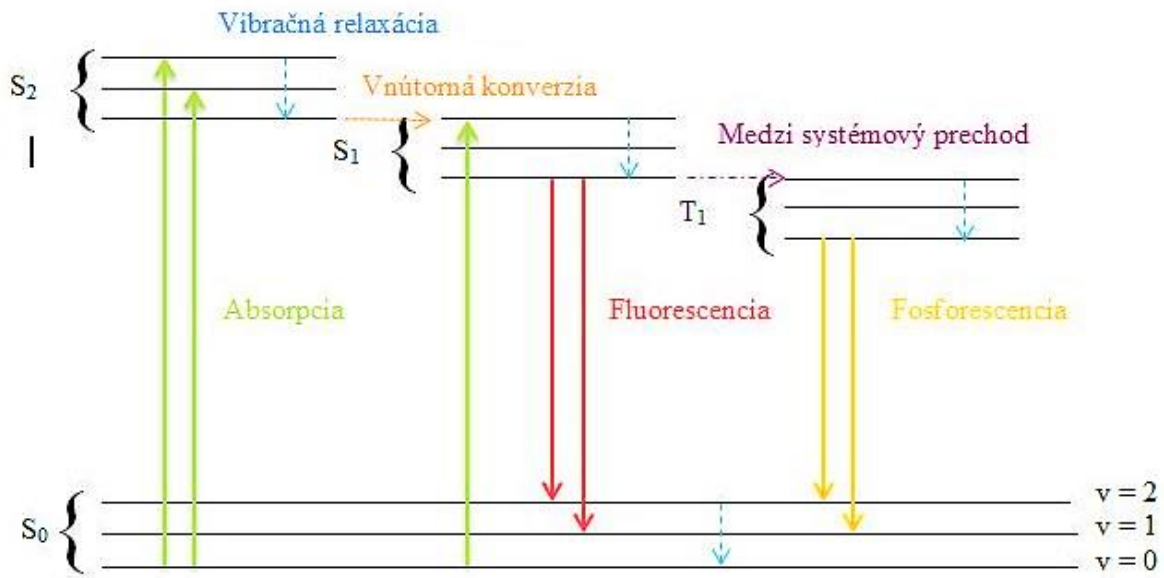
Elektrón, ktorý sa excituje, sa musí nachádzať v singletovom stave, čo znamená, že má opačný spin ako má jeho párový elektrón, keď je v základnom stave. Základný rozdiel medzi fosforescenciou a fluorescenciou je, že pri fluorescencii dochádza k emisii fotónu zo singletového stavu, avšak pri fosforescencii je to z tripletového stavu. Tento jav spôsobuje, že fosforescencia je pomalšia, nakoľko emisia z tripletového stavu je kvantovo zakázaná. Oneskorená fluorescencia nastáva vtedy, keď elektrón, ktorý bol excitovaný, prejde zo singletového stavu do tripletového a potom sa vráti späť do toho istého singletového stavu [5, 7, 8].

2.1.1 Jablónského diagram

Jablónského diagram znázorňuje elektrónové stavy molekuly a prechody medzi elektrónovými stavmi. Na diagrame sú ilustrované žiarivé a nežiarivé prechody a taktiež jednotlivé elektrónové stavy. S_0 je základný, singletový elektrónový stav. Molekula v tomto stave má najnižšiu energiu, je v termodynamickej rovnováhe. Keď molekula absorbuje energiu, dostane sa do vyššieho stavu, napríklad do stavu S_1 alebo S_2 , pretože jej elektrón excituje. Takto excitovaný elektrón sa časom deexcituje. Touto deexcitáciou nasleduje návrat do základnej hladiny. Elektrón sa môže deexcitovať pomocou rôznych deaktiváčnych procesov. Tieto procesy sú rozdelené do dvoch kategórií: žiarivé a nežiarivé prechody [7, 8].

Pri žiarivých prechodoch vždy dochádza k emisii svetelného kvanta (fotónu). Elektrón sa najprv vráti na najnižšiu vibračne-rotačnú hladinu, (pozri. vibračná relaxácia), potom nastáva emisía sekundárneho žiarenia (fluorescencia, fosforescencia, oneskorená fluorescencia).

Medzi nežiarivé procesy patrí vibračná relaxácia, vnútorná konverzia a medzi-systémový prechod [5, 7].



Obrázok 1 Jablonskiho diagram; znázorňuje elektrónové stavy (S_0 , S_1 , S_2 , T_1) a procesy s nimi spojené: zelená – absorpcia, červená – fluorescencia, žltá – fosforescencia, modrá - vibračná relaxácia, hnedá – vnútorná konverzia, fialová – medzi systémový prechod

Keď sa excitovaná molekula dostane do energeticky vyššej hladiny, vytvorí sa kontakt medzi excitovanou molekulou a molekulami, ktoré sú v okolí. Excitovaná molekula potom pridá časť svojej energie okolitým molekulám pomocou vibračných a rotačných procesov. Tento proces sa nazýva vibračná relaxácia a uplatňuje sa okamžite po excitácii. Dôjde k prechodu na najnižšiu vibračno-rotačnú hladinu príslušného elektrónového stavu.

Prípád, keď elektrón prejde medzi jednotlivými elektrónovými stavmi s rovnakou spinovou multiplicitou, je vnútorná konverzia.

Pri medzi-systémovom prechode sa celý systém posunie do tripletového stavu. Prechod medzi stavmi s odlišnou multiplicitou je spinovo zakázaný. Časť energie sa stratí pri prechode do energeticky nižšieho stavu než je singletový stav. Tento jav spôsobuje, že fosforescencia sa spravidla objavuje v dlhších vlnových dĺžkach než fluorescencia [5, 7, 9].

2.2 Fluorescencia

Ako už bolo zmienené, fluorescencia je sekundárne žiarenie, ktoré nie je spinovo zakázané, preto je tento žiarivý prechod veľmi rýchly, merateľný v nanosekundách. Fluorescencia sa zvyčajne odohráva tak, že elektrón molekuly sa z hladiny S_1 dostane do niektorej z vibračných hladín základnej hladiny, čiže S_0 . Takže pri fluorescencii dochádza k spinovo povolenému prechodu [5, 10].

Medzi hlavné charakteristiky fluorescencie patria absorpčné, excitačné a emisné spektrá, kvantový výťažok a doba života. Emisné spektrá sú zobrazením spektrálnej intenzity fluorescencie v závislosti od vlnovej dĺžky emitovaného žiarenia. Ďalej sú emisné spektrá závislé od chemickej štruktúry fluoroforu a od prostredia, ktoré ich obklopuje. Medzi parametre prostredia, ktoré majú schopnosť ovplyvňovať fluorescenciu, patrí polarita, schopnosť tvoriť vodíkové mostíky, pH, viskozita, prítomnosť zhášača, prítomnosť iónov, elektrický potenciál, teplota a tlak. Pre väčšinu organických molekúl platí, že ich absorpčné a emisné spektrá sú navzájom zrkadlovo symetrické. Príčinou je podobné rozloženie vibračno-rotačných hladín v stavoch S_1 a S_0 .

Kvantový výťažok fluorescencie určuje zlomok z excitovaných molekúl, ktoré sa vrátia na základnú hladinu S_0 prostredníctvom fluorescencie.

Doba života je priemerný čas, ktorý molekula strávi v excitovanom stave pred návratom na základnú hladinu. Pre väčšinu fluoreskujúcich látok platí, že emitujú v inom čase než je doba života [5, 7].

2.2.1 Princípy a pravidlá fluorescencie

Fluorescenciu môžeme charakterizovať pomocou troch pravidiel. Prvé je **Kashovo pravidlo**, ktoré definuje nasledujúce pravidlo: pred emisiou fluorescenčného kvanta dochádza k relaxácii vibračnej energie a vnútornej konverzie, čo má za následok to, že k fluorescenčnému prechodu dochádza z najnižšej vibračnej hladiny excitovaného singletového stavu S_1 do stavu základného S_0 , hoci po absorpcii žiarenia môže dôjsť k excitácii aj do vyšších vibračných a energetických hladín. Je to spôsobené malým energetickým rozdielom medzi hladinou S_1 a vyššími energetickými hladinami.

Druhý dôležitý zákon je **Stokesov zákon**, ktorý hovorí, že vlnová dĺžka emisie pri luminiscencii je väčšia alebo rovnaká ako vlnová dĺžka excitačného svetla, z čoho vyplýva, že emisné spektrum fluoroforov je oproti absorpčnému posunuté k dlhším vlnovým dĺžkam, kde je nižšia energia. Je to spôsobené tým, že časť energie sa vytratí pri prechode z vyšších vibračných hladín do najnižšej vibračnej hladiny pri vibračnej relaxácii. Výsledný posuv spektier sa nazýva Stokesov posuv.

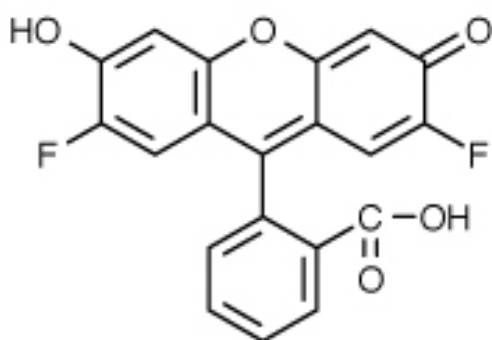
Posledné dôležité pravidlo je **Vavilovo pravidlo**, ktoré vychádza z Kashovho pravidla a hovorí, že kvantový výťažok a doba trvania excitovaného stavu zložitých molekúl v roztoku nezávisí od vlnovej dĺžky budiaceho žiarenia. Z toho teda vyplýva, že emisné spektrum fluorescencie nie je závislé od excitačnej vlnovej dĺžky [5, 7, 10].

2.3 Fluorescenčné sondy

Fluorofory alebo fluorescenčné sondy sú látky, ktoré sú schopné vykazovať fluorescenciu. Pomocou týchto sond môžeme získavať informácie v širokej škále odvetví. Tieto fluorofory spravidla rozdeľujeme do troch skupín: prirodzené fluorofory – čiže vnútorné, vonkajšie kovalentne naviazané fluorofory, tieto sa označujú ako fluorescenčné znaky a zvyčajne je ich pozícia v roztoku dopredu známa. Poslednú skupinu tvoria vonkajšie asociačné fluorofory, známe ako fluorescenčné sondy. Medzi fluorescenčné sondy sa obvykle zaraďujú aromatické zlúčeniny, polyaromatické uhľovodíky alebo heterocykly. Pri výbere fluorescenčných sond je dôležité brať ohľad aj na ich tvar, fotostabilitu, veľkosť a charakter: amfifilný, hydrofilný alebo hydrofóbný charakter [5].

2.3.1 Oregon Green 488

Oregon Green 488, čiže 2',7'-difluorfluoresceín ($C_{20}H_{10}F_2O_5$) je relatívne nová fluorescenčná sonda, jej štruktúra sa podobá štruktúre fluoresceína. Oregon Green 488 (tiež OG488) sa v poslednej dobe stala veľmi často používanou fluorescenčnou sondou v biomedicíne, biochémií alebo v neurovede. V závislosti od pH, môže sonda existovať v roztoku v kationovej, neutrálnej, monoaniónovej ale aj dianiónovej prototrófnej forme. Kationová forma je prítomná pri nízkych pH. Neutrálne, monoaniónové a dianiónové stavy môže dosahovať pri pH 3,30–9,00. Dianiónová forma vykazuje najvyššie fluorescenčné stavy. Oregon Green 488 je často využívaná sonda, pretože je menej pH reaktívna ako obyčajný fluoresceín a menej citlivá na *photobleaching*. Ďalej, fluorescenčná doba života je závislá na teplote, preto je Oregon Green ideálnou sondou pri reakciách, kde je cieľom analyzovať termodynamiku reakcie, ako napríklad van't Hoffová analýza. *Photobleaching* je fotochemická deštrukcia fluoroforov [11, 12].



Obrázok 2: Oregon Green 488 fluorescenčná sonda - chemický vzorec

2.4 Fluorescenčná spektroskopia

Fluorescenčná spektroskopia patrí medzi najpoužívanejšie metodiky štúdia fotoluminiscencie. Každý fluorofor emituje žiarenie pri rôznych vlnových dĺžkach, spektrá sú tiež jedinečné a teda charakteristické pre každý fluorofor. Z dôvodu, že táto metodika je veľmi selektívna, je fluorescenčná spektroskopia často používaná v analytickej alebo fyzikálnej chémii.

Všeobecne spektrofluorimeter má dve fundamentálne odlišnosti od absorpčných fluorimetrov. Spektrofluorimetre obsahujú dva monochromátory, jeden slúži na regulovanie vlnových dĺžok svetla, ktorým sa osvetľuje analyzovaná látka, a druhý monochromátor sa používa pre výber vhodných (charakteristických) vlnových dĺžok fluoroforom emitovaného svetla. Druhý rozdiel je ten, že v fluorescenčnej spektroskopii optické položky, ktoré majú za úlohu osvietiť skúmanú látku a detektory, nie sú usporiadané v jednej osi, ale obvykle uzavierajú uhol (najčastejšie pravý uhol). Toto rozmiestenie zabezpečuje, že ožiarené svetlo, ktoré má rovnakú vlnovú dĺžku ako emitované svetlo fluoroforu, neruší meranie. V praxi bolo zistené, že organické, planárne, aromatické látky a látky, ktoré obsahujú konjugované dvojitie väzby, sú lepšie fluorofory ako tie, ktoré konjugované dvojitie väzby neobsahujú – vykazujú intenzívnejšiu fluorescenciu. Intenzita fluorescencie je priamo úmerná intenzite žiarivého svetla. Všeobecne sa dá vypočítať intenzita vykazovaného svetla podľa tohto vzorca:

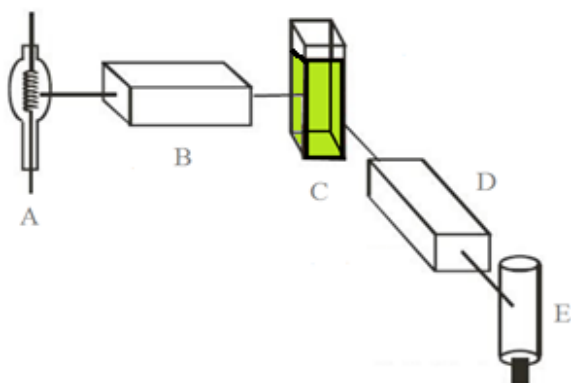
$$I = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot C, \quad (1)$$

kde k je konštanta, ktorá zahrnuje vlastnosti kyvety a nástroja, I_0 je intenzita ožiarenia monochromatického svetla, ε je molárny absorpčný koeficient (pre danú vlnovú dĺžku) a C je koncentrácia analyzovanej látky.

Fluorescenčnú spektroskopiu môžeme rozdeliť na dva spôsoby: ustálená fluorescenčná spektroskopia a časovo korelačná fluorescenčná spektroskopia [13].

2.4.1 Stacionárna fluorescenčná spektroskopia

Stacionárna fluorescenčná spektroskopia (alebo tiež ustálená fluorescenčná spektroskopia) je najbežnejším spôsobom merania fluorescenčných charakteristík. Analyzovaná látka a fluorofor je osvetlený kontinuálnym lúčom a pomocou konštantnej excitácie je sledované emisné spektrum.



Obrázok 3: Ustálená fluorescenčná spektroskopia – všeobecná schéma inštrumentácie: A – výbojka, B – excitačný monochromátor, C – kyveta obsahujúca analyzovanú látku, D – emisný monochromátor, E – fotonásobič [10]

Kontinuálna intenzita osvetlenia je zabezpečovaná vysokotlakovou xenónovou výbojkou (A). Tento typ výbojok pracuje na vysokej intenzite, zvyčajne od 250 nm až do oblasti infračerveného svetla. Lúč, ktorý vyžaruje xenónová výbojka, potom pokračuje smerom do excitačného monochromátoru (B), ktorý má za úlohu vybrať vhodnú vlnovú dĺžku žiarenia

(vhodnú pre naše meranie). Toto žiarenie potom osvetľuje skúmanú látku (C), ktorá sa excituje a potom poskytuje fluorescenciu vo všetkých smeroch. Emisný monochromátor (D) vyberie žiadanú vlnovú dĺžku fluorescencie a ako difrakčný prvok obsahuje mriežku. Fotonásobič (E) potom deteguje fluorescenciu a prevedie získanú informáciu na elektrický prúd. Tento prúd je úmerný intenzite svetla. Ako výstup merania obvykle dostávame emisné a excitačné spektrá [5].

2.4.2 Časovo rozlíšená fluorescenčná spektroskopia

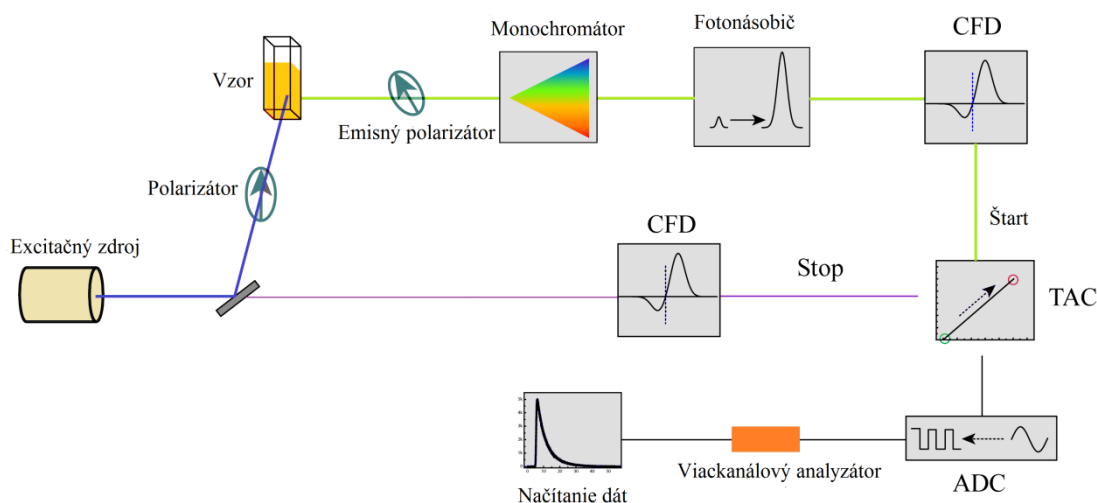
Časovo rozlíšené meranie je vo fluorescenčnej spektroskopii široko používaná metodika. Pomocou časovo rozlíšených fluorescenčných meraní je možné spoznať dynamiku excitovaných stavov, ktorá je veľmi dôležitá pre pochopenie fotofyzikálnych, fotochemických a fotobiologických procesov. Existujú dve dominantné časovo rozlíšené techniky, ktoré sa označujú ako pulzná metóda a metóda fázovo modulovaného budiaceho žiarenia.

Pulzná fluorimetria používa krátky excitačný pulz žiarenia. Fázovo modulovaná fluorimetria používa modulované žiarenie pri rôznych frekvenciách a vytvára harmonickú odozvu vzorky, ktorá je Fourierovou transformáciou odozvy pulzu. Prvá technika pracuje v časovej doméne, druhá vo frekvenčnej doméne. Oba typy fluorimetria sú teoreticky rovnaké, ale líšia sa v inštrumentácii [5].

2.4.2.1 Pulzné fluorimetre – metóda TCSPC

Metóda TCSPC (Time - Correlated Single Photon Counting), čiže "časovo korelované počítanie fotónov" sa používa obvykle na detekciu jednej molekuly v analytickej fyzikálnej chémii. V týchto aplikáciách je zistená doba života použitá na rozlíšenie rôznych fluoroforov v rôznych prostrediach [5].

Meranie sa začína generáciou elektrického a optického pulzu v súčasnom čase v zdroji žiarenia. Tento generovaný elektrický pulz je smerovaný na diskriminátor (Constant Fraction Discriminator - CFD), ktorý presne určí čas prichádzajúceho pulzu, a odtiaľ do štartovacieho vstupu prevodníka času na amplitúdu (Time-to-Amplitude Converter - TAC).

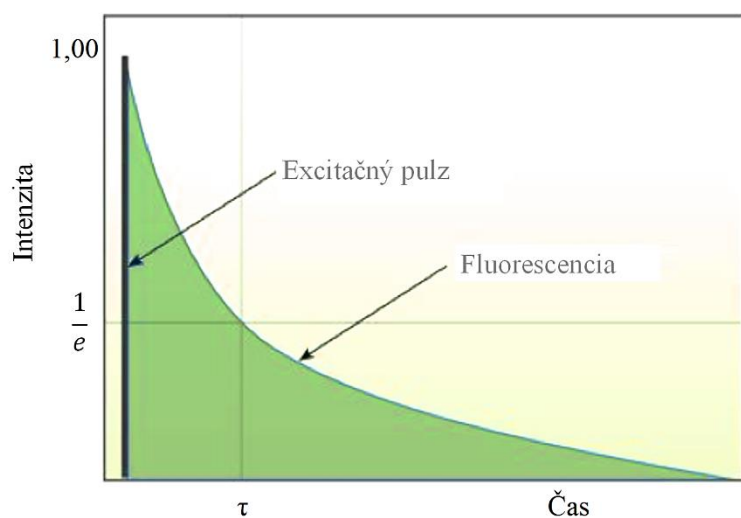


Obrázok 4: TCSPC - Časovo korelačné počítanie fotónov: schéma inštrumentácie prístroja

Medzitým sa optickým pulzom existuje analyzovaný vzorec a ten následne začína emitovať fluorescenciu. Optika musí byť správne naladená tak, aby na fotonásobič nedopadol viac ako jeden fotón na jeden excitačný pulz. Elektrický pulz korešpondujúci s emisiou fotónu je smerovaný cez diskriminátor do stôp vstupu prevodníka (TAC). V prevodníku sa medzitým generoval schodok napätia, čo je napätie, ktoré lineárne rastie s časom. Po obdržaní stopy signálu je schodok napätia prevedený na elektrický pulz, ktorého amplitúda je priamo úmerná oneskoreniu medzi štartom a stop pulzom. Podľa potreby je napätie zesilnené v zesilňovači (Programmable Gain Amplifier - PGA) a prevedené na číselnú hodnotu pomocou analógového digitálneho prevodníka (Analog-to-Digital Converter - ADC) [5, 7].

2.4.2.2 Doba života fluorofóru, jej definícia

Ako už bolo uvedené, doba života fluoroforu je čas, ktorý elektrón strávi v excitovanom stave pred návratom do základného stavu tým, že emituje fotóny. Doba života fluoroforov sa môže pohybovať v rozmedzí od pikosekundy do stoviek nanosekúnd. Ak je populácia fluoroforov v excitovanom stave, doba života označuje dobu, ktorú molekula potrebuje, aby sa znížila na $\frac{1}{e}$ alebo na 36,8% pôvodnej populácie.



Obrázok 5: Schematické znázornenie závislosti fluorescenčnej intenzity na čase, kde τ je fluorescenčná doba života [14]

Schéma reprezentuje závislosť intenzity fluorescencie na čase, naznačuje, že fluorescenčná doba života (na obrázku označená ako τ), je doba, za ktorú intenzita fluorescencie poklesla na $\frac{1}{e}$ pôvodnej hodnoty. Tento pokles intenzity je definovaný ako funkcia času:

$$I_t = \alpha \cdot e^{\left(\frac{-t}{T}\right)}, \quad (2)$$

kde I_t je intenzita v čase t , α je pred-exponenciálny faktor a T je doba života fluorescencie. Pre multi-exponenciálny pokles potom platí rovnica:

$$I_t = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot e^{\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)}. \quad (3)$$

Doba života je všeobecne definovaná ako prevrátená hodnota celkovej rýchlosti poklesu. Rýchlosť poklesu je definovaná ako rýchlosť, ktorou populácia, čiže excitovaná časť fluoroforu, znižuje počet excitovaných molekúl. Populácia sa pravidelne znižuje rýchlosťou

$\Gamma + k_{nr}$ podľa nasledujúcej rovnice:

$$\frac{d_{n_t}}{d_t} = (\Gamma + k_{nr})n_t. \quad (4)$$

Kde n_t označuje počet excitovaných molekúl v čase t po excitácii, k_{nr} je rýchlosť nezhariavých procesov a Γ je rýchlosť emisie. Z toho vyplýva, že doba života sa definuje ako

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}. \quad (5)$$

Pokles fluorescenčnej intenzity definuje časová distribúcia fotónov, ktoré sú emitované. Fluorofor tieto fotóny emituje náhodne počas celého časového rozsahu poklesu. Z toho vyplýva, že doba života je štatistický priemer, fotóny neemitujú v čase rovnakom ako doba života. Rozdiel medzi jedno-exponenciálnym poklesom a multi-exponenciálnym poklesom je, že v prípade multi-exponenciálneho poklesu používaná fluorescenčná sonda neexistuje len v jednom mikroprostredí, ale v mnohých, ktoré majú odlišné vlastnosti. Môžeme teda predpokladať, že fluorofor v zmesi môže existovať vo viacerých mikroprostrediach, takže doba života sa môže distribuovať. V prípade jedno-exponenciálneho poklesu sa dá doba života definovať ako čas priemerný, počas ktorého fluorofor zostáva v stave excitovanom po prebudení pulzom.

Znalosť životnosti excitovaného stavu používaného fluorofóru je rozhodujúca pre kvantitatívnu interpretáciu väčšiny fluorescenčných meraní, ako je napríklad FRET (Förster Resonance Energy Transfer – Fluorescenčný Rezonančný Prenos Energie). Doby života v excitovanom stave sú obvykle namerané buď v časovej doméne, alebo vo frekvenčnej doméne [5, 14].

2.4.2.3 Analýza dát TCSPC

Dáta získané pomocou TCSPC sú mierne komplexné a všeobecne platí, že nemôžu byť analyzované použitím grafických metód. Na analýzu boli použité rôzne metódy, ako napríklad metóda momentu, Laplaceova transformácia, alebo metóda nelineárnych najmenších štvorcov, ich správnosť a presnosť boli porovnávané. Metóda maximálneho entropia je relatívne nový spôsob analýzy dát a je používaná v mnohých laboratóriách. Laplaceova transformácia a metóda momentu sú v súčasnosti menej používané metódy. Najpoužívanejšia a najpresnejšia metóda objavená na analýzu dát získaných pomocou TCSPC je metóda nelineárnych najmenších štvorcov [15].

Cieľom metódy nelineárnych najmenších štvorcov je minimalizácia vplyvu zmenou hodnôt parametrov modelu, čiže dosiahnuť najmenší nesúlad medzi nameranými dátami a poprekladanou funkciou. Tento nesúlad sa označuje ako χ^2 a je vyjadrený ako:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \quad (6)$$

kde n je celkový počet kanálov, $N(t_k)$ je zaznamenaný počet čísel v kanáli k , $N_c(t_k)$ je vypočítaný počet čísel v kanáli k z modelovej predikcie a σ_k^2 je premenná $N(t_k)$. χ^2 je v skutočnosti štatistická hodnota váženej premennej najmenších štvorcov, ktorá je v podstate štatistikou rozdelenia pravdepodobnosti chi-kvadrátu. V praxi sa ale používa χ_R^2 , čo je redukovaná hodnota pôvodnej hodnoty χ^2 . Hodnota redukovaného χ^2 závisí od počtu dát (n) a od počtu parametrov preloženej funkcie (p). Táto hodnota sa vypočíta ako:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu}, \quad (7)$$

kde n je počet nameraných dát, p udáva počet parametrov preloženej funkcie a ν udáva stupne voľnosti. Keďže n má obvykle oveľa väčšiu hodnotu ako p , χ_R^2 má zvyčajne hodnotu blízko jednej [5, 15]. Metóda nelineárnych najmenších štvorcov poskytuje najpresnejšie výsledky, keď namerané dáta spĺňajú nasledujúce podmienky:

- Všetky experimentálne neistoty sú na závislej premennej, to znamená, že na osi y .
- Neistoty na závislej premennej, čiže namerané dáta, majú Gaussovu distribúciu, keďže v strede je správna hodnota.
- Ako na závislej (os y), tak ani na nezávislej (os x) premennej sa nenachádzajú systematické chyby.
- Predpokladaná preložená funkcia je správnym matematickým popisom systému. Nesprávne, nepresné modely poskytujú nesprávne parametre.
- Dátové body sú nezávislé pozorovania.
- Vždy musia byť dostačujúce dátové body, aby parametre boli predurčené.

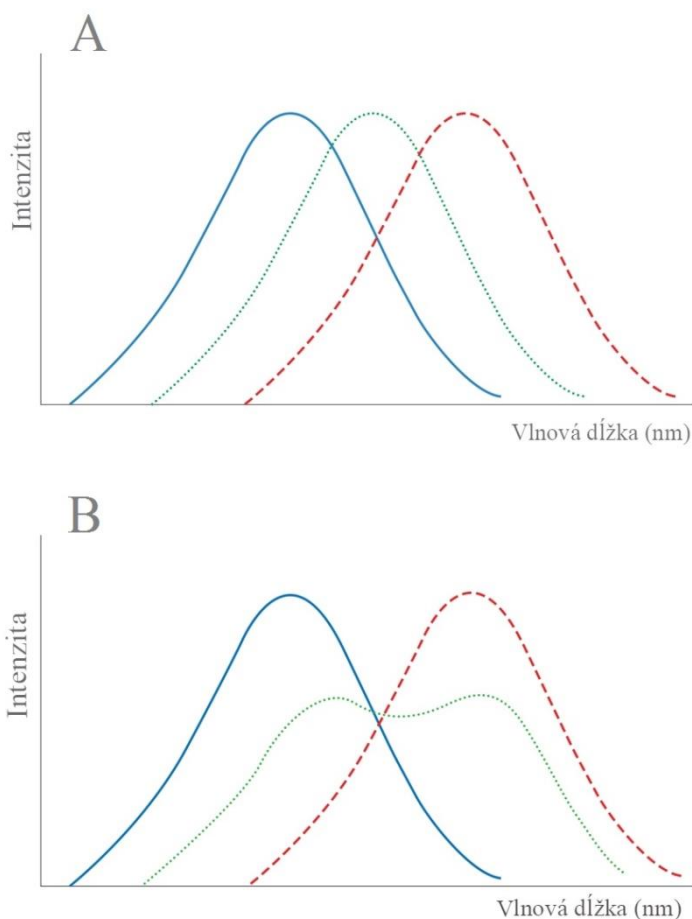
Keď je nesúlad veľmi veľký, model je zlý a najpravdepodobnejšie je, že bude nutné použiť model pre viac parametrov poklesu. Systematické chyby v dátach môžu zapríčiniť i $\chi_R^2 > 1,5$, toto malé zvýšenie potom neznamená, že používame zlý model. V skutočnosti sa používajú sofistikované programy na vyhodnocovanie výsledku TCSPC [5].

2.4.3 Časovo rozlíšené emisné spektrá

Procesy spojené s excitovaným stavom majú za následok komplexné časovo závislé rozpady, čo znamená, že majú veľký vplyv na emisné spektrá. Tieto procesy, ktoré prebiehajú v excitovanom stave, sú študované pomocou meraní časovo rozlíšených emisných spektier (TRES). TRES sú emisné spektrá, ktoré sú namerané v určitej krátkej chvíli po pulzovej excitácii.

Po excitácii sa molekula fluorofóru dostane do tzv. nerelaxovaného stavu a rozpúšťadlo nablízku fluorofóra sa preorientuje, čo je spôsobené tým, že fluorofór zmenil svoj dipólový moment. Túto zmenu vyvolá práve excitácia fluorofóra a je možné ju sledovať pomocou TRES. Na relaxáciu rozpúšťadla má vplyv teplota, pri nižšej teplote je relaxácia rozpúšťadla pomalšia ako emisia, pri strednej teplote sa emisia žiarenia vyskytuje práve v priebehu relaxácie. Druhým príkladom procesu, ktorý ovplyvňuje emisné spektrum, sú reakcie excitovaného stavu, ako napríklad oddelenie náboja, alebo zmena konformácie vyvolaná práve oddelením náboja.

Ako už bolo spomenuté, tieto procesy majú za následok časovo závislé rozpady, pričom intenzita rozpadu závisí od pozorovania vlnovej dĺžky. Keď je intenzita rozpadu meraná na strane emisného spektra, kde sa nachádzajú kratšie vlnové dĺžky, rozpad je rýchlejší ako rozpad celkovej emisie, pretože excitované fluorofóry sú odstránené z pozorovanej vlnovej dĺžky. Na druhej strane emisného spektra, kde sa nachádzajú dlhšie vlnové dĺžky, sú emitujúce fluorofóry už relaxované. Je nutné spomenúť, že emisia je náhodný dej, niektoré fluorofóry emitujú skôr a druhé zase neskôr. Rýchlosť vyhasnutí, čiže rýchlosť rozpadu teda predstavuje priemernú hodnotu. Fluorofóry, ktoré emitujú skôr, sa nachádzajú pri krátkych vlnových dĺžkach. Naopak, fluorofóry pri dlhých vlnových dĺžkach emitujú neskoršie.



Obrázok 6: Emisné spektrum – **A:** emisné spektrum zaznamenané okamžite po excitácii, **B:** emisné spektrum zaznamenané neskôr (relaxované molekuly), modrá – nerelaxovaná molekula, červená- relaxovaná molekula , zelená – posun [5]

Tento proces je ilustrovaný na obrázku č. 6 keď by emisné spektrum bolo zaznamenané okamžite po excitácii ($t = 1$ ns). Výsledkom by tak bola nerelaxovaná emisia. Napriek tomu, ak by spektrum bolo sledované neskoršie ($t = 3$ ns), viac molekúl by relaxovalo pri dlhších vlnových dĺžkach, čiže celé spektrum by sa posunulo časom k dlhším vlnovým dĺžkam. V medzičase ($t = 2$ ns) sa dá pozorovať emisia v oboch stavoch. Čo je typické, emisné spektrá by boli širšie kvôli emisii oboch foriem fluorofóru. Tieto spektrá, reprezentujúce odlišné časy po excitácii, sa volajú časovo rozlíšené emisné spektrá. Stanoviť TRES je technicky veľkou výzvou a molekulová interpretácia je rovnako zložitá [5].

2.4.3.1 Časovo rozlíšené emisné spektrá a TCSPC

Okrem iných spôsobov, aj pomocou metódy TCSPC sa dá získať TRES. Metóda časovo korelačného čítania fotónov dovoľuje získať záznam fotónov prichádzajúcich v krátkom časovom intervale. V tomto prípade sa dajú zvoliť výstupné impulzy z TAC, aby hodnoty napätia boli v obmedzenom rozsahu, a tento rozsah potom určuje časové okno, ktoré je pozorované. Toto emisné spektrum je potom zaznamenané pomocou monochromátora. Táto metóda je neefektívna, a preto sa vo veľkej miere nepoužíva.

Častejší spôsob zaznamenania TRES je nepriamou metódou. Procedúra sa začína meraním časovo rozlíšených rozpadov na viacerých vlnových dĺžkach spektra, keďže intenzita rozpadu je závislá od vlnovej dĺžky. Pri kalkulácii TRES sú intenzity rozpadu zvyčajne analyzované z hľadiska multi-exponenciálneho modelu

$$I(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{\left(\frac{-t}{\tau_i(\lambda)}\right)}, \quad (8)$$

kde $I(\lambda, t)$ je intenzita rozpadu pri rôznych vlnových dĺžkach, $\alpha_i(\lambda)$ je pre-exponenciálny faktor, $\tau_i(\lambda)$ je čas rozpadu.

Cieľom je získať parametrizovanú formu pre intenzitu rozpadu, ktorá je potom použitá pre obnovu TRES. Aby sa dalo získať TRES, je nutné vypočítať tzv. normalizovanú intenzitu, aby časovo integrované intenzity pri každej vlnovej dĺžke boli rovné stacionárnej (steady-state) intenzite vlnovej dĺžky. Dostaneme výraz:

$$H(\lambda) = \frac{I_{ss}(\lambda)}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}, \quad (9)$$

kde $H(\lambda)$ reprezentuje novú sadu intenzity rozpadu, $I_{ss}(\lambda)$ je intenzita stacionárnej fluorescencie. Ďalej platí, že normalizovaná intenzita je rovná súčinu $H(\lambda)$ a $I(\lambda, t)$:

$$I'(\lambda, t) = H(\lambda)I(\lambda, t), \quad (10)$$

z čoho sa dá odvodiť vzorec pre výpočet TRES následne po excitácii pulzom, v ľubovoľnom čase (t):

$$I'(\lambda, t) = I_{ss}(\lambda) \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{\left(\frac{-t}{\tau_i(\lambda)}\right)}}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}. \quad (11)$$

Výhodou tejto procedúry je, že normalizované hodnoty $I'(\lambda, t)$ sú skutočne funkciou impulznej odozvy. Skreslene sú korigované v dôsledku konvolúcie s funkciou odozvy prístroja. Časová závislosť spektrálnych posunov a tvar TRES sú potom použité na stanovenie rýchlosti relaxácie a na určovanie charakteru relaxačného procesu [5].

2.5 Asociatívne koloidy

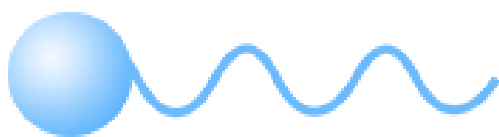
Asociatívne alebo micelárne koloidy sú veľmi stabilné lyofilné sústavy, ktoré vznikli samovoľne vratnou asociáciou z nízkomolekulárnych pravých roztokov nazývaných povrchovo aktívne látky (PAL). Takto vzniknuté polymolekulové útvary sa nazývajú micely. Agregácia, ktorá vedie k tvorbe miciel, prebieha v pomerne úzkom rozmedzí koncentrácie. Kritická micelárna koncentrácia (CMC podľa Critical Micelle Concentration) definuje spodnú hranicu, pri ktorej už prebieha agregácia. Od jednofázovej sústavy – pravého roztoku sa odlišujú v tom, že micely ako samostatná fáza sú citlivé nielen na zmeny koncentrácie, ale aj teploty a pH prostredia. Samovoľne sa koncentrujú na fázovom rozhraní, lebo takto sa dostanú do stavu s termodynamicky nižšou energiou a medzifázové povrchové napätie sa znižuje [16, 17, 18].

Asociatívne koloidy predstavujú sústavy prechodné medzi fázovými a molekulovými koloidmi. Patria medzi vratné (reverzibilné) systémy. Typickým predstaviteľom asociatívnych (micelárnych) koloidov sú micelárne disperzie syntetických zmáčadiel alebo surfaktantov či tenzidov. Ďalej sem radíme mydlá, triesloviny, farbivá a ďalšie prírodné látky. Väčšina z nich je rozpustná vo vode [18].

2.5.1 Vplyv štruktúry molekuly povrchovo aktívnej látky na adsorpciu a štruktúra tenzidov

Molekula niektorých nízkomolekulových látok sa skladá z hydrofóbnej (uhl'ovodíkový radikál) a hydrofilnej (polárna skupina) časti. Tieto molekuly majú dvojité tzv. difilný charakter. Tieto účinné povrchovo aktívne látky sú označené ako amfifilné látky. Molekuly amfifilných látok v rozpúšťadle sa budú v povrchu orientovať. Polárna skupina má väčšiu afinitu k polárnemu rozpúšťadlu, kým nepolárne uhl'ovodíkové reťazce sa stočia do nepolárneho prostredia.

Podľa amfifilného charakteru príslušných molekúl sú tieto povrchovo aktívne látky buď: vo vode nerozpustné, ale afinita ich polárnych skupín k povrchu vodnej fázy umožňuje tvorbu povrchových filmov, alebo vo vode rozpustné, ale hromadia sa na fázovom rozhraní a znižujú povrchové napätie niektoré z nich sa od určitej koncentrácie zhlučujú a vytvárajú častice koloidných rozmerov, pričom tieto látky obyčajne označujeme ako koloidné povrchovo aktívne látky [18].



Obrázok 7: Schematický náčrt molekuly tenzidu

Tenzidy vo vodnom prostredie taktiež majú polárnu skupinu, čiže hydrofilnú časť a nepolárnu časť, čo sa označuje ako hydrofóbná časť. Polárnu skupinu tvorí hlava a nepolárnu časť uhlíkovodíkový reťazec, „chvost“, ktorý musí obsahovať aspoň osem atómov uhlíka.

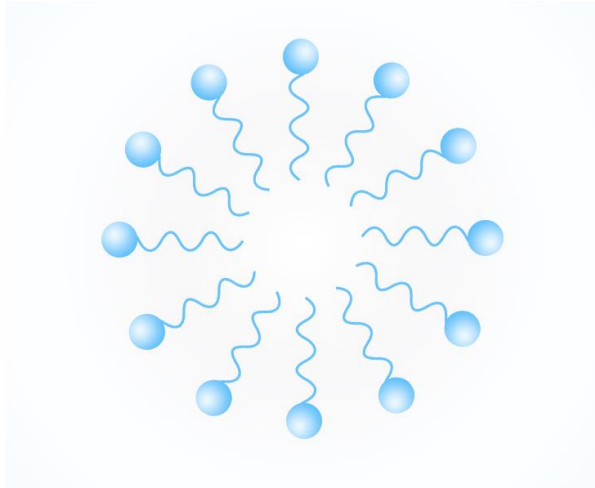
Všeobecne tenzidy môžeme deliť podľa náboja:

- Aniónové tenzidy – hydrofilnú skupinu tvorí záporná skupina. Napríklad: mastné kyseliny, alkyl-sulfonáty.
- Kationové tenzidy – hydrofilnú skupinu tvorí kladná časť. Napríklad: aminy.
- Amfoterné tenzidy – obsahujú dve hydrofilné skupiny, ich náboj závisí od pH prostredia. Napríklad: proteíny, biomolekuly.
- Neiónové tenzidy – nenosia žiadny náboj, sú neutrálne. Napríklad: étery, éstery mastných kyselín [18].

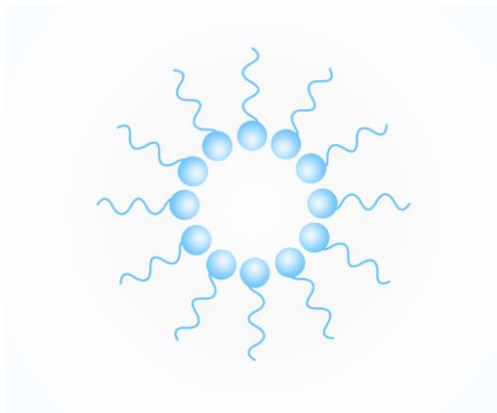
2.5.2 Vznik miciel

Amfifilné molekuly rozpustené vo vode a iónové molekuly sa hromadia na polárnom/nepolárnom fázovom rozhraní, pričom sa orientujú takým spôsobom, aby vytvorili čo najkontinuálnejší prechod medzi fázami, čím znižujú tzv. voľnú energiu fázového rozhrania (Hardy-Harkinsonov princíp). Obvykle 30 až 100 molekúl je potrebné, aby sa vytvorila jedna micela [19].

Pri vzniku micel, molekuly PAL sa orientujú svojimi hydrofilnými časťami k molekulám vody a hydrofóbné časti sa zavierajú vnútri miciel, inými slovami: hydrofilné časti smerujú do roztoku a druhá časť, hydrofóbná smeruje von z roztoku. Primárny tvar miciel pri ich vzniku je guľovitý, keď je ale dostatočná koncentrácia molekúl PAL v roztoku, dochádza k ďalšiemu spojovaniu molekúl a pôvodne guľovitá micela sa tvarovo mení a vytvorí sa cylindrický alebo laminárny útvar [20].

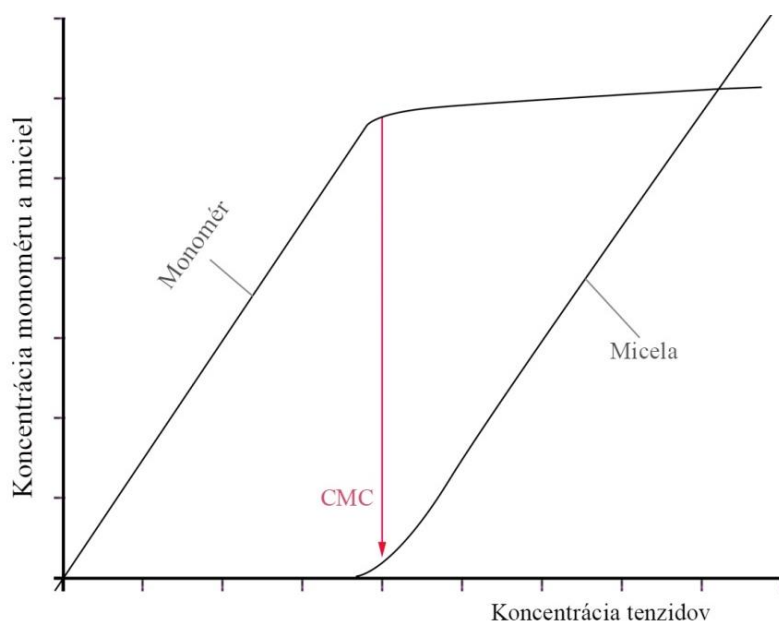


Obrázok 8: *Micela vzniknutá v polárnom prostredí*



Obrázok 9: *Reverzná micela vzniknutá v nepolárnom prostredí*

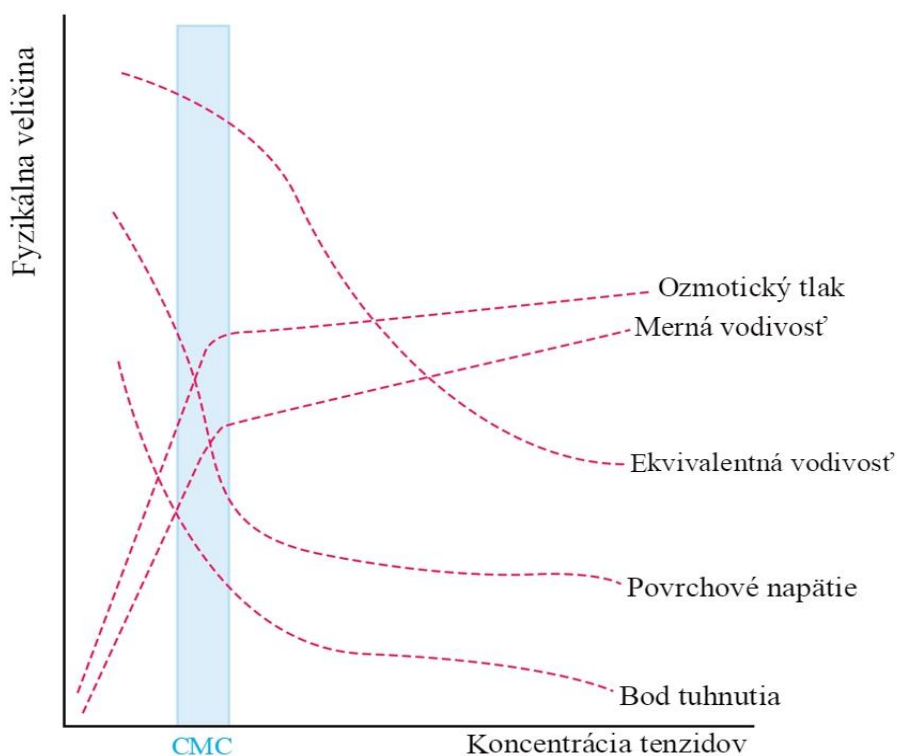
Micely môžu vzniknúť až od určitej koncentrácie PAL v roztoku. Najnižšia koncentrácia PAL, pri ktorej môžu vzniknúť micely, ak už bolo uvedené, sa označuje ako tzv. kritická micelárna koncentrácia. Aby teda vznikla micela, musí byť rozpustnosť PAL vyššia ako CMC. Niektoré PAL sú však za laboratórnej teploty málo rozpustné a koncentrácia PAL v roztoku nedosahuje hodnoty CMC. Preto je u nich nutné zvýšením teploty zvýšiť rozpustnosť nutnú pre dosiahnutie tvorby micel. Teplotu, pri ktorej rozpustnosť PAL dosiahne CMC, označujeme ako Krafftov bod T_k [19, 20, 21].



Graf 1: Zmena koncentrácie monoméru a miciel ako funkcia koncentrácií PAL. CMC - kritická micelárna koncentrácia [21]

Pri vzniku miciel sa veľmi výrazne menia niektoré fyzikálno-chemické vlastnosti roztoku PAL. Zmeny sú v podstate dané prechodom pôvodne analytickej disperzie na disperziu koloidnú.

Hodnotu CMC ovplyvňuje dĺžka uhľovodíkového reťazca, teplota, vlastnosti polárnej alebo nepolárnej časti molekuly PAL, vlastnosti rozpúšťadla látok, ktoré sú v roztoku rozpustené, a anorganické elektrolyty, ktoré sú prítomné v roztoku.



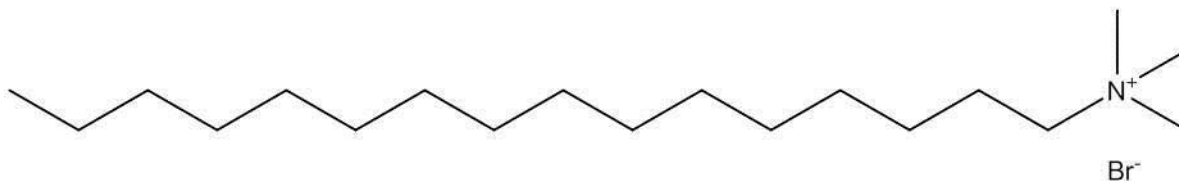
Graf 2: Závislosť fyzikálno-chemických vlastností PAL od koncentrácie tenzidov [22]

Napríklad rozpustnosť iónových tenzidov s rastúcou teplotou neustále rastie, pred dosiahnutím Krafftovho bodu len v malej miere, po bode T_k prudko narastie. S rastúcou teplotou neiónové tenzidy tvoria vo vodnom prostredí pomerne veľké micely, po dosiahnutí tzv. *Cloud Point*, rozpustnosť sa znižuje, roztok sa zakaľuje, nastane separácia fázou. Hodnota CMC tiež závisí od teploty. Asociatívna náchylnosť iónových tenzidov sa s rastúcou teplotou znižuje. Hodnota CMC neiónových tenzidov s rastúcou teplotou sa vždy znižuje [21, 22].

Platí, že s rastúcou dĺžkou uhľovodíkového reťazca hodnota CMC klesá. Zvyšujúca sa koncentrácia elektrolytov v prípade iónových PAL spôsobuje, že hodnota CMC sa znižuje. Dôvodom je tienenie repulzie medzi nabitými hlavami molekúl PAL [16, 21].

2.5.2.1 CTAB

CTAB, čiže cetyltrimethylammonium bromid, patrí medzi kationtové tenzidy. Ako každý tenzid, CTAB je schopný tvoriť vo vode micely, často je tento tenzid využívaný pri tvorbe nanočastíc, napríklad zlatých nanočastíc. Má sterilizujúce účinky, ktoré spôsobuje centrimoniový kation. Niektoré kozmetické produkty obsahujú centimonium bromid, napríklad kondicionéry na vlasy. Štruktúra CTAB je schematicky znázornená na obrázku [23, 24].



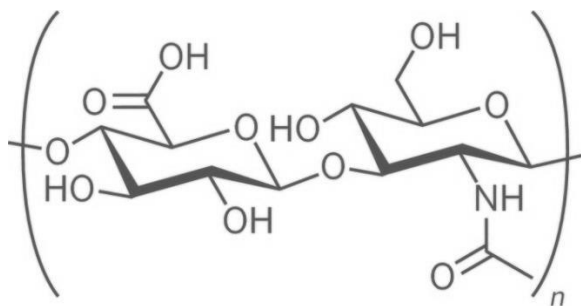
Obrázok 10: Schematicky znázornená molekula CTAB

2.6 Kyselina hyaluronová

2.6.1 Všeobecná charakteristika

Kyselina hyaluronová alebo tiež hyaluronan (Hy) je všadeprítomná zlúčenina, prítomná vo vysokej koncentrácii v koži, v kĺboch alebo taktiež v očnej rohovke [25]. Táto látka je komponentom extracelulárnej matrixu. Tento biopolymér bol popísaný v roku 1934 Karlom Meyerom a Johnom Palmerom. Prvýkrát bola kyselina hyaluronová získaná izoláciou z *corpua vitreum* (sklovca) hovädzieho dobytky.

Všeobecne má veľmi vysokú molekulovú hmotnosť, ale môže existovať aj ako malé fragmenty alebo oligosacharidy. Zvyčajne je hyaluronan prítomný *in vivo* ako polyanión, a nie vo forme protonovanej kyseliny [26]. Hyaluronan má lineárnu, nerozvetvenú štruktúru, ktorá sa skladá z opakujúcej sa disacharidickej podjednotky. Tento disacharid je tvorený pomocou N-acetyl-D-glukosaminu a z kyseliny glukoronovej. Tieto látky sú v molekule hyaluronanu spojené β -1,4 glykosidickou väzbou. Disacharidické podjednotky spojí β -1,3 glykosidická väzba. Hyaluronan je energeticky veľmi stabilná látka, kvôli stereochemii jej disacharidov. Väčšie molekulové skupiny v sacharidoch sú priestorovo výhodnejšie usporiadané (rovníková pozícia), malé atómy ako je vodík sú zase v axiálnej polohe čo je priestorovo menej výhodná poloha [25].



Obrázok 11: Štruktúra kyseliny hyaluronovej

Molekulu sa dá jednoducho rozpustiť vo vode, takto hyaluronan vytvára gél, ktorý sa správa ako mazadlo, adsorbuje vodu, čo mu zabezpečuje hygroskopické a homeostatické vlastnosti. Najbežnejší spôsob ako získať hyaluronan je izolácia z hrebeňa kohúta, zo sklovca zvierat, z pupočnej šnúry, ale taktiež sa dá získať aj z baktérie, ako napríklad *Streptococcus zooepidemicus*, ktorý je schopný vytvoriť tento biopolymer. Z biologického hľadiska je hyaluronan syntetizovaný vo vnútornej časti bunkovej membrány. Mimo bunkovej membrány môže Hy tvoriť komplexy s proteínmi. Má výhodné vlastnosti, ako napríklad biodegradabilita, biokompatibilita, biovstrebávanie [25, 27].

2.1.1 Aplikácia kyseliny hyaluronovej

Jedna z najčastejších aplikácií kyseliny hyaluronovej je vo forme zlúčeniny na liečbu *osteoarthritis*, avšak táto kyselina sa tiež veľmi často používa ako *ophthalmo* zlúčenina [25]. Hyaluronan je intracelulárny komponent spojivového tkaniva, kde plní dôležitú rolu v bunkovej diferenciácii, vo vývoji bunky alebo taktiež funguje ako lubrikant. Tieto vlastnosti sú využívané pri tvorbe lešenia (tkanivové inžinierstvo). Často sa hyaluronan využíva pri výrobe hydrogéllov. Urýchľuje regeneráciu poškodenej kože, používa sa pri pokrytí rán [26].

V poslednej dobe sa využívajú polyméry hyaluronanu pri cielej štúdií dodávania liečiv. Partnerské molekuly ako izopopylakrylamid, kyselina polyakrylová, kyselina algininová alebo celulóza a ich kombinácia s kyselinou hyaluronovou môže spôsobiť tvorbu tzv. farmakokinetických látok. Tieto látky sa potom aplikujú pri transporte liečiv ako napríklad štíty rohovky vyrobené z Hy *in vitro* a *in vivo* ktoré preukázali predĺžené a kontinuálne dodávanie steroidov.

Ďalšia relatívne veľká oblasť aplikácie kyseliny hyaluronovej je jej využitie ako vizkozitné činidlo. V pľúcach umožňuje hladký prechod od vysokej do nízkej viskozity, čím udržuje alveolárnu priechodnosť. Nedonesené dočatá narodené s chorobami dýchacieho traktu majú zvýšenú Hy úroveň, čo môže byť redukované pomocou materského steroidu, a tým sa znižuje rozvoj syndrómu NRDS (syndróm dychovej tiesne novorodenca). Pri indukovanom poškodení pľúc sa tiež zvyšujú Hy úrovne, vývoj pľúcneho edému môže byť zastavený pri aplikácii hyaluronidázy alebo iných steroidov.

Hyaluronan konzervuje terapeutické zníženie vnútroočného tlaku. V gélovej forme má značné využitie pri zabránení vysychania rohovky, a to pri mnohých očných procedúrach. Taktiež sa kyselina hyaluronová používa pri liečbe syndrómu suchého oka či ako nosič

antibiotík do očí. Gél zabraňuje slzám, aby vymyli liek z oka, vďaka čomu sa antibiotiká uvoľňujú postupne a dlhšie [26, 27].

2.1.2 Interakcia medzi hyaluronanom a kationovými tenzidmi

Ako už bolo spomínané, hyaluronan *in vivo* sa objavuje ako polyanión a je rozpustný vo vode. Tieto vlastnosti spôsobia, že hyaluronan sa interaguje s kladne nabitými tenzidmi. Tieto silné interakcie sa uskutočňujú vďaka hydrofóbnym a elektrostatistickým interakciám, čiže záporne nabitý polymér reaguje s opačne nabitými tenzidmi.

Keď pridáme k roztoku hyaluronanu optimálne množstvo kladne nabitého tenzidu, dôjde k agregáčnemu procesu, jeho výsledkom sú malé útvary, tzv. minimicely, ktoré sú naviazané na reťazci hyaluronanu. Optimálna koncentrácia (tiež spodná hranica), od ktorej, sa tvoria minimicely sa nazýva CAC, čiže kritická agregáčná koncentrácia [28, 29].

Sila interakcie medzi surfaktantom a opačne nabitým polyelektrolytom, v našom prípade polyanionom, sa znižuje pri zvyšujúcej sa iónovej sile. Toto je jasným znakom, že interakcie majú elektrostatickú povahu. Hyaluronový protión (keďže používame NaHy, je to Na^+) sa správa rovnako ako voľný tenzidový ión, v našom prípade je to CTA^+ , takže polyanión by nemal vykazovať žiadnu preferenciu niektorého z týchto iónov. Napriek tomu, hydrofobicita a veľkosť CTA^+ iónu spôsobuje to, že hyaluronanový polyanión preferuje tenzidový protión. Podmienka je, že jeho kontakt s vodou v okolí polyelektrolytov je znížený. Z toho vyplýva, že koncentrácia surfaktantových iónov v blízkosti polyelektrolytu je vyššia, čiže kritická micelárna koncentrácia môže byť miestami prekonalá. Micelárne agregáty takto môžu byť indukované v prítomnosti opačne nabitého polyelektrolytu, aj v prípade, keď je koncentrácia surfaktantov v celom objeme nižšia než CMC [30, 31].

Po pridaní hyaluronanu k tenzidom sa vytvorí priehľadný gél, ktorý má hydrofilnú a izotrópnu povahu. Vlastnosti gélu závisia čiastočne od molekulovej hmotnosti hyaluronanu. Všeobecne môžeme tvrdiť, že gély sú pomerne tuhé, čím väčšiu molekulovú hmotnosť má používaný hyaluronan, tým rigidnejší (tuhší) je vznikajúci gél [29, 32].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

V tejto kapitole bola venovaná pozornosť využívaniu fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 v biochemických oblastiach, meranie TRES a TCSPC. Pomocou týchto článku sa dá usúdiť vhodnosť používania tejto sondy v biotechnologických oblastiach, alebo charakterizovať jej chovanie. Je nutné dodať, že Oregon Green 488 sa zvyčajne používa ako náčinie týchto experimentu a len zriedkakedy je experiment zameraný na charakteristiku a popis fluorescenčnej sondy.

Elena Rusinova a spol. v roku 2002 publikovali vedecký článok, v ktorom porovnávali fluorescenčné charakteristiky fluorofórov Alexa 488, Oregon Green 488 a Oregon Green 514, ktoré boli konjugované s biomolekulami. Ukázali, že tieto relatívne nové fluorescenčné sondy sú vynikajúce sondy pre skúmanie termodynamiky reakcie typu proteín–proteín a proteín–nukleová kyselina pomocou fluorescenčnej anizotropie. Na rozdiel od fluoresceínu, emisia týchto fluorescenčných sond má minimálnu pH závislosť, blízko neutralite a sú významne menej náchylné na *photobleaching*. V článku sú porovnávané dáta získané pomocou stacionárnej a časovo rozlíšenej fluorescenčnej anizotropie, keďže dva proteíny s rôznou veľkosťou sa vzájomne interagujú pri asociácii transkripčných faktorov s DNA oligonukleotidom obsahujúcim jedno špecifické väzbové miesto. Teplotná závislosť fluorescenčnej doby života, efekty ovplyvňujúce molekulovou veľkosť a pohyb sondy boli skúmané pomocou ustálenej anizotropie.

Za účelom označovania proteínov a DNA so sondou sa používali rôzne kity/linkery. Aby sa redukoval segmentovaný pohyb sondy, bol vygenerovaný kratší linker medzi fluorescenčnou sondou a DNA molekulou. Nereagovaná sonda bola odstránená etanolom. Vyššia účinnosť označovania bola získaná pri používaní sondy s koncentráciou 20 mM. Časovo rozlíšené fluorescenčné dáta boli získané pomocou metódy TCSPC.

K určeniu maxima zmeny anizotropie, ktorá sa môže objaviť počas viazanie OG488 na biomolekulu, bola nameraná limitná anizotropia fluorescenčnej sondy v 100% glycerolu. Limitná anizotropia bola stanovená blízko k 0,4, čo naznačuje pomalý molekulový pohyb v roztoku. Doba života sondy definuje aj zmeny v pohybe, napríklad keď fluorofór má dobu života 4 ns, a jeho limitná anizotropia je 0,4, je pravdepodobne imobilný. Dĺžka a flexibilita kovalentnej väzby, ktorá sa vytvorí medzi sondou a makromolekulou, ako aj tendencia sondy interagovať s makromolekulou sú dôležité úvahy, pretože tieto vlastnosti determinujú obmedzenie lokálnych pohybov. Doba života OG488 bola stanovená na 3,8 ns, keď sonda bola konjugovaná proteínom. 3,7 ns bola doba života, keď Oregon Green 488 bol súčasťou proteínového komplexu. Oba dva namerané časy sú blízko k 4 ns, z čoho môžeme usúdiť, že sonda bola v roztoku nepohyblivá.

Na stanovenie tepelnej závislosti doby života sondy bol skúmaný pokles intenzity fluorofóra v rozsahu 5–40 °C. Bol dokázaný, že fluorescenčná doba života OG488 je v podstate nezávislá od teploty (pri biologicky dôležitých teplotách, nie v extrémnych). Keby bola pozorovaná určitá zmena intenzity fluorescencie vplyvom zmeny teploty, to by znamenalo, že reakcia medzi fluorescenčnou sondou a proteínom alebo nukleovou kyselinou je závislá od teploty [33].

Angel Orte a spol. v roku 2004 zverejnili vedecký článok v časopisu *The Journal of Physical Chemistry A*. V článku študovali absorpčné a emisné spektrá fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 a prítomnosť protón vymeňujúce reakcie v excitovanom stave. V posledných rokoch vedec Angel Orte a spol. skúmali protón vymeňujúce reakcie fluoresceína, ktoré sa odohrávajú v excitovanom stave a vplyv vhodných protón darcov (donorov) a príjemcov (akceptorov), ktoré podporujú reakcie týchto typoch. Protón transferujúce reakcie v excitovaných stavov znateľne ovplyvňujú fluorescenčné výsledky týchto fluorofórov. Pomocou stacionárnej fluorescencie vedci dokázali, že tlmivé roztoky, ktoré majú acetátovú povahu, podporujú protón transferové reakcie medzi neutrálnym, monoaniónovým a dianiónovým stavom sondy OG488. Časový priebeh excitovaného stavu bol charakterizovaný pomocou časovo-rozlišených fluorescenčných meraní.

Oregon Green 488 vykazuje protón vymeňujúce reakcie počas časových poklesov excitovaného času. Niektoré z týchto reakcií sa odohrávajú spontánne, niektoré potrebujú prítomnosť vhodných protón darcov alebo príjemcov pri dostačujúcej vysokej koncentrácii. V týchto prípadoch je najmenšie množstvo fluorescenčných monoaniónov premenené na dianiónovú formu. Viditeľné absorpčné spektrum OG488 bolo zaznamenané ako funkcia pH v rozmedzí 0–12. So zmenou pH boli pozorovateľné náhle zmeny pri absorpcii. Experimentálne absorpčné spektra roztokov pri rôznych pH vykazujú pH-indukované zmeny v dôsledku protónových reakcií, ktoré sa odohrávajú v základnom stave. Bolo dokázané, že OG488 môže mať vo vodnom roztoku štyri viditeľné prototrópne formy, ktoré vykazujú absorpciu: kationová forma, neutrálna forma, monoaniónová forma a dianiónová forma. Tieto formy majú aj odlišné molárne absorpčné koeficienty v roztoku.

Stacionárne fluorescenčné spektrá boli zaznamenané pri excitácii v 424 nm a 460 nm v širokom rozmedzí pH. Dva odlišné spektrálne profily boli detegované od pH 3,44 do 12. Pri veľmi vysokej pH je prítomná len dianiónová forma, ktorá má kvantový výťažok blízko jednej. Tento emisný druh mal maximum v bode 515 nm, druhý emisný druh, čiže monoaniónová forma mala maximum emisie v bode 513 nm. V pH rozmedzí 0–5 je tiež prítomná neutrálna, základná (elektrónová) forma sondy.

Stacionárna fluorescencia potvrdila, že so zmenou pH kationová forma excitovanej OG488 sa zmenila na kyselinovú formu (*photoacid form*) a hodnota pK_a medzi neutrálnymi a monoaniónovými formami sa znižovala o 1 jednotku. Naopak, dianiónová forma sa nezúčastňuje v ESPT (Excited-State Proton Transfer) reakcie, čiže nedochádza k presunu protónov v excitovanom stave. V súhrne, vo vodnom roztoku všetky excitované kationové molekuly prešli deprotonizáciou, ESPT reakcia sa neodohráva medzi monoaniónovým a dianiónovým stavom OG488, ale ESPT medzi monoaniónovým a neutrálnym stavom je prítomná. V pufrovom roztoku bol dokázané, že s rastúcou koncentráciou pufru sa zvyšuje príspevok dianiónovej formy OG488 [34].

Vedci **Jung Seok Lee** a **Jan Feijen** v roku 2011 zverejnili prácu pod názvom Biodegradabilné polymersomy ako nosiče a uvoľňovacie systémy pre paclitaxel, pričom ako modelová zlúčenina bol použitý paclitaxel značený fluorescenčnou sondou OG488. Počas

experimentu dokázali, že fluorescenčná sonda Oregon Green 488 je schopná tvoriť komplex so zlúčeninou paclitaxel, ľahko sa viaže na molekulu paclitaxela. Paclitaxel je liek, ktorý sa používa na liečbu mnohých typov rakovinových ochorení ako je napríklad rakovina prsníka alebo rakovina pľúc. Oregon Green 488 slúži najmä na lokalizáciu liečiva vnútri polymersomov pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Polymersomy sú v podstate umele vyrobené membránové vrecúška ktoré sú schopné enkapsulovať rôzne zlúčeniny, napríklad lieky, enzýmy, proteíny, DNA alebo RNA fragmenty. Majú podobnú štruktúru ako lipozómy, ale polymersomy sú stabilnejšie a ich priepustnosť je redukovaná.

Oregon Green 488 sa viaže na hydroxylovú skupinu paclitaxela. Vytvorený komplex sa zabuduje do membrány polymersomov, presnejšie je súčasťou hlavne hydrofóbnej časti membrány. Bolo dokazené, že tento zabudovaný komplex má vysoký obsah účinnej látky, ktorá sa časom postupne uvoľňuje do prostredia. V súhrne, vedci zistili, že biodegradabilné polymersomy sú dobré nanonosiče lipofilných liečiv ako je paclitaxel. Oregon Green 488 je vhodná fluorescenčná sonda, ktorá vykazuje dostatočnú intenzitu fluorescencie počas celého merania, je schopný vytvoriť komplex s lipofilnou zlúčeninou paclitaxela a zabudovať sa do membrány polymersomov [35].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| <i>Oregon Green 488</i> | 2',7'-difluorfluoresceín | Lifetechnologies, Thermo Fisher Scientific Inc. č. šarže: 1298315 |
| <i>CTAB</i> | cetyltrimethylammonium bromid | Sigma-Aldrich, Co. č. šarže: SLBJ9504V |
| <i>NaCl</i> | chlorid sodný | Lach-Ner, s.r.o. PP/2009/66278 |
| <i>Hyaluronan</i> | sodný, natívny M = 750–1000 kDa | Contipro Biotech s.r.o. č. šarže: 214-7794 |
| <i>Voda čistená prístrojom PURELAB-flex (Mili Q)</i> | Milipore academic | |

4.2 Prístroje a vybavenie

4.2.1 Fluorolog – Luminiscenčný spektrometer

Prístroj od firmy Horiba Scientific na skúmanie parametrov fluorescencie. Excitačným zdrojom prístroja Fluorolog je xenónová lampa (450 W), jej excitačný rozsah je 200–850 nm. Systém obsahuje viac detektorov: 2 PMT, PbS, InGaAs (LN₂), ktoré umožňujú detegovať fluorescenciu v rozsahu 220–2500 nm. Dva dvojité monochromátory (Czerny-Turner) vyberajú úzku časť spektra, ktorého vlnovú dĺžku možno meniť. Spektrograf registruje spektrá elektromagnetického žiarenia. Ďalej systém umožňuje detegovať fluorescenciu vo dvoch usporiadaniach: pravouhlé a *Front Face*, ktorý umožňuje prácu aj s pevnými alebo zakalenými látkami.

Pre štúdium správania fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 bola potreba merať stacionárnu fluorescenciu (kapitola 2.4.1), preto prístroj Fluorolog bol použitý v pravouhlom usporiadaní.

4.2.2 Fluorocube – Spektrofluorimeter na princípu TCSPC

Prístroj od firmy Horiba Scientific pracuje na princípe TCSPC. Ako zdroj žiarenia obsahuje sadu NanoLED s rôznymi vlnovými dĺžkami, pracuje s pracovnou frekvenciou 1 MHz v rozsahu od 260 nm do 740 nm. Ďalej prístroj obsahuje emisný monochromátor typu Seya-Namioka a TBX-04 pikosekundový detektor, ktorý pracuje v rozsahu 185–650 nm. Detektor umožňuje merať s rozlíšením 20 ps/kanál. Systém Fluorocube umožňuje merať dobu života daného fluorofóru od 10⁻¹⁰–10⁻⁶ s, umožňuje merať aj kvapalnej, aj pevnej vzorky. Kvapalné vzorky môžu byť počas meranie premiešané. Kombináciou systémov Fluorolog a Fluorocube je možno merať doby života excitovaného stavu od 10⁻¹⁰–10¹ s.

4.2.3 Použité programy

| | | |
|--------------------|---|---|
| Fluorolog: | FluorEssence (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | získanie spektier ustálenej fluorescence |
| | OriginPro 8 (OriginLab Corporation) | vyhodnotenie spektier stacionárnej fluorescence |
| Fluorocube: | DataStation v2.4 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | získanie dát meraných metódou TCSPC |
| | DAS6 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | Analýza poklesu intenzity fluorescence |

4.3 Metódy

4.3.1 Príprava zásobných roztokov

Po navážaní potrebného množstva Oregon Green 488 na analytických váhach s presnosťou na štyri desatinné miesta, pevný vzor bol doplnený Mili Q vodou na celkový objem $V_{OG488} = 50$ ml. Takto nachystaný zásobný roztok bol umiestnený na magnetické miešadlo, aby sa rozpustila pevná fluorescenčná sonda. Roztok bol skladovaný pri 4 °C.

Ďalej tým istým spôsobom bol pripravený zásobný roztok NaCl; $V_{NaCl} = 500$ ml, ktorý bol skladovaný pri laboratórnej teplote.

Bol nachystaný zásobný roztok CTAB ($V_{CTAB} = 100$ ml), ako rozpúšťadlo bol používaný dopredu nachystaný roztok 0,15 M NaCl. Pripravený roztok bol miešaný 24 hodín na magnetickom miešadla a bol uchovaný pri laboratórnej teplote.

Ako posledný bol pripravený zásobný roztok hyaluronanu. Z hyaluronanu s molekulovou hmotnosťou 750–1000 kDa bol pripravený 0,5% (hm.) roztok v 0,15M NaCl. Takto nachystaný roztok bol umiestnený na trepačku 24 hodín a skladoval sa pri 4 °C.

Tabuľka 1: Súhrn – zásobné roztoky

| Zásobný roztok | Koncentrácia | Teplota skladovania |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| Oregon Green 488 vo vode | $3 \cdot 10^{-4}$ M | 4 °C |
| NaCl vo vode | 0,15 M | laboratórna |
| CTAB vo 0,15 M NaCl | $200 \cdot 10^{-6}$ M | laboratórna |
| Hy v 0,15 M NaCl | 0,5% (hm.) | 4 °C |

4.3.2 Príprava vzoriek

Boli pripravené 4 vodné roztoky s rôznou koncentráciou, ďalej bol pripravený micelárny roztok s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M a gél s rovnakou koncentráciou sondy. Všetky vzorky boli nachystané a namerané trikrát, uvedené výsledky sú priemerované.

Ako prvý krok bolo nutné zistiť optimálnu koncentráciu fluorescenčnej sondy, z toho dôvodu bol pripravený koncentračný rad zo zásobného roztoku Oregon Green 488. Ako rozpúšťadlo sa používalo roztok 0,15 M NaCl.

Postup práce: do sklenených vialiek bolo napipetované potrebné množstvo fluorescenčnej sondy, rozpúšťadlo (Mili Q voda) bolo odparené pri laboratórnej teplote za zníženého tlaku. Bolo pridané potrebné množstvo zásobného roztoku 0,15 M NaCl a roztoky boli umiestnené na trepačku 24 hodín a ihneď zmerané.

Po zistení optimálnej koncentrácie, bol napipetovaný roztok Oregon Green 488 do sklenených vialiek, predchádzajúcim spôsobom bolo odparené rozpúšťadlo a bol pridaný potrebný objem zásobného roztoku $200 \cdot 10^{-6}$ M CTAB. Roztok bol 24 hodín miešaný a ihneď zmeraný.

Gélové vzorky boli pripravené v skúmavkách nasledovne: bolo napipetované potrebné množstvo (pre dosiahnutie optimálnej koncentrácie) fluorescenčnej sondy. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku, pri laboratórnej teplote. Do skúmavky bolo pridané 5 ml zásobného roztoku CTAB v 0,15 M NaCl, skúmavka bola zazátkovaná a pripravený roztok bol miešaný na trepačke 24 hodín. Ďalší deň bol do skúmavky napipetovaný 5 ml zásobného roztoku hyaluronanu v 0,15 M NaCl a vo vzorke sa nastala fázová separácia. Pripravený roztok bol uložený na trepačku a miešaný 5 dní. Počas vzniku gélu sa separovali dve fáze, vznikla horná fáza (supernatant) a dolná fáza (gél). Vzniknutý gél bol zmeraný 5 dní po pripravení, aby sa gél ustálil, a 1 mesiac po pripravení. Získané výsledky boli porovnávané, aby sa zistila potenciálna zmena v roztoku počas určitého času. Počas jedného mesiaca gél bol pevne zazátkovaný, uchovaný pri laboratórnej teplote vo tme.

Tabuľka 2: Súhrn vzoriek

| Vzorka | Koncentrácia | Čas merania |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Oregon Green 488 v 0,15 M NaCl | 10^{-6} M | 24 hodín po príprave |
| | $5 \cdot 10^{-6}$ M | 24 hodín po príprave |
| | $8 \cdot 10^{-6}$ M* | 24 hodín po príprave |
| | $2 \cdot 10^{-5}$ M | 24 hodín po príprave |
| Oregon Green 488 v CTAB v 0,15 M NaCl | $8 \cdot 10^{-6}$ M* | 24 hodín po príprave |
| Oregon Green 488 v gélu | $8 \cdot 10^{-6}$ M* | 5 dní po príprave |
| Oregon Green 488 v gélu | $8 \cdot 10^{-6}$ M* | 1 mesiac po príprave |

*Koncentrácia $8 \cdot 10^{-6}$ M bola považovaná za optimálnu koncentráciu fluorescenčnej sondy.

4.3.3 Nastavenie prístroja podľa požiadaviek

Emisné a excitačné spektrá fluorescenčnej sondy v každom prostredí boli zistené pomocou prístroja Fluorolog. Kvapalné vzorky boli merané v štandardných kremenných kyvetách, avšak meranie gélových nebolo možné takým spôsobom. Vzorky gélov boli vložené v tenké vrstve medzi dve kremenné sklá, ktoré sa umiestnili do kremenných kyviet. Tento spôsob merania je ekonomický, pretože nie je potrebné používať obrovské množstvo gély a zaisťuje, že gél počas analýzy nevyschne. Meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote, každé spektrum bolo trikrát merané a výsledky boli spriemerované. Štrbiny emisného a excitačného monochromátoru boli nastavené tak, aby intenzita fluorescencie bola v rozmedzí dobrej merateľnosti prístroja.

Tabuľka 3: Použité vlnové dĺžky emisie a excitácie v rôznych systémoch

| Skúmané prostredie | Emisia | Excitácia |
|---------------------------------|------------|------------|
| OG488 v 0,15M NaCl | 465–700 nm | 455 nm |
| | 590 nm | 390–570 nm |
| OG488 v CTAB v 0,15 M NaCl | 465–700 nm | 455 nm |
| | 590 nm | 390–570 nm |
| Oregon Green 488 v géle | 465–700 nm | 455 nm |
| | 590 nm | 390–570 nm |
| Oregon Green 488 v géle (starý) | 465–700 nm | 455 nm |
| | 590 nm | 390–570 nm |

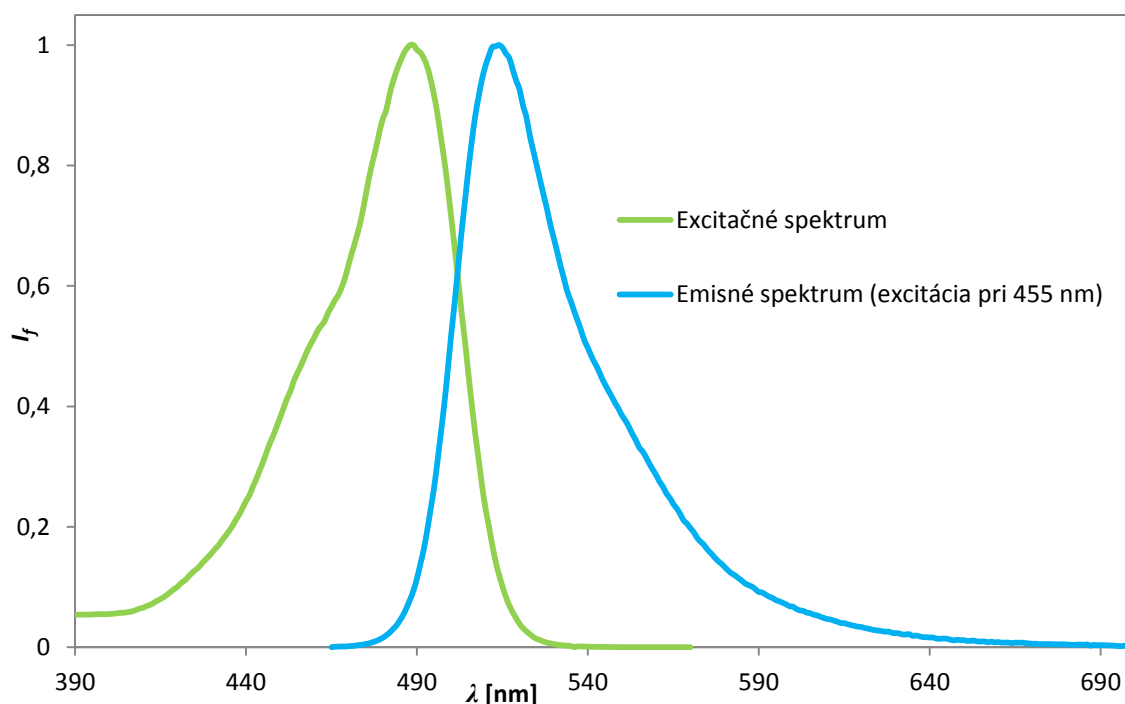
Meranie časovo-rozlišenej fluorescencie prebiehalo na prístroji Fluorocube pri laboratórnej teplote. Bola potreba pri meraní kvapalných vzorcov stanoviť signál lampy, čiže prompt pomocou koloidného kremíka (ludox), pričom emisný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku použitej nanoLED diódy.

Meranie prebiehalo v reverznom móde, bola meraná odozva prístroja pre nasledujúcu dekonvolúciu. Neutrálne filtre boli použité v prípade vysokej intenzity žiarenia. Všetky vzorky boli merané pomocou nanoLED diódy s vlnovou dĺžkou 455 nm a dĺžkou pulzu 1,2 ns. Excitačný polarizátor bol nastavený na 0°, emisný polarizátor na 54,75° (54,75° je tzv. *magický úhol*). Rozsah TAC bol nastavený na 100 ns, meškania signálu (coaxial decay) na 65 ns, synchronizačné meškание (sync. delay) na 50 ns, počet fotónov v maxime poklesu (peak preset) bol nastavený na 10 000, pričom na krajoch emisného spektra počet fotónov bol zmenený na 5000 a urobený nový prompt. Opakovacia frekvencia diódy (repetition rate) bola nastavená na 1 MHz. V kvapalných roztokoch bol pokles intenzity fluorescencie meraný od 485 nm do 700 nm s krokom 5 nm. Pokles intenzity fluorescencie v géloch bol snímaný s krokom 10 nm. Kvapalné vzorky boli merané v štandardnej kremennej kyvete, u gélových vzorov sa používala špeciálna kyveta (kyveta na pevné vzorky), ktorá s excitačným lúčom zvierá uhol 45 a minimalizuje odraz excitačného žiarenia, pretože je odklonená od zvislej osi.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

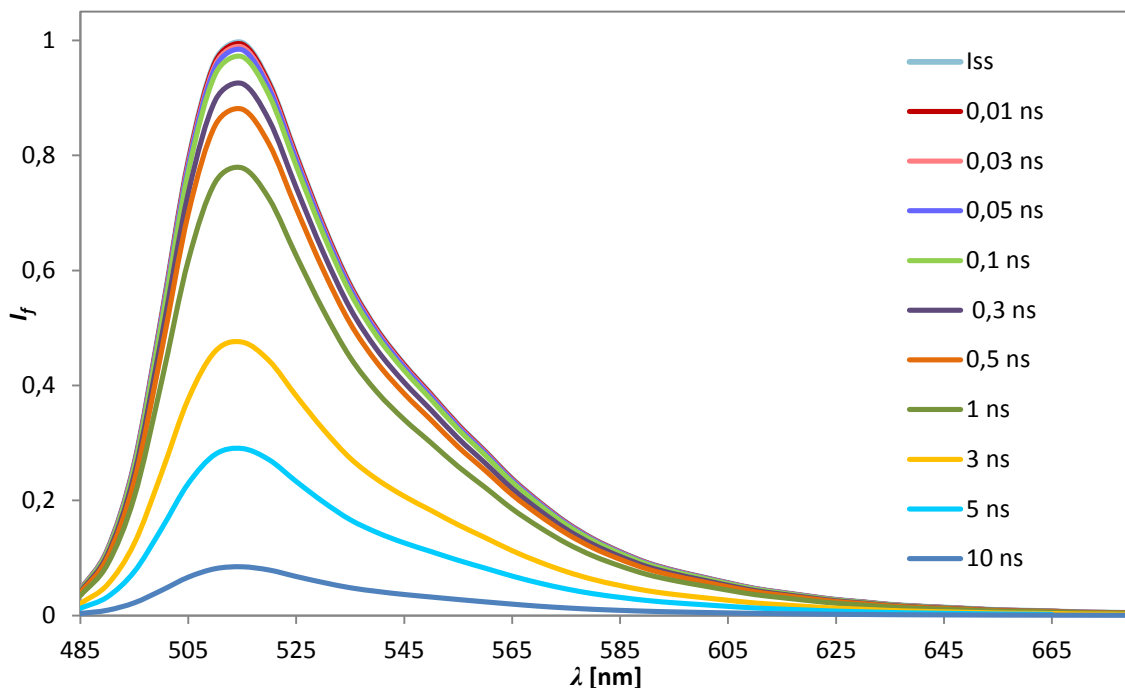
5.1.1 Oregon Green 488 vo vodnom roztoku

Vodný roztok bol nachystaný používaním Mili Q vody, NaCl a OG488. Tento vodný roztok so sondou bol pripravený vo viacerých koncentráciách: 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $8 \cdot 10^{-6}$ M. Hlavným cieľom tohto postupu bolo zistenie optimálnej koncentrácie sondy v roztoku. Pomocou stacionárnej fluorescence boli namerané excitačné a emisné spektrá vzorky, na základe obdržaných výsledkov sa usúdilo, že roztok s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M sa považuje za najvýhodnejší. Optimálna koncentrácia znamená, že pri koncentracii $8 \cdot 10^{-6}$ M sa v systéme nevznikajú nežiaduce agregáty sondy a intenzita fluorescence je dostatočná a umožňuje rýchlejší zber dát.



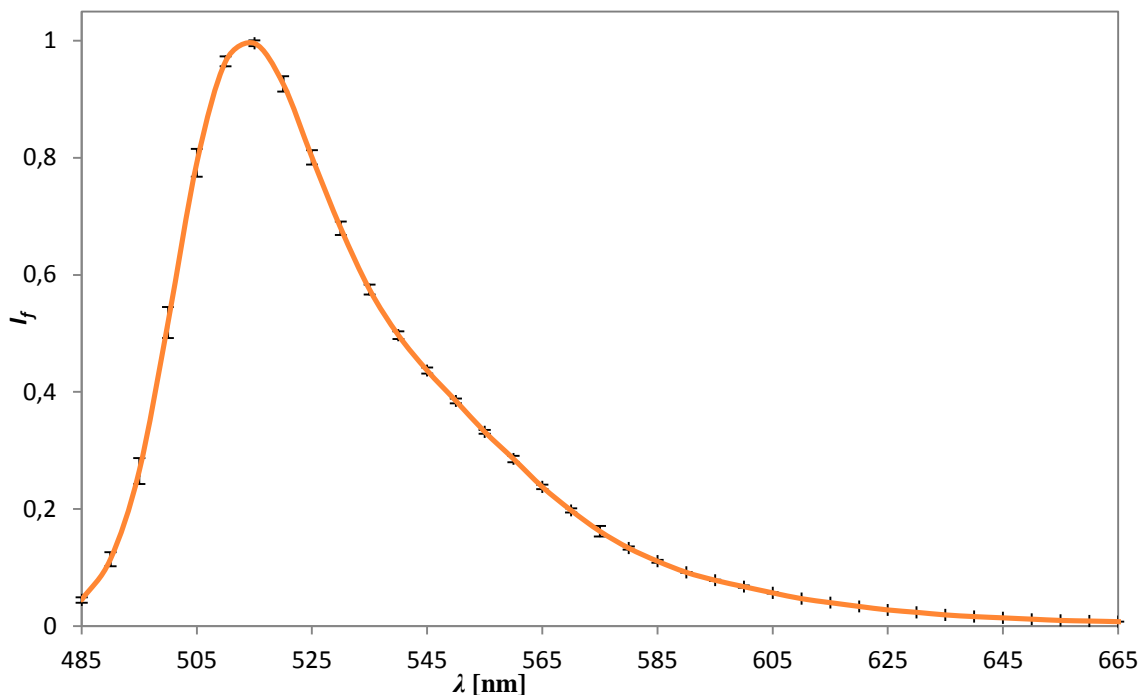
Obrázok 12: Normalizované excitačné a emisné spektra OG488 v 0,15 M NaCl s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M

Ustálená fluorescence ukázala excitačné a emisné spektrum fluorescenčnej sondy v roztoku. Maximum emisie je v bode 515 nm. Namerané emisné spektrum sa ďalej používalo na rekonštrukciu TRES.



Obrázok 13: TRES - OG488 v 0,15 M NaCl s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$

Na základe nameraných dát bola zostrojená TRES, ktorá má jeden emisný pík, a to je v bode 515 nm. Poklesy intenzity fluorescence sú uvedené s presnosťou $\pm 2,5$ nm, pretože emisné spektrum od 485 nm do 700 nm bolo namerané s krokom 5 nm. I_{ss} je intenzita fluorescence nameraná pomocou metódy stacionárnej fluorescenčnej spektroskopie. Vodné prostredie je málo viskózne, čas relaxácie rozpúšťadla nie je porovnateľná s fluorescenciou.



Obrázok 14: Dekonvolúcia emisného spektra OG488 v 0,15 M NaCl s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M

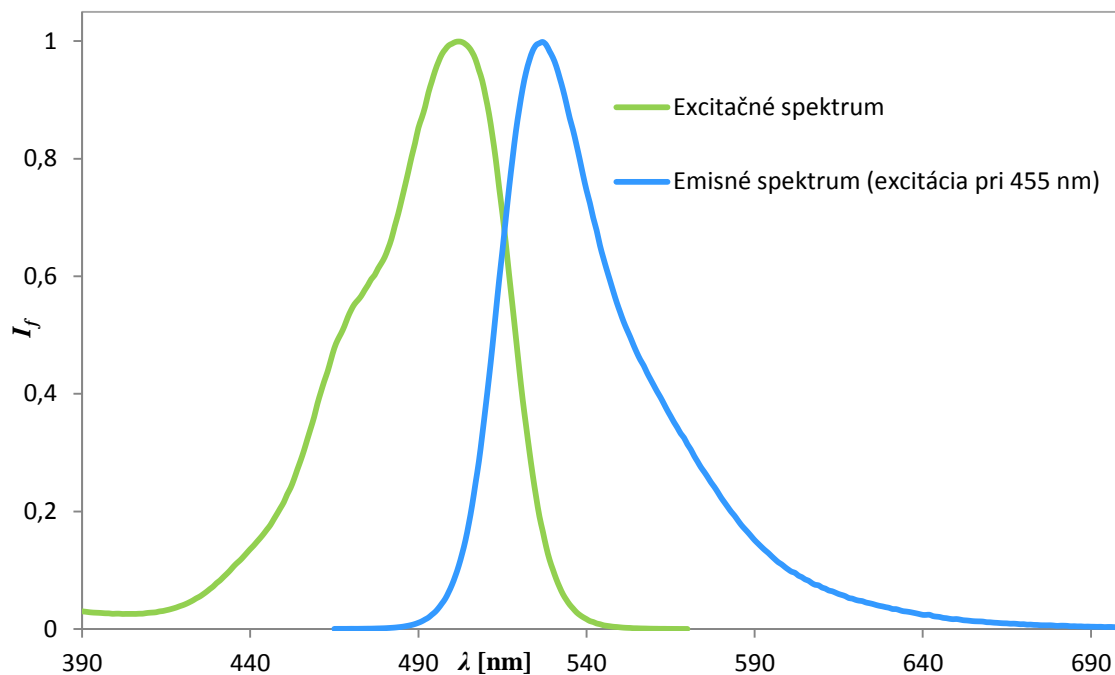
Dekonvolúcia emisného spektra potvrdila predpoklad, že Oregon Green 488 má pravdepodobne jeden emisný druh. Avšak je nutné dodať, že pri dlhších vlnových dĺžkach (570–700 nm) bol prítomný ešte jeden emisný druh sondy. Tento emisný druh mal relatívne veľmi malé zastúpenie v roztoku a objavoval sa obzvlášť nepravidelne. Dôvodom prítomnosti druhého emisného druhu môže byť to, že v roztoku došlo k zhasaniu sondy, napríklad kyslíkom, ktorý je prítomný v prostredí. Avšak najpravdepodobnejšie vysvetlenie je, že okrem neutrálnej formy, bola vo vodnom roztoku prítomná aj iná prototrópna forma sondy [34].

Doba života fluorescenčnej sondy bola stanovená na 3,8–4,06 ns. Jav, že Oregon Green 488 má len jednu dobu života vo vodnom roztoku, naznačuje, že pravdepodobne nie je schopný tvoriť diméry vo vodnom roztoku.

5.1.2 Oregon Green 488 v micelárnom roztoku

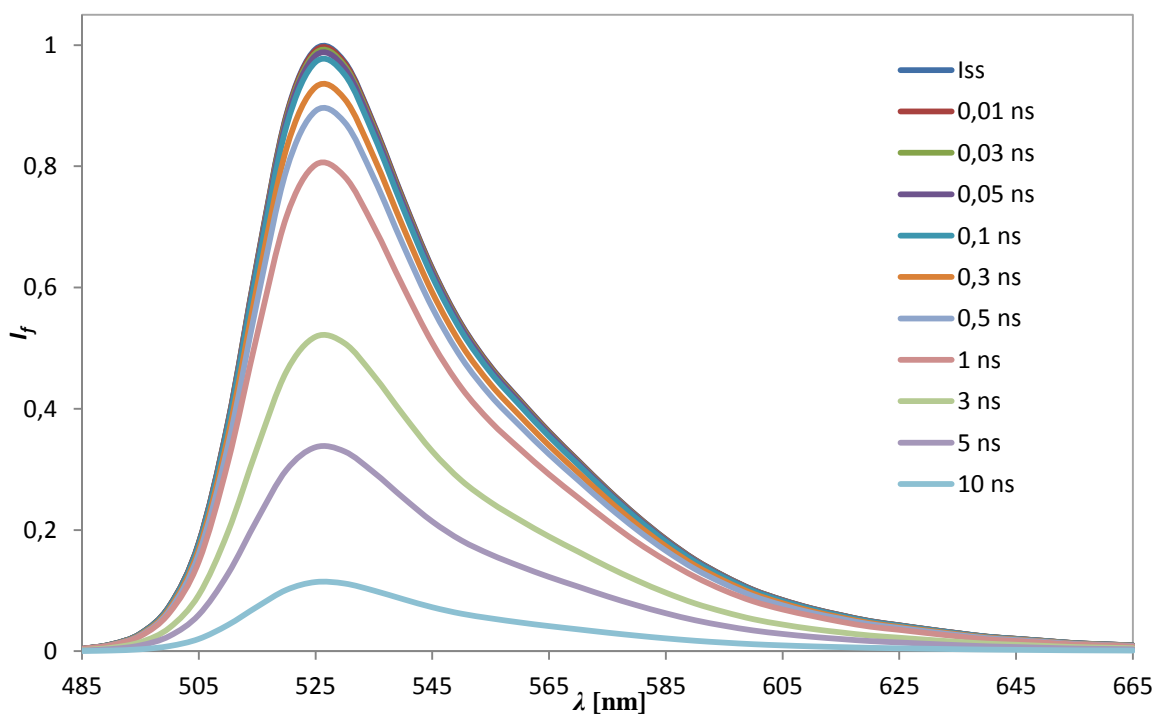
V tomto experimente bolo snímané súprávanie fluorescenčnej sondy v micelárnom systéme. Roztok CTAB ($200 \cdot 10^{-6}$ M CTAB v 0,15 M NaCl) mal koncentráciu $8 \cdot 10^{-6}$ M, táto koncentrácia bola vopred experimentálne stanovená za optimálnu koncentráciu.

Ustálená fluorescencia ukázala po excitácii pri 455 nm emisné spektrum fluorescenčnej sondy. Maximum fluorescencie bol nájdený v 525 nm. Toto emisné spektrum bolo naďalej použité pre rekonštrukcie TRES.



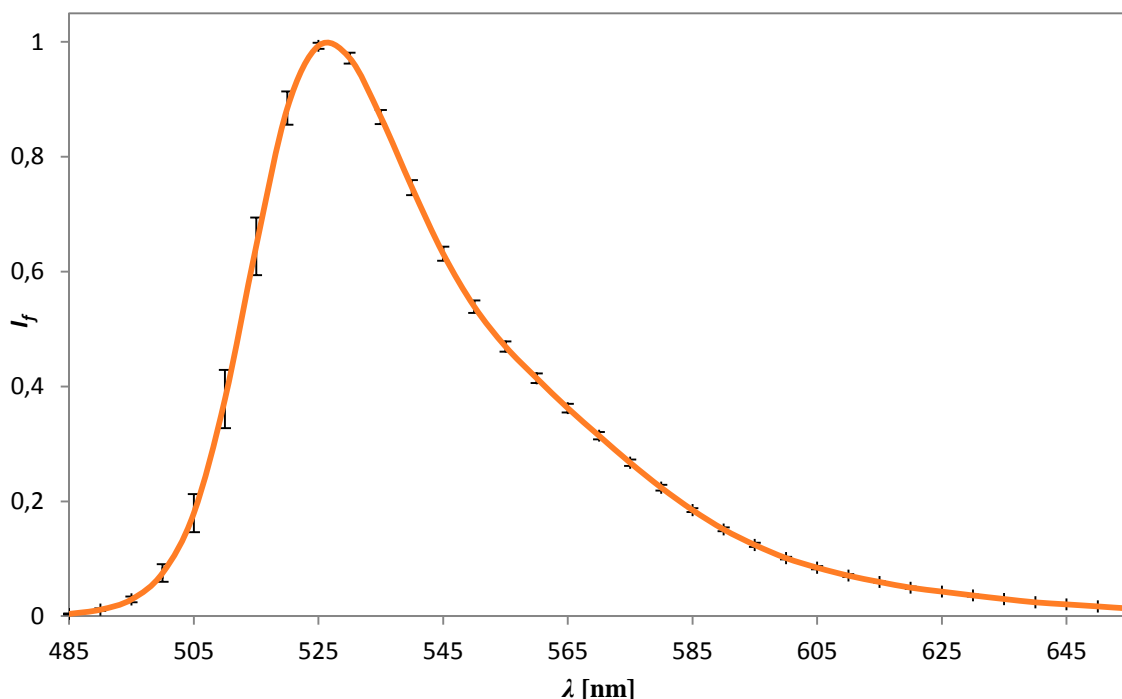
Obrázok 15: Normalizované excitačné a emisné spektrá OG 488 v $200 \cdot 10^{-6} M$ v $0,15 M NaCl$ s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$

Ďalej boli pomocou prístroja Fluorocube namerané poklesy intenzity fluorescence v čase. Na základe nameraných dát bola rekonštruovaná TRES pomocou vzťahu č. 11 vo vybraných časoch od 0,01 ns do 10 ns následne po excitácii pulzom žiarenie.



Obrázok 16: TRES – OG488 v $200 \cdot 10^{-6} M$ v $0,15 M NaCl$ s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$

TRES obsahuje len jeden emisný pík, ktorý sa objavuje v každom čase po excitácii. Na základe získaných informácií môžeme usúdiť, že v excitovanom stave sa nedochádzalo k reakcii sondy. V micelárnom roztoku nie je prostredie dostatočne viskózne na to, aby sa dalo zaznamenávať prejavy relaxácie, ktoré sa odohrávajú v roztoku príliš rýchlo. Čas relaxácie rozpúšťadla nie je porovnateľný s fluorescenciou. Je nevyhnutne dodať, že výsledky boli namerané s presnosťou $\pm 2,5$ nm z dôvodu, že dáta boli vyhodnocované s krokom 5 nm.



Obrázok 17 Dekonvolúcia emisného spektra OG488 v $200 \cdot 10^{-6}$ M CTAB v $0,15$ M NaCl s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M

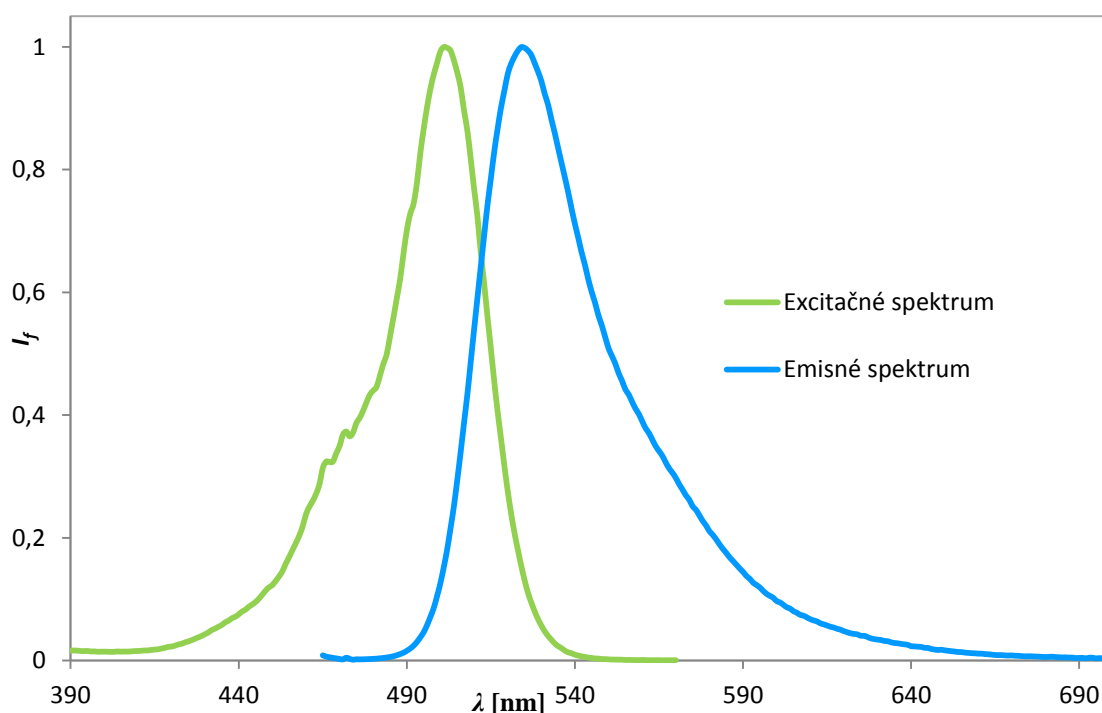
Získané poklesy intenzity fluorescencie pri jednotlivých vlnových dĺžkach s krokom 5 nm umožnili vytvoriť dekonvolúciu emisného spektra. Emisia potvrdila, že Oregon Green 488 má v micelárnom roztoku jednu dobu života. Stanovená doba života sondy sa pohybuje v rozmedzí 4,3–4,7 ns a emituje pri každej vlnovej dĺžke spektra. Tento emisný druh má maximum v bode 525 nm. Je pravdepodobné, že fluorescenčná sonda je prítomná v micelárnom roztoku v dianiónovej forme [34]. Táto dianiónová forma sondy sa priblíži ku kladne nabitým hlavám tenzidu vďaka elektrostatickým interakciám, ktoré sa odohrávajú medzi polárnou hlavou, ktorá nosí kladný náboj, a π -elektrónmi, ktoré sú prítomné kvôli molekulovej štruktúre sondy. Oregon Green 488 stráca časť svojej energie kvôli elektrostatickým interakciám, molekuly sondy sa najprv relaxujú, potom začnú deexcitovať a emitovať žiarenie. Fluorofór v micelárnom roztoku bol ustálený, nevykazoval žiadne značné zmeny, bol stabilný.

5.1.3 Oregon Green 488 v géle

V tejto časti experimentu bolo snímané správanie fluorescenčnej sondy v géle, ktorý bol vytvorený podľa popísaného postupu, Hy v 0,15 M NaCl s koncentráciou 0,5% hm. Hotová vzorka so sondou mala koncentráciu $8 \cdot 10^{-6}$ M, ktorá sa považovala za optimálnu koncentráciu. Ďalej bolo porovnané správanie fluorescenčnej sondy v čerstvom a starom géle, ktorý bol uchovaný vo tme 1 mesiac po tvorbe. Cieľom tejto časti experimentu bolo zistiť, či časom dôjde k interakcií sondy s géloom.

5.1.3.1 Oregon Green 488 v čerstvom géle

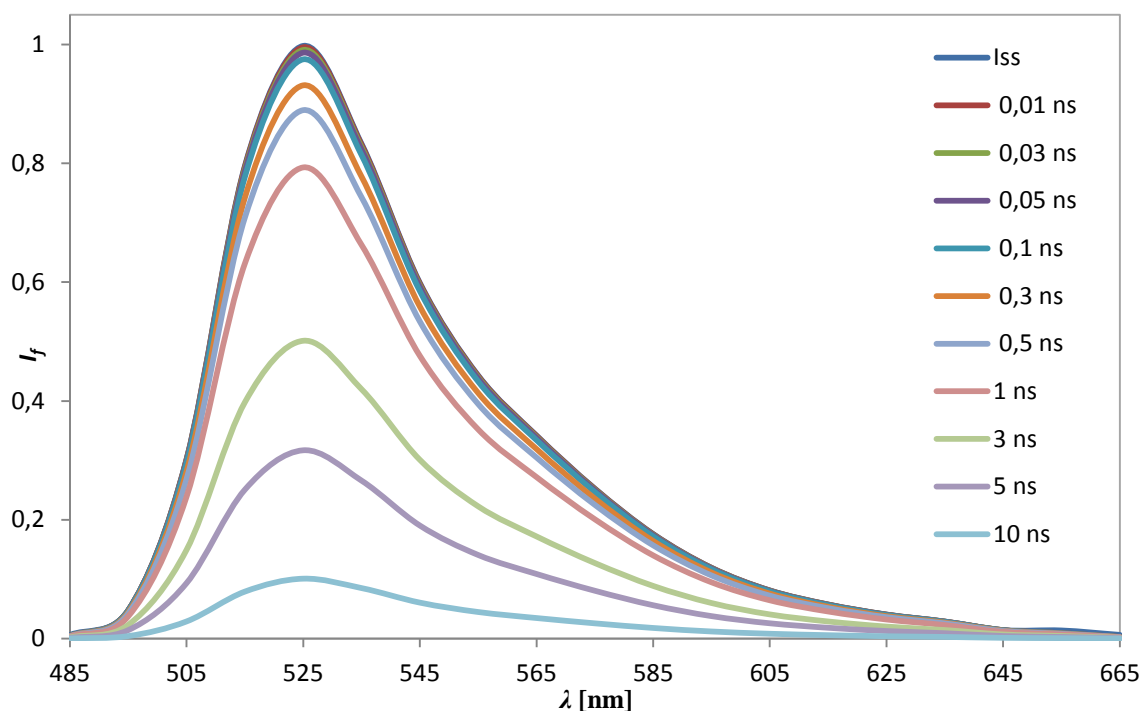
Ustálená fluorescencia ukázala emisné spektrum OG488 v géle po excitácii 455 nm. Emisné spektrum má jedno maximum v bode 525 nm, ale je nutné dodať, že spektrum bolo trikrát namerané a získané hodnoty boli priemerované.



Obrázok 18: Normalizované emisné a excitačné spektrá OG488 v géle s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6}$ M

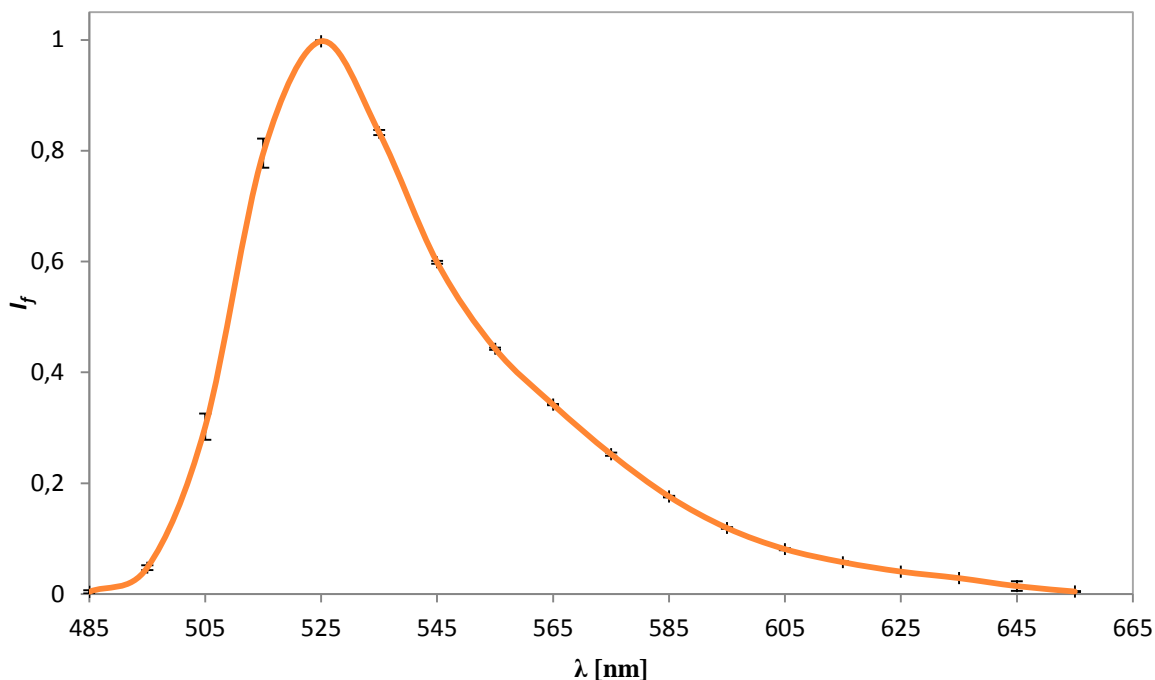
Takto získané emisné spektrum bolo ďalej použité na rekonštrukcie TRES.

Podobne ako v micelárnom roztoku, TRES ukazovala jeden pík pri 525 nm. To znamená, že maximum TRES sa vôbec neposúvalo, spektrum vykazoval len jeden pík v celom časovom intervale, z čoho môžeme odvodiť, že sonda má jeden emisný druh, ktorý je prítomný v celom emisnom spektre.



Obrázok 19: TRES - OG488 ($8 \cdot 10^{-6} M$) v čerstvom hydrogéle

Pomocou analýzy poklesu intenzity fluorescencie bolo potvrdené, že Oregon Green 488 má jeden emisný druh v géle. Je potrebné dodať, že bol nameraný jeden veľmi krátky emisný druh fluorescenčnej sondy, ktorý sa nachádzal na modrej strane emisného spektra. Tento emisný druh vykazoval krátku dobu života, radovo v pikosekundách a objavoval sa len na začiatku emisného spektra, pri vlnových dĺžkach 485–505 nm. Jeho relatívne zastúpenie bolo veľmi malé. Pravdepodobne odraz používanej lampy generoval tento emisný druh Oregona Greena 488, takže tieto údaje neboli brané do úvahy pri vyhodnocovaní. Hydrogély boli vyhodnocované s krokom 10 nm, čo spôsobuje, že uvedené údaje zahrňujú chybu ± 5 nm.



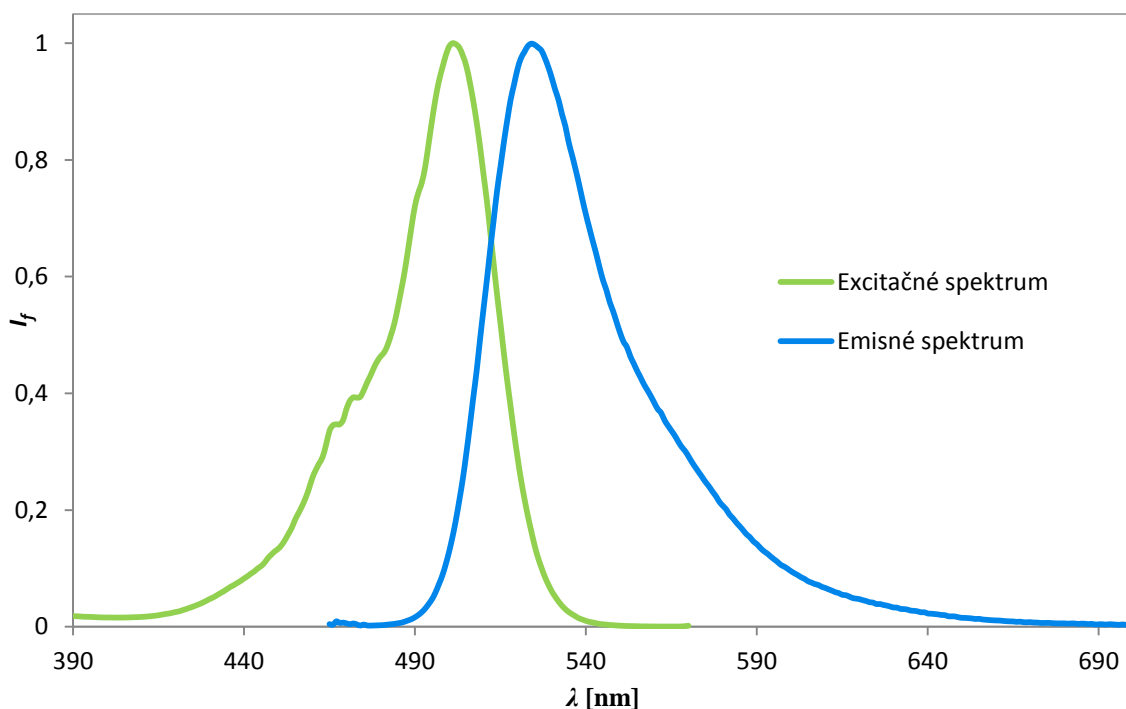
Obrázok 20: Dekonvolúcia emisného spektra OG488 ($8 \cdot 10^{-6} M$) v čerstvom hydrogéle

Doba života bola stanovená na 4,1–4,45 ns, čo je kratší čas v porovnaní s fluorescenčnou dobou života fluorofóru v micelárnom roztoku. Pravdepodobne sa vytvorená monomérna forma sondy spôsobila tento emisný druh. Tieto monoméry sa ďalej nespojili, nereagovali, a preto v roztoku dimérna forma sondy nebola prítomná. Fluorofór nezmenil svoju polohu v géle, stále sa nachádzal v blízkosti polárnych hláv, nebol solubilizovaný do vnútra micel.

5.1.3.2 Oregon Green 488 v ustálo m géle

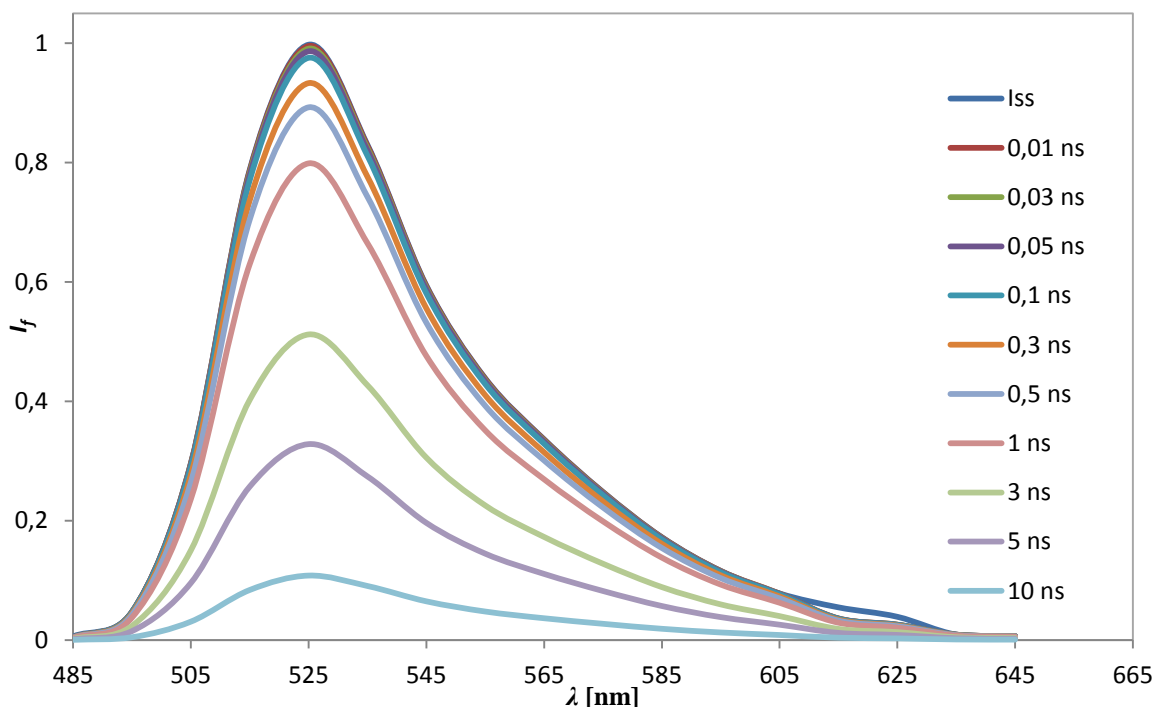
Cieľom tohto experimentu bolo zistiť zmenu správania fluorescenčnej sondy OG488 v géle, ktorý bol pripravený rovnakým spôsobom ako čerstvý gél, ale po príprave bol nechaný na jeden mesiac v tme pri laboratórnej teplote.

Pomocou ustálenej fluorescence bolo zistené emisné spektrum ustáleného gélu. Vzorka bola excitovaná pri 455 nm a bolo namerané maximum emisie. Emisný rozsah spektra bol skúmaný od 465 do 700 nm.



Obrázok 21: Normalizované emisné a excitačné spektrá OG488 s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$ v gélu

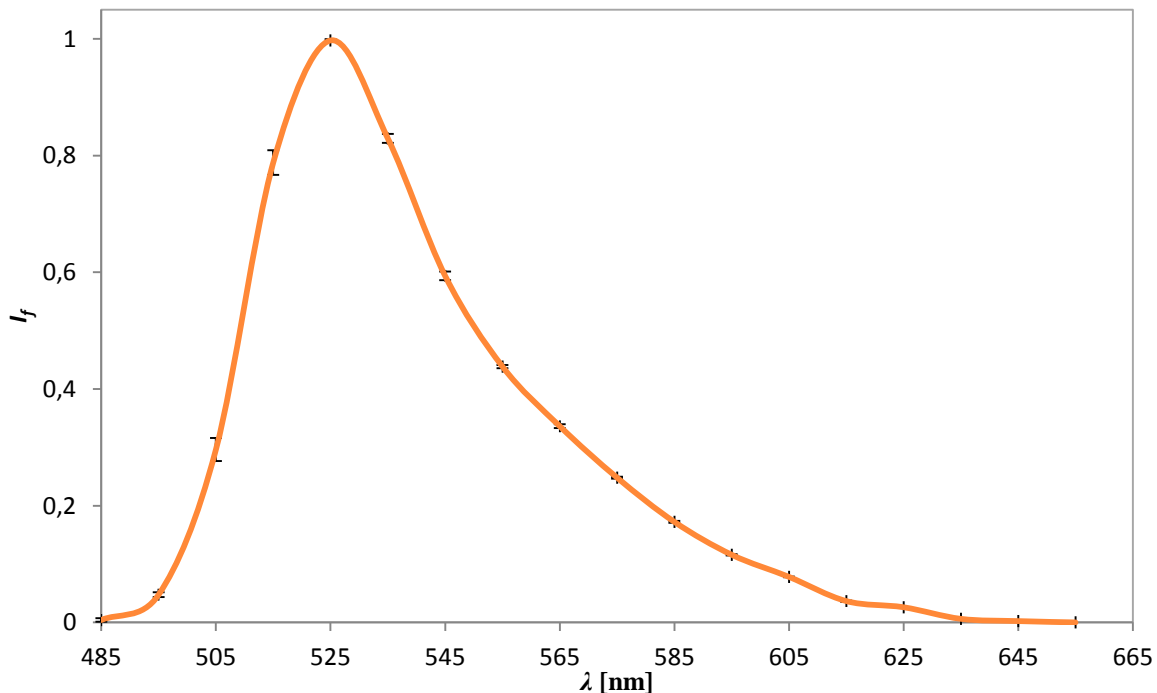
Získané emisné spektrum je veľmi podobné predchádzajúcim prípadom, spektrum má jedno maximum v bode 525 nm. Pomocou nameraného emisného spektra ďalej bola rekonštruovaná TRES.



Obrázok 22: TRES - OG488 v stálom géle s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$

TRES potvrdila, že fluorescenčná sonda má v spektre jeden pík v bode 525 nm, ktorý sa objavuje v každom čase po excitácii žiarením. Emisné maximum sa po čase neposúvalo,

z čoho môžeme odvodiť, že ani po čase nevznikla žiadna interakcia medzi sondou a gélom. Je nutné dodať, že roztoky hydrogéllov boli namerané s krokom 10 nm.



Obrázok 23: Dekonvolúcia emisného spektra OG488 v ustálenom géle s koncentráciou $8 \cdot 10^{-6} M$

Dekonvolúciou emisného spektra fluorescenčnej sondy boli získané veľmi podobné výsledky ako v micelárnom roztoku s rovnakou koncentráciou sondy. Bol zistený jeden emisný druh OG488. Odraz lampy sa tiež prejavovalo v ustálenom géle, rovnako ako v čerstvom. Je potrebné dodať, že intenzita fluorescencie pri dlhších vlnových dĺžkach od 635 do 665 nm bola nadmerne malá a v niektorých prípadoch sa nedal namerať pokles intenzity.

Dekonvolúcia potvrdila, že Oregon Green 488 v ustálenom géle má stále jednu dobu života, ktorá sa prejavuje v intervale 4,–4,6 ns, ako v predchádzajúcom prípade. V súhrne môžeme zriadiť, že neprebíhala žiadna zmena v roztoku. Nevytvorili sa diméry sondy, neuskutočnila sa interakcia medzi gélom a fluorescenčnou sondou a nedochádzalo k interakcii sondy s hyaluronanom.

ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo preskúmať a charakterizovať správanie hydrofilnej fluorescenčnej sondy Oregon Green 488 v prostredí hydrogéllov. Oregon Green 488 je relatívne nová fluorescenčná sonda a je derivátom fluoresceínu. Tento fluorofór je využívaný najmä v biochemických oblastiach, ako napríklad neuroveda, analýza DNA, proteínov, nukleových kyselín a podobne. Oregon Green 488 je rezistentnejší proti fotodegradácii, má stabilné absorpčné a fluorescenčné vlastnosti vo fyziologickom pH rozmedzí. Síce Oregon Green 488 je často používaná sonda v biochemickom výskume, avšak o jeho správaní v prostredí hydrogéllov odborná literatúra neposkytuje dostačujúce informácie.

Aby sa dalo charakterizovať správanie tejto sondy, bolo potrebné nájsť vhodnú metodiku, ktorá je dostatočne presná a citlivá. Fluorescenčná spektroskopia poskytuje relatívne spoľahlivé výsledky a je dosť citlivou metódou, pomocou ktorej sa dajú získať informácie o fluorescenčom parametre daného fluorofóru.

Na začiatku merania bolo potrebné zistiť, pri akých vlnových dĺžkach emituje Oregon Green 488, inými slovami, určiť jeho emisné spektrum po excitácii pri 455 nm. Ďalej bolo nutné stanoviť optimálnu koncentráciu sondy, pri ktorej je intenzita fluorescencie dostačujúca a netvorí sa žiadne agregáty sondy. Ako prvý bol skúmaný vodný roztok OG488. Pomocou získaných dát sa dalo lepšie interpretovať ďalšie výsledky obdržané v micelárnom roztoku a v géle. Pomocou metódy TCSPC boli namerané emisné spektrá fluorescenčnej sondy, vo vodnom a v micelárnom roztoku s krokom 5 nm, v géle s krokom 10 nm. Vo vodnom roztoku sonda vykazovala jednu dobu života, ale je nutné dodať, že pri dlhších vlnových dĺžkach bol detegovaný druhý emisný druh sondy. V roztoku mohlo dôjsť k zhášaniu sondy, alebo k vzniku druhej prototropnej formy sondy [34]. Tento emisný druh sa nebral do úvahy a ďalej sa s ním nepracovalo. Oregon Green má vo vodnom roztoku dobu života 3,8–4,06 ns, jeho emisné maximum sa nachádza v bode 515 nm a TRES má identický tvar vo všetkých časoch, ktoré boli určené ľubovoľne od 0,01 ns do 10 ns. Vodný roztok je málo viskóznym, nedali sa zaznamenať relaxačné prejavy. Oregon Green 488 v micelárnom roztoku vykazoval tiež jednu dobu života, ktorá bola stanovená na 4,3–4,7 ns, jeho emisné maximum sa posunulo batochromne o 10 nm, nachádzal v bode 525 nm. Podľa nameraných údajov sa dá dospieť k záveru, že fluorescenčná sonda nachádzala v blízkosti polárnych hláv miciel. Dianióvaná forma sondy sa priblížila ku kladne nabitým hlavám tenzidov kvôli elektrostatickým interakciám. Správanie sondy môžeme charakterizovať ako ustálené a stabilné, nedochádzalo k reakcii sondy v roztoku. Sonda v čerstvom géle vykazovala takisto jednu dobu života v rozmedzí 4,1–4,45 ns. Emisné maximum fluorescenčnej sondy bolo identické ako v micelárnom roztoku, 525 nm, TRES nevykazoval žiadne zmeny v rôznych časoch. Na začiatku emisného spektra pri 485–505 nm bol prítomný odraz lampy, čo generoval tzv. nepravý emisný druh sondy. S týmto emisným druhom sa ďalej nepracovalo. Fluorofór vykazoval tiež jednu dobu života v ustálenom géle, táto doba života bola takmer identická s predošlým prípadom: 4,1 až 4,6 ns. Emisné maximum sa neposúvalo (525 nm), z čoho môžeme odvodiť, že medzi sondou a gélom neprebíha interakcia. V roztoku neboli prítomné diméry a nedochádzalo k interakcii medzi sondou a hyaluronanom.

V súhrne, Oregon Green 488 sa v prostredí hydrogélov správal ustálene, bol nájdený jeden emisný druh a maximum emisie nachádzal v bode 525 nm. Sonda sa chová stabilne v roztoku, nezmení svoje fotofyzikálne vlastnosti, nedochádza k reakcii medzi sondou a gélom. Pravdepodobne nedochádza ani k interakcii medzi sondou a hyaluronanom. Fluorofór nachádzal v prostredie gélu blízko k polárnym hlavám tenzidov, kde polarita bola zvýšená. Táto zvýšená polarita v roztoku tiež môže spôsobiť intramolekulárny prenos náboja. Pomocou získaných informáciách sa dá odvodiť, že Oregon Green 488 je použiteľná sonda vo výskume hydrogélom len v prípade, keď cieľom analýzy nie je prostredie vnútri micel pretože táto fluorescenčná sonda nebola gélom solubilizovaná, a teda neposkytuje dostatočné informácie o prostredí vo vnútri hydrogélom. Teoreticky, tento fluorofór by bol vhodný pri analýze charakterizácii povrchu micel, v blízkosti molekúl vody. Na charakterizáciu nosičov liečiv, ktoré sú umiestené vnútri micel, by sa dalo používať túto sondu len v prípade prítomnosti reverzných micel, ktoré vznikajú v nepolárnom prostredí.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] HOFFMAN, Allan S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, vol. 64, č. 43, s. 18-23. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002700>
- [2] LIM, F a A. SUN. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980-11-21, vol. 210, issue 4472, s. 908-910. DOI: 10.1126/science.6776628. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.6776628>
- [3] QIU, Yong a Kinam PARK. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, vol. 64, č. 53, s. 49-60. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002840>
- [4] BUENGER, Daniel, Fuat TOPUZ a Juergen GROLL. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*. 2012, vol. 37, issue 12, s. 1678-1719. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001200086X>
- [5] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [6] VÁMOSI, György. *Luminiscencia* [online]. Pécs, 2006 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.zipernowsky.hu/~nasztlaci/alapok+hardver/fluoreszcenia_hu.pdf. Přednáška. Ziperowsky Károly MSZ.
- [7] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.
- [8] BERNARD VALEUR, Mário Nuno Berberan-Santos. Molecular fluorescence: principles and applications. 2nd ed. Weinheim [Germany]: Wiley-VCH, 2012. ISBN 978-352-7328-376.
- [9] Elumalai, P., Atkins, P., de Paula, J. Atkins' Physical Chemistry, Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-879285-9

- [10] BERGOU, János, János EROSTYÁK, László KOZMA a Ferenc PINTÉR. *Általános Fizika III.: Fénytan - Relativitáselmélet - Atomhéjfizika*. Pécs: Dialóg-Campus Kiadó, 2004. ISBN 9639542008.
- [11] ORTE, Angel, Eva M. TALAVERA, António L. MAÇANITA, Juan Carlos ORTE a Jose M. ALVAREZ-PEZ. Three-State 2',7'-Difluorofluorescein Excited-State Proton Transfer Reactions in Moderately Acidic and Very Acidic Media. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005, vol. 109, issue 39, s. 8705-8718. DOI: 10.1021/jp051264g.
- [12] ORTE, Angel, Ruperto BERMEJO, Eva M. TALAVERA, Luis CROVETTO a Jose M. ALVAREZ-PEZ. 2',7'-Difluorofluorescein Excited-State Proton Reactions: Correlation between Time-Resolved Emission and Steady-State Fluorescence Intensity. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005, vol. 109, issue 12, s. 2840-2846. DOI: 10.1021/jp044681m.
- [13] GALBÁCS, Zoltán, Gábor GALBÁCS a Pál SIPOS. *Műszeres analitikai kémiai laboratóriumi gyakorlatok*. Szeged: JATEPress, 2008. ISBN 3159780000537
- [14] ISS: focus and discover. TERPETSCHNIG, Ewald a David M. JAMESON. ISS. Fluorescence Lifetime (FLT) [online]. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://www.iss.com/resources/research/technical_notes/K2CH_FLT.html
- [15] CHANG, Ching-Wei, Dhruv SUD a Mary-Ann MYCEK. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Digital Microscopy*. 2007, č. 3, s. 495-524. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)81024-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X06810241>
- [16] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [17] *Handbook of cosmetic science and technology*. Editor André O Barel, Marc Paye. New York: Marcel Dekker, 2001, 886 s. ISBN 08-247-0292-1.

- [18] KLADEKOVÁ, Daniela. *Vybrané kapitoly z koloidnej chémie* [online]. 2011 [cit. 2015-03-31]. ISBN 978-80-7097-885-6. Dostupné z: <http://www.upjs.sk/pracoviska/univerzitna-kniznica/e-publikacia/#pf>
- [19] BANYAI, István. *Asszociációs kolloidok* [online]. 2012, Debrecen [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://dragon.unideb.hu/~kolloid/kolloid/orak/kembsc/BScBI_10.pdf. Prednáška. University of Debrecen.
- [20] KVÍTEK L., PANÁČEK A.: *Základy koloidní chemie*. Katedra fyzikální chemie – Univerzita Palackého Olomouc, 2007
- [21] GILÁNYI, Tibor. *KOLLOIDKÉMIA: Nanorendszerek és határfelületek* [online]. Budapest, 2005 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.chem.elte.hu/departments/kolloid/KolloidJegyzet_Ver1.0.pdf. Skriptum. ELTE.
- [22] PEINTLER, Gábor. *Asszociációs kolloidok* [online]. Szeged, 2012 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.staff.u-szeged.hu/~peintler/files/1-Asszociacios_kolloidok_javitott.pdf. Skriptum. University of Szeged.
- [23] ITO, E., K. W. YIP, D. KATZ, S. B. FONSECA, D. W. HEDLEY, S. CHOW, G. W. XU, T. E. WOOD, C. BASTIANUTTO, Potential Use of Cetrimonium Bromide as an Apoptosis-Promoting Anticancer Agent for Head and Neck Cancer. *Molecular Pharmacology*. 2009-10-16, vol. 76, issue 5, s. 969-983. DOI: 10.1124/mol.109.055277. Dostupné z: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.109.055277>
- [24] FENGER, R., E. FERTITTA, H. KIRMSE, A. F. THÜNEMANN a K. RADEMANN. Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012, vol. 14, issue 26, s. 9343-. DOI: 10.1039/c2cp40792b. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cp40792b>
- [25] KAKEHI, Kazuaki, Mitsuhiro KINOSHITA a Shin-ichi YASUEDA. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*. 2003, vol. 797, 1-2, s. 347-355. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00479-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203004793>

- [26] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 92, issue 2, s. 1262-1279. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712010478>
- [27] PRICE, Richard D., M.G. BERRY a Harshad A. NAVSARIA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive*. 2007, vol. 60, issue 10, s. 1110-1119. DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681507001805>
- [28] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Gunnar. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10. DOI: 10.1021/j100373a075
- [29] THALBERG, Kyrre. a Bjoern. LINDMAN. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*. 1991, vol. 7, issue 2, s. 277–283. DOI: 10.1021/la00050a013.
- [30] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Gunnar. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10. DOI: 10.1021/j100373a075.
- [31] BJOERLING, Mikael, Asa HERSLOEF-BJOERLING a STILBS. An NMR self diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*. 1995, vol. 28, issue 20, s. 6970-6975. DOI: 10.1021/ma00124a038.
- [32] CSETNEKI, Ildikó. *Kolloid polimer gélek szerkezetének és tulajdonságainak kapcsolata* [online]. Budapest, 2006 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernoki_Kar/2006/Csetneki_Ildiko_ertekezes.pdf. Dizertačné práce. BMU.
- [33] RUSINOVA, Elena, Vira TRETACHENKO-LADOKHINA, Oana E. VELE, Donald F. SENEAR a J.B. Alexander ROSS. *Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein–protein and protein–nucleic acid interactions*. *Analytical Biochemistry*. 2002, vol. 308, issue 1, s. 18-25. DOI: 10.1016/s0003-2697(02)00325-1.

- [34] ORTE, Angel, Luis CROVETTO, Eva M. TALAVERA, Noël BOENS a Jose M. ALVAREZ-PEZ. Absorption and Emission Study of 2',7'-Difluorofluorescein and Its Excited-State Buffer-Mediated Proton Exchange Reactions. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005, vol. 109, issue 5, s. 734-747. DOI: 10.1021/jp046786v. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp046786v>
- [35] LEE, Jung Seok. Biodegradable polymersomes for drug delivery circulation kinetics and biodistribution, modulated drug delivery and cellular uptake. Enschede: University of Twente [Host], 2011. ISBN 978-903-6531-887.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Zoznam skratiek

| | |
|------------------|--|
| ADC | analog-to-digital convertor (analogovo-digitálny prevodník) |
| CAC | kritická agregačná koncentrácia |
| CFD | constant function discriminator (diskriminátor konštantnej frakcie) |
| CMC | kritická micelárna koncentrácia |
| CTA ⁺ | cetyltrimethylamonium ión |
| CTAB | cetyltrimethylamonium bromid |
| Da | dalton, atómová hmotnostná jednotka |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| ESPT | excited-state proton transfer (prenos protónu v excitovanom čase) |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer (fluorescenčný rezonančný prenos energie) |
| Hy | hyaluronan |
| LED | light-emitting diode (dióda emitujúca žiarenie) |
| LN ₂ | liquid nitrogen (kvapalný dusík) |
| M | mól, látkové množstvo |
| NRDS | neonatal respiratory distress syndrome (syndróm dychovej tiesne novorodenca) |
| OG488 | Oregon Green 488 |
| PAL | povrchovo aktívne látky (tenzidy) |
| PGA | programmable gain amplifier (programovateľný zosilňovač) |
| PMT | photomultiplier (fotonásobič) |
| TAC | time-to-amplitude convertor (prevodník času na amplitúdu) |
| TCSPC | time-correlated single photon counting (časovo korelované čítanie fotónov) |
| TRES | time-resolved emission spectra (časovo rozlíšené emisné spektrá) |

Zoznam symbolov

| | |
|--|---|
| α | pred-exponenciálny faktor |
| C | koncentrácia analyzovanej látky |
| ε | molárny absorpčný koeficient |
| Γ | rýchlostná konštanta emisie |
| λ | vlnová dĺžka |
| σ | smerodajná odchýlka |
| τ | doba života |
| $I, I_0, I_t, I_{ss}(\lambda), I'(\lambda, t)$ | intenzita fluorescencie, intenzita ožiarenie monochromatického svetla, intenzita fluorescencie v čase t , intenzita ustálenej |

| | |
|--------------------|---|
| | fluorescencie, normalizovaná intenzita fluorescencie |
| k | konštanta zahrňujúce vlastnosti kyvety a prístroja |
| k_{nr} | rýchlostná konštanta nežiarivých procesov |
| n, p, v | počet nameraných dát, počet parametrov preloženej funkcie, počet stupňu voľnosti |
| n_t | počet excitovaných molekúl fluorofóru v čase t |
| $N(t_k), N_c(t_k)$ | funkcia poklesu intenzity fluorescencie, funkcia preložená poklesom intenzity fluorescencie |
| $H(\lambda)$ | súbor intenzity rozpadu |
| t | čas po excitácii pulzom žiarenia |
| T_k | Krafftov bod |
| χ, χ_R | parameter správnosti preloženia dát, redukovaný parameter správnosti preloženia dát |

6 PRÍLOHY



Príloha 1: Pripravený zásobný roztok Oregon Green 488 vo vode s koncentráciou $3 \cdot 10^{-4}$ M



Príloha 2: Koncentračný rad OG488. Zľava: 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $8 \cdot 10^{-6}$ M, $2 \cdot 10^{-5}$ M